



(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)



1-0026475

(51)⁷ A61K 39/395; G01N 33/569; A61K 39/155; A61K 45/06; C07K 14/00; C07K 14/765; C07K 16/00; C07K 16/08; C07K 16/10; C07K 19/00; C12N 15/09; G01N 33/53; G01N 33/566; A61K 38/16; A61K 39/12 (13) B

-
- (21) 1-2015-03597 (22) 13/03/2014
(86) PCT/US2014/025259 13/03/2014 (87) WO/2014/159822 02/10/2014
(30) 61/782,215 14/03/2013 US; 61/911,093 03/12/2013 US
(45) 25/11/2020 392 (43) 25/02/2016 335A
(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, USA
(72) GURNETT-BANDER, Anne (US); PEREZ-CABALLERO, David (US);
SIVAPALASINGAM, Sumathi (US); DUAN, Xunbao (US); MACDONALD,
Douglas (US).
(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK
CO., LTD.)
-

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG PROTEIN F CỦA VIRUT HỢP BÀO HÔ HẤP CỦA NGƯỜI, DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY VÀ PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC ĐƯỢC PHÂN LẬP MÃ HÓA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể hoàn toàn của người mà liên kết với protein F của virus hợp bào hô hấp, chế phẩm chứa kháng thể này. Các kháng thể theo sáng chế là hữu ích để ngăn ngừa quá trình dung hợp virus với màng tế bào và ngăn ngừa tình trạng lây lan của virus từ tế bào này sang tế bào khác, nhờ đó cung cấp phương tiện phòng ngừa việc lây nhiễm, hoặc điều trị bệnh nhân mắc tình trạng lây nhiễm và làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng hoặc biến chứng đi kèm với tình trạng lây nhiễm virus. Ngoài ra, kháng thể này cũng có thể hữu ích để chẩn đoán tình trạng lây nhiễm bởi RSV (Respiratory Syncytial Virus).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể của người và các đoạn liên kết kháng nguyên của các kháng thể của người mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (respiratory syncytial virus F protein-RSV-F), chế phẩm chứa các kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virus hợp bào hô hấp (respiratory syncytial virus -RSV) là virus ARN mạch đơn có chiều âm, là nguyên nhân hàng đầu gây ra các bệnh lây nhiễm đường hô hấp nghiêm trọng ở trẻ sơ sinh và trẻ em, trong đó tình trạng lây nhiễm khởi phát xuất hiện ở trẻ em từ 6 tuần đến 2 tuổi và không phổ biến ở 4 tuần tuổi đầu tiên trong suốt thời gian xảy ra các bệnh dịch ở bệnh viện (Hall *et al.*, 1979, New Engl. J. Med. 300:393-396). (Feigen *et al.*, eds., 1987, trong tài liệu: Textbook of Pediatric Infectious Diseases, W B Saunders, Philadelphia ở các trang 1653-1675; New Vaccine Development, Establishing Priorities, Vol. 1, 1985, National Academy Press, Washington D.C. ở các trang 397-409; Ruuskanen *et al.*, 1993, Curr. Probl. Pediatr. 23:50-79; Hall *et al.*, 1979, New Engl. J. Med. 300:393-396). Một số nhóm trẻ em nhất định có nguy cơ phát triển tình trạng lây nhiễm RSV và các nhóm này bao gồm trẻ sơ sinh sinh non (Hall *et al.*, 1979, New Engl. J. Med. 300:393-396), trẻ em có dị tật bẩm sinh khí đạo, trẻ em có bệnh loạn sản phế quản-phổi (Groothuis *et al.*, 1988, Pediatrics 82:199-203), trẻ em có bệnh tim bẩm sinh (MacDonald *et al.*, New Engl. J. Med. 307:397-400), và trẻ em có chứng suy giảm miễn dịch bẩm sinh hoặc chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (Ogra *et al.*, 1988, Pediatr. Infect. Dis. J. 7:246-249; và Pohl *et al.*, 1992, J. Infect. Dis. 165:166-169), và xơ nang (Abman *et al.*, 1988, J. Pediatr. 113:826-830).

RSV cũng có thể lây nhiễm cộng đồng người lớn nữa. Trong cộng đồng này, RSV chủ yếu gây ra bệnh đường hô hấp trên, mặc dù các bệnh nhân cao tuổi có thể có nguy cơ cao hơn đối với lây nhiễm nghiêm trọng và viêm phổi (Evans, A. S., eds., 1989, Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control, 3rd ed., Plenum Medical Book,

New York ở các trang 525-544), cũng như người lớn mà bị ức chế miễn dịch, cụ thể là bệnh nhân cấy ghép tủy xương (Hertz *et al.*, 1989, *Medicine* 68:269-281). Các bệnh nhân có nguy cơ khác bao gồm những người mắc bệnh suy tim sung huyết và những người mắc bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (tức là COPD). Cũng đã có các báo cáo về các bệnh dịch trong số các bệnh nhân tại viện dưỡng lão và người lớn trẻ tuổi sống ở cơ sở từ thiện (Falsey, A. R., 1991, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 12:602-608; và Garvie *et al.*, 1980, *Br. Med. J.* 281:1253-1254).

Trong khi các tùy chọn điều trị đối với bệnh RSV đã được xác lập thì hạn chế, thì các dạng bệnh đường hô hấp dưới trầm trọng hơn thường đòi hỏi biện pháp chăm sóc hỗ trợ đáng kể, bao gồm cả phương pháp cho dùng oxy được làm ẩm và biện pháp trợ giúp hô hấp (Fields *et al.*, eds, 1990, *Fields Virology*, 2nd ed., Vol. 1, Raven Press, New York ở các trang 1045-1072).

Ribavirin, đây là thuốc duy nhất được phê duyệt dùng cho việc điều trị tình trạng lây nhiễm, đã thể hiện là hữu hiệu trong việc điều trị viêm phổi và viêm tiểu phế quản gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV, và đã thể hiện cải biến được tiến trình của bệnh RSV trầm trọng ở trẻ em có khả năng miễn dịch bình thường (Smith *et al.*, 1991, *New Engl. J. Med.* 325:24-29). Việc sử dụng ribavirin thì hạn chế do các quan ngại xung quanh nguy cơ tiềm tàng của nó đối với phụ nữ có thai mà có thể tiếp xúc với thuốc được sol khí hóa trong khi họ được điều trị trong môi trường bệnh viện.

Tương tự, trong khi vaccin có thể là hữu ích, nhưng, cho đến nay, vẫn chưa phát triển được một vaccin thương mại nào. Một vài ứng viên vaccin đã bị bỏ và số khác thì đang được phát triển (Murphy *et al.*, 1994, *Virus Res.* 32:13-36). Tình hình phát triển vaccin đã cho thấy là có vấn đề. Cụ thể là, đòi hỏi phải sinh miễn dịch trong giai đoạn sơ sinh tức thì vì tỷ lệ mắc phải đỉnh của bệnh đường hô hấp dưới xảy ra ở thời điểm 2 đến 5 tháng tuổi. Tuy nhiên, đã biết được rằng đáp ứng miễn dịch sơ sinh thì chưa thành thực ở thời điểm đó. Ngoài ra, trẻ sơ sinh vào thời điểm đó vẫn có hiệu giá kháng thể RSV có được từ mẹ cao, điều này có thể làm giảm tính sinh miễn dịch của vaccin (Murphy *et al.*, 1988, *J. Virol.* 62:3907-3910; và Murphy *et al.*, 1991, *Vaccine* 9:185-189).

Hai glycoprotein, đó là F và G, trên bề mặt của RSV đã thể hiện là các đích của các kháng thể trung hòa (Fields *et al.*, 1990, trên đây; và Murphy *et al.*, 1994, trên đây).

Hai protein này cũng chịu trách nhiệm chính về việc nhận biết virus và việc virus xâm nhập vào các tế bào đích; protein G liên kết với thụ thể tế bào đặc hiệu và protein F thúc đẩy quá trình dung hợp virus với tế bào. Protein F cũng được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào bị nhiễm và chịu trách nhiệm về quá trình dung hợp kế tiếp với các tế bào khác dẫn đến hiện tượng tạo hợp bào và hiện tượng lây lan virus từ tế bào này sang tế bào khác.

Hiện nay, phương pháp duy nhất được chấp nhận cho việc phòng bệnh RSV là tạo miễn dịch thụ động. Ví dụ, kháng thể được làm cho giống của người, palivizumab (SYNAGIS®), kháng thể này đặc hiệu với epitop trên protein F, được phê duyệt đối với phương thức dùng thuốc vào trong cơ cho các bệnh nhi để phòng ngừa bệnh đường hô hấp dưới nghiêm trọng do RSV gây ra ở mức liều dùng hằng tháng được đề nghị là 15mg/kg thể trọng suốt mùa RSV (tháng 11 đến tháng 4 ở bán cầu bắc). SYNAGIS® là dạng đa hợp của trình tự kháng thể của người (95%) và trình tự kháng thể chuột (5%). (Johnson *et al.*, (1997), J. Infect. Diseases 176:1215-1224 và U.S. Pat. No. 5,824,307).

Mặc dù SYNAGIS® đã được sử dụng một cách thành công cho việc phòng ngừa tình trạng lây nhiễm RSV ở các bệnh nhi, nhiều liều dùng vào trong cơ là 15mg/kg của SYNAGIS® là cần thiết để thu được tác dụng phòng bệnh. Sự cần thiết phải dùng nhiều liều dùng vào trong cơ của kháng thể đòi hỏi phải đến phòng khám bác sĩ nhiều lần, điều này không chỉ là bất tiện đối với bệnh nhân mà còn có thể gây ra tình trạng bỏ lỡ liều.

Đã có nhiều nỗ lực nhằm cải thiện đặc tính trị liệu của kháng thể kháng RSV-F, và điều này dẫn đến việc nhận diện và phát triển motavizumab, còn được gọi là NUMAX™. Tuy nhiên, thử nghiệm lâm sàng đã cho thấy các bệnh nhân cụ thể được cho dùng motavizumab đã có các phản ứng quá mẫn trầm trọng. Nên đã ngừng việc phát triển tiếp kháng thể kháng RSV-F được làm cho giống của người này.

Các kháng thể khác kháng protein RSV-F đã được mô tả và có thể được tìm thấy trong US6656467; US5824307, US 7786273; US 7670600; US 7083784; US6818216; US7700735; US7553489; US7323172; US7229619; US7425618; US7740851; US7658921; US7704505; US7635568; US6855493; US6565849; US7582297; US7208162; US7700720; US6413771; US5811524; US6537809; US5762905; US7070786; US7364742; US7879329; US7488477; US7867497; US5534411; US6835372; US7482024; US7691603; US8562996; US8568726; US20100015596;

WO2009088159A1. Cho đến nay, không một cơ quan quản lý nào phê duyệt chất bất kỳ ngoài SYNAGIS® để sử dụng trong việc phòng ngừa tình trạng lây nhiễm RSV.

Vì vậy, vẫn còn có nhu cầu về các kháng thể mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên RSV, như RSV-F, kháng thể này có độ hiệu nghiệm cao và kháng thể này không gây ra tác dụng phụ có hại mà sẽ ngăn cản sự phê duyệt cho việc sử dụng trong lâm sàng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng (mAb) đã được phân lập hoàn toàn của người và các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F). Giả định rằng protein F đóng vai trò nhất định trong quá trình dung hợp virus với tế bào và trong quá trình truyền virus từ tế bào này sang tế bào khác, các kháng thể được mô tả trong tài liệu này đem lại phương pháp ức chế quá trình đó và như vậy, có thể được sử dụng để phòng ngừa tình trạng lây nhiễm của bệnh nhân tiếp xúc với, hoặc có nguy cơ mắc phải tình trạng lây nhiễm RSV, hoặc để điều trị và/hoặc giảm bớt một hoặc nhiều triệu chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV ở bệnh nhân tiếp xúc với, hoặc có nguy cơ mắc phải tình trạng lây nhiễm RSV, hoặc mắc tình trạng lây nhiễm RSV. Các kháng thể được mô tả trong tài liệu này cũng có thể được sử dụng để phòng ngừa hoặc để điều trị tình trạng lây nhiễm RSV ở bệnh nhân mà có thể trải qua dạng lây nhiễm RSV trầm trọng hơn do một tình trạng y lý tiềm ẩn hoặc có trước. Bệnh nhân mà có thể được lợi từ phương pháp trị liệu bằng kháng thể theo sáng chế có thể là trẻ sơ sinh sinh non, trẻ sơ sinh đủ tháng sinh ra trong suốt mùa RSV (gần cuối mùa thu (tháng 11) đến đầu mùa xuân (tháng 4)) mà có nguy cơ vì các tình trạng y lý có trước hoặc tiềm ẩn khác bao gồm cả bệnh tim bẩm sinh hoặc bệnh phổi mạn tính, trẻ em lớn hơn một tuổi có hoặc không có tình trạng y lý tiềm ẩn, bệnh nhân sống ở cơ sở từ thiện hoặc bệnh nhân nhập viện, hoặc người lớn cao tuổi (> 65 tuổi) có hoặc không có tình trạng y lý tiềm ẩn, như bệnh suy tim sung huyết (congestive heart failure-CHF), hoặc bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD). Bệnh nhân mà có thể được lợi từ liệu pháp này có thể mắc tình trạng y lý là kết quả của tình trạng hệ hô hấp, hệ tim mạch, hệ thần kinh-cơ, hoặc hệ miễn dịch bị suy giảm. Ví dụ, bệnh nhân có thể mắc tình trạng bất thường khí đạo, hoặc suy chức năng khí đạo, bệnh phổi mạn tính, bệnh tim mạn tính

hoặc bệnh tim bẩm sinh, bệnh thần kinh-cơ mà gây hại cho quá trình kiểm soát dịch tiết hô hấp, hoặc bệnh nhân có thể bị ức chế miễn dịch do bệnh suy giảm miễn dịch thể kết hợp trầm trọng hoặc bệnh suy giảm miễn dịch mắc phải trầm trọng, hoặc mắc bệnh truyền nhiễm hoặc tình trạng ung thư tiềm ẩn bất kỳ khác mà gây ra hiện tượng ức chế miễn dịch, hoặc bệnh nhân có thể bị ức chế miễn dịch do phương pháp trị liệu bằng thuốc ức chế miễn dịch (ví dụ, thuốc bất kỳ được sử dụng để điều trị bệnh nhân được cấy ghép) hoặc liệu pháp phóng xạ. Bệnh nhân mà có thể được lợi từ các kháng thể theo sáng chế có thể là bệnh nhân mà mắc bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), xơ nang (CF), loạn sản phế quản-phổi, bệnh suy tim sung huyết (CHF), hoặc bệnh tim bẩm sinh.

Vì các kháng thể theo sáng chế thì hữu hiệu hơn trong việc trung hòa RSV so với các kháng thể đã biết, nên có thể sử dụng liều lượng kháng thể hoặc đoạn kháng thể thấp hơn để thu được mức bảo vệ cao hơn đối với tình trạng lây nhiễm RSV, và phương pháp trị liệu và/hoặc giảm bớt các triệu chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV hữu hiệu hơn. Do vậy, việc sử dụng liều lượng của các kháng thể hoặc các đoạn của chúng mà liên kết đặc hiệu miễn dịch với kháng nguyên RSV-F thấp hơn có thể gây ra ít phản ứng có hại hơn hoặc phản ứng có hại đỡ trầm trọng hơn. Cũng vậy, việc sử dụng các kháng thể trung hòa hữu hiệu hơn có thể làm giảm nhu cầu về việc cho dùng thường xuyên các kháng thể hoặc các đoạn kháng thể so với mức được dự liệu trước đó là cần thiết cho việc phòng ngừa lây nhiễm, hoặc cho việc trung hòa virus, hoặc cho việc điều trị hoặc giảm bớt một hoặc nhiều triệu chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV. Các triệu chứng của tình trạng lây nhiễm RSV có thể bao gồm màu da hơi xanh do thiếu oxy (chứng giảm oxy-huyết), khó thở (thở gấp hoặc thở hụt hơi), ho, ho do viêm thanh-khí-phế quản (ho như “hải cầu sứa”), sốt, cánh mũi phập phồng, nghẹt mũi (tịt mũi), chứng ngưng thở, chán ăn, mất nước, kén ăn, trạng thái tâm thần bị thay đổi, hoặc thở khò khè.

Các kháng thể này có thể hữu ích khi được cho dùng với mục đích phòng bệnh (trước khi tiếp xúc với virus và lây nhiễm virus) để giảm bớt tính trầm trọng, hoặc khoảng thời gian lây nhiễm sơ cấp với RSV, hoặc giảm bớt ít nhất một triệu chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm này. Các kháng thể này có thể được sử dụng một mình hoặc cùng với một chất thứ hai hữu ích đối với việc điều trị tình trạng lây nhiễm RSV. Theo các phương án cụ thể, có thể cho dùng các kháng thể này với mục đích trị liệu (sau

khi tiếp xúc với virus và lây nhiễm virus) hoặc một mình, hoặc cùng với một chất thứ hai để giảm bớt mức độ trầm trọng hoặc khoảng thời gian lây nhiễm sơ cấp, hoặc để giảm bớt ít nhất một triệu chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm này. Theo các phương án cụ thể, các kháng thể có thể được sử dụng với mục đích phòng bệnh trong vai trò là liệu pháp độc lập để bảo vệ bệnh nhân có nguy cơ mắc tình trạng lây nhiễm RSV, như các bệnh nhân được mô tả trên đây. Bệnh nhân bất kỳ trong số các cộng đồng bệnh nhân này có thể được lợi từ phương pháp trị liệu bằng các kháng thể theo sáng chế, khi được cho dùng một mình hoặc cùng với một chất thứ hai, bao gồm cả, ví dụ, liệu pháp kháng virus, như ribavirin, hoặc vacxin kháng virus khác.

Các kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể có độ dài đầy đủ (ví dụ, kháng thể IgG1 hoặc IgG4) hoặc có thể chỉ là phần liên kết kháng nguyên (ví dụ, đoạn Fab, đoạn F(ab')₂ hoặc đoạn scFv), và có thể được cải biến để tác động đến tính năng, ví dụ, để loại bỏ các chức năng kích động dư (Reddy *et al.*, (2000), J. Immunol. 164:1925-1933).

Do vậy, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F).

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), trong đó kháng thể này có một hoặc nhiều đặc điểm dưới đây:

- (a) là kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người;
- (b) tương tác với trình tự axit amin chứa các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 161 đến vị trí 188 của SEQ ID NO: 354;
- (c) tương tác với hoặc serin ở vị trí 173 của SEQ ID NO: 354, hoặc threonin ở vị trí 174 của SEQ ID NO: 354, hoặc cả serin ở vị trí 173 của SEQ ID NO: 354 và threonin ở vị trí 174 của SEQ ID NO: 354;
- (d) có khả năng trung hòa chủng phân nhóm A và phân nhóm B của virus hợp bào hô hấp *in vitro*;
- (e) thể hiện khả năng làm giảm một cách đáng kể tổng lượng virus ở mũi và/hoặc

ở phổi *in vivo* ở mô hình động vật của tình trạng lây nhiễm RSV; hoặc
(f) ức chế quá trình dung hợp virus với tế bào.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), trong đó kháng thể này tương tác với trình tự axit amin chứa các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 161 đến vị trí 188 của SEQ ID NO: 354.

Theo một phương án, kháng thể này là kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó tương tác với trình tự axit amin chứa các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 161 đến vị trí 188 của SEQ ID NO: 354, và trong đó kháng thể này trung hòa chủng phân nhóm A và/hoặc phân nhóm B của virus hợp bào hô hấp *in vitro* và *in vivo*.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó thể hiện khả năng làm giảm một cách đáng kể tổng lượng virus ở phổi ở mô hình chuột của tình trạng lây nhiễm RSV khi được cho dùng ở mức liều nằm trong khoảng từ 0,05mg/kg đến 0,15mg/kg.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó thể hiện mức giảm hiệu giá virus ở mũi và/hoặc hiệu giá virus ở phổi lớn hơn từ 1 đến 2 lần hàm logarit so với palivizumab ở mô hình chuột bông của tình trạng lây nhiễm RSV khi được cho dùng ở mức liều nằm trong khoảng từ 0,62mg/kg đến 5,0mg/kg.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó thể hiện ED₉₉ là 0,15mg/kg hoặc thấp hơn khi được cho dùng ở mô hình chuột của tình trạng lây nhiễm phân nhóm A của RSV.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó thể hiện ED₉₉ là 0,62mg/kg hoặc thấp hơn khi được cho dùng ở mô hình chuột bông của tình trạng lây nhiễm phân nhóm A của RSV.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó thể hiện ED₉₉ là 2,5mg/kg hoặc thấp hơn khi được cho dùng ở mô hình chuột bông của tình trạng lây nhiễm phân nhóm B của RSV.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), thể hiện ED₉₉ thấp hơn 2 đến 3 lần so với ED₉₉ của palivizumab hoặc motavizumab.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), thể hiện nồng độ ức chế một nửa mức tối đa (IC₅₀) là 2pM đến 600pM trong thử nghiệm trung hòa vi lượng đặc hiệu với chủng RSV phân nhóm A của RSV.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), thể hiện nồng độ ức chế một nửa mức tối đa (IC₅₀) là từ 6pM đến 100pM trong thử nghiệm trung hòa vi lượng đặc hiệu với chủng RSV phân nhóm B của RSV.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein RSV-F thể hiện độ hiệu nghiệm trung hòa đối với một hoặc nhiều chủng phòng thí nghiệm phân nhóm A của RSV mà có mức cải thiện từ 15 đến 17 lần so với palivizumab, hoặc thể hiện độ hiệu nghiệm trung hòa đối với một hoặc nhiều chủng lâm sàng phân nhóm A của RSV mà có mức cải thiện từ 10 đến 22 lần so với palivizumab.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), thể hiện độ

hiệu nghiệm trung hòa đối với một hoặc nhiều chủng phòng thí nghiệm phân nhóm B của RSV mà có mức cải thiện từ 2 đến 5 lần so với palivizumab.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), thể hiện độ hiệu nghiệm trung hòa đối với một hoặc nhiều chủng phòng thí nghiệm phân nhóm A hoặc chủng lâm sàng phân nhóm A của RSV mà có mức cải thiện từ 0,5 đến 2 lần so với AM-22.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), thể hiện độ hiệu nghiệm trung hòa đối với một hoặc nhiều chủng phòng thí nghiệm phân nhóm B của RSV mà có mức cải thiện từ 2,5 đến 17 lần so với AM-22.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), thể hiện K_D nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{-7}M$ đến $6 \times 10^{-10}M$, như được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), thể hiện K_D nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{-7}M$ đến $9 \times 10^{-9}M$, như được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), chứa ba CDR chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) nằm trong trình tự axit amin của HCVR được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322 và 338; và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) nằm trong trình tự axit amin của LCVR được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO : 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330 và 346.

Các phương pháp và các kỹ thuật dùng để nhận diện các CDR trong trình tự axit amin của HCVR và trình tự axit amin của LCVR thì đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật

này và có thể được sử dụng để nhận diện các CDR trong trình tự axit amin của HCVR và/hoặc trình tự axit amin của LCVR đã được chỉ ra được bộc lộ trong tài liệu này. Các quy ước tiêu biểu mà có thể được sử dụng để nhận diện ranh giới của các CDR bao gồm, ví dụ, định nghĩa Kabat, định nghĩa Chothia và định nghĩa AbM. Nhìn chung, định nghĩa Kabat là trên cơ sở mức biến đổi trình tự, định nghĩa Chothia là trên cơ sở vị trí của vùng vòng cấu trúc, và định nghĩa AbM là dạng chiết trung giữa phương pháp Kabat và phương pháp Chothia. Ví dụ, xem tài liệu: Kabat, "Sequences of protein of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, (1997), *J. Mol. Biol.* 273:927-948; và Martin *et al.*, (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272. Cơ sở dữ liệu công cộng cũng sẵn có để nhận diện các trình tự CDR trong kháng thể.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322 và 338.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330 và 346.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322 và 338; và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO : 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330 và 346.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-

F), chứa trình tự axit amin chuỗi nặng có SEQ ID NO: 363 và trình tự axit amin chuỗi nhẹ có SEQ ID NO: 364.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), chứa cặp trình tự axit amin của HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330 và 338/346.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), chứa cặp trình tự axit amin của HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 274/282 và 338/346.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), bao gồm:

(a) miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, và 344; và

(b) miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336 và 352.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), còn bao gồm:

(c) miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324 và 340;

(d) miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326 và 342;

(e) miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332 và 348; và

(f) miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334 và 350.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F) bao gồm:

(a) miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324 và 340;

(b) miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326 và 342;

(c) miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, và 344;

(d) miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332 và 348;

(e) miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334 và 350; và

(f) miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336 và 352.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F) bao gồm:

- (a) miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 276 và 340;
- (b) miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 278 và 342;
- (c) miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 280 và 344;
- (d) miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 284 và 348;
- (e) miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 286 và 350; và
- (f) miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 288 và 352.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với RSV-F chứa các trình tự axit amin của HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt của các SEQ ID NO: 276, 278 và 280 và các trình tự axit amin của LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt của các SEQ ID NO: 284, 286 và 288.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với RSV-F chứa các trình tự axit amin của HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt của các SEQ ID NO: 340, 342 và 344 và các trình tự axit amin của LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt của các SEQ ID NO: 348, 350 và 352.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F) cạnh tranh với kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên chứa cặp trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202,

210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330 và 338/346 để liên kết đặc hiệu với RSV-F.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, phần này chứa cặp trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330 và 338/346, và phần này liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), không cạnh tranh với palivizumab, motavizumab, hoặc AM-22 để liên kết đặc hiệu với RSV-F.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F) liên kết với cùng một epitop trên RSV-F mà được nhận biết bởi kháng thể chứa cặp trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330 và 338/346.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, phần này chứa cặp trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330 và 338/346, và phần này liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), không liên kết cùng một epitop trên RSV-F với palivizumab hoặc motavizumab.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với RSV-F, trong đó kháng thể này hoặc đoạn của nó thể hiện một hoặc nhiều đặc điểm dưới đây: (i) chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322 và 338, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (ii) chứa LCVR có trình tự axit amin được

chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330 và 346, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (iii) chứa miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, và 344, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336 và 352, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (iv) chứa miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324 và 340, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (v) miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326 và 342, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (vi) miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332 và 348, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (vii) và miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334 và 350, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (viii) thể hiện K_D nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{-7}M$ đến $6 \times 10^{-10}M$ như được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt; (ix) có khả năng trung hòa chủng phân nhóm A và/hoặc phân nhóm B của virus hợp bào hô hấp *in vitro*; (x) thể hiện khả năng làm giảm một cách đáng kể tổng lượng virus ở mô hình chuột của tình trạng lây nhiễm RSV khi được cho dùng ở mức liều nằm trong khoảng từ 0,05mg/kg đến 0,15mg/kg; (xi) thể hiện mức giảm hiệu giá virus ở mũi và/hoặc hiệu giá

virut ở phổi ở mô hình chuột bông của tình trạng lây nhiễm RSV ở mức liều nằm trong khoảng từ 0,62mg/kg đến 5,0mg/kg lớn hơn từ 1 đến 2 lần hàm logarit so với palivizumab; (xii) thể hiện liều lượng hữu hiệu 99 (ED_{99}) nằm trong khoảng từ 0,15mg/kg đến 2,5mg/kg khi được cho dùng ở mô hình động vật của tình trạng lây nhiễm RSV (ví dụ, mô hình chuột nhắt hoặc mô hình chuột bông); hoặc (xiii) thể hiện nồng độ ức chế một nửa mức tối đa (IC_{50}) là từ 2pM đến 15pM trong thử nghiệm trung hòa vi lượng đặc hiệu với chủng RSV phân nhóm A của RSV và nồng độ ức chế một nửa mức tối đa (IC_{50}) là từ 6pM đến 100pM trong thử nghiệm trung hòa vi lượng.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với RSV-F, trong đó kháng thể này hoặc đoạn của nó thể hiện một hoặc nhiều đặc điểm dưới đây: (i) chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322 và 338, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (ii) chứa LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330 và 346, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (iii) chứa miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, và 344, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336 và 352, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (iv) chứa miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324 và 340, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (v) miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230,

246, 262, 278, 294, 310, 326 và 342, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (vi) miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332 và 348, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (vii) và miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334 và 350, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (viii) thể hiện K_D nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{-7}M$ đến $6 \times 10^{-10}M$; (ix) có khả năng trung hòa chủng phân nhóm A và/hoặc phân nhóm B của virus hợp bào hô hấp *in vitro*; (x) thể hiện khả năng làm giảm một cách đáng kể tổng lượng virus ở mô hình động vật của tình trạng lây nhiễm RSV (ví dụ, mô hình chuột nhắt) khi được cho dùng ở mức liều nằm trong khoảng từ 0,05mg/kg đến 0,15mg/kg; (xi) thể hiện mức giảm hiệu giá virus ở mũi và/hoặc hiệu giá virus ở phổi ở mô hình động vật của tình trạng lây nhiễm RSV (ví dụ, mô hình chuột bông) ở mức liều nằm trong khoảng từ 0,62mg/kg đến 5,0mg/kg lớn hơn từ 1 đến 2 lần hàm logarit so với palivizumab; (xii) thể hiện liều lượng hữu hiệu 99 (ED_{99}) nằm trong khoảng từ 0,05mg/kg đến 2,5mg/kg khi được cho dùng ở mô hình động vật của tình trạng lây nhiễm RSV (ví dụ, mô hình chuột nhắt hoặc mô hình chuột bông); (xiii) thể hiện ED_{99} thấp hơn 2 đến 3 lần so với ED_{99} của palivizumab hoặc motavizumab; (xiv) thể hiện độ hiệu nghiệm trung hòa đối với một hoặc nhiều chủng phòng thí nghiệm phân nhóm A của RSV mà có mức cải thiện từ 15 đến 17 lần so với palivizumab, hoặc thể hiện độ hiệu nghiệm trung hòa đối với một hoặc nhiều chủng lâm sàng phân nhóm A của RSV mà có mức cải thiện từ 10 đến 22 lần so với palivizumab; (xv) thể hiện độ hiệu nghiệm trung hòa đối với một hoặc nhiều chủng phòng thí nghiệm phân nhóm B của RSV mà có mức cải thiện từ 2 đến 5 lần so với palivizumab; (xvi) thể hiện độ hiệu nghiệm trung hòa đối với một hoặc nhiều chủng phòng thí nghiệm phân nhóm A hoặc chủng lâm sàng phân nhóm A của RSV mà có mức cải thiện từ 0,5 đến 2 lần so với AM-22; (xvii) thể hiện độ hiệu nghiệm trung hòa đối với một hoặc nhiều chủng phòng thí nghiệm phân nhóm B của RSV mà có mức cải thiện từ 2,5 đến 17 lần so với AM-22.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với RSV-F, trong đó kháng thể này hoặc đoạn của nó thể hiện một hoặc nhiều đặc điểm dưới đây: (i) chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322 và 338, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (ii) chứa LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330 và 346, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (iii) chứa miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, và 344, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336 và 352, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (iv) chứa miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324 và 340, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (v) miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326 và 342, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (vi) miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332 và 348, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (vii) và miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334 và 350, hoặc một trình

tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (viii) thể hiện K_D nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{-7}M$ đến $6 \times 10^{-10}M$; (ix) có khả năng trung hòa chủng phân nhóm A và/hoặc phân nhóm B của virus hợp bào hô hấp *in vitro*; (x) thể hiện khả năng làm giảm một cách đáng kể tổng lượng virus ở động vật có vú có tình trạng lây nhiễm RSV; (xi) tương tác với trình tự axit amin chứa các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 161 đến vị trí 188 của SEQ ID NO: 354; (xii) tương tác với hoặc serin ở vị trí 173 của SEQ ID O: 354, hoặc threonin ở vị trí 174 của SEQ ID NO: 354, hoặc cả serin ở vị trí 173 của SEQ ID O: 354, và threonin ở vị trí 174 của SEQ ID NO: 354; (xiii) ức chế quá trình dung hợp RSV với tế bào chủ; (xiv) không cạnh tranh chéo với palivizumab hoặc AM-22 để liên kết với RSV-F.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập của người mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó tương tác với trình tự axit amin chứa các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 161 đến vị trí 188 của SEQ ID NO: 354.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập của người mà liên kết đặc hiệu với RSV-F, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó tương tác với ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 355 và 356.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập của người mà liên kết đặc hiệu với RSV-F, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó tương tác với ít nhất một gốc axit amin trong các gốc 161 đến 188 của SEQ ID NO: 354.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập của người mà liên kết đặc hiệu với RSV-F, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó tương tác với ít nhất một gốc axit amin trong SEQ ID NO: 355 hoặc SEQ ID NO: 356.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập của người mà liên kết đặc hiệu với RSV-F, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó tương tác với hoặc serin ở vị

trí 173 của SEQ ID NO: 354, hoặc threonin ở vị trí 174 của SEQ ID NO: 354, hoặc cả serin ở vị trí 173 của SEQ ID NO: 354 và threonin ở vị trí 174 của SEQ ID NO: 354.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó tương tác với trình tự axit amin chứa các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 161 đến vị trí 188 của SEQ ID NO: 354, và trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó chứa ba CDR chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) nằm trong trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) của SEQ ID NO: 274; và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) nằm trong trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) của SEQ ID NO: 282.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (RSV-F), trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

- (a) miền HCDR1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 276;
- (b) miền HCDR2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 278;
- (c) miền HCDR3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 280;
- (d) miền LCDR1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 284;
- (e) miền LCDR2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 286; và
- (f) miền LCDR3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 288.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập của người, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết đặc hiệu với RSV-F, trong đó kháng thể này chứa ba HCDR nằm trong trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) của SEQ ID NO: 274; và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) nằm trong trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) của SEQ ID NO: 282 và trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó tương tác với ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 355 và 356.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập của người, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết đặc hiệu với RSV-F, trong

đó kháng thể này chứa ba HCDR nằm trong trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) của SEQ ID NO: 274; và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) nằm trong trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) của SEQ ID NO: 282 và trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó tương tác với ít nhất một gốc axit amin trong các gốc 161 đến 188 của SEQ ID NO: 354.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập của người, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết đặc hiệu với RSV-F, trong đó kháng thể này chứa ba HCDR nằm trong trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) của SEQ ID NO: 274; và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) nằm trong trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) của SEQ ID NO: 282 và trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó tương tác với ít nhất một gốc axit amin trong SEQ ID NO: 355 hoặc SEQ ID NO: 356.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập của người, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết đặc hiệu với RSV-F, trong đó kháng thể này chứa ba HCDR nằm trong trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) của SEQ ID NO: 274; và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) nằm trong trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) của SEQ ID NO: 282, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó tương tác với hoặc serin ở vị trí 173 của SEQ ID NO: 354, hoặc threonin ở vị trí 174 của SEQ ID NO: 354, hoặc cả serin ở vị trí 173 của SEQ ID NO: 354 và threonin ở vị trí 174 của SEQ ID NO: 354.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập của người, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà không cạnh tranh chéo với palivizumab hoặc motavizumab để liên kết với RSV-F.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập của người, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà không cạnh tranh chéo với AM-22 để liên kết với RSV-F.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập của người, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà không liên kết cùng một epitop trên RSV-F với palivizumab.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập của người, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà không liên kết cùng một epitop trên RSV-F với motavizumab.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập của người, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà không liên kết với epitop trên RSV-F nằm trong khoảng từ gốc axit amin 255 đến gốc axit amin 276 của SEQ ID NO: 354.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được phân lập của người, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng không liên kết vào cùng một epitop trên RSV-F với palivizumab, trong đó epitop nằm trong khoảng từ gốc axit amin 255 đến gốc axit amin 276 của SEQ ID NO: 354.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến các phân tử axit nucleic mã hóa các kháng thể hoặc các đoạn của chúng mà liên kết đặc hiệu với RSV-F. Các vectơ biểu hiện tái tổ hợp mang axit nucleic theo sáng chế, và các tế bào chủ mà các vectơ này đã được đưa vào trong đó, thì cũng thuộc phạm vi sáng chế, như là đối với các phương pháp sản xuất kháng thể bằng cách nuôi cấy tế bào chủ trong các điều kiện cho phép sản xuất kháng thể, và thu hồi các kháng thể được sản xuất.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn của nó chứa HCVR được mã hóa bởi trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289, 305, 321, và 337 hoặc trình tự về cơ bản đồng nhất có mức tương đồng của nó ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99%.

Theo một phương án, HCVR được mã hóa bởi trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 273 và 337.

Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn của nó còn chứa LCVR được mã hóa bởi trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281, 297, 313, 329, và 345, hoặc trình tự về cơ bản đồng nhất có mức tương đồng của nó ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99%.

Theo một phương án, LCVR được mã hóa bởi trình tự axit nucleic được chọn từ

nhóm bao gồm SEQ ID NO: 281 và 345.

Theo một phương án, sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể chứa miền HCDR3 được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 7, 23, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 151, 167, 183, 199, 215, 231, 247, 263, 279, 295, 311, 327, và 343 hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền LCDR3 được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 15, 31, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 159, 175, 191, 207, 223, 239, 255, 271, 287, 303, 319, 335, và 351, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn của nó còn chứa miền HCDR1 được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3, 19, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147, 163, 179, 195, 211, 227, 243, 259, 275, 291, 307, 323, và 339, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền HCDR2 được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 5, 21, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 149, 165, 181, 197, 213, 229, 245, 261, 277, 293, 309, 325, và 341, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền LCDR1 được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 11, 27, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155, 171, 187, 203, 219, 235, 251, 267, 283, 299, 315, 331, và 347, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền LCDR2 được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 13, 29, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 157, 173, 189, 205, 221, 237, 253, 269, 285, 301, 317, 333, và 349, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến kháng thể của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên đặc hiệu với RSV-F chứa HCVR được mã hóa bởi các đoạn trình tự nucleotit được tạo ra từ các trình tự dòng mầm V_H , D_H và J_H , và LCVR được mã hóa bởi

các đoạn trình tự nucleotit được tạo ra từ các trình tự dòng mầm V_K và J_K .

Sáng chế đề xuất các kháng thể có mẫu hình glycosyl hóa được cải biến. Trong một số ứng dụng, việc cải biến để loại bỏ các vị trí glycosyl hóa không mong muốn có thể là hữu ích, hoặc, ví dụ, việc loại bỏ gốc fucosa để làm tăng chức năng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular cytotoxicity -ADCC) (xem tài liệu: Shield *et al.* (2002) JBC 277:26733). Trong các ứng dụng khác, có thể tiến hành việc cải biến quá trình galactosyl hóa để cải biến tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity-CDC).

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa ít nhất một kháng thể được phân lập đơn dòng hoàn toàn của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với RSV-F và chất mang được dụng hoặc chất pha loãng. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa hai kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng, phần này liên kết với cùng một epitop hoặc liên kết với hai epitop khác nhau trên RSV-F và chất mang được dụng hoặc chất pha loãng. Cần phải hiểu rằng dạng kết hợp bất kỳ của các kháng thể như được mô tả trong tài liệu này có thể được sử dụng trong được phẩm để đạt được kết quả mong muốn ở cộng đồng bệnh nhân cần đến liệu pháp này. Ví dụ, hai kháng thể mà nhận biết và/hoặc liên kết RSV-F có thể được sử dụng trong chế phẩm. Theo cách khác, hai kháng thể, một nhận biết và/hoặc liên kết RSV-F và kháng thể thứ hai liên kết với một kháng nguyên khác trên RSV (ví dụ, RSV-G) có thể được sử dụng trong chế phẩm. Theo một phương án, hai kháng thể, một nhận biết và/hoặc liên kết RSV-F và kháng thể thứ hai mà liên kết với kháng nguyên metapneumovirus có thể được sử dụng trong chế phẩm. Theo cách khác, từ hai kháng thể trở lên có thể được sử dụng trong chế phẩm, một nhận biết và/hoặc liên kết với RSV-F, một liên kết với kháng nguyên metapneumovirus và một liên kết với kháng nguyên virus cúm hoặc với virus bất kỳ khác mà gây ra các bệnh hô hấp.

Theo một phương án, được phẩm này chứa kháng thể mà liên kết RSV-F và có cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 274/282 và 338/346.

Theo một phương án, được phẩm này chứa kháng thể mà liên kết RSV-F và có

cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR bao gồm các SEQ ID NO: 274/282.

Theo một phương án, dược phẩm này chứa kháng thể mà liên kết RSV-F và có cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR bao gồm các SEQ ID NO: 338/346.

Theo một phương án, dược phẩm này chứa ít nhất một kháng thể mà liên kết RSV-F, trong đó kháng thể này chứa ba vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) nằm trong một trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 274 và 338; và ba vùng quyết định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) nằm trong một trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 282 và 346.

Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế, hoặc chế phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để trung hòa RSV từ chủng phân nhóm A hoặc phân nhóm B bất kỳ của RSV.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm, chế phẩm này là dạng kết hợp của kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế, và chất trị liệu thứ hai.

Chất trị liệu thứ hai có thể là thuốc phân tử nhỏ, protein/polypeptit, kháng thể, phân tử axit nucleic, như phân tử đối nghĩa, hoặc ARN can thiệp kích thước nhỏ. Chất trị liệu thứ hai có thể là tổng hợp hoặc được tạo ra từ tự nhiên.

Chất trị liệu thứ hai có thể là chất bất kỳ mà được kết hợp một cách thuận lợi với kháng thể hoặc đoạn của nó theo sáng chế, ví dụ, chất kháng virus (ví dụ, ribavirin), vắc xin đặc hiệu với RSV, hoặc vắc xin đặc hiệu với virus cúm, hoặc vắc xin đặc hiệu với metapneumovirus (MPV), ARN can thiệp kích thước nhỏ đặc hiệu với kháng nguyên RSV, ARN can thiệp kích thước nhỏ đặc hiệu với kháng nguyên virus cúm, ARN can thiệp kích thước nhỏ đặc hiệu với kháng nguyên metapneumovirus (MPV), kháng thể thứ hai đặc hiệu với kháng nguyên RSV, hoặc kháng nguyên metapneumovirus (MPV), hoặc kháng nguyên virus cúm, kháng thể kháng IL4R, kháng thể kháng RSV-G hoặc NSAID. Theo các phương án cụ thể, chất trị liệu thứ hai có thể là chất mà giúp vô hiệu hóa hoặc làm giảm (các) tác dụng phụ có thể có bất kỳ gắn liền với kháng thể hoặc đoạn

liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế, nếu (các) tác dụng phụ này xảy ra.

Cũng sẽ được nhìn nhận rằng các kháng thể và chế phẩm được dụng theo sáng chế có thể được sử dụng trong các liệu pháp kết hợp, đó là, các kháng thể và chế phẩm được dụng có thể được cho dùng đồng thời với, trước, hoặc tiếp sau, một hoặc nhiều phương pháp trị liệu hoặc các quy trình y khoa mong muốn khác. Dạng kết hợp cụ thể của các liệu pháp (các phương pháp trị liệu hoặc các quy trình) để sử dụng trong chế độ dùng thuốc kết hợp sẽ chú ý đến tính tương hợp của các phương pháp trị liệu và/hoặc các quy trình mong muốn và tác dụng trị liệu mong muốn cần đạt được. Cũng sẽ được nhìn nhận rằng các liệu pháp được sử dụng có thể đạt được tác dụng mong muốn đối với cùng một rối loạn (ví dụ, kháng thể có thể được cho dùng đồng thời với một chất khác được sử dụng để điều trị cùng một rối loạn), hoặc chúng có thể đạt được các tác dụng khác nhau (ví dụ, kiểm soát các tác dụng phụ có hại bất kỳ). Như được sử dụng trong tài liệu này, các chất trị liệu bổ sung mà thường được cho dùng để điều trị hoặc phòng ngừa một bệnh hoặc tình trạng cụ thể, là thích hợp cho bệnh hoặc tình trạng đang được điều trị.

Khi nhiều phương pháp trị liệu được cho dùng đồng thời, thì có thể điều chỉnh liều lượng theo đó, như được công nhận trong lĩnh vực kỹ thuật thích hợp.

Khía cạnh thứ năm của sáng chế đề xuất phương pháp dùng để phòng ngừa lây nhiễm virus hợp bào hô hấp ở bệnh nhân cần đến liệu pháp này, hoặc dùng để điều trị bệnh nhân mắc tình trạng lây nhiễm RSV, hoặc dùng để giảm bớt ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV, phương pháp này bao gồm việc cho bệnh nhân cần đến liệu pháp này dùng một hoặc nhiều kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng như được mô tả trong tài liệu này, hoặc được phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế hoặc các đoạn của chúng, như được mô tả trong tài liệu này, sao cho phòng ngừa được tình trạng lây nhiễm RSV, hoặc ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm này được giảm bớt, làm dịu hoặc làm giảm về mức độ trầm trọng và/hoặc khoảng thời gian.

Theo một phương án có liên quan, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế, một mình hoặc kết hợp với chất trị liệu thứ hai, để sử dụng trong việc phòng ngừa tình trạng lây nhiễm virus hợp bào hô hấp (RSV) ở bệnh

nhân cần đến liệu pháp này, hoặc dùng để điều trị bệnh nhân mắc tình trạng lây nhiễm RSV, hoặc dùng để giảm bớt ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm này, trong đó tình trạng lây nhiễm này hoặc được phòng ngừa, hoặc ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm này được phòng ngừa, giảm nhẹ, hoặc giảm bớt về mức độ trầm trọng và/hoặc khoảng thời gian.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế, một mình hoặc kết hợp với chất trị liệu thứ hai trong sản xuất được phẩm dùng để phòng ngừa tình trạng lây nhiễm virus hợp bào hô hấp (RSV) ở bệnh nhân cần đến liệu pháp này, hoặc dùng để điều trị bệnh nhân mắc tình trạng lây nhiễm RSV, hoặc dùng để giảm bớt ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm này, trong đó tình trạng lây nhiễm này hoặc được phòng ngừa, hoặc ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm này được phòng ngừa, giảm nhẹ, hoặc giảm bớt về mức độ trầm trọng và/hoặc khoảng thời gian.

Theo một phương án, bệnh nhân cần đến phương pháp điều trị bằng kháng thể theo sáng chế, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó là bệnh nhân mà có thể mắc phải dạng lây nhiễm RSV trầm trọng hơn do tình trạng y lý tiềm ẩn hoặc có trước. Theo một phương án, phương pháp đem lại cách phòng ngừa sự phát triển của tình trạng lây nhiễm RSV ở bệnh nhân có nguy cơ mắc bệnh này, phương pháp này bao gồm việc cho bệnh nhân dùng lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với protein F của RSV, hoặc được phẩm chứa lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với protein F của RSV sao cho tình trạng lây nhiễm này hoặc được phòng ngừa, giảm nhẹ hoặc giảm bớt về mức độ trầm trọng và/hoặc khoảng thời gian, hoặc ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm này được phòng ngừa hoặc giảm nhẹ hoặc giảm bớt về mức độ trầm trọng hoặc khoảng thời gian. Theo một phương án, việc cho dùng kháng thể RSV-F được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó đem lại tác dụng phòng ngừa bệnh thở khó khè tái phát ở bệnh nhân. Theo một phương án, việc cho dùng kháng thể RSV-F được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó đem lại tác dụng phòng ngừa bệnh hen gắn liền với RSV ở trẻ em. Theo một phương án, việc cho dùng kháng thể RSV-F được phân lập của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó đem lại tác dụng phòng ngừa tình trạng lây nhiễm RSV do virus hợp bào hô hấp

phân nhóm A hoặc phân nhóm B gây ra.

[0001] Theo một phương án, ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV mà có thể điều trị được bằng kháng thể theo sáng chế, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, có thể được chọn từ nhóm bao gồm chứng giảm oxy-huyết, màu da hơi xanh do thiếu oxy, khó thở (ví dụ, thở gấp hoặc thở hụt hơi), ho, ho do viêm thanh-khí-phế quản (ho như “hải cầu sứa”), sốt, cánh mũi phập phồng, tịt mũi, thở khò khè, viêm phổi, chứng ngưng thở, mất nước, kén ăn, trạng thái tâm thần bị thay đổi, chán ăn, hoặc viêm tiểu phế quản.

Theo một phương án, bệnh nhân có nguy cơ phát triển tình trạng lây nhiễm RSV, bệnh nhân mà có thể được lợi từ phương pháp trị liệu bằng các kháng thể theo sáng chế, hoặc bằng chế phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế, có thể được chọn từ nhóm bao gồm trẻ sơ sinh sinh non, trẻ sơ sinh đủ tháng mà bị gây hại do một số tình trạng y lý tiềm ẩn khác và/hoặc bị phơi nhiễm trong suốt mùa cao điểm của RSV, trẻ em lớn hơn hoặc bằng một tuổi có hoặc không có tình trạng y lý tiềm ẩn (ví dụ, bệnh tim bẩm sinh, bệnh phổi mạn tính, xơ nang, chứng suy giảm miễn dịch, rối loạn thần kinh-cơ), bệnh nhân sống ở cơ sở từ thiện hoặc bệnh nhân nhập viện, bệnh nhân cao tuổi (≥ 65 tuổi) có hoặc không có tình trạng y lý tiềm ẩn như bệnh suy tim sung huyết hoặc bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính), bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch do bệnh tiềm ẩn hoặc do việc cho dùng các phương pháp trị liệu ức chế miễn dịch, bệnh nhân có một số tình trạng y lý tiềm ẩn mà có thể làm cho họ mắc tình trạng lây nhiễm RSV, ví dụ, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), suy tim sung huyết, xơ nang, loạn sản phế quản-phổi, suy chức năng khí đạo, bệnh phổi mạn tính, bệnh nhân ung thư, hoặc bệnh nhân được cấy ghép đang dùng liệu pháp ức chế miễn dịch.

Theo một phương án, bệnh nhân là ứng viên cho liệu pháp kháng thể theo sáng chế có thể mắc một tình trạng là kết quả của tình trạng hệ hô hấp, hệ tim mạch, hệ thần kinh-cơ hoặc hệ miễn dịch bị suy giảm. Tình trạng này có thể được chọn từ nhóm bao gồm tình trạng bất thường của khí đạo, bệnh phổi mạn tính, bệnh tim mạn tính, bệnh thần kinh-cơ mà gây hại cho quá trình kiểm soát dịch tiết hô hấp và hiện tượng ức chế miễn dịch. Bệnh phổi mạn tính có thể là bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), xơ nang, hoặc loạn sản phế quản-phổi. Bệnh tim mạn tính có thể là bệnh suy tim sung huyết

(CHF), hoặc bệnh tim bẩm sinh. Tình trạng hoặc bệnh thần kinh-cơ có thể là bệnh thoái hóa thần kinh, hoặc tình trạng không kiểm soát và/hoặc loại bỏ được dịch tiết hô hấp do tổn thương hoặc tai biến hệ thần kinh, ví dụ, đột quỵ, hoặc tổn thương tủy sống. Hiện tượng ức chế miễn dịch có thể là kết quả của bệnh suy giảm miễn dịch thể kết hợp trầm trọng hoặc bệnh suy giảm miễn dịch mắc phải trầm trọng, hoặc có thể là kết quả của bệnh truyền nhiễm hoặc tình trạng ung thư bất kỳ khác mà dẫn đến hiện tượng ức chế miễn dịch, hoặc là kết quả của phương pháp điều trị bằng liệu pháp thuốc ức chế miễn dịch hoặc liệu pháp phóng xạ.

Theo một phương án, kháng thể được cho dùng với mục đích phòng bệnh (được cho dùng trước khi phát triển tình trạng lây nhiễm) cho bệnh nhân có nguy cơ phát triển tình trạng lây nhiễm RSV, hoặc có nguy cơ phát triển ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV. Các bệnh nhân là ứng viên cho phương pháp điều trị bằng các kháng thể theo sáng chế có thể được cho dùng chế phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể bằng đường phân phối bất kỳ thích hợp cho việc dùng thuốc, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tiêm vào tĩnh mạch, tiêm vào trong cơ, hoặc tiêm dưới da.

Theo một phương án, kháng thể được cho dùng với mục đích trị liệu (được cho dùng sau khi phát triển tình trạng lây nhiễm) cho bệnh nhân để giảm nhẹ hoặc làm giảm mức độ trầm trọng và/hoặc khoảng thời gian của ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV.

Theo một phương án, có thể cho bệnh nhân dùng các kháng thể theo sáng chế kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu hữu ích đối với việc điều trị tình trạng lây nhiễm RSV. Một hoặc nhiều chất trị liệu có thể được chọn từ nhóm bao gồm chất chống virus; vacxin đặc hiệu với RSV, vacxin đặc hiệu với virus cúm, hoặc vacxin đặc hiệu với metapneumovirus (MPV); ARN can thiệp kích thích nhỏ đặc hiệu với kháng nguyên RSV hoặc kháng nguyên metapneumovirus (MPV); kháng thể thứ hai đặc hiệu với kháng nguyên RSV hoặc kháng nguyên metapneumovirus (MPV); kháng thể kháng IL4R, kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên virus cúm, kháng thể kháng RSV-G và NSAID.

Khía cạnh thứ sáu của sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc

vacxin, mà khi cho cá thể dùng, tốt hơn, nếu là người, gây ra đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên virus hợp bào hô hấp (RSV) ở cá thể đó.

Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vacxin, chứa kháng nguyên RSV, ví dụ, protein RSV-F, polypeptit, hoặc một đoạn sinh miễn dịch của nó, hoặc epitop nằm trong và/hoặc thu được từ kháng nguyên của polypeptit RSV-F hoặc một đoạn của nó, và/hoặc chứa ADN và/hoặc ARN có chức năng mã hóa và biểu hiện epitop từ kháng nguyên của polypeptit RSV-F, hoặc các polypeptit khác theo sáng chế.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vacxin, có thể chứa protein RSV-F như được thể hiện trong SEQ ID NO: 354. Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vacxin, có thể chứa đoạn polypeptit RSV-F bao gồm các gốc 161 đến 188 của SEQ ID NO: 354. Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vacxin, có thể bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin nằm trong SEQ ID NO: 355 và/hoặc SEQ ID NO: 356. Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vacxin, có thể bao gồm SEQ ID NO: 355 và/hoặc SEQ ID NO: 356.

Theo một khía cạnh có liên quan, sáng chế đề xuất phương pháp gây đáp ứng miễn dịch ở một cá thể nào đó, cụ thể là động vật có vú, tốt hơn, nếu là người, bằng cách cho cá thể dùng chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vacxin, chứa protein RSV-F, hoặc một đoạn sinh miễn dịch của nó, hoặc kháng nguyên RSV-F hoặc một đoạn sinh miễn dịch của nó bao gồm một hoặc nhiều epitop nằm trong kháng nguyên RSV-F hoặc đoạn của nó, thích hợp để tạo ra kháng thể và/hoặc đáp ứng miễn dịch tế bào T để bảo vệ cá thể này khỏi lây nhiễm, cụ thể là lây nhiễm virus hợp bào hô hấp (RSV).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp sử dụng các chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc các vacxin theo sáng chế để gây đáp ứng miễn dịch đem lại tác dụng ức chế, hoặc làm chậm quá trình tiến triển của tình trạng lây lan từ tế bào này sang tế bào khác. Sáng chế còn đề xuất các phương pháp dùng để giảm bớt ít nhất một triệu chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV bằng cách cho dùng chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vacxin, chứa ít nhất một kháng nguyên RSV-F, hoặc một hoặc nhiều epitop nằm trong kháng nguyên RSV-F, mà khi được cho dùng thì sẽ gây đáp ứng miễn dịch ở cá thể.

Ví dụ, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp gây đáp ứng miễn dịch ở một cá thể nào đó bao gồm việc cho cá thể này dùng chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vaccin chứa kháng nguyên RSV-F (ví dụ, trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 354), hoặc đoạn kháng nguyên của nó, (ví dụ, polypeptit bao gồm các gốc 161 đến 188 của SEQ ID NO: 354), hoặc vector axit nucleic chứa trình tự nucleotit để dẫn dắt quá trình biểu hiện của polypeptit virus này, hoặc đoạn hoặc biến thể của nó, *in vivo* để gây đáp ứng miễn dịch.

Theo một phương án của sáng chế, polypeptit để sử dụng trong chế phẩm sinh miễn dịch hoặc trong vaccin để gây đáp ứng miễn dịch ở một cá thể nào đó bao gồm các gốc 161 đến 188 của SEQ ID NO: 354. Theo một phương án của sáng chế, polypeptit để sử dụng trong chế phẩm sinh miễn dịch hoặc trong vaccin để gây đáp ứng miễn dịch ở một cá thể nào đó bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin nằm trong SEQ ID NO: 355 và/hoặc SEQ ID NO: 356. Theo một phương án của sáng chế, polypeptit để sử dụng trong chế phẩm sinh miễn dịch hoặc trong vaccin để gây đáp ứng miễn dịch ở một cá thể nào đó bao gồm SEQ ID NO: 355 và/hoặc SEQ ID NO: 356. Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vaccin, có thể gây ra đáp ứng kháng thể hoặc đáp ứng tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên RSV-F của RSV, trong đó các kháng thể được tạo ra tương tác với hoặc serin ở vị trí 173 của SEQ ID NO: 354, hoặc threonin ở vị trí 354, hoặc cả serin ở vị trí 173 của SEQ ID NO: 354 và threonin ở vị trí 174 của SEQ ID NO: 354.

Theo các phương án cụ thể của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vaccin có thể chứa polynucleotit và/hoặc polypeptit sinh miễn dịch theo sáng chế, hoặc dạng kết hợp của chúng, cùng với tá dược/chất mang thích hợp, như tá dược/chất mang được dùng. Chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vaccin theo sáng chế có thể còn chứa các chất phụ trợ dùng để làm tăng tính sinh miễn dịch của dạng chế phẩm.

Theo các phương án cụ thể, thật là thuận lợi khi bào chế các kháng nguyên RSV-F hoặc các đoạn của chúng thành các chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc các vaccin mà chứa lượng sinh miễn dịch, tốt hơn, nếu là lượng hữu hiệu về phương diện miễn dịch học của các kháng nguyên bổ sung để gây ra hiện tượng miễn dịch đối với các mầm bệnh khác, tốt hơn, nếu là các virus và/hoặc vi khuẩn. Các kháng nguyên bổ sung này có

thể bao gồm kháng nguyên virus cúm, kháng nguyên từ metapneumovirus hoặc từ coronavirus, kháng nguyên từ *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, hoặc *Bordetella pertussis*. Các kháng nguyên RSV khác có thể được đưa vào các chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vaccin, như glycoprotein RSV-G, hoặc các đoạn sinh miễn dịch của nó, protein HN, hoặc các dẫn xuất của nó.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Biểu đồ dạng sơ đồ của protein RSV-F.

Hình 2A và 2B. Thể hiện rằng H1H3592P3 phong bế quá trình xâm nhập của virus bằng cách ức chế quá trình dung hợp của virus và màng tế bào.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi các phương pháp này được mô tả, cần phải hiểu rằng sáng chế này không bị giới hạn ở các phương pháp và điều kiện thử nghiệm cụ thể được mô tả, như vậy các phương pháp và điều kiện này có thể thay đổi. Cũng cần phải hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng trong tài liệu này chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể mà thôi, và không được dự định là làm giới hạn phạm vi của sáng chế, vì phạm vi của sáng chế chỉ bị giới hạn ở yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Trừ khi được quy định khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong tài liệu này có nghĩa như thường được hiểu bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế này thuộc về. Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ “khoảng”, khi được sử dụng liên quan đến giá trị bằng số được trích dẫn cụ thể, có nghĩa là trị số này có thể thay đổi không quá 1% so với trị số được trích dẫn. Ví dụ, như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ “khoảng 100” bao gồm cả 99 và 101 và tất cả các trị số nằm trong khoảng này (ví dụ, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, v.v.).

Mặc dù có thể sử dụng các phương pháp và chất liệu tương đồng hoặc tương đương bất kỳ với phương pháp và chất liệu được mô tả trong tài liệu này để thực hiện hoặc thử nghiệm sáng chế, nhưng bây giờ, mô tả các phương pháp và chất liệu được ưu tiên.

Các định nghĩa

“Protein F của virus hợp bào hô hấp”, còn được gọi là “RSV-F” là protein bề mặt xuyên màng kiểu I, protein này có peptit tín hiệu được phân cắt ở đầu cuối N và phần neo màng gần đầu cuối C (Collins, P.L. *et al.*, (1984), PNAS (USA) 81:7683-7687). Protein RSV-F được tổng hợp dưới dạng chất tiền thân 67KDa không có hoạt tính được gọi tên là F0 (Calder, L.J.; *et al.*, *Virology* (2000), 271,122–131. Protein F0 được hoạt hóa bằng cách phân hủy protein trong phức hợp Golgi bằng proteaza tương tự furin ở hai vị trí, thu được hai polypeptit được liên kết bằng disulfua, F2 và F1, lần lượt từ đầu cuối N và đầu cuối C. Có peptit 27 axit amin được giải phóng được gọi là “pep27”. Có các vị trí phân cắt furin (furin cleavage site-FCS) ở một trong hai bên của pep27 (Collins, P.L.; Mottet, G. (1991), *J.Gen.Virol.*, 72: 3095–3101; Sugrue, R.J , *et al.* (2001), *J..Gen.Virol.*, 82,1375–1386). Cấu trúc siêu phân tử F2 bao gồm đơn vị lặp lại Heptad C (Heptad repeat C-HRC), trong khi F1 chứa polypeptit dung hợp (fusion polypeptit-FP), đơn vị lặp lại heptad A (heptad repeat A-HRA), miền I, miền II, đơn vị lặp lại heptad B (heptad repeat B-HRB), miền xuyên màng (transmembrane-TM) và miền tế bào chất (cytoplasmic domain-CP) (xem tài liệu: Sun, Z. *et al.* *Viruses* (2013), 5:211-225). Protein RSV-F đóng vai trò nhất định trong quá trình dung hợp hạt virus với màng tế bào, và được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào bị nhiễm, vì thế mà, đóng vai trò nhất định trong quá trình truyền virus từ tế bào này sang tế bào khác và quá trình tạo hợp tử. Trình tự axit amin của protein RSV-F được đưa ra trong GenBank dưới dạng số truy cập AAX23994 và trong tài liệu này còn được gọi là SEQ ID NO: 354.

Cấu trúc được thao tác gen của protein RSV-F được thể hiện trong tài liệu này là có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 353.

Thuật ngữ “chủng phòng thí nghiệm” như được sử dụng trong tài liệu này được dùng để chỉ chủng của RSV (phân nhóm A hoặc B) mà đã được cấy truyền nhiều lần trong môi trường nuôi cấy tế bào *in vitro*. “Chủng phòng thí nghiệm” có thể có các đột biến thích ứng mà có thể ảnh hưởng đến các thuộc tính sinh học của chúng. “Chủng lâm sàng” như được sử dụng trong tài liệu này được dùng để chỉ sản phẩm phân lập RSV (phân nhóm A hoặc B), mà thu được từ cá thể bị lây nhiễm và đã được phân lập và nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy mô ở mức cấy truyền thấp.

Thuật ngữ “liều lượng hữu hiệu 99” hay “ED99” được dùng để chỉ liều lượng của một chất mà tạo ra tác dụng mong muốn là mức giảm 99% của mảng tạo virus so với đối chứng kiểu tương đương (âm tính). Trong sáng chế này, ED99 được dùng để chỉ liều lượng của các kháng thể kháng RSV-F mà sẽ trung hòa tình trạng lây nhiễm virus (ví dụ, làm giảm 99% tổng lượng virus) in vivo, như được mô tả trong ví dụ 5.

Thuật ngữ “IC50” được dùng để chỉ “nồng độ ức chế một nửa mức tối đa”, trị số này đo tính hiệu quả của tình trạng ức chế bằng hợp chất (ví dụ, kháng thể kháng RSV-F) đối với công dụng sinh học hoặc hóa sinh. Số đo định lượng này thể hiện số lượng cần thiết để một chất ức chế cụ thể ức chế một quá trình sinh học đã cho là một nửa.

“Palivizumab”, còn được gọi là “SYNAGIS®”, là kháng thể kháng RSV-F được làm cho giống của người có các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như được nêu ra trong US7635568 và 5824307 (trong tài liệu này còn được thể hiện là SEQ ID NO: 361 đối với chuỗi nặng của kháng thể và SEQ ID NO: 362 đối với chuỗi nhẹ của kháng thể). Kháng thể này, đây là kháng thể liên kết đặc hiệu miễn dịch với protein RSV-F, hiện được FDA phê duyệt dùng cho phương pháp phòng bệnh miễn dịch thụ động đối với bệnh RSV nghiêm trọng ở trẻ em có nguy cơ cao và được cho dùng vào trong cơ ở liều hằng tháng được khuyến nghị là 15mg/kg thể trọng suốt mùa RSV (tháng 11 đến tháng 4 ở bán cầu bắc). SYNAGIS® chứa 95% trình tự kháng thể của người và 5% trình tự kháng thể của chuột. Xem thêm tài liệu: Johnson et al., (1997), J. Infect. Diseases 176:1215-1224.

“Motavizumab”, còn được gọi là “NUMAX™”, là kháng thể đơn dòng được làm cho giống của người đặc hiệu với RSV-F có độ hiệu nghiệm được làm tăng được tạo ra bằng phương pháp làm trưởng thành ái lực in vitro các vùng quyết định tính hỗ trợ của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của palivizumab. Nhằm mục đích tham chiếu, trình tự axit amin của kháng thể NUMAX™ được bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ 2003/0091584 và trong Mỹ số 6,818,216 và trong tài liệu: Wu et al., (2005) J. Mol. Bio. 350(1):126-144 và trong tài liệu: Wu, et al. (2007) J. Mol. Biol. 368:652-665. Còn được thể hiện trong tài liệu này là SEQ ID NO: 359 đối với chuỗi nặng và là SEQ ID NO: 360 đối với chuỗi nhẹ của kháng thể.

Như được sử dụng trong tài liệu này, các thuật ngữ “điều trị”, “sự điều trị” và “đang điều trị” được dùng để chỉ sự làm giảm hoặc giảm bớt quá trình tiến triển, tính trầm trọng, và/hoặc khoảng thời gian lây nhiễm RSV đường hô hấp trên và/hoặc lây nhiễm RSV đường hô hấp dưới, viêm tai giữa, hoặc triệu chứng hoặc tình trạng hô hấp liên quan đến nó (như bệnh hen, thở khò khè, hoặc dạng kết hợp của chúng) là kết quả của việc cho dùng một hoặc nhiều liệu pháp (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc cho dùng một hoặc nhiều chất phòng bệnh hoặc chất trị liệu). Theo các phương án cụ thể, các thuật ngữ này được dùng để chỉ sự làm giảm hoặc ức chế quá trình sao chép của RSV, sự ức chế hoặc làm giảm quá trình lây lan của RSV sang mô khác hoặc đối tượng khác (ví dụ, lây lan sang đường hô hấp dưới), sự ức chế hoặc làm giảm quá trình lây nhiễm tế bào bằng RSV, hoặc sự giảm bớt một hoặc nhiều triệu chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV đường hô hấp trên và/hoặc lây nhiễm RSV đường hô hấp dưới hoặc viêm tai giữa.

Như được sử dụng trong tài liệu này, các thuật ngữ “phòng ngừa”, “đang phòng ngừa”, và “sự phòng ngừa” được dùng để chỉ sự phòng ngừa hoặc ức chế quá trình phát triển hoặc khởi phát của tình trạng lây nhiễm RSV đường hô hấp trên và/hoặc lây nhiễm RSV đường hô hấp dưới, viêm tai giữa hoặc một tình trạng hô hấp liên quan đến nó ở đối tượng, sự phòng ngừa hoặc ức chế quá trình tiến triển của tình trạng lây nhiễm RSV đường hô hấp trên thành tình trạng lây nhiễm RSV đường hô hấp dưới, viêm tai giữa hoặc tình trạng hô hấp liên quan đến nó là kết quả của việc cho dùng một liệu pháp (ví dụ, chất phòng bệnh hoặc chất trị liệu), sự phòng ngừa triệu chứng của tình trạng lây nhiễm RSV đường hô hấp trên và/hoặc tình trạng lây nhiễm RSV đường hô hấp dưới, viêm tai giữa hoặc một tình trạng hô hấp liên quan đến nó, hoặc việc cho dùng dạng kết hợp của các liệu pháp (ví dụ, dạng kết hợp của chất phòng bệnh hoặc chất trị liệu).

Thuật ngữ “kháng thể”, như được sử dụng trong tài liệu này, là có ý chỉ các phân tử globulin miễn dịch bao gồm bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được kết nối với nhau bằng liên kết disulfua (tức là, “các phân tử kháng thể đầy đủ”), cũng như các multime của chúng (ví dụ, IgM) hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng. Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (“HCVR” hay “VH”) và vùng ổn định chuỗi nặng (bao gồm các miền CH1, CH2 và CH3). Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (“LCVR” hay “VL”) và vùng ổn định

của chuỗi nhẹ (CL). Vùng VH và VL có thể còn được chia nhỏ thành các vùng có tính siêu biến, được gọi là vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining region - CDR), nằm xen kẽ với các vùng mà được bảo toàn nhiều hơn, được gọi là vùng khung làm việc (framework-FR). Mỗi VH và VL bao gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu cuối amin đến đầu cuối carboxy theo trật tự sau đây: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo các phương án cụ thể của sáng chế, các FR của kháng thể (hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó) có thể là đồng nhất với các trình tự dòng mầm của người, hoặc có thể được cải biến bằng cách nhân tạo hoặc tự nhiên. Trình tự liên ứng axit amin có thể được xác định trên cơ sở phép phân tích từng bên một của hai hoặc nhiều CDR hơn nữa.

Việc thay thế một hoặc nhiều gốc CDR hoặc lược bỏ một hoặc nhiều CDR thì cũng có thể được. Các kháng thể đã được mô tả trong tài liệu khoa học mà trong đó một hoặc hai CDR có thể được bỏ qua vì khả năng liên kết. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9:133-139) đã phân tích các vùng tiếp xúc giữa các kháng thể và các kháng nguyên của chúng, trên cơ sở các cấu trúc tinh thể đã được công bố, và đã kết luận rằng chỉ từ một phần năm đến một phần ba số gốc CDR thực sự tiếp xúc với kháng nguyên. Padlan cũng đã phát hiện ra nhiều kháng thể mà trong đó một hoặc hai CDR không có axit amin nào tiếp xúc với kháng nguyên (xem thêm tài liệu: Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428).

Các gốc CDR không tiếp xúc kháng nguyên có thể được nhận diện trên cơ sở các nghiên cứu trước đó (ví dụ, các gốc H60-H65 ở CDRH2 thì thường không cần thiết), từ các vùng của các CDR theo Kabat nằm bên ngoài các CDR theo Chothia, bằng cách lập mô hình phân tử và/hoặc bằng thực nghiệm. Nếu CDR hoặc (các) gốc của nó được lược bỏ, thì nó thường được thế bằng axit amin chiếm vị trí tương ứng trong một trình tự kháng thể của người khác hoặc phần liên ứng của các trình tự này. Các vị trí dùng cho việc thay thế trong các CDR và các axit amin để thay thế cũng có thể được lựa chọn bằng thực nghiệm. Các đoạn thay thế thực nghiệm có thể là đoạn thay thế kiểu bảo toàn hoặc đoạn thay thế không theo kiểu bảo toàn.

Các kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người được bộc lộ trong tài liệu này có thể bao gồm một hoặc nhiều đoạn thay thế, chèn và/hoặc xóa bỏ axit amin trong vùng

khung và/hoặc vùng CDR của miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng so với các trình tự dòng mầm tương ứng. Có thể dễ dàng xác nhận các đột biến này bằng cách so sánh trình tự axit amin được bộc lộ trong tài liệu này với các trình tự dòng mầm sẵn có từ, ví dụ, cơ sở dữ liệu trình tự kháng thể công cộng. Sáng chế đề cập đến các kháng thể, và các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng, phần này được tạo ra từ trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin được bộc lộ trong tài liệu này, trong đó một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều vùng khung và/hoặc vùng CDR được làm đột biến thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm mà kháng thể được tạo ra từ đó, hoặc thành (các) gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm của người khác, hoặc thành đoạn thay thế axit amin kiểu bảo toàn của (các) gốc dòng mầm tương ứng (các thay đổi trình tự này trong tài liệu này được gọi chung là “các đột biến dòng mầm”). Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, bắt đầu với các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được bộc lộ trong tài liệu này, có thể dễ dàng tạo ra nhiều kháng thể và các đoạn liên kết kháng nguyên khác nhau mà có một hoặc nhiều đột biến dòng mầm riêng biệt hoặc các dạng kết hợp của chúng. Theo các phương án cụ thể, tất cả các gốc vùng khung và/hoặc gốc CDR trong các miền VH và/hoặc VL được làm đột biến ngược thành các gốc được tìm thấy trong trình tự dòng mầm gốc mà kháng thể được tạo ra từ đó. Theo các phương án khác, chỉ các gốc nhất định được làm đột biến ngược thành trình tự dòng mầm gốc, ví dụ, chỉ các gốc được làm đột biến được tìm thấy trong 8 axit amin đầu tiên của FR1 hoặc trong 8 axit amin cuối cùng của FR4, hoặc chỉ các gốc được làm đột biến được tìm thấy trong CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều gốc trong số (các) gốc vùng khung và/hoặc (các) gốc CDR được làm đột biến thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác (tức là, trình tự dòng mầm mà khác với trình tự dòng mầm mà kháng thể ban đầu được tạo ra từ đó). Ngoài ra, các kháng thể theo sáng chế có thể chứa dạng kết hợp bất kỳ của từ hai đột biến dòng mầm trở lên trong vùng khung và/hoặc vùng CDR, ví dụ, trong đó các gốc riêng biệt nhất định được làm đột biến thành gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm cụ thể trong khi các gốc nhất định khác mà khác với trình tự dòng mầm gốc được duy trì hoặc được làm đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác. Một khi đã thu được, các kháng thể và các đoạn liên kết kháng nguyên mà chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm có thể dễ dàng được thử nghiệm về một hoặc nhiều thuộc tính mong

muốn như, tính đặc hiệu liên kết tốt hơn, ái lực liên kết cao hơn, các thuộc tính sinh học chủ vận hoặc đối kháng tốt hơn hoặc mạnh hơn (tùy theo từng trường hợp), mức sinh miễn dịch giảm, v.v. Các kháng thể và các đoạn liên kết kháng nguyên thu được theo phương thức tổng quát này nằm trong phạm vi sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến các kháng thể hoàn toàn đơn dòng chứa các biến thể của trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin của HCVR, LCVR và/hoặc CDR được bộc lộ trong tài liệu này có một hoặc nhiều đoạn thay thế kiểu bảo toàn. Ví dụ, sáng chế đề cập đến các kháng thể có các trình tự axit amin của HCVR, LCVR và/hoặc CDR với, ví dụ, 10 đoạn thay thế axit amin kiểu bảo toàn trở xuống, 8 đoạn thay thế axit amin kiểu bảo toàn trở xuống, 6 đoạn thay thế axit amin kiểu bảo toàn trở xuống, 4 đoạn thay thế axit amin kiểu bảo toàn trở xuống, v.v. so với trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin của HCVR, LCVR và/hoặc CDR được bộc lộ trong tài liệu này.

Thuật ngữ “kháng thể của người”, như được sử dụng trong tài liệu này, là có ý bao gồm các kháng thể có vùng biến đổi và vùng ổn định được tạo ra từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Chất mAb của người theo sáng chế có thể chứa các gốc axit amin không được mã hóa bởi các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng phương pháp gây đột biến ngẫu nhiên hoặc phương pháp gây đột biến đặc hiệu vị trí in vitro hoặc bằng đột biến tế bào sinh dưỡng in vivo), ví dụ, ở các CDR và cụ thể là CDR3. Tuy nhiên, thuật ngữ “kháng thể của người”, như được sử dụng trong tài liệu này, là không có ý bao gồm mAb mà trong đó các trình tự CDR được tạo ra từ dòng mầm của loài động vật có vú khác (ví dụ, chuột nhắt), đã được ghép lên trình tự FR của người.

Thuật ngữ “tái tổ hợp” thường được dùng để chỉ protein, polypeptit hoặc tế bào bất kỳ biểu hiện gen đang được quan tâm mà được sản xuất bằng phương pháp thao tác gen. Thuật ngữ “tái tổ hợp” khi được sử dụng liên quan đến protein hoặc polypeptit, có nghĩa là polypeptit được sản xuất bằng quá trình biểu hiện polynucleotit tái tổ hợp. Protein được sử dụng trong chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể được phân lập từ nguồn tự nhiên hoặc được sản xuất bằng phương pháp thao tác gen.

Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể tái tổ hợp của người. Thuật ngữ “kháng thể tái tổ hợp của người”, như được sử dụng trong tài

liệu này, là có ý bao gồm tất cả các kháng thể của người mà được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng phương tiện tái tổ hợp, như các kháng thể được biểu hiện bằng cách sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào tế bào chủ (được mô tả thêm dưới đây), các kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể tổ hợp, tái tổ hợp của người (được mô tả thêm dưới đây), các kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột nhắt), động vật này là chuyển gen đối với các gen globulin miễn dịch của người (ví dụ, xem tài liệu: Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) hoặc các kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng phương tiện bất kỳ khác mà có liên quan đến việc cắt ghép intron của các trình tự gen globulin miễn dịch của người với các trình tự ADN khác. Các kháng thể tái tổ hợp của người như vậy có vùng biến đổi và vùng ổn định được tạo ra từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Tuy nhiên, theo các phương án cụ thể, các kháng thể tái tổ hợp của người như vậy được gây đột biến in vitro (hoặc, khi động vật chuyển gen đối với các trình tự Ig của người được sử dụng, đột biến tế bào sinh dưỡng in vivo) và vì vậy, trình tự axit amin của vùng VH và VL của các kháng thể tái tổ hợp là các trình tự mà, trong khi được tạo ra từ và liên quan đến các trình tự VH và VL dòng mầm của người, có thể không tồn tại theo cách tự nhiên trong kho dòng mầm kháng thể của người in vivo.

Thuật ngữ “liên kết đặc hiệu”, hoặc “liên kết đặc hiệu với”, hoặc các thuật ngữ tương tự, có nghĩa là kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó tạo phức hợp với kháng nguyên mà tương đối ổn định trong các điều kiện sinh lý. Tình trạng liên kết đặc hiệu có thể đặc trưng bởi hằng số phân ly cân bằng là ít nhất bằng $1 \times 10^{-6} \text{M}$ hoặc nhỏ hơn (ví dụ, KD nhỏ hơn biểu đạt tình trạng liên kết chặt hơn). Các phương pháp xác định xem liệu hai phân tử có liên kết đặc hiệu hay không thì đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, ví dụ, phương pháp thẩm tách cân bằng, phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt và các phương pháp tương tự. Như được mô tả trong tài liệu này, các kháng thể đã được nhận diện bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™, phần này liên kết đặc hiệu với RSV-F. Ngoài ra, các kháng thể đa đặc hiệu mà liên kết với protein RSV-F và một hoặc nhiều kháng nguyên bổ sung hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà liên kết với hai vùng khác nhau của RSV-F thì dù sao cũng được xem là các kháng thể “liên kết đặc hiệu”, như được sử dụng trong tài liệu này.

Thuật ngữ kháng thể “ái lực cao” được dùng để chỉ các mAb có ái lực liên kết với RSV-F, được biểu đạt ở dạng KD, là ít nhất 10-9M; càng tốt hơn, nếu là 10-10M, càng tốt hơn, nếu là 10-11M, càng tốt hơn, nếu là 10-12M như được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™ hoặc ELISA ái lực-dung dịch.

Với thuật ngữ “tốc độ phân ly chậm”, “Koff” hay “kd” có nghĩa là kháng thể mà phân ly khỏi RSV-F, với hằng số tốc độ là $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn, nếu là $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ hoặc nhỏ hơn, như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™.

Các thuật ngữ “phần liên kết kháng nguyên” của kháng thể, “đoạn liên kết kháng nguyên” của kháng thể, và các thuật ngữ tương tự, như được sử dụng trong tài liệu này, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein có trong tự nhiên, thu được bằng phản ứng enzym, tổng hợp hoặc được thao tác gen mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo phức hợp. Các thuật ngữ “phần liên kết kháng nguyên” của kháng thể, hoặc “đoạn kháng thể”, như được sử dụng trong tài liệu này, được dùng để chỉ một hoặc nhiều đoạn của kháng thể mà giữ lại khả năng liên kết với RSV-F.

Các phương án cụ thể, kháng thể hoặc các đoạn kháng thể theo sáng chế có thể được tiếp hợp với một gốc trị liệu (“thể tiếp hợp miễn dịch”), như chất kháng sinh, kháng thể kháng RSV-7 thứ hai, vacxin, hoặc biến độc tố, hoặc gốc trị liệu bất kỳ khác hữu ích đối với việc điều trị tình trạng lây nhiễm RSV.

“Kháng thể được phân lập”, như được sử dụng trong tài liệu này, là có ý chỉ kháng thể mà về cơ bản không có các kháng thể (Ab) khác có tính đặc hiệu kháng nguyên khác nhau (ví dụ, kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với RSV-F, hoặc một đoạn của nó, về cơ bản không có Ab mà liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên không phải là RSV-F).

“Kháng thể phong bế” hoặc “kháng thể trung hòa”, như được sử dụng trong tài liệu này (hoặc “kháng thể có chức năng trung hòa hoạt tính RSV-F”), là có ý chỉ kháng thể mà sự liên kết của nó với RSV-F đem lại tác dụng ức chế ít nhất một hoạt tính sinh học của RSV-F. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể trợ giúp trong việc phong bế quá trình dung hợp RSV với tế bào chủ, hoặc phòng ngừa quá trình tạo hợp tử, hoặc phòng ngừa bệnh nguyên phát do RSV gây ra. Theo cách khác, kháng thể theo sáng chế có thể

thể hiện khả năng giảm bớt ít nhất một triệu chứng của tình trạng lây nhiễm RSV. Mức ức chế này đối với hoạt tính sinh học của RSV-F có thể được đánh giá bằng cách đo một hoặc nhiều chất chỉ thị về hoạt tính sinh học của RSV-F bằng một hoặc nhiều thử nghiệm trong số vài thử nghiệm in vitro tiêu chuẩn (như thử nghiệm trung hòa, như được mô tả trong tài liệu này) hoặc các thử nghiệm in vivo đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, các mô hình động vật để kiểm tra mức bảo vệ đối với phương pháp thử bằng RSV sau khi cho dùng một hoặc nhiều kháng thể được mô tả trong tài liệu này).

Thuật ngữ “cộng hưởng plasmon bề mặt”, như được sử dụng trong tài liệu này, được dùng để chỉ hiện tượng quang học mà cho phép phân tích các tương tác phân tử sinh học thời gian thực bằng cách phát hiện những thay đổi về nồng độ protein trong cơ chất cảm biến sinh học, ví dụ, bằng cách sử dụng hệ thống BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.).

Thuật ngữ “KD”, như được sử dụng trong tài liệu này, là có ý chỉ hằng số phân ly cân bằng của một tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể.

Thuật ngữ “epitop” được dùng để chỉ quyết định tổ kháng nguyên mà tương tác với vị trí liên kết kháng nguyên đặc hiệu trong vùng biến đổi của phân tử kháng thể được biết đến với tên gọi là paratop. Một kháng nguyên có thể có nhiều epitop. Vì vậy, các kháng thể khác nhau có thể liên kết với các vùng khác nhau trên kháng nguyên và có thể có các tác dụng sinh học khác nhau. Thuật ngữ “epitop” cũng được dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà tế bào B và/hoặc tế bào T đáp ứng với vị trí này. Thuật ngữ này cũng được dùng để chỉ vùng kháng nguyên mà được liên kết bởi kháng thể. Các epitop có thể được định nghĩa theo cấu trúc hoặc chức năng. Các epitop chức năng thường là phân nhóm của các epitop cấu trúc và có các gốc mà góp phần trực tiếp vào ái lực tương tác. Các epitop cũng có thể là theo hình thể, đó là, bao gồm các axit amin không tuyến tính. Theo các phương án cụ thể, các epitop có thể bao gồm các quyết định tổ là các nhóm bề mặt có hoạt tính hóa học của các phân tử như axit amin, mạch bên bằng đường, nhóm phosphoryl hoặc nhóm sulfonyl, và, theo các phương án cụ thể, có thể có đặc điểm cấu trúc không gian ba chiều đặc trưng và/hoặc đặc điểm mang điện đặc trưng.

Thuật ngữ “mức đồng nhất cơ bản” hoặc “về cơ bản đồng nhất”, khi nói đến axit nucleic hoặc đoạn của nó, biểu đạt rằng, khi được xếp thẳng hàng tối ưu với các đoạn

chèn hoặc các đoạn xóa bỏ nucleotit thích hợp bằng một axit nucleic khác (hoặc mạch bổ trợ của nó), thì có mức đồng nhất trình tự nucleotit ở ít nhất là 90%, và càng tốt hơn, nếu là ít nhất 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% số bazơ nucleotit, như được đo bằng thuật toán đã biết rõ bất kỳ về mức đồng nhất trình tự, như FASTA, BLAST hoặc GAP, như được bàn dưới đây. Phân tử axit nucleic có mức đồng nhất cơ bản với phân tử axit nucleic tham chiếu có thể, trong các trường hợp nhất định, mã hóa polypeptit có cùng một trình tự axit amin hoặc có trình tự axit amin về cơ bản tương đồng với polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic tham chiếu.

Khi áp dụng cho các polypeptit, thuật ngữ “mức tương đồng cơ bản” hoặc “về cơ bản tương đồng” có nghĩa là hai trình tự peptit, khi được xếp thẳng hàng tối ưu, như bằng cách chương trình GAP hoặc BESTFIT có sử dụng độ lớn khoảng trống mặc định, có chung ít nhất 90% mức đồng nhất trình tự, thậm chí càng tốt hơn, nếu ít nhất 95%, 98% hoặc 99% mức đồng nhất trình tự. Tốt hơn, nếu các vị trí gốc, các vị trí này là không đồng nhất, khác nhau bởi các đoạn thay thế axit amin kiểu bảo toàn. “Thay thế axit amin kiểu bảo toàn” là kiểu thay thế mà trong đó gốc axit amin được thế bằng một gốc axit amin khác có mạch bên (nhóm R) có các thuộc tính hóa học tương đồng (ví dụ, điện tích hoặc tính kỵ nước). Nhìn chung, sự thay thế axit amin kiểu bảo toàn về cơ bản sẽ không làm thay đổi các thuộc tính chức năng của protein. Trong các trường hợp mà hai trình tự axit amin trở lên khác biệt với nhau bởi các đoạn thay thế kiểu bảo toàn, phần trăm tương đồng hoặc độ tương đồng có thể được điều chỉnh tăng lên để phù hợp với bản chất bảo toàn của việc thay thế. Phương tiện để thực hiện việc điều chỉnh này thì chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rõ. (Ví dụ, xem tài liệu: Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331). Các ví dụ về nhóm axit amin mà có mạch bên có các thuộc tính hóa học tương đồng bao gồm 1) các mạch bên béo: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; 2) các mạch bên hydroxyl-béo: serin và threonin; 3) các mạch bên chứa amit: asparagin và glutamin; 4) các mạch bên thơm: phenylalanin, tyrosin và tryptophan; 5) các mạch bên bazơ: lysin, arginin và histidin; 6) các mạch bên axit: aspartat và glutamat, và 7) các mạch bên chứa lưu huỳnh: xystein và metionin. Các nhóm đoạn thay thế axit amin kiểu bảo toàn được ưu tiên là: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat, và asparagin-glutamin. Theo cách khác, thay thế kiểu bảo toàn là sự thay đổi bất kỳ có trị số dương

trong ma trận logarit hợp lý PAM250 được bộc lộ trong tài liệu: Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443 45. Thay thế “kiểu bảo toàn vừa phải” là sự thay đổi bất kỳ có trị số không âm trong ma trận logarit hợp lý PAM250.

Mức tương đồng trình tự của các polypeptit thường được đo bằng cách sử dụng phần mềm phân tích trình tự. Phần mềm phân tích protein so khớp các trình tự tương đồng bằng cách sử dụng các số đo mức tương đồng được gán cho các đoạn thay thế, các đoạn xóa bỏ khác nhau và các đoạn cải biến khác, bao gồm cả đoạn thay thế axit amin kiểu bảo toàn. Ví dụ, phần mềm GCG chứa các chương trình như GAP và BESTFIT mà có thể được sử dụng với các thông số mặc định để xác định mức tương đồng trình tự hoặc mức đồng nhất trình tự giữa các polypeptit có quan hệ gần, như các polypeptit tương đồng từ các loài sinh vật khác nhau hoặc giữa protein kiểu hoang dại và dạng đột biến của nó. Ví dụ, xem tài liệu: GCG phiên bản 6.1. Cũng có thể so sánh các trình tự polypeptit bằng cách sử dụng FASTA có các thông số mặc định hoặc được khuyến nghị; chương trình trong GCG phiên bản 6.1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) cung cấp các phép xếp thẳng hàng và phần trăm mức đồng nhất trình tự của các vùng của mức chồng lấn nhiều nhất giữa trình tự truy vấn và trình tự tra cứu (Pearson (2000) trên đây). Một thuật toán được ưu tiên khác khi so sánh trình tự theo sáng chế với cơ sở dữ liệu chứa số lượng lớn các trình tự từ các sinh vật khác nhau là chương trình máy vi tính BLAST, đặc biệt là BLASTP hoặc TBLASTN, có sử dụng các thông số mặc định. (ví dụ, xem tài liệu: Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 410 và (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389 402).

Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc đoạn kháng thể để sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể là đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu. Các kháng thể đa đặc hiệu có thể là đặc hiệu với các epitop khác nhau của một polypeptit đích hoặc có thể chứa các miền liên kết kháng nguyên đặc hiệu với các epitop của nhiều polypeptit đích. Dạng thức kháng thể đặc hiệu kép tiêu biểu mà có thể được sử dụng theo văn cảnh của sáng chế liên quan đến việc sử dụng miền CH3 của globulin miễn dịch (Ig) thứ nhất và miền CH3 của Ig thứ hai, trong đó các miền CH3 của Ig thứ nhất và thứ hai khác biệt với nhau bởi ít nhất một axit amin, và trong đó sự khác biệt ít nhất một axit amin làm giảm mức liên kết kháng thể đặc hiệu kép với protein A so với kháng thể đặc hiệu kép thiếu sự khác biệt axit amin. Theo một phương án, miền CH3 của Ig

thứ nhất liên kết protein A và miền CH3 của Ig thứ hai chứa đột biến mà làm giảm hoặc làm mất khả năng liên kết protein A như cải biến H95R (theo cách đánh số exon IMGT; H435R theo cách đánh số EU). CH3 thứ hai có thể còn có cải biến Y96F (theo IMGT; Y436F theo EU). Các cải biến khác nữa mà có thể được tìm thấy trong CH3 thứ hai bao gồm: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, và V82I (theo IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, và V422I theo EU) trong trường hợp mAb IgG1; N44S, K52N, và V82I (IMGT; N384S, K392N, và V422I theo EU) trong trường hợp mAb IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, và V82I (theo IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, và V422I theo EU) trong trường hợp mAb IgG4. Các thay đổi của dạng thức kháng thể đặc hiệu kép được mô tả trên đây được dự liệu trong phạm vi của sáng chế.

Với cụm từ “lượng hữu hiệu trị liệu” có nghĩa là lượng đem lại tác dụng mong muốn mà lượng này được cho dùng vì tác dụng như vậy. Lượng chính xác sẽ phụ thuộc vào mục đích của việc điều trị, và sẽ có thể xác định được bởi chuyên gia trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết (ví dụ, xem tài liệu: Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

“Chế phẩm sinh miễn dịch” liên quan đến chế phẩm chứa kháng nguyên/chất sinh miễn dịch, ví dụ, vi sinh vật, như virus hoặc vi khuẩn, hoặc thành phần của chúng, protein, polypeptit, đoạn của protein hoặc polypeptit, tế bào nguyên bị bất hoạt, cấu trúc siêu phân tử hoặc virus được làm yếu, hoặc polysacarit, hoặc dạng kết hợp của chúng, được cho dùng để kích thích hệ miễn dịch dịch thể và/hoặc hệ miễn dịch tế bào của đối tượng tiếp nhận đối với một hoặc nhiều kháng nguyên/chất sinh miễn dịch có mặt trong chế phẩm sinh miễn dịch. Chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị người dễ mắc tình trạng lây nhiễm RSV, bằng cách cho dùng chế phẩm sinh miễn dịch thông qua đường dùng toàn thân. Các phương thức dùng thuốc này có thể bao gồm tiêm thông qua đường dùng vào trong cơ (i.m.), trong chân bì (i.d.), vào trong mũi hoặc đường dùng xông xịt, hoặc đường dùng dưới da (s.c.); ứng dụng bằng miếng dán hoặc thiết bị phân phối qua chân bì khác. Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch có thể được sử dụng trong sản xuất vacxin hoặc trong việc tạo kháng thể đa dòng hoặc kháng thể đơn dòng mà có thể được sử dụng để bảo vệ hoặc điều trị động vật có vú một cách thụ động.

Các thuật ngữ “vacxin” hoặc “chế phẩm vacxin”, các thuật ngữ này được sử dụng thay thế cho nhau, được dùng để chỉ chế phẩm chứa ít nhất một chế phẩm sinh miễn dịch mà gây ra đáp ứng miễn dịch ở động vật.

Theo một phương án của sáng chế, protein đang được quan tâm chứa kháng nguyên. Các thuật ngữ “kháng nguyên”, “chất sinh miễn dịch,” “có tính kháng nguyên”, “sinh miễn dịch”, “có hoạt tính kháng nguyên” và “có hoạt tính miễn dịch” khi được đưa ra liên quan đến phân tử, được dùng để chỉ chất bất kỳ mà có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch dịch thể và/hoặc đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào đặc hiệu. Theo một phương án, kháng nguyên chứa epitop, như được định nghĩa trên đây.

“Lượng bảo vệ miễn dịch”, như được sử dụng trong tài liệu này, là lượng kháng nguyên hữu hiệu để gây ra đáp ứng sinh miễn dịch ở đối tượng tiếp nhận mà thích hợp để phòng ngừa hoặc giảm nhẹ các dấu hiệu hoặc các triệu chứng của bệnh, bao gồm cả các tác dụng có hại cho sức khỏe hoặc các biến chứng của chúng. Có thể gây ra hiện tượng miễn dịch dịch thể hoặc hiện tượng miễn dịch qua trung gian tế bào hoặc cả hai. Có thể đánh giá đáp ứng sinh miễn dịch của động vật đối với chế phẩm, ví dụ, một cách gián tiếp thông qua việc đo hiệu giá kháng thể, thử nghiệm tăng sinh bạch huyết bào, hoặc một cách trực tiếp thông qua việc theo dõi các dấu hiệu và các triệu chứng sau khi thử nghiệm bằng vi sinh vật. Có thể đánh giá hiện tượng miễn dịch bảo vệ do chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vacxin đem lại bằng cách đo, ví dụ, mức giảm của tình trạng loại thải sinh vật thử nghiệm, mức giảm các dấu hiệu lâm sàng như tỷ lệ tử vong, tỷ lệ bệnh, nhiệt độ, và tình trạng thể lý tổng quát, sức khỏe và thể trạng của đối tượng. Đáp ứng miễn dịch có thể bao gồm, mà không giới hạn ở, gây ra hiện tượng miễn dịch tế bào và/hoặc hiện tượng miễn dịch dịch thể. Lượng của chế phẩm hoặc vacxin mà hữu hiệu trị liệu có thể thay đổi, tùy thuộc vào sinh vật cụ thể được sử dụng, hoặc tình trạng ở động vật đang được điều trị hoặc chủng ngừa.

“Đáp ứng miễn dịch”, hoặc “đáp ứng miễn dịch học” như được sử dụng trong tài liệu này, ở đối tượng được dùng để chỉ sự phát triển của đáp ứng miễn dịch dịch thể, đáp ứng miễn dịch tế bào, hoặc đáp ứng miễn dịch dịch thể và đáp ứng miễn dịch tế bào đối với kháng nguyên/chất sinh miễn dịch. Thuật ngữ “đáp ứng miễn dịch dịch thể” được dùng để chỉ đáp ứng mà ít nhất là một phần do các kháng thể gây ra. “Đáp ứng miễn

dịch tế bào” là đáp ứng do bạch huyết bào T hoặc các tế bào bạch huyết khác hoặc cả hai gây ra, và bao gồm quá trình sản xuất xytokin, chemokin và các phân tử tương đồng do tế bào T được hoạt hóa, tế bào bạch huyết, hoặc cả hai tạo ra. Có thể xác định các đáp ứng miễn dịch bằng cách sử dụng các thử nghiệm miễn dịch và các thử nghiệm trung hòa tiêu chuẩn, thử nghiệm này thì đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. “Tính sinh miễn dịch”, như được sử dụng trong tài liệu này, được dùng để chỉ khả năng protein hoặc polypeptit tạo ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu đối với vi khuẩn hoặc virus mà gây ra bệnh đã được nhận diện.

Mô tả tổng quát

Virus hợp bào hô hấp (RSV) là virus ARN dải đơn có chiều âm, đây là nguyên nhân hàng đầu của các lây nhiễm đường hô hấp nghiêm trọng ở trẻ sơ sinh và trẻ em, mà hiện tượng lây nhiễm sơ cấp xảy ra ở trẻ em từ 6 tuần đến 2 tuổi và không phổ biến ở 4 tuần tuổi đầu tiên trong suốt thời gian xảy ra các bệnh dịch ở bệnh viện (Hall et al., 1979, *New Engl. J. Med.* 300:393-396). (Feigen et al., eds., 1987, trong tài liệu: *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, W B Saunders, Philadelphia ở các trang 1653-1675; *New Vaccine Development, Establishing Priorities*, Vol. 1, 1985, National Academy Press, Washington D.C. ở các trang 397-409; Ruuskanen et al., 1993, *Curr. Probl. Pediatr.* 23:50-79; Hall et al., 1979, *New Engl. J. Med.* 300:393-396). Các cộng đồng trẻ em nhất định thì có nguy cơ phát triển tình trạng lây nhiễm RSV và cộng đồng này bao gồm trẻ sơ sinh sinh non (Hall et al., 1979, *New Engl. J. Med.* 300:393-396), trẻ em có dị tật bẩm sinh khí đạo, trẻ em có bệnh loạn sản phế quản-phổi (Groothuis et al., 1988, *Pediatrics* 82:199-203), trẻ em có bệnh tim bẩm sinh (MacDonald et al., *New Engl. J. Med.* 307:397-400), và trẻ em có chứng suy giảm miễn dịch bẩm sinh hoặc chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (Ogra et al., 1988, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 7:246-249; và Pohl et al., 1992, *J. Infect. Dis.* 165:166-169), và xơ nang (Abman et al., 1988, *J. Pediatr.* 113:826-830).

RSV cũng có thể lây nhiễm cộng đồng người lớn nữa. Trong cộng đồng này, RSV chủ yếu gây ra bệnh đường hô hấp trên, mặc dù các bệnh nhân cao tuổi có thể có nguy cơ cao hơn đối với lây nhiễm nghiêm trọng và viêm phổi (Evans, A. S., eds., 1989, *Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control*, 3rd ed., Plenum Medical Book,

New York ở các trang 525-544), cũng như người lớn mà bị ức chế miễn dịch, cụ thể là bệnh nhân cấy ghép tủy xương (Hertz et al., 1989, *Medicine* 68:269-281). Các bệnh nhân có nguy cơ khác bao gồm những người mắc bệnh suy tim sung huyết và những người mắc bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (tức là COPD). Cũng đã có các báo cáo về các bệnh dịch trong số các bệnh nhân tại viện dưỡng lão và người lớn trẻ tuổi sống ở cơ sở từ thiện (Falsey, A. R., 1991, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 12:602-608; và Garvie et al., 1980, *Br. Med. J.* 281:1253-1254).

Trong khi các tùy chọn điều trị đối với bệnh RSV đã được xác lập thì hạn chế, thì các dạng bệnh đường hô hấp dưới trầm trọng hơn thường đòi hỏi biện pháp chăm sóc hỗ trợ đáng kể, bao gồm cả phương pháp cho dùng oxy được làm ẩm và biện pháp trợ giúp hô hấp (Fields et al., eds, 1990, *Fields Virology*, 2nd ed., Vol. 1, Raven Press, New York ở các trang 1045-1072).

Ribavirin, đây là thuốc duy nhất được phê duyệt dùng cho việc điều trị lây nhiễm, đã thể hiện là hữu hiệu trong việc điều trị viêm phổi và viêm tiểu phế quản gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV, và đã thể hiện là cải biến tiến trình của bệnh RSV trầm trọng ở trẻ em có khả năng miễn dịch bình thường (Smith et al., 1991, *New Engl. J. Med.* 325:24-29). Tuy nhiên, việc sử dụng ribavirin bị hạn chế do các quan ngại xung quanh nguy cơ tiềm tàng của nó đối với phụ nữ có thai mà có thể tiếp xúc với thuốc được sol khí hóa trong khi họ được điều trị trong môi trường bệnh viện. Việc sử dụng nó cũng bị hạn chế do giá thành tương đối cao của nó.

Các chất ức chế peptit khác đối với tình trạng lây nhiễm RSV đã được nhận diện, chất này ức chế quá trình sinh trưởng của virus in vitro, nhưng đã thất bại khi được thử nghiệm in vivo, chắc chắn hơn cả là do thiếu tính khả dụng đường miệng và thời gian bán hủy tương đối thấp trong hệ tuần hoàn (Lambert, D.M., et al. (1996), *PNAS (USA)* 93:2186-2191; Magro, M. et al., (2010), *J. Virol.* 84:7970-7982; Park, M. et al. (2011), *Anal. Biochem.* 409:195-201).

Các chất ức chế phân tử nhỏ khác đối với tình trạng lây nhiễm RSV cũng đã được nhận diện, nhưng đã bị ngừng vì các lý do khác nhau, một số bao gồm cả thể là do các tác dụng phụ độc hại (Wyde, P.R. et al. (1998), *Antiviral Res.* 38:31-42; Nikitenko,

A.A. et al. (2001), *Bioorg Med Chem Lett* 11:1041-1044; Douglas, J.L., et al. (2003), *J. Virol* 77:5054-5064; Bonfanti, J.F. et al, (2008), *J. Med Chem* 51:875-896).

Tương tự, trong khi vacxin có thể là hữu ích, nhưng, cho đến nay, vẫn chưa phát triển được một vacxin thương mại nào. Một vài ứng viên vacxin đã bị bỏ và số khác thì đang trong quá trình phát triển (Murphy et al., 1994, *Virus Res.* 32:13-36). Sự phát triển của vacxin đã bộc lộ là có vấn đề. Cụ thể là, việc gây miễn dịch là cần thiết trong giai đoạn sơ sinh tức thì vì tỷ lệ mắc phải đỉnh của bệnh đường hô hấp dưới xảy ra ở thời điểm từ 2 đến 5 tháng tuổi. Tuy nhiên, đã biết được rằng đáp ứng miễn dịch sơ sinh là chưa thành thực ở thời điểm đó. Ngoài ra, trẻ sơ sinh ở thời điểm đó vẫn có hiệu giá kháng thể RSV cao có được từ mẹ, điều này có thể làm giảm tính sinh miễn dịch của vacxin (Murphy et al., 1988, *J. Virol.* 62:3907-3910; và Murphy et al., 1991, *Vaccine* 9:185-189).

Hiện nay, phương pháp gây miễn dịch thụ động đường như là phương pháp được phê duyệt duy nhất cho việc phòng bệnh RSV. Bằng chứng ban đầu mà đã cho thấy vai trò bảo vệ của IgG là thu được từ các nghiên cứu chứng minh kháng thể từ mẹ ở chồn sương (Prince, G. A., Ph.D. diss., University of California, Los Angeles, 1975) và người (Lambrecht et al, 1976, *J. Infect. Dis.* 134:211-217; và Glezen et al., 1981, *J. Pediatr.* 98:708-715).

Hemming et al. (Morell et al., eds., 1986, *Clinical Use of Intravenous Immunoglobulins*, Academic Press, London ở các trang 285-294) đã nhận ra công dụng có thể có của kháng thể RSV trong việc điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng lây nhiễm RSV trong suốt các nghiên cứu liên quan đến tính được động của globulin miễn dịch dùng vào tĩnh mạch (intravenous immune globulin-IVIG) ở trẻ mới sinh bị nghi có tình trạng nhiễm khuẩn sơ sinh. Sau đó, cùng một nhóm nhà nghiên cứu này đã kiểm tra khả năng của huyết thanh tăng miễn dịch hoặc globulin miễn dịch, được làm giàu về kháng thể trung hòa RSV, để bảo vệ chuột bông và linh trưởng chống lại tình trạng lây nhiễm RSV (Prince et al., 1985, *Virus Res.* 3:193-206; Prince et al., 1990, *J. Virol.* 64:3091-3092; Hemming et al., 1985, *J. Infect. Dis.* 152:1083-1087; Prince et al., 1983, *Infect. Immun.* 42:81-87; và Prince et al., 1985, *J. Virol.* 55:517-520). Các kết quả của các nghiên cứu này cho thấy rằng kháng thể trung hòa RSV được cho dùng với mục đích

phòng bệnh đã ức chế quá trình sao chép ở đường hô hấp của RSV ở chuột bông. Khi được cho dùng với mục đích trị liệu, kháng thể RSV đã làm giảm mức sao chép virus ở phổi cả ở mô hình chuột bông và ở mô hình linh trưởng không phải là người.

Các nghiên cứu gần đây hơn đã tập trung vào vai trò của hai glycoprotein, được đặt tên là F và G, chất này được tìm thấy trên bề mặt của RSV, trong vai trò là đích của các kháng thể trung hòa, do vai trò của các glycoprotein này trong quá trình gắn kết và dung hợp virus với tế bào chủ (Fields et al., 1990, trên đây; và Murphy et al., 1994, trên đây). Protein G liên kết với thụ thể tế bào cụ thể và protein F thúc đẩy quá trình dung hợp virus với tế bào. Protein F cũng được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào bị nhiễm và chịu trách nhiệm về quá trình dung hợp kế tiếp với các tế bào khác dẫn đến quá trình tạo hợp tử. Vì vậy, các kháng thể của protein F có thể trực tiếp trung hòa virus, hoặc phong bế quá trình dung hợp virus với tế bào, hoặc phòng ngừa tình trạng lây lan từ tế bào này sang tế bào khác bằng cách phòng ngừa quá trình tạo hợp tử.

Kháng thể được làm cho giống của người thứ nhất được phê duyệt để sử dụng ở các bệnh nhi dùng để phòng ngừa bệnh đường hô hấp dưới nghiêm trọng do RSV gây ra là palivizumab (SYNAGIS®), đây là kháng thể liên kết đặc hiệu miễn dịch với protein F và được cho dùng vào trong cơ ở liều hằng tháng được khuyến nghị là 15mg/kg thể trọng suốt mùa RSV (tháng 11 đến tháng 4 ở bán cầu bắc). SYNAGIS® bao gồm 95% trình tự kháng thể của người và 5% trình tự kháng thể của chuột. (xem tài liệu: Johnson et al., 1997, J. Infect. Diseases 176:1215-1224 và Patent Mỹ số 5,824,307).

Trong khi SYNAGIS® đã được sử dụng một cách thành công cho việc phòng ngừa tình trạng lây nhiễm RSV ở các bệnh nhi, nhu cầu phải đến phòng khám bác sĩ nhiều lần vì nhiều lần dùng liều lượng vào trong cơ là 15mg/kg của SYNAGIS® thì không chỉ bất tiện cho bệnh nhân, mà còn có thể gây ra tình trạng bỏ lỡ liều. Vì vậy, có nhu cầu về việc phát triển các kháng thể mà giữ lại được tính đặc hiệu miễn dịch đối với kháng nguyên RSV, nhưng kháng thể này thì hiệu nghiệm hơn, với đặc tính được động tốt hơn, và vì vậy mà có đặc tính trị liệu tổng thể tốt hơn. Kháng thể này được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ 2003/0091584 và được biết đến với tên gọi là motavizumab (NUMAX™). Mặc dù NUMAX™ có các đặc tính liên kết tốt hơn mà có thể khắc phục các yêu cầu về liều dùng cao hơn được mô tả trên đây đối với

SYNAGIS®, nhưng cũng đã có mức tăng từ 3 đến 5 lần về tần suất và mức độ trầm trọng của các phản ứng quá mẫn so với SYNAGIS®. Sau đó, NUMAX™ bị rút khỏi chương trình phát triển trong tương lai.

Do vậy, vẫn có nhu cầu về các liệu pháp hữu hiệu chống lại tình trạng lây nhiễm RSV, và cụ thể là, có nhu cầu nhận diện kháng thể hiệu nghiệm hơn dùng để phòng ngừa và điều trị tình trạng lây nhiễm RSV, nhưng không có các tác dụng phụ có hại gắn liền với những loại được mô tả trên đây. Các kháng thể được mô tả trong tài liệu này, trong khi thể hiện ái lực liên kết thấp hơn đối với RSV-F (tức là các kháng thể theo sáng chế không liên kết chặt vào RSV-F bằng palivizumab) so với ái lực liên kết được mô tả đối với palivizumab hoặc motavizumab dường như thể hiện khả năng trung hòa tốt hơn và giải quyết các nhu cầu đó.

Theo các phương án cụ thể, các kháng thể theo sáng chế là thu được từ các con chuột được gây miễn dịch bằng chất sinh miễn dịch sơ cấp, như hạt RSV nguyên, hoặc là sống, được làm yếu, hoặc bị bất hoạt, hoặc bằng dạng virus tái tổ hợp, hoặc bằng protein F đã được tinh chế (xem số truy cập GenBank AAX23994.1 (SEQ ID NO: 354)), hoặc protein F được sản xuất theo cách tái tổ hợp (xem SEQ ID NO: 353), sau đó là gây miễn dịch bằng chất sinh miễn dịch thứ cấp (virus nguyên, hoặc protein F đã được tinh chế), hoặc bằng đoạn có hoạt tính sinh miễn dịch của protein F.

Chất sinh miễn dịch có thể là ADN mã hóa protein F hoặc một đoạn có hoạt tính của nó.

Chất sinh miễn dịch có thể được tạo ra từ miền đầu cuối N hoặc đầu cuối C của chất tiền thân 67KDa (F0), hoặc từ một trong hai đoạn được tạo ra từ chất tiền thân bằng proteaza tương tự furin thu được hai polypeptit được liên kết bằng disulfua, được gọi tên là F2 và F1, lần lượt từ đầu cuối N và đầu cuối C. Đoạn này có thể được tạo ra từ vùng bất kỳ trong số các vùng đã biết của protein RSV-F (xem tài liệu: Sun, Z. et al. (2013), Viruses 5:211-225).

Trình tự axit amin có độ dài đầy đủ của RSV-F được thể hiện là SEQ ID NO: 354 và cũng được thể hiện trong số truy cập GenBank AAX23994.1.

Cấu trúc gen chứa protein F của RSV được thể hiện là SEQ ID NO: 353.

Theo các phương án cụ thể, các kháng thể mà liên kết đặc hiệu với RSV-F có thể được điều chế bằng cách sử dụng các đoạn của các vùng được nêu trên đây, hoặc các peptit mà kéo dài vượt quá các vùng đã được đặt tên là 5 đến 20 gốc axit amin tính từ một trong hai đầu cuối N hoặc C, hoặc cả hai đầu cuối N hoặc C của các vùng được mô tả trong tài liệu này. Theo các phương án cụ thể, dạng kết hợp bất kỳ của các vùng được nêu trên đây hoặc các đoạn của chúng có thể được sử dụng trong việc điều chế các kháng thể đặc hiệu với RSV-F. Theo các phương án cụ thể, một hoặc nhiều vùng bất kỳ trong số các vùng được nêu trên đây của RSV-F, hoặc các đoạn của chúng có thể được sử dụng để điều chế các kháng thể đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép, hoặc đa đặc hiệu.

Các đoạn liên kết kháng nguyên của các kháng thể

Trừ khi được quy định cụ thể khác, thuật ngữ “kháng thể,” như được sử dụng trong tài liệu này, sẽ được hiểu là bao hàm các phân tử kháng thể chứa hai chuỗi nặng của globulin miễn dịch và hai chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch (tức là, “phân tử kháng thể đầy đủ”) cũng như các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng. Các thuật ngữ “phần liên kết kháng nguyên” của kháng thể, “đoạn liên kết kháng nguyên” của kháng thể, và các thuật ngữ tương tự, như được sử dụng trong tài liệu này, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein có trong tự nhiên, thu được bằng phản ứng enzym, tổng hợp hoặc được thao tác gen mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo phức hợp. Các thuật ngữ “phần liên kết kháng nguyên” của kháng thể, hoặc “đoạn kháng thể”, như được sử dụng trong tài liệu này, được dùng để chỉ một hoặc nhiều đoạn của kháng thể mà giữ lại khả năng liên kết đặc hiệu với RSV-F. Đoạn kháng thể có thể bao gồm đoạn Fab, đoạn $F(ab')_2$, đoạn Fv, đoạn dAb, đoạn chứa CDR, hoặc CDR đã được phân lập. Các đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể được tạo ra, ví dụ, từ các phân tử kháng thể đầy đủ bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp bất kỳ như kỹ thuật phân cắt bằng thủy phân protein hoặc kỹ thuật thao tác gen tái tổ hợp có liên quan đến việc thao tác và biểu hiện ADN mã hóa miền ổn định và miền biến đổi của kháng thể (tùy ý). ADN này thì đã biết và/hoặc dễ tìm từ, ví dụ, các nguồn thương mại, thư viện ADN (bao gồm, ví dụ, thư viện thể thực khuẩn-kháng thể), hoặc có thể được tổng hợp. ADN có thể được giải trình tự và được xử lý hóa học hoặc bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử, ví dụ, để sắp xếp một hoặc nhiều miền biến đổi và/hoặc miền ổn định thành cấu hình thích hợp, hoặc để đưa codon vào, tạo ra gốc xystein, cải biến, thêm hoặc xóa bỏ

các axit amin, v.v.

Các ví dụ không hạn chế về các đoạn liên kết kháng nguyên bao gồm: (i) đoạn Fab; (ii) đoạn $F(ab')_2$; (iii) đoạn Fd; (iv) đoạn Fv; (v) phân tử Fv mạch đơn (scFv); (vi) đoạn dAb; và (vii) các đơn vị nhận biết tối thiểu bao gồm các gốc axit amin bắt chước vùng siêu biến của kháng thể (ví dụ, vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) đã được phân lập như peptit CDR3), hoặc peptit FR3-CDR3-FR4 bị giới hạn. Các phân tử được thao tác gen khác, như kháng thể đặc hiệu miễn, kháng thể một miền, kháng thể bị xóa bỏ miền, kháng thể thể khảm, kháng thể được ghép CDR, song thể, thể ba, thể bốn, tiểu kháng thể, kháng thể nano (ví dụ, kháng thể nano hóa trị một, kháng thể nano hóa trị hai, v.v.), dược chất miễn dịch cấu kiện nhỏ (small modular immunopharmaceutical-SMIP), và miền IgNAR biến đổi của cá mập, cũng được bao gồm trong thuật ngữ “đoạn liên kết kháng nguyên”, như được sử dụng trong tài liệu này.

Đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể thường chứa ít nhất một miền biến đổi. Miền biến đổi có thể có kích thước hoặc thành phần axit amin bất kỳ và thường chứa ít nhất một CDR liền kề với hoặc nằm trong khung với một hoặc nhiều trình tự khung. Trong các đoạn liên kết kháng nguyên có miền V_H gắn liền với miền V_L , thì các miền V_H và V_L có thể nằm cân xứng với nhau theo cách sắp xếp thích hợp bất kỳ. Ví dụ, vùng biến đổi có thể là dạng dimer và chứa các dimer $V_H - V_H$, $V_H - V_L$ hoặc $V_L - V_L$. Theo cách khác, đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa miền V_H hoặc V_L dạng monome.

Theo các phương án cụ thể, đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất một miền biến đổi được liên kết cộng hóa trị với ít nhất một miền ổn định. Các cấu hình không hạn chế tiêu biểu của miền biến đổi và miền ổn định mà có thể được tìm thấy trong đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bao gồm: (i) $V_H - C_{H1}$; (ii) $V_H - C_{H2}$; (iii) $V_H - C_{H3}$; (iv) $V_H - C_{H1} - C_{H2}$; (v) $V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}$; (vi) $V_H - C_{H2} - C_{H3}$; (vii) $V_H - C_L$; (viii) $V_L - C_{H1}$; (ix) $V_L - C_{H2}$; (x) $V_L - C_{H3}$; (xi) $V_L - C_{H1} - C_{H2}$; (xii) $V_L - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3}$; (xiii) $V_L - C_{H2} - C_{H3}$; và (xiv) $V_L - C_L$. Theo cấu hình bất kỳ của miền biến đổi và miền ổn định, kể cả cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình tiêu biểu được liệt kê trên đây, miền biến đổi và miền ổn định có thể được liên kết một cách trực tiếp với nhau hoặc có thể được liên kết bằng vùng liên kết hoặc vùng bản lề một phần hoặc toàn bộ. Vùng bản lề có thể bao gồm ít nhất 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc

nhiều hơn) axit amin mà tạo ra liên kết linh động hoặc bán linh động giữa các miền biến đổi và/hoặc ổn định liên kết trong một phân tử polypeptit đơn lẻ. Ngoài ra, đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm đime cùng loại hoặc đime khác loại (hoặc multimer khác) của cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình miền biến đổi và miền ổn định được liệt kê trên đây được liên kết không cộng hóa trị với nhau và/hoặc với một hoặc nhiều miền V_H hoặc V_L monome (ví dụ, bằng (các) liên kết disulfua).

Đối với phân tử kháng thể đầy đủ, các đoạn liên kết kháng nguyên có thể có tính đặc hiệu đơn hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Đoạn liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu của kháng thể thường chứa ít nhất hai miền biến đổi khác nhau, trong đó mỗi miền biến đổi có khả năng liên kết đặc hiệu với một kháng nguyên riêng rẽ hoặc với epitop khác trên cùng một kháng nguyên. Dạng thức kháng thể đa đặc hiệu bất kỳ, kể cả các dạng thức kháng thể đặc hiệu kép tiêu biểu được bộc lộ trong tài liệu này, có thể được điều chỉnh để sử dụng trong phạm vi đoạn liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường sẵn có trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Điều chế các kháng thể của người

Các phương pháp tạo các kháng thể của người ở chuột chuyển gen thì đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Có thể sử dụng các phương pháp như vậy đã biết bất kỳ theo văn cảnh của sáng chế để tạo các kháng thể của người mà liên kết đặc hiệu với RSV-F.

Sử dụng công nghệ VELOCIMMUNE® (ví dụ, xem, US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) hoặc phương pháp đã biết bất kỳ khác dùng để tạo các kháng thể đơn dòng, các kháng thể thể khảm ái lực cao đối với RSV-F được phân lập đầu tiên có vùng biến đổi của người và vùng ổn định của chuột. Công nghệ VELOCIMMUNE® liên quan đến việc tạo chuột chuyển gen có hệ gen chứa các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của người được liên kết theo cách có thể chỉ huy vào với ổ gen vùng ổn định nội sinh của chuột sao cho chuột tạo ra được kháng thể chứa vùng biến đổi của người và vùng ổn định của chuột khi đáp ứng lại tình trạng kích thích kháng nguyên. ADN mã hóa các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được phân lập và được liên kết theo cách có thể chỉ huy vào với ADN mã hóa vùng

ổn định của chuỗi nhẹ và vùng ổn định của chuỗi nặng của người. Sau đó, ADN được biểu hiện trong tế bào có khả năng biểu hiện kháng thể hoàn toàn của người.

Nhìn chung, chuột VELOCIMMUNE® được thử bằng kháng nguyên đang được quan tâm, và các tế bào bạch huyết (như tế bào B) được thu hồi từ chuột biểu hiện các kháng thể. Các tế bào bạch huyết có thể được dung hợp với dòng tế bào u tủy để điều chế các dòng tế bào lai sinh sản vô hạn định, và các dòng tế bào lai này được sàng lọc và lựa chọn để nhận diện các dòng tế bào lai mà tạo ra các kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên đang được quan tâm. ADN mã hóa các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được phân lập và được liên kết với các vùng ổn định kiểu tương đương thích hợp của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Có thể sản xuất protein kháng thể này trong tế bào, như tế bào CHO. Theo cách khác, có thể phân lập ADN mã hóa kháng thể thể khảm đặc hiệu với kháng nguyên hoặc các miền biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng một cách trực tiếp từ bạch huyết bào đặc hiệu với kháng nguyên.

Ban đầu, các kháng thể thể khảm ái lực cao được phân lập có vùng biến đổi của người và chuột vùng ổn định. Như trong phần thử nghiệm dưới đây, các kháng thể được xác định đặc điểm và được lựa chọn về đặc tính mong muốn, bao gồm cả ái lực, tính chọn lọc, epitop, v.v. Các vùng ổn định của chuột được thay thế bằng vùng ổn định mong muốn của người để tạo ra kháng thể hoàn toàn của người theo sáng chế, ví dụ, IgG1 hoặc IgG4 kiểu hoang dại hoặc đã được cải biến. Trong khi vùng ổn định được lựa chọn có thể thay đổi theo mục đích sử dụng cụ thể, thì đặc tính liên kết kháng nguyên ái lực cao và đặc tính đặc hiệu đích nằm ở vùng biến đổi.

Theo các phương án cụ thể, các kháng thể theo sáng chế này có ái lực (K_D) nằm trong khoảng từ $1,0 \times 10^{-7}M$ đến $1,0 \times 10^{-12}M$, khi được đo theo mức liên kết với kháng nguyên được làm bất động trên pha rắn hoặc trong pha dung dịch. Theo các phương án cụ thể, các kháng thể theo sáng chế có ái lực (K_D) nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{-7}M$ đến $6 \times 10^{-10}M$, khi được đo theo mức liên kết với kháng nguyên được làm bất động trên pha rắn hoặc trong pha dung dịch. Theo các phương án cụ thể, các kháng thể theo sáng chế có ái lực (K_D) nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{-7}M$ đến $9 \times 10^{-10}M$, khi được đo theo mức liên kết với kháng nguyên được làm bất động trên pha rắn hoặc trong pha dung dịch. Các vùng ổn định của chuột được thay thế bằng các vùng ổn định mong muốn của người để

tạo ra các kháng thể hoàn toàn của người theo sáng chế. Trong khi vùng ổn định được lựa chọn có thể thay đổi theo mục đích sử dụng cụ thể, thì đặc tính liên kết kháng nguyên ái lực cao và đặc tính đặc hiệu đích nằm ở vùng biến đổi. Thật ngạc nhiên là, các kháng thể nhất định theo sáng chế, trong khi thể hiện ái lực thấp hơn so với motavizumab, thì lại hiệu nghiệm hơn về phương diện trung hòa virus.

Tương đương sinh học

Các kháng thể kháng RSV-F và các đoạn kháng thể theo sáng chế bao hàm protein có các trình tự axit amin mà thay đổi so với các trình tự axit amin của kháng thể đã được mô tả, nhưng giữ lại khả năng liên kết RSV-F. Các kháng thể biến thể và đoạn kháng thể như vậy chứa một hoặc nhiều đoạn thêm, đoạn xóa bỏ hoặc đoạn thay thế axit amin so với trình tự cha mẹ, nhưng thể hiện hoạt tính sinh học về cơ bản tương đương với hoạt tính sinh học của kháng thể đã được mô tả. Cũng vậy, các trình tự ADN mã hóa kháng thể theo sáng chế bao hàm các trình tự mà chứa một hoặc nhiều đoạn thêm, đoạn xóa bỏ hoặc đoạn thay thế nucleotit so với trình tự được bộc lộ, nhưng mã hóa kháng thể hoặc đoạn kháng thể mà về cơ bản tương đương sinh học với kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo sáng chế.

Hai protein liên kết kháng nguyên, hoặc kháng thể, được coi là tương đương sinh học nếu, ví dụ, chúng là đương lượng được phẩm hoặc lựa chọn thay thế được phẩm mà tốc độ và mức độ hấp thu của chúng không thể hiện sự chênh lệch đáng kể khi được cho dùng ở cùng một mức liều theo mol trong các điều kiện thử nghiệm tương tự, ở dạng liều đơn hoặc liều đa. Một số kháng thể sẽ được coi là các đương lượng hoặc lựa chọn thay thế được phẩm nếu chúng tương đương về mức độ hấp thu nhưng không tương đương về tốc độ hấp thu và vẫn có thể được coi là tương đương sinh học bởi vì các khác biệt về tốc độ hấp thu này là có chủ đích và được phản ánh ở nhãn, không thiết yếu để đạt được nồng độ thuốc trong cơ thể có hiệu quả đối với việc sử dụng kinh niên chẳng hạn, và được coi là không đáng kể về mặt y học đối với sản phẩm thuốc cụ thể được nghiên cứu.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu độ an toàn, độ tinh khiết và độ hiệu nghiệm của chúng không có sự chênh lệch có ý nghĩa về mặt lâm sàng.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học

nếu bệnh nhân có thể được chuyển một hoặc nhiều lần giữa sản phẩm tham chiếu và sản phẩm sinh học mà không làm tăng nguy cơ gặp phải các tác dụng phụ có hại, kể cả thay đổi về tính gây miễn dịch có ý nghĩa về mặt lâm sàng, hoặc hiệu quả giảm, so với liệu pháp điều trị liên tục không đổi thuốc.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu chúng đều có tác dụng thông qua một hoặc nhiều cơ chế tác dụng chung đối với một hoặc nhiều tình trạng bệnh, đến mức mà các cơ chế này thì đã biết.

Đặc tính tương đương sinh học có thể được chứng minh bằng các phương pháp *in vivo* và/hoặc *in vitro*. Các phương pháp đo đặc tính tương đương sinh học bao gồm, ví dụ, (a) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc các động vật có vú khác, mà trong đó nồng độ của kháng thể hoặc các sản phẩm chuyển hóa của nó được đo trong máu, huyết tương, huyết thanh, hoặc dịch sinh học khác ở dạng hàm số thời gian; (b) thử nghiệm *in vitro* mà đã tương quan với và có tính dự báo hợp lý về dữ liệu sinh khả dụng *in vivo* ở người; (c) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc động vật có vú khác mà trong đó tác dụng dược lý tức thời thích hợp của kháng thể (hoặc đích của nó) được đo ở dạng hàm số thời gian; và (d) trong thử nghiệm lâm sàng được kiểm soát tốt mà xác lập được độ an toàn, tính hiệu quả, hoặc độ sinh khả dụng hoặc đặc tính tương đương sinh học của kháng thể.

Các biến thể tương đương sinh học của các kháng thể theo sáng chế có thể được kiến tạo bằng cách, ví dụ, tạo ra các đoạn thay thế khác nhau của các gốc hoặc các trình tự hoặc xóa bỏ các trình tự hoặc gốc ở đầu cuối hoặc bên trong không cần thiết cho hoạt tính sinh học. Ví dụ, các gốc xystein không thiết yếu cho hoạt tính sinh học có thể được xóa bỏ hoặc được thay thế bằng các axit amin khác để ngăn ngừa hiện tượng tạo thành các cầu disulfua nội phân tử không đúng hoặc không cần thiết sau quá trình hồi tính. Trong các trường hợp khác, các kháng thể tương đương sinh học có thể bao gồm các biến thể của kháng thể có các thay đổi axit amin mà cải biến các đặc tính glycosyl hoá của kháng thể, ví dụ, các đột biến mà làm mất hoặc loại bỏ quá trình glycosyl hoá.

Các đặc tính sinh học của kháng thể

Nhìn chung, các kháng thể theo sáng chế có thể thực hiện chức năng bằng cách liên kết với RSV-F và hoạt động như vậy để phong bế quá trình dung hợp màng virut với màng tế bào chủ. Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể thực hiện chức năng bằng

cách liên kết với RSV-F và làm như vậy để phong bế tình trạng lây lan từ tế bào này sang tế bào khác của virus và phong bế quá trình tạo hợp tử gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV của tế bào.

Theo các phương án cụ thể, các kháng thể theo sáng chế có thể thực hiện chức năng bằng cách phong bế hoặc ức chế quá trình dung hợp RSV với màng tế bào bằng cách liên kết với đoạn hoặc vùng bất kỳ khác của protein F nguyên thể có chiều dài đầy đủ, trình tự axit amin của protein này được thể hiện trong SEQ ID NO: 354, còn được thể hiện là số truy cập GenBank AAX23994.1. Các kháng thể cũng có thể liên kết với vùng bất kỳ mà được tìm thấy trong SEQ ID NO: 353, hoặc với đoạn được tìm thấy trong SEQ ID NO: 353.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với protein F của phân nhóm A hoặc B của RSV, trong đó kháng thể này hoặc đoạn của nó thể hiện một hoặc nhiều đặc điểm dưới đây: (a) là kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người; (b) thể hiện K_D nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{-7}M$ đến $6 \times 10^{-10}M$; (c) có khả năng trung hòa chủng phân nhóm A và phân nhóm B của virus hợp bào hô hấp *in vitro*; (d) thể hiện khả năng làm giảm một cách đáng kể tổng lượng virus ở mô hình động vật của tình trạng lây nhiễm RSV (e) thể hiện mức giảm hiệu giá virus ở mũi và/hoặc hiệu giá virus ở phổi lớn hơn từ 1 đến 2 lần hàm logarit so với palivizumab; (f) thể hiện liều lượng hữu hiệu 99 (ED_{99}) là 0,15mg/kg hoặc thấp hơn khi được cho dùng theo phương thức dưới da ở mô hình chuột của tình trạng lây nhiễm phân nhóm A của RSV, hoặc ED_{99} là 0,62mg/kg hoặc thấp hơn khi được cho dùng ở mô hình chuột bông của tình trạng lây nhiễm phân nhóm A của RSV, hoặc ED_{99} là 2,5mg/kg hoặc thấp hơn khi được cho dùng ở mô hình chuột bông của tình trạng lây nhiễm phân nhóm B của RSV; (g) thể hiện ED_{99} thấp hơn 2 đến 3 lần so với ED_{99} của palivizumab hoặc motavizumab; (h) thể hiện độ hiệu nghiệm trung hòa đối với một hoặc nhiều chủng phòng thí nghiệm phân nhóm A của RSV mà có mức cải thiện từ 15 đến 17 lần so với palivizumab, hoặc thể hiện độ hiệu nghiệm trung hòa đối với một hoặc nhiều chủng lâm sàng phân nhóm A của RSV mà có mức cải thiện từ 10 đến 22 lần so với palivizumab; (i) thể hiện độ hiệu nghiệm trung hòa đối với chủng phòng thí nghiệm phân nhóm B của RSV mà có mức cải thiện từ 2 đến 5 lần so với palivizumab (j) thể hiện độ hiệu nghiệm trung hòa đối với chủng phòng thí nghiệm hoặc

chủng lâm sàng phân nhóm A của RSV mà có mức cải thiện từ 0,5 đến 2 lần so với AM-22; (k) thể hiện độ hiệu nghiệm trung hòa đối với một hoặc nhiều chủng phòng thí nghiệm phân nhóm B của RSV mà có mức cải thiện từ 2,5 đến 17 lần so với AM-22; (l) chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322 và 338, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (m) chứa LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330 và 346, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (n) chứa miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, và 344, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% và miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336 và 352, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (o) chứa miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324 và 340, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326 và 342, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332 và 348, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334 và 350, hoặc một trình tự về cơ bản tương đồng

của nó có mức đồng nhất trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (p) tương tác với trình tự axit amin chứa các gốc nằm trong khoảng từ vị trí 161 đến vị trí 188 của SEQ ID NO: 354; (q) tương tác với hoặc serin ở vị trí 173 của SEQ ID NO: 354, hoặc threonin ở vị trí 174 của SEQ ID NO: 354, hoặc cả serin ở vị trí 173 của SEQ ID NO: 354 và threonin ở vị trí 174 của SEQ ID NO: 354; (r) không cạnh tranh chéo với palivizumab hoặc motavizumab để liên kết với protein RSV-F; (s) ức chế quá trình dung hợp virut với tế bào.

Các kháng thể kháng RSV-F nhất định theo sáng chế có thể liên kết với protein F của RSV và trung hòa khả năng gây nhiễm của cả phân nhóm A và phân nhóm B của RSV như được xác định bằng thử nghiệm *in vitro*. Có thể đo khả năng của các kháng thể theo sáng chế trong việc liên kết với và trung hòa khả năng gây nhiễm của các phân nhóm của RSV bằng cách sử dụng phương pháp tiêu chuẩn bất kỳ mà chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết, bao gồm cả các thử nghiệm liên kết, hoặc các thử nghiệm trung hòa, hoặc các thử nghiệm bảo vệ *in vivo*, như được mô tả trong tài liệu này.

Các thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* tiêu biểu, không hạn chế dùng để đo hoạt tính liên kết và mức trung hòa *in vitro* và tính hiệu quả *in vivo* được minh họa trong các ví dụ 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 và 12 trong tài liệu này. Trong ví dụ 3, ái lực liên kết và các hằng số động học của các kháng thể kháng RSV-F của người được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt và các phép đo được thực hiện trên công cụ Biacore 4000 hoặc T200. Trong ví dụ 4, độ hiệu nghiệm của các kháng thể được kiểm tra trong thử nghiệm trung hòa vi lượng RSV. Ví dụ 5 thể hiện khả năng của các kháng thể theo sáng chế trong việc trung hòa tình trạng lây nhiễm RSV *in vivo* ở hai mô hình động vật khác nhau. Các ví dụ 7 và 8 thể hiện sự tương tác của các kháng thể theo sáng chế với vị trí liên kết cụ thể trên protein RSV-F. Các ví dụ 9 và 10 thể hiện khả năng trung hòa của các kháng thể với một vài chủng phòng thí nghiệm và chủng lâm sàng của các phân nhóm A và B của RSV. Ví dụ 11 thể hiện khả năng của các kháng thể theo sáng chế trong việc ức chế quá trình dung hợp virut với tế bào. Ví dụ 12 thể hiện tình trạng cạnh tranh chéo của các kháng thể khác nhau để liên kết với RSV-F.

Lập bản đồ epitop và các công nghệ có liên quan

Có thể sử dụng các kỹ thuật khác nhau mà chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết

để xác định xem liệu một kháng thể nào đó có “tương tác với một hoặc nhiều axit amin” trong polypeptit hoặc protein hay không. Các kỹ thuật tiêu biểu bao gồm, ví dụ, thử nghiệm phong bế chéo thông thường như thử nghiệm được mô tả trong tài liệu: Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY) có thể được thực hiện. Các phương pháp khác bao gồm phép phân tích đột biến quét alanin, phân tích thâm tách peptit (Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248:443-63), các nghiên cứu tinh thể học về phép phân tích phân cắt peptit và phép phân tích NMR. Ngoài ra, cũng có thể sử dụng các phương pháp như cắt epitop, chiết epitop và cải biến hóa học kháng nguyên (Tomer (2000) *Protein Science* 9: 487-496). Một phương pháp khác mà có thể được sử dụng để nhận diện các axit amin trong polypeptit mà tương tác với kháng thể là trao đổi hydro/deuteri được phát hiện bằng phép đo phổ khối. Nhìn chung, phương pháp trao đổi hydro/deuteri có liên quan đến việc đánh dấu deuteri protein đang được quan tâm, sau đó là liên kết kháng thể với protein đã đánh dấu deuteri. Tiếp theo, phức hợp protein/kháng thể được chuyển vào nước và proton có thể trao đổi được trong các axit amin mà được bảo vệ bởi phức hợp kháng thể trải qua quá trình trao đổi ngược deuteri với hydro ở tốc độ chậm hơn so với proton có thể trao đổi được trong các axit amin mà không phải là một phần của mặt phân cách. Kết quả là, các axit amin mà tạo thành một phần của mặt phân cách protein/kháng thể có thể giữ lại deuteri và do đó, thể hiện khối lượng tương đối cao hơn so với các axit amin không nằm ở mặt phân cách. Sau khi phân tách kháng thể, protein đích được phân cắt bằng proteaza và phân tích đo phổ khối, nhờ đó bộc lộ các gốc được đánh dấu deuteri mà tương ứng với các axit amin đặc hiệu tương tác với kháng thể. Ví dụ, xem tài liệu: Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Thuật ngữ “epitop” được dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà tế bào B và/hoặc tế bào T đáp ứng với vị trí này. Các epitop tế bào B có thể được tạo ra cả từ các axit amin liên tiếp hoặc các axit amin không liên tiếp được đặt liền kề bằng quá trình gấp cuộn bậc ba của protein. Các epitop được tạo ra từ các axit amin liên tiếp thường được giữ lại khi tiếp xúc với các dung môi gây biến tính, trong khi đó các epitop được tạo ra bằng quá trình gấp cuộn bậc ba thường bị mất khi xử lý bằng các dung môi gây biến tính. Epitop thường bao gồm ít nhất 3, và thông thường hơn là, ít nhất 5 hoặc 8-10 axit amin theo hình thể không gian độc đáo.

Phương pháp xác định đặc tính có sự trợ giúp của quá trình cải biến (Modification-Assisted Profiling-MAP), còn được gọi là phương pháp xác định đặc tính kháng thể trên cơ sở cấu trúc kháng nguyên (Antigen Structure-based Antibody Profiling ASAP) là phương pháp có tác dụng phân loại số lượng lớn các kháng thể đơn dòng (mAb) nhắm chống lại cùng một kháng nguyên theo mức tương đồng của đặc tính liên kết của mỗi kháng thể đối với bề mặt kháng nguyên được cải biến bằng enzym hoặc hóa chất (US 2004/0101920). Mỗi loại có thể phản ánh một epitop độc đáo hoặc khác biệt rõ rệt với hoặc chồng lấn một phần với epitop được trình bày bằng một loại khác. Công nghệ này cho phép lọc nhanh các kháng thể đồng nhất về gen, sao cho việc xác định đặc điểm có thể tập trung vào các kháng thể khác biệt về gen. Khi được áp dụng cho việc sàng lọc tế bào lai, MAP có thể tạo thuận lợi cho quá trình nhận diện các dòng thuần tế bào lai hiếm mà tạo ra mAb có đặc tính mong muốn. MAP có thể được sử dụng để phân loại các kháng thể theo sáng chế thành các nhóm kháng thể liên kết các epitop khác nhau.

Theo các phương án cụ thể, các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của sáng chế tương tác với trình tự axit amin chứa các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 161 đến vị trí 188 của SEQ ID NO: 354. Theo các phương án cụ thể, các kháng thể theo sáng chế có thể tương tác với các gốc axit amin mà kéo dài vượt quá vùng được nhận diện trên đây là 5 đến 10 gốc axit amin, hoặc 10 đến 15 gốc axit amin, hoặc 15 đến 20 gốc axit amin về phía đầu cuối amin hoặc đầu cuối carboxy của protein RSV-F.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập của người mà liên kết đặc hiệu với RSV-F, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó tương tác với ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 355 và 356.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập của người mà liên kết đặc hiệu với RSV-F, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó tương tác với ít nhất một gốc axit amin trong các gốc 161 đến 188 của SEQ ID NO: 354.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập của người mà liên kết đặc hiệu RSV-F, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, trong đó

kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó tương tác với ít nhất một gốc axit amin trong SEQ ID NO: 355 hoặc SEQ ID NO:356.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng được phân lập của người mà liên kết đặc hiệu với RSV-F, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó tương tác với hoặc serin ở vị trí 173 của SEQ ID NO: 354, hoặc threonin ở vị trí 174 của SEQ ID NO: 354, hoặc cả serin ở vị trí 173 của SEQ ID NO: 354 và threonin ở vị trí 174 của SEQ ID NO: 354.

Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng RSV-F mà liên kết với cùng một epitop với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu tiêu biểu được mô tả trong tài liệu này trong bảng 1. Cũng vậy, sáng chế còn đề cập đến các kháng thể kháng RSV-F mà cạnh tranh với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu tiêu biểu được mô tả trong tài liệu này trong bảng 1 để liên kết với đoạn RSV-F.

Theo các phương án cụ thể, các kháng thể theo sáng chế không cạnh tranh chéo với palivizumab, motavizumab, hoặc AM-22 để liên kết với RSV-F.

Theo các phương án cụ thể, các kháng thể theo sáng chế không liên kết với cùng một epitop trên protein RSV-F với palivizumab hoặc motavizumab.

Theo các phương án cụ thể, các kháng thể theo sáng chế không liên kết với epitop trên RSV-F nằm trong khoảng từ gốc axit amin 255 đến gốc axit amin 276 của SEQ ID NO: 354.

Ta có thể dễ dàng xác định liệu một kháng thể nào đó có liên kết với cùng một epitop với, hoặc cạnh tranh để liên kết với, kháng thể kháng RSV-F tham chiếu hay không bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, để xác định xem liệu một kháng thể thử nghiệm nào đó có liên kết với cùng một epitop với kháng thể RSV-F tham chiếu theo sáng chế hay không, kháng thể tham chiếu này được phép liên kết với protein RSV-F hoặc peptit trong các điều kiện làm bảo hòa. Tiếp theo, khả năng của kháng thể thử nghiệm trong việc liên kết với phân tử RSV-F được đánh giá. Nếu kháng thể thử nghiệm có khả năng liên kết với RSV-F sau khi liên kết bão hòa với kháng thể kháng RSV-F tham chiếu, thì có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm liên kết với epitop khác với kháng thể kháng RSV-F tham chiếu. Mặt khác,

nếu kháng thể thử nghiệm không có khả năng liên kết với phân tử RSV-F sau khi liên kết bão hòa với kháng thể kháng RSV-F tham chiếu, thì có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với cùng một epitop với epitop được liên kết bởi kháng thể kháng RSV-F tham chiếu theo sáng chế.

Để xác định liệu một kháng thể nào đó có cạnh tranh để liên kết với kháng thể kháng RSV-F tham chiếu hay không, phương pháp liên kết được mô tả trên đây được tiến hành theo hai hướng: Theo hướng thứ nhất, kháng thể tham chiếu được phép liên kết với phân tử RSV-F trong các điều kiện làm bão hòa, sau đó là đánh giá khả năng liên kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử RSV-F. Theo hướng thứ hai, kháng thể thử nghiệm được phép liên kết với phân tử RSV-F trong các điều kiện làm bão hòa, sau đó là đánh giá khả năng liên kết của kháng thể tham chiếu với phân tử RSV-F. Nếu, theo cả hai hướng, chỉ kháng thể thứ nhất (bão hòa) có khả năng liên kết với phân tử RSV-F, thì kết luận rằng kháng thể thử nghiệm và kháng thể tham chiếu cạnh tranh để liên kết với RSV-F. Theo đánh giá của chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, kháng thể mà cạnh tranh để liên kết với kháng thể tham chiếu có thể không cần liên kết với epitop đồng nhất với kháng thể tham chiếu, nhưng có thể phong bế khả năng liên kết của kháng thể tham chiếu trong không gian bằng cách liên kết với epitop chồng lấn hoặc liền kề.

Hai kháng thể liên kết với cùng một epitop hoặc epitop chồng lấn nếu mỗi kháng thể ức chế theo cách cạnh tranh (phong bế) khả năng liên kết của kháng thể kia với kháng nguyên. Đó là, lượng dư gấp 1, 5, 10, 20 hoặc 100 lần của một kháng thể ức chế khả năng liên kết của kháng thể kia là ít nhất 50% nhưng tốt hơn, nếu là 75%, 90% hoặc thậm chí là 99% như được đo trong thử nghiệm liên kết cạnh tranh (ví dụ, xem tài liệu: Junghans *et al.*, Cancer Res. 1990 50:1495-1502). Theo cách khác, hai kháng thể có cùng một epitop nếu về cơ bản tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên mà làm giảm hoặc làm mất khả năng liên kết của một kháng thể làm giảm hoặc làm mất khả năng liên kết của kháng thể kia. Hai kháng thể có các epitop chồng lấn nếu một số đột biến axit amin mà làm giảm hoặc làm mất khả năng liên kết của một kháng thể làm giảm hoặc làm mất khả năng liên kết của kháng thể kia.

Sau đó, có thể thực hiện thử nghiệm thông thường bổ sung (ví dụ, các phân tích liên kết và đột biến peptit) để xác nhận liệu nguyên nhân dẫn đến việc kháng thể thử

nghiệm không có khả năng liên kết thực tế có phải là do liên kết với cùng epitop như kháng thể tham chiếu hay không hay là do sự phong bế trong không gian (hoặc hiện tượng khác) dẫn đến việc kháng thể thử nghiệm không có khả năng liên kết. Các thử nghiệm kiểu này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng ELISA, RIA, phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, đếm tế bào theo dòng chảy hoặc thử nghiệm liên kết kháng thể định tính hoặc định lượng bất kỳ khác sẵn có trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thử nghiệm tiếp hợp miễn dịch

Sáng chế đề xuất kháng thể RSV-F đơn dòng của người được tiếp hợp với một gốc trị liệu (“thử nghiệm tiếp hợp miễn dịch”), như chất mà có khả năng làm giảm mức độ trầm trọng của tình trạng lây nhiễm RSV sơ cấp, hoặc giảm bớt ít nhất một triệu chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV, bao gồm cả tình trạng ho, sốt, viêm phổi, hoặc mức độ trầm trọng của chúng. Chất này có thể là kháng thể thứ hai khác của RSV-F, hoặc vaccin. Loại gốc trị liệu mà có thể được tiếp hợp với kháng thể kháng RSV-F và sẽ chú ý đến tình trạng được điều trị và tác dụng trị liệu mong muốn cần đạt được. Theo cách khác, nếu tác dụng trị liệu mong muốn là để điều trị các di chứng hoặc triệu chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV, hoặc tình trạng bất kỳ khác là kết quả của tình trạng lây nhiễm này, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, viêm phổi, thì có thể là thuận lợi khi tiếp hợp một chất thích hợp để điều trị các di chứng hoặc triệu chứng của tình trạng này, hoặc giảm nhẹ các tác dụng phụ bất kỳ của các kháng thể theo sáng chế. Các ví dụ về các chất thích hợp dùng để tạo thử nghiệm tiếp hợp miễn dịch thì đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, xem WO 05/103081.

Các kháng thể đa đặc hiệu

Các kháng thể theo sáng chế có thể là đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu. Các kháng thể đa đặc hiệu có thể là đặc hiệu với các epitop khác nhau của một polypeptit đích hoặc có thể chứa các miền liên kết kháng nguyên đặc hiệu với nhiều polypeptit đích. Ví dụ, xem tài liệu: Tutt *et al.*, 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Các kháng thể theo sáng chế có thể được liên kết với hoặc được đồng biểu hiện với phân tử chức năng khác, ví dụ, peptit hoặc protein khác. Ví dụ, kháng thể hoặc đoạn của nó có thể được liên kết chức năng (ví dụ, bằng liên hợp hóa học, dung hợp gen, liên kết không cộng hóa trị hoặc liên kết khác) với một

hoặc nhiều thực thể phân tử khác, như kháng thể hoặc đoạn kháng thể khác để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu có tính đặc hiệu liên kết thứ hai.

Dạng thức kháng thể đặc hiệu kép tiêu biểu mà có thể được sử dụng theo văn cảnh của sáng chế liên quan đến việc sử dụng miền C_{H3} của globulin miễn dịch (Ig) thứ nhất và miền C_{H3} của Ig thứ hai, trong đó các miền C_{H3} của Ig thứ nhất và thứ hai khác biệt với nhau bởi ít nhất một axit amin, và trong đó sự khác biệt ít nhất một axit amin này làm giảm mức liên kết kháng thể đặc hiệu kép với protein A so với kháng thể đặc hiệu kép thiếu sự khác biệt axit amin. Theo một phương án, miền C_{H3} của Ig thứ nhất liên kết protein A và miền C_{H3} của Ig thứ hai chứa đột biến mà làm giảm hoặc làm mất khả năng liên kết protein A như cải biến H95R (theo cách đánh số exon IMGT; H435R theo cách đánh số EU). C_{H3} thứ hai có thể còn bao gồm cải biến Y96F (theo IMGT; Y436F theo EU). Các cải biến khác nữa mà có thể được tìm thấy trong C_{H3} thứ hai bao gồm: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, và V82I (theo IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, và V422I theo EU) trong trường hợp kháng thể IgG1; N44S, K52N, và V82I (IMGT; N384S, K392N, và V422I theo EU) trong trường hợp kháng thể IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, và V82I (theo IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, và V422I theo EU) trong trường hợp kháng thể IgG4. Các thay đổi của dạng thức kháng thể đặc hiệu kép được mô tả trên đây được dự liệu trong phạm vi của sáng chế.

Dạng chế phẩm trị liệu và phương thức cho dùng

Sáng chế đề cập đến chế phẩm trị liệu chứa các kháng thể kháng RSV-F hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế. Chế phẩm trị liệu theo sáng chế sẽ được cho dùng với chất mang, tá dược, và các chất thích hợp khác mà được sát nhập vào các dạng chế phẩm để giúp cải thiện khả năng vận chuyển, phân phối, dung nạp và các khả năng tương tự. Nhiều dạng chế phẩm thích hợp có thể được tìm thấy trong công thức mà các nhà hóa dược đã biết: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Các dạng chế phẩm này bao gồm, ví dụ, bột, bột nhão, thuốc mỡ, gel, sáp, dầu, lipid, túi chứa lipid (cation hoặc anion) (như LIPOFECTIN™), thể tiếp hợp ADN, bột nhão hấp thu khan, nhũ tương dầu trong nước và nước trong dầu, nhũ tương carbowax (polyetylen glycol có trọng lượng phân tử khác

nhau), gel bán rắn, và hỗn hợp bán rắn chứa carbowax. Xem thêm tài liệu: Powell *et al.* “Compendium of excipients for parenteral formulations” PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Liều của mỗi kháng thể trong số các kháng thể theo sáng chế có thể thay đổi tùy thuộc vào độ tuổi và thể trọng của đối tượng được cho dùng dùng thuốc, bệnh đích, tình trạng bệnh, đường dùng thuốc, và các yếu tố khác. Khi các kháng thể theo sáng chế được sử dụng để điều trị tình trạng lây nhiễm RSV ở bệnh nhân, hoặc dùng để điều trị một hoặc nhiều triệu chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV, như ho hoặc viêm phổi gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV ở bệnh nhân, hoặc để giảm bớt mức độ trầm trọng của bệnh, thật là thuận lợi khi cho dùng mỗi kháng thể trong số các kháng thể theo sáng chế theo phương thức vào tĩnh mạch hoặc dưới da bình thường ở mức liều đơn là từ 0,01 đến 30mg/kg thể trọng, càng tốt hơn, nếu là 0,1 đến 20mg/kg thể trọng, hoặc 0,1 đến 15mg/kg thể trọng, hoặc 0,02 đến 7mg/kg thể trọng, 0,03 đến 5mg/kg thể trọng, hoặc 0,05 đến 3mg/kg thể trọng, hoặc 1mg/kg thể trọng, hoặc 3,0mg/kg thể trọng, hoặc 10mg/kg thể trọng, hoặc 20mg/kg thể trọng. Có thể cho dùng liều đa khi cần thiết. Tùy thuộc vào mức độ trầm trọng của tình trạng, có thể điều chỉnh tần suất và khoảng thời gian điều trị. Theo các phương án cụ thể, các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế có thể được cho dùng dưới dạng liều ban đầu là ít nhất bằng 0,1mg đến 800mg, 1 đến 600mg, 5 đến 300mg, hoặc 10 đến 150mg, đến 100mg, hoặc đến 50mg. Theo các phương án cụ thể, có thể theo sau liều ban đầu là cho dùng liều thứ hai hoặc nhiều liều kế tiếp của các kháng thể hoặc các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng theo lượng mà có thể bằng hoặc thấp hơn lượng của liều ban đầu, trong đó các liều kế tiếp cách nhau là ít nhất 1 ngày đến 3 ngày; ít nhất một tuần, ít nhất 2 tuần; ít nhất 3 tuần; ít nhất 4 tuần; ít nhất 5 tuần; ít nhất 6 tuần; ít nhất 7 tuần; ít nhất 8 tuần; ít nhất 9 tuần; ít nhất 10 tuần; ít nhất 12 tuần; hoặc ít nhất 14 tuần.

Các hệ thống phân phối khác nhau thì đã biết và có thể được sử dụng để cho dùng được phẩm theo sáng chế, ví dụ, bao nang trong liposom, vi hạt, vi nang, các tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện virus đột biến, nhập bào qua trung gian thụ thể (ví dụ, xem tài liệu: Wu *et al.* (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Các phương pháp đưa thuốc vào cơ thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đường dùng trong chân bì, qua chân bì, vào trong cơ, vào trong màng bụng, vào tĩnh mạch, dưới da, vào trong mũi, trên

màng cứng và qua đường miệng. Có thể cho dùng chế phẩm bằng đường dùng thuận tiện bất kỳ, ví dụ, bằng cách truyền hoặc tiêm tĩnh mạch nhanh, bằng cách hấp thu qua biểu mô hoặc lớp niêm mạc (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc mũi, niêm mạc trực tràng và niêm mạc ruột, v.v.) và có thể được cho dùng cùng với hoạt chất sinh học khác. Phương thức cho dùng có thể là toàn thân hoặc khu trú. Có thể phân phối chế phẩm ở dạng chế phẩm được sol khí hóa (xem US2011/0311515 và US2012/0128669). Phương thức phân phối các chất hữu ích đối với việc điều trị các bệnh hô hấp bằng cách xông xịt đang trở nên được chấp nhận rộng rãi hơn (xem tài liệu: A. J. Bitonti and J. A. Dumont, (2006), *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58:1106-1118). Ngoài đặc điểm hữu hiệu trong việc điều trị bệnh phổi cục bộ ra, cơ chế phân phối này cũng có thể hữu ích cho phương thức phân phối toàn thân các kháng thể (xem tài liệu: Maillet et al. (2008), *Pharmaceutical Research*, Vol. 25, No. 6, 2008).

Dược phẩm cũng có thể được phân phối trong túi, cụ thể là liposom (ví dụ, xem tài liệu: Langer (1990) *Science* 249:1527-1533).

Trong một số tình huống cụ thể, có thể phân phối dược phẩm trong hệ thống giải phóng có kiểm soát. Theo một phương án, có thể sử dụng bơm. Theo phương án khác, có thể sử dụng các chất liệu polyme. Theo phương án khác nữa, hệ thống giải phóng có kiểm soát có thể được đặt gần với đích của chế phẩm, vì thế mà, đòi hỏi chỉ một phần của liều toàn thân.

Các chế phẩm tiêm có thể bao gồm dạng liều để tiêm tĩnh mạch, dưới da, trong da và tiêm bắp, truyền nhỏ giọt, v.v. Các chế phẩm tiêm này có thể được bào chế bằng các phương pháp đã biết rộng rãi. Ví dụ, các chế phẩm tiêm có thể được bào chế, ví dụ, bằng cách hòa tan, tạo huyền phù hoặc nhũ hóa kháng thể hoặc muối của nó được mô tả trên đây trong môi trường chứa nước hoặc môi trường chứa dầu vô trùng thường được dùng để tiêm. Môi trường chứa nước dùng cho thuốc tiêm bao gồm, ví dụ, dung dịch nước muối sinh lý, dung dịch đẳng trương chứa glucoza và chất phụ trợ khác, v.v., mà có thể được sử dụng kết hợp với chất hòa tan thích hợp như rượu (ví dụ, etanol), rượu đa chức (ví dụ, propylen glycol, polyetylen glycol), chất hoạt động bề mặt không ion [ví dụ, polysorbat 80, HCO-50 (polyoxyetylen (50mol) sản phẩm cộng của dầu thầu dầu được hydro hóa)], v.v. Môi trường chứa dầu được sử dụng bao gồm, ví dụ, dầu vừng,

dầu đậu tương, v.v., mà có thể được sử dụng kết hợp với chất hòa tan như benzyl benzoat, rượu benzylic, v.v.. Tốt hơn, nếu thuốc tiêm được bào chế như vậy được đựng trong ống thuốc tiêm thích hợp.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được phân phối theo phương thức dưới da hoặc vào tĩnh mạch bằng kim và bơm tiêm tiêu chuẩn. Ngoài ra, liên quan đến phương thức phân phối dưới da, thiết bị phân phối dạng bút dễ dàng phân phối dược phẩm theo sáng chế. Thiết bị phân phối dạng bút này có thể là dạng tái sử dụng hoặc sử dụng một lần. Thiết bị phân phối dạng bút tái sử dụng thường sử dụng hộp có thể thay thế mà chứa dược phẩm. Một khi toàn bộ lượng dược phẩm trong hộp được sử dụng và hộp này rỗng, thì hộp rỗng này dễ dàng được lấy ra và thay bằng hộp mới chứa dược phẩm. Thiết bị phân phối dạng bút sau đó có thể được tái sử dụng. Trong thiết bị phân phối dạng bút sử dụng một lần, không có hộp có thể thay thế. Đúng hơn là, thiết bị phân phối dạng bút sử dụng một lần được nạp trước dược phẩm và được giữ trong khoang chứa trong thiết bị này. Một khi khoang chứa không còn dược phẩm, thì toàn bộ thiết bị này được bỏ đi.

Nhiều thiết bị phân phối thuốc dạng bút tái sử dụng và tiêm tự động có thể được sử dụng để phân phối dược phẩm theo sáng chế dưới da. Các ví dụ về thiết bị này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), bút DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Thụy Sĩ), bút HUMALOG MIX 75/25™, bút HUMALOG™, bút HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Đan Mạch), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Đan Mạch), bút BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, và OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Đức), trong số rất nhiều sản phẩm khác. Các ví dụ về thiết bị phân phối dạng bút sử dụng một lần có ứng dụng trong phương thức phân phối dưới da dược phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở bút SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), và KWIKPEN™ (Eli Lilly), dụng cụ tiêm tự động SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Đức), EPIPEN (Dey, L.P.) và bút HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), trong số rất nhiều sản phẩm khác.

Để thuận lợi, các dược phẩm để sử dụng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu

hóa được mô tả trên đây được điều chế thành các dạng liều dùng ở dạng liều đơn vị được làm phù hợp với liều của các hoạt chất. Các dạng liều dùng ở dạng liều đơn vị này bao gồm, ví dụ, viên nén, viên tròn, viên nang, thuốc tiêm (ống thuốc tiêm), viên thuốc đạn, v.v. Lượng kháng thể nói trên thường nằm trong khoảng từ 5 đến 500mg trong mỗi dạng liều ở dạng liều đơn vị; đặc biệt là ở dạng thuốc tiêm, tốt hơn là lượng kháng thể nói trên thường nằm trong khoảng từ 5 đến 100mg và nằm trong khoảng từ 10 đến 250mg đối với dạng liều khác.

Chế độ dùng thuốc

Theo các phương án cụ thể của sáng chế, có thể cho đối tượng dùng dạng đa liều của kháng thể kháng RSV-F trong một khoảng thời gian xác định. Các phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm việc cho đối tượng dùng một cách liên tiếp dạng đa liều của kháng thể kháng RSV-F. Như được sử dụng trong tài liệu này, “cho dùng một cách liên tiếp” có nghĩa là cho đối tượng dùng mỗi liều kháng thể kháng RSV-F ở thời điểm khác nhau, ví dụ, vào các ngày khác nhau phân cách với nhau bởi một khoảng thời gian gián cách định trước (ví dụ, tính bằng giờ, ngày, tuần hoặc tháng). Sáng chế đề cập đến phương pháp mà bao gồm việc cho bệnh nhân dùng liên tiếp một liều ban đầu của kháng thể kháng RSV-F, sau đó là một hoặc nhiều liều thứ hai của kháng thể kháng RSV-F và tùy ý sau đó là một hoặc nhiều liều thứ ba của kháng thể kháng RSV-F.

Các thuật ngữ “liều ban đầu,” “liều thứ hai”, và “liều thứ ba”, được dùng để chỉ trình tự thời gian của việc cho dùng kháng thể kháng RSV-F. Vì vậy, “liều ban đầu” là liều lượng mà được cho dùng ở thời điểm bắt đầu chế độ điều trị (còn được gọi là “liều đường chuẩn”); “liều thứ hai” là các liều lượng mà được cho dùng sau liều ban đầu; và “liều thứ ba” là các liều lượng mà được cho dùng sau liều thứ hai. Liều ban đầu, thứ hai và thứ ba có thể đều chứa cùng một lượng kháng thể kháng RSV-F, nhưng thường có thể khác biệt với nhau về tần suất cho dùng. Tuy nhiên, theo các phương án cụ thể, lượng kháng thể kháng RSV-F được chứa trong liều ban đầu, thứ hai và/hoặc thứ ba thay đổi khác với nhau (ví dụ, được điều chỉnh lên hoặc xuống khi cần) trong suốt thời gian điều trị. Theo các phương án cụ thể, hai hoặc nhiều liều hơn nữa (ví dụ, 2, 3, 4,

hoặc 5) được cho dùng ở thời điểm bắt đầu chế độ điều trị trong vai trò là “liều nạp” sau đó là các liều kế tiếp mà được cho dùng với tần suất thưa hơn (ví dụ, “liều duy trì”).

Theo một phương án tiêu biểu của sáng chế, mỗi liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba được cho dùng từ 1 đến 26 tuần (ví dụ, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, hoặc nhiều hơn) sau liều ngay trước. Thuật ngữ “liều ngay trước”, như được sử dụng trong tài liệu này, có nghĩa là, theo trình tự sử dụng nhiều liều, liều lượng kháng thể kháng RSV-F mà cho bệnh nhân dùng trước khi cho dùng liều tiếp theo theo trình tự sử dụng mà không có liều nào xen vào.

Các phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế có thể bao gồm việc ho bệnh nhân dùng một số liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba bất kỳ của kháng thể kháng RSV-F. Ví dụ, theo các phương án cụ thể, cho bệnh nhân dùng chỉ duy nhất một liều thứ hai. Theo các phương án khác, cho bệnh nhân dùng hai hoặc nhiều liều thứ hai hơn nữa (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn). Cũng vậy, theo các phương án cụ thể, cho bệnh nhân dùng chỉ duy nhất một liều thứ ba. Theo các phương án khác, cho bệnh nhân dùng hai hoặc nhiều liều thứ ba hơn nữa (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn).

Theo các phương án liên quan đến nhiều liều thứ hai, có thể cho dùng mỗi liều thứ hai ở cùng một tần suất với các liều thứ hai khác. Ví dụ, có thể cho bệnh nhân dùng mỗi liều thứ hai 1 đến 2 tuần sau liều ngay trước. Tương tự, theo các phương án liên quan đến nhiều liều thứ ba, có thể cho dùng mỗi liều thứ ba ở cùng một tần suất với các liều thứ ba khác. Ví dụ, có thể cho bệnh nhân dùng mỗi liều thứ ba 2 đến 4 tuần sau liều ngay trước. Theo cách khác, tần suất cho bệnh nhân dùng liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba có thể thay đổi trong khoảng thời gian của chế độ điều trị. Tần suất dùng thuốc cũng có thể được bác sĩ điều chỉnh trong suốt thời gian điều trị tùy thuộc vào nhu cầu của từng bệnh nhân sau khám lâm sàng.

Các công dụng trị liệu của kháng thể

Nhờ khả năng liên kết/tương tác của chúng với protein dung hợp RSV (RSV-F), các kháng thể theo sáng chế là hữu ích đối với việc phòng ngừa quá trình dung hợp virut với màng tế bào chủ, việc phòng ngừa tình trạng lây lan virut từ tế bào này sang tế bào

khác, và đối với việc ức chế quá trình tạo hợp tử. Như vậy, các kháng thể theo sáng chế là hữu ích đối với việc phòng ngừa tình trạng lây nhiễm RSV của đối tượng khi được cho dùng với mục đích phòng bệnh. Theo cách khác, các kháng thể theo sáng chế có thể là hữu ích đối với việc giảm bớt ít nhất một triệu chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm, như tình trạng ho, sốt, viêm phổi, hoặc việc giảm bớt tính trầm trọng, khoảng thời gian, và/hoặc tần suất của tình trạng lây nhiễm. Các kháng thể theo sáng chế còn được dự liệu cho mục đích sử dụng để phòng bệnh ở các bệnh nhân có nguy cơ phát triển hoặc mắc phải tình trạng lây nhiễm RSV. Các bệnh nhân này bao gồm trẻ sơ sinh sinh non, trẻ sơ sinh đủ tháng sinh ra trong suốt mùa RSV (cuối mùa thu đến đầu mùa xuân), cao tuổi (ví dụ, ở người 65 tuổi trở lên), hoặc các bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch do bệnh hoặc phương pháp điều trị bằng các phương pháp trị liệu ức chế miễn dịch, hoặc các bệnh nhân mà có thể có tình trạng y lý tiềm ẩn làm cho họ dễ bị lây nhiễm RSV (ví dụ, bệnh nhân xơ nang, bệnh nhân có bệnh suy tim sung huyết hoặc các tình trạng tim khác, bệnh nhân có tình trạng suy nhược khí đạo, bệnh nhân có COPD). Được dự liệu rằng các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng một mình, hoặc cùng với một chất thứ hai, hoặc chất thứ ba dùng để điều trị tình trạng lây nhiễm RSV, hoặc dùng để giảm bớt ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV, như sốt, tình trạng ho, viêm tiểu phế quản, hoặc viêm phổi gắn liền với, hoặc là kết quả của tình trạng lây nhiễm này. Chất thứ hai hoặc chất thứ ba có thể được phân phối đồng thời với các kháng thể theo sáng chế, hoặc chúng có thể được cho dùng một cách tách biệt, hoặc trước hoặc sau các kháng thể theo sáng chế. Chất thứ hai hoặc chất thứ ba có thể là một chất kháng virus như ribavirin, NSAID hoặc các chất khác để làm giảm tình trạng sốt hoặc đau, một kháng thể thứ hai khác nhưng khác biệt mà liên kết đặc hiệu với RSV-F, một chất (ví dụ, kháng thể) mà liên kết với một kháng nguyên RSV khác, như RSV-G, vacxin chống RSV, ARN can thiệp kích thước nhỏ đặc hiệu với kháng nguyên RSV.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng cho việc điều chế dược phẩm dùng để điều trị các bệnh nhân mắc tình trạng lây nhiễm RSV. Theo phương án khác nữa của sáng chế, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng cho việc điều chế dược phẩm dùng để làm giảm mức độ trầm trọng của tình trạng lây nhiễm RSV sơ cấp, hoặc dùng để làm giảm khoảng thời gian lây nhiễm, hoặc

dùng để làm giảm ít nhất một triệu chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV. Theo phương án khác nữa của sáng chế, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng làm liệu pháp phụ trợ với chất bất kỳ khác hữu ích đối với việc điều trị tình trạng lây nhiễm RSV, bao gồm cả chất chống virus, biến độc tố, vaccin, kháng thể RSV-F thứ hai, hoặc kháng thể bất kỳ khác đặc hiệu với kháng nguyên RSV, bao gồm cả kháng thể RSV-G, hoặc liệu pháp giảm nhẹ bất kỳ khác mà chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết.

Các liệu pháp kết hợp

Như đã nêu trên đây, các phương pháp theo sáng chế, theo các phương án cụ thể, bao gồm việc cho đối tượng dùng một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung kết hợp với kháng thể kháng RSV-F. Như được sử dụng trong tài liệu này, cách diễn đạt “kết hợp với” có nghĩa là các chất trị liệu bổ sung được cho dùng trước, sau hoặc đồng thời với được phẩm chứa kháng thể kháng RSV-F. Thuật ngữ “kết hợp với” còn bao gồm phương thức cho dùng liên tiếp hoặc đồng thời kháng thể kháng RSV-F và chất trị liệu thứ hai.

Ví dụ, khi được cho dùng “trước” được phẩm chứa kháng thể kháng RSV-F, chất trị liệu bổ sung có thể được cho dùng vào thời điểm 72 giờ, 60 giờ, 48 giờ, 36 giờ, 24 giờ, 12 giờ, 10 giờ, 8 giờ, 6 giờ, 4 giờ, 2 giờ, 1 giờ, 30 phút, 15 phút hoặc 10 phút trước khi cho dùng được phẩm chứa kháng thể kháng RSV-F. Khi được cho dùng “sau” được phẩm chứa kháng thể kháng RSV-F, chất trị liệu bổ sung có thể được cho dùng vào thời điểm 10 phút, 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ, 10 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ, 60 giờ hoặc 72 giờ sau khi cho dùng được phẩm chứa các kháng thể kháng RSV-F. Phương thức cho dùng “đồng thời” hoặc với được phẩm chứa kháng thể kháng RSV-F có nghĩa là cho đối tượng dùng chất trị liệu bổ sung ở dạng liều dùng tách biệt trong vòng ít hơn 5 phút (trước, sau hoặc cùng một thời điểm) từ thời điểm cho dùng được phẩm chứa kháng thể kháng RSV-F, hoặc cho đối tượng dùng ở dạng chế phẩm liều dùng kết hợp đơn lẻ chứa cả chất trị liệu bổ sung và kháng thể kháng RSV-F.

Các liệu pháp kết hợp có thể bao gồm kháng thể kháng RSV-F theo sáng chế và chất trị liệu bổ sung bất kỳ mà có thể được kết hợp một cách thuận lợi với kháng thể theo sáng chế, hoặc với đoạn có hoạt tính sinh học của kháng thể theo sáng chế.

Ví dụ, có thể sử dụng chất trị liệu thứ hai hoặc thứ ba để trợ giúp trong việc làm giảm tổng lượng virus ở phổi, như chất chống virus, ví dụ, ribavirin. Cũng có thể sử

dùng các kháng thể cùng với các liệu pháp khác, như đã nêu trên đây, bao gồm cả biến độc tố, vacxin đặc hiệu với RSV, kháng thể thứ hai đặc hiệu với RSV-F, hoặc kháng thể đặc hiệu với một kháng nguyên RSV khác, như RSV-G.

Công dụng chẩn đoán của kháng thể

Cũng có thể sử dụng các kháng thể kháng RSV theo sáng chế để phát hiện và/hoặc đo RSV trong mẫu, ví dụ, nhằm mục đích chẩn đoán. Cũng được dự liệu là có thể thực hiện việc xác nhận tình trạng lây nhiễm được cho là do RSV gây ra bằng cách đo mức có mặt của virus thông qua việc sử dụng một hoặc nhiều kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể theo sáng chế. Các thử nghiệm chẩn đoán tiêu biểu dùng cho RSV có thể bao gồm, ví dụ, cho mẫu thu được từ bệnh nhân tiếp xúc với kháng thể kháng RSV-F theo sáng chế, trong đó kháng thể kháng RSV-F được đánh dấu bằng chất đánh dấu có thể phát hiện được hoặc phân tử thông báo hoặc được sử dụng làm phối tử bất giữ để phân lập một cách chọn lọc virus chứa protein F từ các mẫu của bệnh nhân. Theo cách khác, có thể sử dụng kháng thể kháng RSV-F không được đánh dấu trong các ứng dụng chẩn đoán kết hợp với kháng thể thứ cấp mà bản thân kháng thể này được đánh dấu để phát hiện. Phân tử đánh dấu hoặc phân tử thông báo để phát hiện có thể là chất đồng vị phóng xạ, như ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , hoặc ^{125}I ; gốc huỳnh quang hoặc phát quang hóa học như florescein isothiocyanat, hoặc rodamin; hoặc enzym như phosphatase kiềm, β -galactosidase, peroxidase củ cải ngựa, hoặc luxiferase. Các thử nghiệm tiêu biểu cụ thể mà có thể được sử dụng để phát hiện hoặc đo RSV chứa protein F trong mẫu bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay-RIA), và thử nghiệm phân loại tế bào có hoạt hóa hiện tượng huỳnh quang (fluorescence-activated cell sorting-FACS).

Các mẫu mà có thể được sử dụng trong các thử nghiệm chẩn đoán RSV theo sáng chế bao gồm mẫu mô hoặc dịch bất kỳ có thể thu được từ bệnh nhân, mà chứa lượng protein RSV-F để phát hiện, hoặc các đoạn của nó, trong các điều kiện bình thường hoặc bệnh lý. Nhìn chung, mức RSV-F trong một mẫu cụ thể thu được từ bệnh nhân khỏe mạnh (ví dụ, bệnh nhân không bị bệnh hoặc tình trạng gắn liền với sự có mặt của RSV-F) sẽ được đo để ban đầu xác lập mức đường chuẩn hoặc mức tiêu chuẩn của protein F

từ RSV. Sau đó, có thể so sánh mức đường chuẩn này của RSV-F với mức RSV-F được đo trong các mẫu thu được từ các cá thể bị nghi có tình trạng lây nhiễm RSV, hoặc các triệu chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm này.

Vaccin và các chế phẩm sinh miễn dịch

Một khía cạnh của sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vaccin, mà khi cho cá thể dùng, tốt hơn, nếu là người, gây ra đáp ứng miễn dịch đối với kháng nguyên virus hợp bào hô hấp (RSV) ở cá thể đó, ví dụ, polypeptit RSV-F, trong đó chế phẩm có thể bao gồm protein RSV-F tái tổ hợp, hoặc đoạn polypeptit của protein RSV-F, hoặc epitop nằm trong và thu được từ kháng nguyên của polypeptit RSV-F hoặc một đoạn của nó, và/hoặc chứa ADN và/hoặc ARN có chức năng mã hóa và biểu hiện epitop từ kháng nguyên của polypeptit RSV-F, hoặc các polypeptit khác theo sáng chế. Chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin có thể được sử dụng với mục đích trị liệu hoặc với mục đích phòng bệnh và có thể được sử dụng để gây ra hiện tượng miễn dịch kháng thể và/hoặc hiện tượng miễn dịch tế bào, như hiện tượng miễn dịch tế bào phát sinh từ tế bào T CTL hoặc tế bào T CD4+.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vaccin, có thể chứa protein RSV-F như được thể hiện trong SEQ ID NO: 354. Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vaccin, có thể chứa đoạn polypeptit RSV-F bao gồm các gốc 161 đến 188 của SEQ ID NO: 354. Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vaccin, có thể bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin nằm trong SEQ ID NO: 355 và/hoặc SEQ ID NO: 356. Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vaccin, có thể bao gồm SEQ ID NO: 355 và/hoặc SEQ ID NO: 356.

Theo một khía cạnh có liên quan, sáng chế đề xuất phương pháp gây đáp ứng miễn dịch ở một cá thể nào đó, cụ thể là động vật có vú, tốt hơn, nếu là người, bằng cách cho cá thể dùng chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vaccin, chứa protein RSV-F, hoặc một đoạn sinh miễn dịch của nó, hoặc kháng nguyên RSV-F hoặc một đoạn sinh miễn dịch của nó bao gồm một hoặc nhiều epitop nằm trong kháng nguyên RSV-F hoặc đoạn của nó, thích hợp để tạo ra kháng thể và/hoặc đáp ứng miễn dịch tế bào T để bảo vệ cá thể này khỏi lây nhiễm, cụ thể là lây nhiễm virus hợp bào hô hấp (RSV). Sáng chế còn đề

xuất các phương pháp sử dụng các chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc các vaccin theo sáng chế để gây đáp ứng miễn dịch mà đem lại tác dụng ức chế, hoặc làm chậm quá trình tiến triển của tình trạng lây lan từ tế bào này sang tế bào khác. Sáng chế còn đề xuất các phương pháp dùng để giảm bớt ít nhất một triệu chứng gắn liền với tình trạng lây nhiễm RSV bằng cách cho dùng chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vaccin, chứa ít nhất một kháng nguyên RSV-F, hoặc một hoặc nhiều epitop nằm trong kháng nguyên RSV-F, mà khi được cho dùng thì sẽ gây đáp ứng miễn dịch ở cá thể.

Ví dụ, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp gây đáp ứng miễn dịch ở một cá thể nào đó bao gồm việc cho cá thể này dùng chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vaccin chứa kháng nguyên RSV-F (ví dụ, trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 354), hoặc đoạn kháng nguyên của nó, (ví dụ, polypeptit bao gồm các gốc 161 đến 188 của SEQ ID NO: 354), hoặc vector axit nucleic chứa trình tự nucleotit để dẫn dắt quá trình biểu hiện của polypeptit virut này, hoặc đoạn hoặc biến thể của nó, *in vivo* để gây đáp ứng miễn dịch.

Theo một phương án của sáng chế, polypeptit để sử dụng trong chế phẩm sinh miễn dịch hoặc trong vaccin để gây đáp ứng miễn dịch ở một cá thể nào đó bao gồm các gốc 161 đến 188 của SEQ ID NO: 354. Theo một phương án của sáng chế, polypeptit để sử dụng trong chế phẩm sinh miễn dịch hoặc trong vaccin để gây đáp ứng miễn dịch ở một cá thể nào đó bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin nằm trong SEQ ID NO: 355 và/hoặc SEQ ID NO: 356. Theo một phương án của sáng chế, polypeptit để sử dụng trong chế phẩm sinh miễn dịch hoặc trong vaccin để gây đáp ứng miễn dịch ở một cá thể nào đó bao gồm SEQ ID NO: 355 và/hoặc SEQ ID NO: 356. Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vaccin, có thể gây ra đáp ứng kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên RSV-F của RSV, trong đó các kháng thể được tạo ra tương tác với hoặc serin ở vị trí 173 của SEQ ID NO: 354, hoặc threonin ở vị trí 354, hoặc cả serin ở vị trí 173 của SEQ ID NO: 354 và threonin ở vị trí 174 của SEQ ID NO: 354.

Theo các phương án cụ thể, thật là thuận lợi khi bào chế các kháng nguyên RSV-F hoặc các đoạn của chúng thành các chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc các vaccin mà chứa lượng sinh miễn dịch, tốt hơn, nếu là lượng hữu hiệu về phương diện miễn dịch học của các kháng nguyên bổ sung để gây ra hiện tượng miễn dịch đối với các mầm

bệnh khác, tốt hơn, nếu là các virus và/hoặc vi khuẩn. Các kháng nguyên bổ sung này có thể bao gồm kháng nguyên virus cúm, kháng nguyên từ metapneumovirus hoặc từ coronavirus, kháng nguyên từ *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, hoặc *Bordetella pertussis*. Các kháng nguyên RSV khác có thể được đưa vào các chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vaccin, như glycoprotein RSV-G, hoặc các đoạn sinh miễn dịch của nó, protein HN, hoặc các dẫn xuất của nó. Theo các phương án cụ thể, các kháng nguyên virus cúm để đưa vào trong chế phẩm sinh miễn dịch hoặc các vaccin theo sáng chế có thể bao gồm virus sống, nguyên hoặc virus bị bất hoạt, virus cúm dạng mảnh, được nuôi cấy trong trứng hoặc các tế bào MDCK, hoặc các tế bào Vero hoặc virosom cúm nguyên, hoặc protein được tinh chế hoặc protein tái tổ hợp của chúng, như các protein HA, NP, NA, hoặc M, hoặc các dạng kết hợp của chúng.

Theo các phương án cụ thể của sáng chế, chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vaccin dạng chế phẩm có thể bao gồm polypeptit và/hoặc polynucleotit tái tổ hợp sinh miễn dịch theo sáng chế, hoặc dạng kết hợp của chúng, cùng với tá dược/chất mang thích hợp, như tá dược/chất mang dược dụng. Tốt hơn, nếu cho dùng chế phẩm sinh miễn dịch và/hoặc vaccin theo phương thức ngoài đường tiêu hóa, bao gồm cả, ví dụ, phương thức cho dùng dưới da, vào trong cơ, vào tĩnh mạch, hoặc trong chân bì. Các dạng chế phẩm thích hợp đối với việc dùng thuốc ngoài đường tiêu hóa bao gồm nước và dung dịch tiêm vô trùng không chứa nước mà có thể chứa chất chống oxy hóa, các chất đệm, hợp chất kìm hãm vi khuẩn và các chất tan mà đem lại dạng chế phẩm đẳng trương với dịch thể, tốt hơn, nếu là máu của cá thể; và các huyền phù vô trùng chứa nước và không chứa nước mà có thể chứa chất tạo huyền phù hoặc chất làm đặc. Các dạng chế phẩm có thể được trình bày trong vật chứa liều đơn vị hoặc vật chứa đa liều, ví dụ, lọ và ống thuốc tiêm được bịt kín và có thể được bảo quản trong điều kiện đông khô chỉ cần bổ sung chất mang lỏng vô trùng ngay trước khi sử dụng.

Chế phẩm sinh miễn dịch, hoặc vaccin dạng chế phẩm của sáng chế có thể còn chứa các chất phụ trợ dùng để làm tăng tính sinh miễn dịch của dạng chế phẩm. Ở thời điểm này, chất phụ trợ duy nhất được sử dụng rộng rãi ở người là phèn (nhôm phosphat hoặc nhôm hydroxit) và gel canxi phosphat. Chất phụ trợ Freund hoàn chỉnh và các chất phụ trợ khác được sử dụng trong nghiên cứu và các ứng dụng ngành thú y có độc tính, điều này hạn chế công dụng tiềm tàng của chúng trong vaccin cho người. Tuy nhiên, các

chế phẩm đã được xác định về mặt hóa học như nhũ tương dầu và các dạng chế phẩm trên cơ sở chất hoạt động bề mặt, ví dụ, MF59 (nhũ tương dầu trong nước được làm ổn định bằng thuốc tẩy đã được hóa lỏng kích thước micro), QS21 (saponin đã được tinh chế), AS02 [SBAS2] (nhũ tương dầu trong nước + MPL + QS-21), Montanide ISA-51 và ISA-720 (nhũ tương nước trong dầu được làm ổn định), cũng đang trong quá trình phát triển. Ngoài ra, các dẫn xuất vi sinh vật (tự nhiên và tổng hợp), ví dụ, muramyl dipeptit, monophosphoryl lipid A (ví dụ, monophosphoryl lipid A được khử axyl ở 3-O, còn được gọi là 3D-MPL, chất này được sản xuất bởi Ribí Immunochem, Montana), Detox (MPL + khung xương thành tế bào M. Phlei), AGP [RC-529] (monosacarit được axyl hóa tổng hợp), DCChol (chất kích thích miễn dịch dạng lipid có khả năng tự tổ chức thành liposom), OM-174 (dẫn xuất lipid A), motif CpG (các oligonucleotit tổng hợp chứa motif CpG kích thích miễn dịch), CT và LT được cải biến (độc tố vi khuẩn được cải biến gen để đem lại tác dụng phụ trợ không độc), và QS21, phần không độc đã được tinh chế bằng HPLC được tạo ra từ vỏ của *Quillaja Saponaria Molina*, đều đang trong quá trình phát triển để sử dụng cho người.

Một dạng được ưu tiên của monophosphoryl lipid A được khử axyl ở 3-O được bộc lộ trong bằng sáng chế Châu Âu 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA).

Các chất phụ trợ dạng hạt khác bao gồm, ví dụ, các virosom (các chất dẫn dạng liposom một bản sát nhập kháng nguyên virus), AS04 ([SBAS4] muối Al với MPL), ISCOMS (phức hợp được kiến tạo của saponin và lipid), polylactit co-glycolit (polylactide co-glycolide-PLG).

Các chất phụ trợ thích hợp khác bao gồm tất cả các hợp chất kích thích miễn dịch có thể chấp nhận được, như xytokin, chemokin, hoặc yếu tố kích thích khuẩn lạc. Ví dụ, các chất này có thể bao gồm các intolokin IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, interferon gama, và hGM-CSF.

Cần phải hiểu rằng chất phụ trợ và/hoặc hợp chất kích thích miễn dịch để sử dụng sẽ phụ thuộc vào đối tượng mà được cho dùng vacxin hoặc chế phẩm sinh miễn dịch, đường tiêm và số lần tiêm được thực hiện.

Trong khi sáng chế đã được mô tả liên quan đến các polypeptit RSV-F nhất định, cần phải hiểu rằng sáng chế bao hàm các đoạn của các polypeptit có trong tự nhiên, và các polypeptit tương đồng có các đoạn thêm, đoạn xóa bỏ hoặc đoạn thay thế mà về cơ bản không ảnh hưởng đến các thuộc tính sinh miễn dịch của các polypeptit hoặc polynucleotit tái tổ hợp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây được đưa ra nhằm cung cấp cho chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này một bản mô tả và bộc lộ hoàn chỉnh về cách tạo ra và sử dụng phương pháp và chế phẩm theo sáng chế, và không có ý làm giới hạn những gì mà tác giả sáng chế cho là thuộc phạm vi của sáng chế của mình. Đã có các nỗ lực nhằm đảm bảo độ chính xác của các con số sử dụng (ví dụ, lượng, nhiệt độ, v.v.), tuy nhiên một vài sai số và độ lệch thử nghiệm cần phải được giải thích. Trừ khi được quy định khác, các phần là phần khối lượng, khối lượng phân tử là khối lượng phân tử trung bình, nhiệt độ là theo độ C, và áp suất là bằng hoặc gần áp suất khí quyển.

Ví dụ 1. Tạo kháng thể của người kháng protein RSV-F

Chất sinh miễn dịch bao gồm một chất bất kỳ trong số các chất dưới đây có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể kháng protein RSV-F. Theo các phương án cụ thể, các kháng thể theo sáng chế là thu được từ các con chuột được gây miễn dịch bằng chất sinh miễn dịch sơ cấp, như sản phẩm phân lập của virus hợp bào hô hấp nguyên, hoặc là sống, được làm yếu hoặc bị giết chết/bị bất hoạt. Có thể tiêm cho các con chuột một hoặc nhiều liều tiêm tăng cường chứa cùng một sản phẩm phân lập của virus, hoặc chúng có thể được tiêm tăng cường bằng chính protein RSV-F. Theo các phương án cụ thể, các con chuột được tiêm virus sống, sau đó là tiêm tăng cường bằng cấu trúc được thể hiện là SEQ ID NO: 353, hoặc bằng protein RSV-F đã được phân lập, thu được từ sản phẩm phân lập của virus hoặc được điều chế theo phương thức tái tổ hợp. (Xem thêm số truy cập GenBank AAX23994.1)

Theo các phương án cụ thể, các kháng thể theo sáng chế là thu được từ các con chuột được gây miễn dịch bằng chất sinh miễn dịch sơ cấp, như RSV có hoạt tính sinh học, phân nhóm A hoặc B, và/hoặc protein dung hợp (F) của RSV, hoặc đoạn sinh miễn

dịch của protein dung hợp của RSV (RSV-F), hoặc ADN mã hóa protein có chiều dài đầy đủ hoặc đoạn có hoạt tính của nó. Có thể cho động vật dùng chất sinh miễn dịch thông qua đường dùng bất kỳ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vào trong cơ, dưới da, trong tĩnh mạch hoặc trong mũi.

Theo các phương án cụ thể, virut nguyên, hoặc protein RSV-F hoặc các đoạn của nó có thể được sử dụng để điều chế các kháng thể đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép, hoặc đa đặc hiệu.

Virut nguyên, hoặc các protein có chiều dài đầy đủ, hoặc các đoạn của chúng, mà được sử dụng làm chất sinh miễn dịch, như đã nêu trên đây, được cho dùng một cách trực tiếp, với chất phụ trợ để kích thích đáp ứng miễn dịch, cho chuột VELOCIMMUNE[®] chứa ADN mã hóa các vùng biến đổi chuỗi nhẹ kapa và chuỗi nặng của globulin miễn dịch của người. Đáp ứng miễn dịch với kháng thể được theo dõi bằng thử nghiệm miễn dịch RSV-F. Khi thu được đáp ứng miễn dịch mong muốn, tế bào lách được thu hoạch và được dung hợp với các tế bào u tủy của chuột để duy trì khả năng sống của chúng và tạo ra các dòng tế bào lai tế bào. Các dòng tế bào lai được sàng lọc và lựa chọn để nhận diện các dòng tế bào mà sản xuất các kháng thể đặc hiệu với RSV-F. Việc sử dụng kỹ thuật này, và các chất sinh miễn dịch khác nhau được mô tả trên đây, đã tạo ra được một vài kháng thể thể khảm (tức là, các kháng thể có miền biến đổi của người và miền ổn định của chuột); các kháng thể tiêu biểu nhất định được tạo ra theo phương thức này được gọi tên là H1M3621N, H1M3622N, H1M2634N và H1M3627N.

Các kháng thể kháng RSV-F cũng được phân lập một cách trực tiếp từ tế bào B dương tính với kháng nguyên mà không cần dung hợp với tế bào u tủy, như được mô tả trong patent Mỹ số U.S. 2007/0280945A1. Việc sử dụng phương pháp này, đã tạo ra được một vài kháng thể kháng RSV-F hoàn toàn của người (tức là, các kháng thể có miền biến đổi của người và miền ổn định của người); các kháng thể tiêu biểu được tạo ra theo phương thức này được gọi tên như sau: H1H3564P, H1H3565P, H1H3566P, H1H3567P, H1H3581P, H1H3583P, H1H3589P, H1H3591P, H1H3592P, H1H3597P, H1H3598P, H1H3603P, H1H3604P, H1H3605P, H1H3607P, H1H3608P2, H1H3592P2 và H1H3592P3.

Các thuộc tính sinh học của các kháng thể tiêu biểu được tạo ra theo các phương

pháp của ví dụ này được mô tả chi tiết trong các ví dụ được trình bày dưới đây.

Ví dụ 2. Các trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

Bảng 1 thể hiện các cặp trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể được lựa chọn đặc hiệu với protein RSV-F và ký hiệu nhận diện kháng thể tương ứng của chúng. Thông thường, các kháng thể được đề cập trong tài liệu này là theo danh pháp sau: Tiền tố Fc (ví dụ, “H4H”, “H1M”, “H2M”), sau đó là ký hiệu nhận diện bằng số (ví dụ, “3117” như được thể hiện trong bảng 1), sau đó là hậu tố “P” hoặc “N”. Vì vậy, theo danh pháp này, kháng thể có thể được gọi là, ví dụ “H1H3117”. Các tiền tố H4H, H1M, và H2M trên các tên gọi kháng thể được sử dụng trong tài liệu này chỉ vùng Fc cụ thể của kháng thể. Ví dụ, kháng thể “H2M” có Fc IgG2 của chuột, trong khi đó kháng thể “H4H” có Fc IgG4 của người. Theo đánh giá của chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, kháng thể H1M hoặc H2M có thể được chuyển hóa thành kháng thể H4H, và ngược lại, nhưng trong trường hợp bất kỳ, các miền biến đổi (bao gồm cả CDR), mà có thể được chỉ rõ bằng ký hiệu nhận diện bằng số được thể hiện trong bảng 1, sẽ vẫn như nhau. Các kháng thể có cùng một tên gọi kháng thể bằng số, nhưng khác biệt bởi hậu tố một chữ là N, B hoặc P chỉ các kháng thể có chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có các trình tự CDR đồng nhất nhưng có các thay đổi trình tự trong vùng mà nằm ngoài các trình tự CDR (tức là, trong vùng khung). Vì vậy, các biến thể N, B và P của một kháng thể cụ thể có các trình tự CDR đồng nhất trong vòng các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của chúng nhưng khác biệt với nhau trong vùng khung của chúng.

Các đối chứng kháng thể

Các đối chứng của kháng thể kháng RSV-F được đưa vào trong các ví dụ dưới đây nhằm mục đích so sánh. Các đối chứng âm khớp kiểu tương đương cũng được sử dụng trong các ví dụ. Một kháng thể đối chứng kháng RSV-F trong tài liệu này được gọi tên là đối chứng I và là kháng thể kháng RSV-F được làm cho giống của người có các trình tự miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể palivizumab (SYNAGIS®) được làm cho giống của người như được nêu ra trong US7635568 và US5824307. Miền biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được biểu hiện lần lượt với miền ổn định của kappa và gamma-1 của người. Một kháng thể kháng RSV-F trong tài liệu

này được gọi tên là đôi chứng II và là biến thể kháng thể kháng RSV-F được làm cho giống của người của palivizumab, có các trình tự miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể motavizumab (NUMAX™) được làm cho giống của người được mô tả trong US2003/0091584 và bởi Wu *et al*, (2007), J. Mol. Biol. 368:652-665. Miền biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được biểu hiện lần lượt với miền ổn định của kapa và gama-1 của người. Một kháng thể kháng RSV-F khác được gọi tên là đôi chứng III (còn được gọi là AM-22) và được mô tả trong patent Mỹ số 8568726. Trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của AM-22 được thể hiện trong SEQ ID NO: 357 (đối với chuỗi nặng của kháng thể) và SEQ ID NO: 358 (đối với chuỗi nhẹ của kháng thể).

Bảng 1

	Các SEQ ID NO:							
Tên gọi kháng thể	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H1H3564P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H3565P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H3566P	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H3567P	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H3581P	66	68	70	72	74	76	78	80
H1H3583P	82	84	86	88	90	92	94	96
H1H3589P	98	100	102	104	106	108	110	112
H1H3591P	114	116	118	120	122	124	126	128
H1H3592P	130	132	134	136	138	140	142	144
H1H3597P	146	148	150	152	154	156	158	160
H1H3598P	162	164	166	168	170	172	174	176
H1H3603P	178	180	182	184	186	188	190	192
H1H3604P	194	196	198	200	202	204	206	208
H1H3605P	210	212	214	216	218	220	222	224
H1H3607P	226	228	230	232	234	236	238	240
H1H3608P2	242	244	246	248	250	252	254	256
H1H3592P2	258	260	262	264	266	268	270	272

H1H3592P3	274	276	278	280	282	284	286	288
H1M3621N	290	292	294	296	298	300	302	304
H1M3622N	306	308	310	312	314	316	318	320
H1M2634N	322	324	326	328	330	332	334	336
H1M3627N	338	340	342	344	346	348	350	352

Ví dụ 3. Ái lực liên kết của kháng thể và các hằng số động học của các kháng thể đơn dòng kháng RSV-F của người như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt

Ái lực liên kết và các hằng số động học của các kháng thể đơn dòng kháng RSV-F của người được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C (các bảng 2-3). Các phép đo được thực hiện trên công cụ Biacore 4000 hoặc T-200. Các kháng thể, được biểu hiện với Fc của chuột (AbPID tiền tố H1M; H2M) hoặc Fc IgG1 của người (AbPID tiền tố H1H), được bắt giữ lên bề mặt cảm biến Fc kháng của chuột hoặc kháng của người (dạng thức bắt giữ Mab), và protein dạng monome tan (RSV-F.mmh; SEQ ID NO: 353) được tiêm trên bề mặt này. Tất cả các nghiên cứu liên kết Biacore được thực hiện trong dung dịch đệm chạy HBST (HEPES 0,01M độ pH 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, 0,005% thể tích/thể tích chất hoạt động bề mặt P20). Các nồng độ khác nhau của RSV-F.mmh được điều chế trong dung dịch đệm chạy HBST được tiêm trên bề mặt đã bắt giữ kháng thể kháng RSV-F đơn dòng ở tốc độ dòng chảy là 30µl/phút (Biacore 4000) hoặc ở tốc độ dòng chảy là 50µl/phút (Biacore T-200) và mức kết hợp RSV-F.mmh với kháng thể đơn dòng đã được bắt giữ được theo dõi lần lượt trong 6 phút hoặc 3 phút. Mức phân ly RSV-F.mmh khỏi kháng thể đơn dòng trong dung dịch đệm chạy HBST được theo dõi trong 8 đến 10 phút ở 25°C. Hằng số tốc độ kết hợp (k_a) và hằng số tốc độ phân ly (k_d) động học được xác định bằng cách xử lý và làm khớp dữ liệu với mô hình liên kết 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm làm khớp đường cong Scrubber 2.0. Hằng số cân bằng phân ly liên kết (K_D) và thời gian bán hủy phân ly ($t_{1/2}$) được tính từ hằng số tỷ số động học là: $K_D (M) = k_d / k_a$; và $t_{1/2} (\text{phút}) = (\ln 2) / (60 * k_d)$.

Các kháng thể kháng RSV-F theo sáng chế đã thể hiện khoảng ái lực rộng đối với RSV-F.mmh. Đối chứng I, được tạo ra trên cơ sở trình tự công cộng của palivizumab

được nêu ra trong US 7,635,568, và đối chứng II, được tạo ra dựa trên trình tự công cộng của motavizumab như được mô tả trong tài liệu: Wu *et al*, (2007), (J. Mol. Biol. 368:652-665) đã thể hiện mức khác biệt ~70 lần (đối chứng I; 38nM so với đối chứng II; 0,43nM) về ái lực mà đã được ghi nhận trước đó.

Bảng 2: Ái lực liên kết Biacore của mAb tế bào lai ở 25°C

Khả năng liên kết ở 25°C / dạng thức bắt giữ Mab				
AbPID	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	t_{1/2} (phút)
H1M3621N	2,05E+05	2,08E-04	1,01E-09	56
H1M3622N	3,84E+04	9,13E-05	2,38E-09	127
H1M3624N	1,79E+05	1,83E-04	1,02E-09	63
H1M3627N	2,59E+05	5,23E-04	2,02E-09	22

Bảng 3: Ái lực liên kết Biacore của Fc mAb của người ở 25°C

Khả năng liên kết ở 25°C / dạng thức bắt giữ Mab				
AbPID	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	t_{1/2} (phút)
H1H3564P	3,10E+03	7,78E-05	2,50E-08	148
H1H3565P	1,93E+04	5,80E-05	3,01E-09	199
H1H3566P	2,04E+04	4,20E-05	2,06E-09	275
H1H3567P	6,05E+04	2,63E-03	4,34E-08	4
H1H3581P	NB	NB	NB	NB
H1H3583P	8,94E+04	3,08E-03	3,44E-08	4
H1H3589P	3,77E+04	9,14E-03	2,43E-07	1
H1H3591P	4,46E+04	1,53E-03	3,42E-08	8
H1H3592P	1,06E+05	4,66E-04	4,39E-09	25
H1H3592P2	9,93E+04	1,46E-03	1,47E-08	8
H1H3592P3	8,86E+04	7,47E-04	8,43E-09	15
H1H3597P	NB	NB	NB	NB
H1H3598P	NB	NB	NB	NB
H1H3603P	3,00E+03	1,23E-04	4,10E-08	94
H1H3604P	3,10E+03	9,27E-05	3,00E-08	125
H1H3605P	2,80E+03	1,68E-04	5,90E-08	69
H1H3607P	4,20E+03	1,48E-04	3,50E-08	78
H1H3608P2	4,85E+03	2,60E-05	5,35E-09	445
H1H3627N	2,56E+05	1,49E-04	5,81E-10	78

Đối chứng I	6,75E+04	2,57E-03	3,81E-08	4
Đối chứng II	1,89E+05	8,13E-05	4,29E-10	142

NB: Không quan sát thấy hiện tượng liên kết trong các điều kiện của thí nghiệm

Ví dụ 4. Các kháng thể protein dung hợp virus hợp bào hô hấp (RSV-F) thể hiện khả năng trung hòa hiệu nghiệm qua chủng phân nhóm A và phân nhóm B của RSV

Các kháng thể đã được tinh chế được kiểm tra trong thử nghiệm trung hòa vi lượng RSV để xác định độ hiệu nghiệm. Nói một cách vắn gọn, 10^4 tế bào HEp-2 được nuôi cấy trong môi trường MEM có nồng độ glucoza cao, được bổ sung Hyclone FBS 5%, L-glutamin và các chất kháng sinh, được ươm vào các vi đĩa 96 lỗ màu đen có đáy trong suốt và được ủ trong 16-18 giờ (37°C , CO_2 5%). Tiếp theo, các nồng độ khác nhau của các kháng thể, bắt đầu ở mức 666nM với các lần pha loãng kế tiếp 1:5 trong môi trường, được ủ với chủng RSV 1540 (A2) ở mức bội nhiễm là 0,04 trong 2 giờ (37°C , CO_2 5%). Bao gồm cả đối chứng kiểu tương đương không có virus và không liên quan.

Sau khi ủ, hỗn hợp kháng thể: virus được bổ sung vào tế bào HEp-2 và tình trạng lây nhiễm được duy trì trong 3 ngày. Mức độ lây nhiễm được xác định bằng cách cố định các tế bào trong PFA 2% và thực hiện ELISA bằng kháng thể kháng RSV của dê/kháng thể HRP kháng của dê. Các chất phản ứng phát quang được bổ sung vào các lỗ và tín hiệu được phát hiện bằng cách sử dụng máy đọc đĩa (Victor X3, Perkin Elmer). Các trị số về mức phát quang được phân tích bằng phương trình log ba thông số trên đường cong đáp ứng 11 điểm (GraphPad Prism).

Các kháng thể theo sáng chế đã thể hiện khoảng hoạt tính trung hòa rộng chống chủng RSV A2 (1540) (bảng 4-5). Một vài kháng thể đã thể hiện chỉ số IC_{50} thấp hơn đối chứng I trong khi chỉ có một số ít kháng thể tiêu biểu H1H3627N, H1H3591P, H1H3592P và H1H3592P3 đã thể hiện khả năng trung hòa tốt hơn đối chứng II. Các kháng thể lựa chọn (H1H3627N, H1H3592P3) cũng được thử nghiệm về khả năng của chúng trong việc trung hòa chủng RSV phân nhóm B (bảng 6).

Ví dụ này thể hiện tính hiệu quả của các kháng thể theo sáng chế này trong việc trung hòa một vài chủng của RSV-F, qua hai phân nhóm, *in vitro*, với độ hiệu nghiệm cao hơn đã được thể hiện trước đó đối với các đối chứng đã được xác lập.

Bảng 4. Độ hiệu nghiệm trung hòa của mAb đã được lựa chọn chống RSV A2 (1540)

	IC₅₀ [pM] đối với khả năng trung hòa RSV A2:						
AbPID	Thử nghiệm 1	Thử nghiệm 2	Thử nghiệm 3	Thử nghiệm 4	Thử nghiệm 5	Thử nghiệm 6	Thử nghiệm 7
H1M3621N	582	180	-	-	-	-	-
H1M3622N	320	82	-	-	-	-	-
H1M3624N	540	270	92	-	-	-	-
H1M3627N	4	4	5	-	-	10	-
H1H3564P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1H3565P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1H3566P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1H3567P	-	-	-	257	-	390	-
H1H3581P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1H3583P	-	-	-	-	50	-	-
H1H3589P	-	-	-	-	300	-	-
H1H3591P	-	-	-	6	-	8	6
H1H3592P	-	-	-	6	-	5	4
H1H3592P3							10
H1H3597P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1H3598P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1H3603P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1H3604P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1H3605P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1H3607P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1H3608P2	>10000	-	-	-	-	-	-
H1H3570P	>10000	-	-	-	-	-	-
H1H3627N	-	-	-	-	-	-	3
Đối chứng 1	1820	950	290	530	160	500	250
Đối chứng 2	50	30	23	20	12	12	12

Bảng 5. Độ hiệu nghiệm trung hòa của mAb đã được lựa chọn chống phân nhóm A của RSV

	Phân nhóm A trung hòa: IC₅₀ & mức cải thiện theo số lần gấp so với đối chứng 1
--	--

AbPID	RSV-A2 (1540) IC ₅₀ trung hòa [pM]	Lần	RSV-Long IC ₅₀ trung hòa [pM]	Lần
H1H3627N	2,6	138	7,3	73
H1H3592P3	10	36	15	35
Đối chứng I	360	--	536	--
Đối chứng II	14	25	65	8,2

Bảng 6. Độ hiệu nghiệm trung hòa của mAb đã được lựa chọn chống phân nhóm B của RSV

Phân nhóm B Trung hòa: IC ₅₀ & mức cải thiện theo số lần gấp so với đối chứng 1				
AbPID	RSV – 1580 IC ₅₀ trung hòa [pM]	Lần	RSV-9320 IC ₅₀ trung hòa [pM]	Lần
H1H3627N	6,7	55	11	42
H1H3592P3	31	12	100	4,6
Đối chứng I	375	--	460	--
Đối chứng II	43	8,7	56	8,2

Ví dụ 5. Các kháng thể được lựa chọn kháng RSV-F thể hiện khả năng trung hòa hiệu nghiệm tình trạng lây nhiễm RSV *in vivo*

A. Mô hình chuột

Các kháng thể tiêu biểu H1H3627N và H1H3592P3 được lựa chọn cho các nghiên cứu trung hòa RSV *in vivo* bằng cách sử dụng chuột Balb/c. Nói một cách vắn gọn, các con chuột Balb/c 7 tuần tuổi (n=4-5) (số lượng = 4 đến 5 con) được tiêm SC ở hai liều lượng (0,15 hoặc 0,05mg/kg) bằng cách sử dụng hoặc H1H3627N, H1H3592P3, đối chứng I, đối chứng II hoặc kháng thể khớp kiểu tương đương. Kháng thể mang (1mg/kg) được sử dụng trong tất cả các thử nghiệm để giảm thiểu hiện tượng mất kháng thể kháng RSV-F.

Một ngày sau khi tiêm, các con chuột được thử theo phương thức vào trong mũi bằng 50ul (10⁶ pfu) của chủng RSV A2 (1540). Bốn ngày sau lây nhiễm, huyết thanh được hút, các con chuột được làm chết, và phổi được chiết và làm đồng đều trong 1ml PBS bằng cách sử dụng thiết bị làm đồng đều OmniGLH. Sản phẩm đồng đều của phổi

được quay ly tâm để loại bỏ các mảnh vỡ tế bào và một phần của dịch nổi ở trên được sử dụng để xác định nồng độ mAb kháng RSV-F ở phổi. Dịch nổi ở trên còn lại được sử dụng để tạo các dịch pha loãng theo dãy mà được ủ với tế bào HEp-2 trong 2 giờ, để cho phép xảy ra quá trình xâm nhập của virus. Kế tiếp, dịch nổi ở trên được loại ra và các tế bào được chồng lên bằng 1% metylxenluloza. Sáu ngày sau, các tế bào được nhuộm bằng thuốc tím tinh thể và mảng được đếm và mức giảm virus theo $\log_{10}$ (logarit cơ số 10) được tính so với đối chứng kiểu tương đương.

Các kháng thể tiêu biểu H1H3627N và H1H3592P3 thì hiệu quả hơn trong việc làm giảm tổng lượng virus *in vivo* so với các kháng thể kháng RSV-F đối chứng I hoặc đối chứng II (các bảng 7a-7e). Cụ thể là, ở liều 0,15mg/kg, các kháng thể H1H3627N, H1H3592P3 và đối chứng II đều làm giảm mức lây nhiễm RSV ở phổi một cách hữu hiệu xuống gần mức không thể phát hiện được so với đối chứng I (sự thay đổi về mức giảm virus theo số lần hàm $\log(10) \geq 2,10$). Tổng các số đo IgG của người ở phổi và huyết thanh xác nhận rằng các mức kháng thể là tương đối nhất quán giữa các nhóm.

Ở liều thấp hơn được cho dùng, mức khác biệt lớn hơn về tính hiệu quả trung hòa giữa ba kháng thể so với đối chứng I là rõ ràng. Ở 0,05mg/kg, H1H3592P3 đã thể hiện mức giảm tổng lượng virus cao nhất, với sự thay đổi theo số lần gấp nằm trong khoảng từ 1,49 đến $> 2,07$ lần hàm logarit, so với sự thay đổi theo số lần gấp về mức giảm tổng lượng virus là 1,08 đến 1,36 lần hàm logarit của H1H3627N và 0,01 đến 0,65 lần hàm logarit của đối chứng II. Đối chứng I ở liều thấp hơn này thì chỉ hữu hiệu vừa phải với sự thay đổi về mức giảm tổng lượng virus là 0,03 đến 1,03 lần hàm logarit.

Các kết quả này cho thấy rằng cả H1H3627N và H1H3592P3 là những kháng thể trung hòa RSV hiệu nghiệm *in vivo*, mà kháng thể sau thể hiện xu hướng trở thành chất trung hòa hữu hiệu hơn đối với tình trạng lây nhiễm RSV ở liều thấp hơn.

Thử nghiệm khoảng liều dùng được thực hiện theo cùng một quy trình được mô tả trên đây, tiêm SC (dưới da) 4 liều lượng khác nhau của kháng thể đối chứng I (0,6, 0,3, 0,15 và 0,05mg/kg), và hai liều lượng (0,15 và 0,05mg/kg) của H1H3592P3 và đối chứng II. Mức giảm virus ở phổi được tính ở dạng tỷ lệ phần trăm của đối chứng kiểu tương đương (thử nghiệm M4, các bảng 7d-e).

Kháng thể tiêu biểu H1H3592P3 thì hiệu quả hơn trong việc làm giảm tổng lượng virus *in vivo* (ở chuột nhắt) so với các kháng thể kháng RSV-F đối chứng I hoặc đối chứng II. Ngoài ra, liều lượng của đối chứng I cần thiết để đạt đến mức giảm virus 99% ở phổi thì cao hơn liều lượng của H1H3592P3 là 3-4 lần.

Các bảng 7(a-e): Mức giảm virus RSV (log (10)) ở các con chuột sau khi cho dùng các kháng thể kháng RSV-F

Bảng 7a

Thử nghiệm M1		Liều: 0,15mg/kg			Liều: 0,05mg/kg		
PID	Số chuột trong mỗi nhóm	Mức giảm virus (log10)	mAb [ng/ml] Phổi	mAb [ng/ml] huyết thanh	Mức giảm virus (log10)	mAb [ng/ml] Phổi	mAb [ng/ml] huyết thanh
H1H3627N	5	>2,10	35 ± 18	1041 ± 212	1,20	7 ± 4	274 ± 38
H1H3592P3	5	>2,10	44 ± 14	1731 ± 770	>2,07	17 ± 4	438 ± 51
Đối chứng I	5	1,02	33 ± 11	895 ± 132	1,03	9 ± 5	365 ± 111
Đối chứng II	5	>2,10	82 ± 24	1948 ± 429	0,65	7 ± 4	555 ± 80
Đối chứng kiểu tương đương	5	Không có	76 ± 28	2180 ± 197	Không có	25 ± 2	1287 ± 120

Bảng 7b

Thử nghiệm M2		Liều: 0,15mg/kg			Liều: 0,05mg/kg		
PID	Số chuột trong mỗi nhóm	Mức giảm virus (log10)	mAb [ng/ml] Phổi	mAb [ng/ml] huyết thanh	Mức giảm virus (log10)	mAb [ng/ml] Phổi	mAb [ng/ml] huyết thanh
H1H3627N	5	>2,51	23 ± 8	724 ± 148	1,08	3 ± 3	300 ± 35
H1H3592P3	5	>2,51	27 ± 5	1261 ± 74	1,49	10 ± 2	333 ± 55
Đối chứng I	5	0,79	9 ± 2	611 ± 61	0,15	1 ± 1	221 ± 35

Đối chứng II	5	2,31	13 ± 8	587 ± 36	0,01	1 ± 3	237 ± 22
Đối chứng kiểu tương đương	5	Không có	46 ± 12	1389 ± 170	Không có	15 ± 4	498 ± 92

Bảng 7c

Thử nghiệm M3		Liều: 0,15mg/kg			Liều: 0,05mg/kg		
PID	Số chuột trong mỗi nhóm	Mức giảm virus (log10)	mAb [ng/ml] Phổi	mAb [ng/ml] huyết thanh	Mức giảm virus (log10)	mAb [ng/ml] Phổi	mAb [ng/ml] huyết thanh
H1H3627 N	4	2,7	26 ± 6	1143 ± 83	1,36	7 ± 1	394 ± 16
H1H3592 P3	4	>2,83	31 ± 12	947 ± 105	1,66	13 ± 4	371 ± 21
Đối chứng I	4	1,00	58 ± 14	1426 ± 114	0,03	6 ± 5	442 ± 27
Đối chứng II	4	2,35	20 ± 6	1152 ± 142	0,54	Dưới giới hạn phát hiện	373 ± 21
Đối chứng kiểu tương đương	4	Không có	41 ± 3	808 ± 52	Không có	37 ± 8	326 ± 26

Bảng 7d

Thử nghiệm M4 (ED ₉₉)		Liều: 0,6mg/kg		Liều: 0,3mg/kg	
PID	Số chuột trong mỗi nhóm	Mức giảm virus (%)	mAb [ng/ml] huyết thanh	Mức giảm virus (%)	mAb [ng/ml] huyết thanh
Đối chứng I	5	>99	8451,9 ± 2562	96,9	3129,7 ± 403

ND: Không được xác định

Bảng 7e

Thử nghiệm M4	Liều: 0,15mg/kg	Liều: 0,05mg/kg
---------------	-----------------	-----------------

(ED ₉₉)					
PID	Số chuột trong mỗi nhóm	Mức giảm virus (%)	mAb [ng/ml] huyết thanh	Mức giảm virus (%)	mAb [ng/ml] huyết thanh
H1H3592P3	5	>99	1578,9 ± 256	90,6	524,0 ± 42
Đối chứng I	5	57,9	1561,2 ± 282	24,2	547,5 ± 59
Đối chứng II	5	96,7	1566,0 ± 354	48,5	465,7 ± 85
Đối chứng kiểu tương đương	5	Không có	1406,0 ± 196	Không có	375,3 ± 86

ND: Không được xác định

B. Mô hình chuột bông

Các kháng thể tiêu biểu H1H3627N và H1H3592P3 được lựa chọn cho các nghiên cứu trung hòa RSV *in vivo* bằng cách sử dụng chuột bông. Nói một cách vắn gọn, chuột bông 6-8 tuần tuổi (n=5) được tiêm IM (vào trong cơ) ở hai liều lượng (5 hoặc 0,6mg/kg) bằng cách sử dụng hoặc H1H3627N, H1H3592P3, đối chứng I, đối chứng II hoặc kháng thể khớp kiểu tương đương.

Một ngày sau khi tiêm, chuột cống được thử theo phương thức vào trong mũi bằng 100ul (10⁵ pfu) của chủng RSV A2. Bốn ngày sau lây nhiễm, huyết thanh được hút, chuột cống được làm chết, và mô phổi và mô mũi được chiết để chuẩn độ virus. Sản phẩm đồng đều của phổi được quay ly tâm để loại bỏ các mảnh vỡ tế bào và một phần của dịch nổi ở trên được sử dụng để xác định nồng độ mAb kháng RSV-F ở phổi. Dịch nổi ở trên còn lại được sử dụng để tạo các dịch pha loãng theo dãy, mà được ủ với tế bào HEp-2 để cho phép xảy ra quá trình xâm nhập của virus. Tiếp đó, dịch nổi ở trên được loại ra và các tế bào được chồng lên bằng 1% metylxenluloza. Sáu ngày sau, các tế bào được nhuộm và mảng được đếm và mức giảm virus theo log₁₀ được tính so với đối chứng kiểu tương đương.

Kháng thể tiêu biểu H1H3592P3 thì hiệu quả hơn trong việc làm giảm tổng lượng virus ở phổi và mũi so với đối chứng I, và hiệu quả bằng đối chứng II ở phổi và tốt hơn

ở mũi. Kháng thể tiêu biểu H1H3627N chỉ tốt hơn so với đối chứng I và hiệu quả bằng đối chứng II ở mũi (bảng 8). Cụ thể là, ở liều 5mg/kg, các kháng thể H1H3627N, H1H3592P3, đối chứng I và đối chứng II đều làm giảm mức lây nhiễm RSV ở phổi một cách hữu hiệu xuống gần mức không thể phát hiện được so với đối chứng kiểu tương đương (thay đổi về mức giảm virus theo số lần hàm $\log(10) \geq 2,33$). Tuy nhiên, ở mũi, mức khác biệt lớn hơn về tính hiệu quả trung hòa giữa H1H3627N, H1H3592P3, đối chứng II so với đối chứng I là rõ ràng. H1H3592P3 đã thể hiện mức giảm tổng lượng virus lớn hơn (2,65 lần hàm logarit) so với H1H3627N (1,46 lần hàm logarit) hoặc đối chứng II (1,33 lần hàm logarit).

Ở liều thấp hơn được cho dùng, mức khác biệt lớn hơn về tính hiệu quả trung hòa giữa ba kháng thể so với đối chứng I là rõ ràng ở phổi. Ở 0,6mg/kg, H1H3592P3 đã thể hiện mức giảm tương tự về tổng lượng virus so với đối chứng II (1,5 lần hàm logarit) và chúng đều hiệu quả hơn so với đối chứng I (0,624 lần hàm logarit). H1H3627N đã thể hiện tính hiệu quả kém hơn ba kháng thể khác.

Tiếp theo, kháng thể tiêu biểu kháng RSV-F H1H3592P3 được lựa chọn để thử nghiệm khả năng của nó trong việc trung hòa phân nhóm B của RSV *in vivo* bằng cách sử dụng mô hình chuột bông. Đối với RSV/A, chuột bông từ 6 tuần tuổi đến 8 tuần tuổi ($n = 4-6$ /nhóm/thử nghiệm) được cho dùng vào trong cơ 5 hoặc 0,6mg/kg của H1H3592P3, đối chứng I hoặc đối chứng II. Ngày tiếp theo, các con vật được thử bằng 10^5 pfu của chủng RSV/B 18537. Bốn ngày sau khi thử, hiệu giá virus ở phổi và mũi được xác định cùng với hiệu giá kháng thể trong huyết thanh. Các kết quả được thể hiện trong bảng 9 là dữ liệu được tập hợp từ hai thử nghiệm độc lập.

H1H3592P3 đã thể hiện tính hiệu quả trong việc làm giảm tổng lượng virus RSV/B ở phổi ở cả liều cao và liều thấp (bảng 9). Ở 5,0mg/kg, tổng lượng virus RSV/B ở phổi được làm giảm là 2,21 lần hàm logarit với H1H3592P3, so với mức giảm là 2,11 lần hàm logarit bởi đối chứng I và 2,18 lần hàm logarit bởi đối chứng II. Ở 0,6mg/kg, tổng lượng virus RSV/B ở phổi được làm giảm là 1,29 lần hàm logarit với H1H3592P3, so với mức giảm là 0,75 lần hàm logarit bởi đối chứng I và 0,83 lần hàm logarit bởi đối chứng II.

Nhìn chung, H1H3592P3 đã thể hiện tính ưu việt trong việc trung hòa phân nhóm B của RSV ở phổi so với cả đối chứng I và II ở 0,6mg/kg. Ở 5mg/kg, H1H3592P3 đã

thể hiện khả năng trung hòa có thể so sánh được so với đối chứng I và đối chứng II trong việc làm giảm tổng lượng virus ở phổi.

Các kết quả này cho thấy rằng H1H3592P3 là chất trung hòa hiệu nghiệm đối với chủng RSV phân nhóm A và B *in vivo* ở chuột bông, là chất trung hòa hữu hiệu hơn đối với tình trạng lây nhiễm RSV ở liều cao ở mũi và ở liều thấp hơn ở phổi. Tính hiệu quả ở liều thấp thể hiện khả năng của chế độ liều thấp hơn trong lâm sàng.

Bảng 8: Mức giảm virus RSV-A (log (10)) ở chuột bông sau khi cho dùng các kháng thể kháng RSV-F

Thử nghiệm R1		Liều: 0,6mg/kg			Liều: 5,0mg/kg		
PID	Số chuột bông trong mỗi nhóm	Mức giảm virus ở phổi (log10)	Mức giảm virus ở mũi (log10)	mAb [ng/ml] huyết thanh Ngày 4	Mức giảm virus ở phổi (log10)	Mức giảm virus ở mũi (log10)	mAb [ng/ml] huyết thanh Ngày 4
H1H36 27N	5	0,34	0,22	3,43 ± 0,25	2,33	1,46	21,52 ± 5,47
H1H35 92P3	5	1,66	0,19	3,49 ± 0,55	2,56	2,66	46,28 ± 7,69
Đối chứng I	5	0,62	0,21	3,04 ± 0,29	2,37	1,07	39,95 ± 5,23
Đối chứng II	5	1,50	0,20	4,26 ± 0,66	2,55	1,33	24,06 ± 2,96
Đối chứng kiểu tương đương	4	Không có	Không có	3,78 ± 0,99	Không có	Không có	30,43 ± 6,66

Bảng 9: Mức giảm virus RSV-B (log (10)) ở chuột bông sau khi cho dùng các kháng thể kháng RSV-F

Thử nghiệm R2		Liều: 0,6mg/kg			Liều: 5,0mg/kg		
PID	Số chuột bông trong	Mức giảm virus ở phổi (log10)	Mức giảm virus ở mũi (log10)	mAb [ng/ml] huyết thanh	Mức giảm virus ở phổi (log10)	Mức giảm virus ở mũi (log10)	mAb [ng/ml] huyết thanh

	mỗi nhóm			Ngày 4			Ngày 4
H1H3592P3	10	1,29	0,21	3,89 ± 0,99	2,21	0,86	42,31 ± 13,5
Đối chứng I	11	0,75	0,15	3,87 ± 0,73	2,11	0,79	35,28 ± 11,8
Đối chứng II	11	0,83	0,10	3,75 ± 0,49	2,18	1,24	27,65 ± 7,49
Đối chứng kiểu tương đương	10	Không có	Không có	3,56 ± 1,17	Không có	Không có	34,28 ± 9,24

C. Mô hình chuột bông – xác định ED₉₉ của kháng thể tiêu biểu H1H3592P3

Các nghiên cứu khoảng liều dùng có sử dụng chuột bông được thực hiện để xác định xem ở mức liều nào kháng thể tiêu biểu H1H3592P3 làm giảm tổng lượng virus là >99% (tức là ED₉₉). Chuột bông được cho dùng theo phương thức IM liều H1H3592P3 hoặc kháng thể đối chứng 1 ở 10, 5, 2,5, 1,25 hoặc 0,62mg/kg với mục đích phòng bệnh. Ngoài ra, kháng thể đối chứng kiểu tương đương được cho dùng ở 10 hoặc 0,62mg/kg để xác định các hoạt chất trong nghiên cứu này. Sau khi điều trị bằng kháng thể, việc thử RSV của phân nhóm A (chủng RSV A2) hoặc phân nhóm B (chủng RSV B 18537) theo phương thức vào trong mũi được thực hiện. Bốn ngày sau lây nhiễm, huyết thanh được hút, chuột bông được làm chết, và mô phổi được chiết để chuẩn độ virus. H1H3592P3 ở mức liều là 0,62mg/kg đã đạt được mức giảm tổng lượng virus >99% ở phổi so với đối chứng 1, đối chứng này cần liều lượng là 2,5mg/kg để đạt đến cùng một mức giảm virus là >99% (bảng 10). Nồng độ cuối trung bình của đối chứng 1 (27µg/ml) ở ED₉₉ đã được tính đã tương quan hợp lý với công trình đã được công bố trước (Scott and Lamb, 1999), điều này cho thấy rằng nồng độ palivizumab trong huyết thanh (tức là đối chứng 1) là 30-40µg/ml, vào thời điểm lây nhiễm RSV, là gắn liền với mức giảm 99% về tổng lượng virus ở phổi. Nồng độ cuối trung bình của H1H3592P3 (4,9µg/ml) đã tương quan hợp lý với liều lượng thấp hơn 4 lần được phân phối ở ED₉₉ của nó. Các kết quả đối với phép thử phân nhóm B là tương tự (bảng 11) ở chỗ ED₉₉ của H1H3592P3 đạt được ở 2,5mg/kg trong khi đối chứng 1 cần sơ bộ là liều lượng cao hơn 4 lần

(10mg/kg) để thu được cùng một mức giảm virus ở phổi là >99%.

Tóm lại, các nghiên cứu này chứng minh rằng liều lượng H1H3592P3 với tần suất thưa hơn có thể đem lại cùng một mức bảo vệ với kiểu liều dùng hằng tháng hiện nay được sử dụng với palivizumab.

Bảng 10. Xác định ED₉₉ của các kháng thể kháng RSV-F sau khi thử phân nhóm A của RSV

Xác định ED₉₉ bằng phân nhóm A của RSV					
% mức giảm virus ở phổi					
PID	10mg/kg	5mg/kg	2,5mg/kg	1,25mg/kg	0,62mg/kg
H1H3592P3	>99	>99	>99	>99	>99
Đối chứng I	>99	>99	>99	98,9	95,9
Đối chứng kiểu tương đương	Không có	Không có	Không có	Không có	Không có
Nồng độ kháng thể trong huyết thanh (ug/ml)					
H1H3592P3	107,2 ±3,4	48,44 ±6,1	20,15 ±1,8	10,55 ±1,5	4,91 ±0,7
Đối chứng I	89,16 ±6,5	58,07 ±6,3	26,93 ±3,3	12,72 ±2,2	6,65 ±0,5
Đối chứng kiểu tương đương	90,57 ±12,6	--	--	--	5,39 ±0,5

Bảng 11. Xác định ED₉₉ của các kháng thể kháng RSV-F sau khi thử phân nhóm B của RSV

Xác định ED₉₉ bằng phân nhóm B của RSV					
% mức giảm virus ở phổi					
PID	10mg/kg	5mg/kg	2,5mg/kg	1,25mg/kg	0,62mg/kg
H1H3592P3	>99	>99	>99	98,4	96,7
Đối chứng I	>99	97,7	98,4	96,3	88,2
Đối chứng kiểu tương đương	Không có	Không có	Không có	Không có	Không có
Nồng độ kháng thể trong huyết thanh (ug/ml)					
H1H3592P3	98,04 ±18,4	50,99 ±7,8	27,82 ±4,9	10,49 ±1,7	7 ±0,3
Đối chứng I	98,89 ±10,9	42,74 ±8,9	26,46 ±3,3	16,06 ±2,2	7,58 ±1,1
Đối chứng kiểu tương đương	99,72 ±17,4	Không có	Không có	Không có	5,38 ±0,5

đương					
-------	--	--	--	--	--

Ví dụ 6. Tạo kháng thể đặc hiệu kép

Các kháng thể đặc hiệu kép khác nhau được tạo ra để sử dụng trong việc thực hiện các phương pháp theo sáng chế. Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu với RSV-F được tạo ra theo dạng thức đặc hiệu kép (“phần đặc hiệu kép”) mà trong đó các vùng biến đổi liên kết với các miền riêng biệt của protein RSV- F được liên kết với nhau để đem lại tính đặc hiệu miền kép trong một phân tử liên kết đơn lẻ. Các phần đặc hiệu kép được thiết kế một cách thích hợp có thể làm tăng tổng mức hiệu quả trung hòa virus thông qua việc làm tăng cả tính đặc hiệu và độ bền liên kết. Các vùng biến đổi có tính đặc hiệu đối với các miền riêng biệt được ghép cặp trên khung cấu trúc mà cho phép mỗi vùng liên kết một cách đồng thời với các epitop tách biệt, hoặc với các vùng khác nhau trong một miền. Trong một ví dụ về phần đặc hiệu kép, các vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) từ phần liên kết có tính đặc hiệu đối với một miền được tái tổ hợp với các vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) từ một loạt phần liên kết có tính đặc hiệu đối với miền thứ hai để nhận diện các thành phần V_L không cùng gốc mà có thể được ghép cặp với V_H gốc mà không phá vỡ tính đặc hiệu gốc đối với V_H đó. Bằng cách này, một đoạn V_L đơn lẻ (ví dụ, V_{L1}) có thể được kết hợp với hai miền V_H khác nhau (ví dụ, V_{H1} và V_{H2}) để tạo ra phần đặc hiệu kép bao gồm hai “nhánh” liên kết ($V_{H1}-V_{L1}$ và $V_{H2}-V_{L1}$). Việc sử dụng một đoạn V_L đơn lẻ làm giảm sự phức tạp của hệ thống và nhờ đó, đơn giản hóa và làm tăng hiệu suất trong quy trình tạo dòng thuần, biểu hiện và tinh chế được sử dụng để tạo ra phần đặc hiệu kép (ví dụ, xem, USSN13/022759 và US2010/0331527).

Theo cách khác, các kháng thể mà liên kết RSV-F và một đích thứ hai, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, một kháng thể kháng RSV-F thứ hai khác, hoặc biến độc tố, hoặc vacxin, có thể được điều chế theo dạng thức đặc hiệu kép bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong tài liệu này, hoặc các kỹ thuật khác mà chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết. Các vùng biến đổi của kháng thể liên kết với các vùng riêng biệt có thể được liên kết lại với các vùng biến đổi mà liên kết với vị trí thích hợp trên, ví dụ, một kháng nguyên virus khác để đem lại tính đặc hiệu kháng nguyên kép trong một phân tử liên kết đơn lẻ. Các phần đặc hiệu kép được thiết kế một cách thích hợp có tính chất này biểu hiện chức năng kép. Ví dụ, trong trường hợp kháng thể đặc hiệu kép mà

liên kết với RSV-F và RSV-G, thì kháng thể này có thể có khả năng trung hòa virus tốt hơn, mà không cần đến việc cho dùng chế phẩm chứa hai kháng thể tách biệt. Các vùng biến đổi có tính đặc hiệu đối với RSV-F, được kết hợp với vùng biến đổi có tính đặc hiệu đối với RSV-G và được ghép cặp trên khung cấu trúc mà cho phép mỗi vùng biến đổi liên kết với các kháng nguyên tách biệt.

Các phân liên kết đặc hiệu kép được kiểm tra về khả năng liên kết và phong bế chức năng các kháng nguyên đích, ví dụ, RSV-F và RSV-G, trong thử nghiệm bất kỳ trong số các thử nghiệm được mô tả trên đây đối với các kháng thể. Ví dụ, các phương pháp tiêu chuẩn để đo khả năng liên kết protein tan thì được sử dụng để đánh giá tương tác đặc hiệu kép, như Biacore, ELISA, sắc ký đào thải theo kích cỡ, tán xạ ánh sáng laser đa góc, đo nhiệt lượng quét trực tiếp, và các phương pháp khác. Khả năng liên kết các kháng thể đặc hiệu kép với cả RSV-F và RSV-G được xác định thông qua việc sử dụng thử nghiệm liên kết ELISA mà trong đó các peptit tổng hợp là các kháng nguyên khác nhau được phủ lên các lỗ của đĩa vi chuẩn độ, và khả năng liên kết của phân đặc hiệu kép được xác định thông qua việc sử dụng kháng thể phát hiện thứ hai. Cũng có thể thực hiện các thử nghiệm liên kết bằng cách sử dụng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt, mà trong đó tương tác liên kết thời gian thực của peptit với kháng thể được đo bằng cách tạo dòng chảy peptit hoặc phân đặc hiệu kép băng qua bề mặt cảm biến mà phân đặc hiệu kép hoặc peptit được lần lượt bắt giữ trên đó. Khả năng phong bế chức năng *in vitro* của cả RSV-F và RSV-G bởi phân đặc hiệu kép được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm sinh học bất kỳ như thử nghiệm trung hòa được mô tả trong tài liệu này, hoặc bằng các nghiên cứu về khả năng bảo vệ *in vivo* ở các mô hình động vật thích hợp, như những loại được mô tả trong tài liệu này, hoặc ở mô hình viêm phổi *in vivo*.

Ví dụ 7: Tạo các thể đột biến lẫn lộn RSV *in vitro* để xác định epitop liên kết của H1H3592P3

Tạo các thể đột biến lẫn lộn của H1H3592P3

3×10^5 tế bào HEp-2/lỗ được dàn mỏng trong đĩa 6 lỗ trong 24 giờ. Nồng độ của H1H3592P3, nằm trong khoảng từ 50ug/ml đến 0,016ug/ml được trộn với chủng phân nhóm A của RSV 1540 hoặc chủng phân nhóm B của RSV 1580 trong 1 giờ ở 37°C. Sau khi ủ đồng thời, hỗn hợp RSV/kháng thể được bổ sung vào tế bào HEp-2 đã được

uom trước đó ở mức bội nhiễm (multiplicity of infection-MOI) là 10 đơn vị tạo mảng (plaque-forming unit-pfu)/tế bào. Các tế bào được ủ trong 6 ngày, và tác dụng gây bệnh tế bào được theo dõi hàng ngày bằng cách sử dụng phương pháp soi kính hiển vi quang học. Vào ngày 6, các hàm lượng của mỗi lỗ được thu hoạch, được điều chỉnh đến nồng độ ban đầu của kháng thể và được sử dụng để gây nhiễm tế bào HEp-2 mới được uom. Việc cấy truyền theo dây này được lặp lại cho đến khi quan sát thấy tác dụng gây bệnh tế bào rõ ràng ở các nồng độ H1H3592P3 (50ug/ml) cao, mức này là xấp xỉ lớn hơn IC_{50} của kháng thể 2 lần hàm logarit, cho thấy sự có mặt của thể đột biến virus. Các dịch nổi ở trên từ các lỗ này được xác nhận nhờ sự có mặt của virus kháng thuốc thông qua thử nghiệm trung hòa vi lượng (được mô tả dưới đây) và việc phân lập mảng được thực hiện trong đĩa nuôi cấy mô 10cm. 10 mảng riêng biệt được trải rộng trong đĩa 6 lỗ và virus được kiểm tra lại về khả năng kháng thuốc thông qua phương pháp trung hòa vi lượng. Sau đó, thực hiện việc giải trình tự trên các thể đột biến virus này.

Thử nghiệm trung hòa vi lượng

Để xác nhận liệu các thể đột biến lẫn trốn được tạo ra dưới áp lực của H1H3592P3 có kháng lại phương pháp trung hòa hay không, thử nghiệm trung hòa vi lượng ở tế bào HEp-2 được thực hiện. Nói một cách vắn gọn, 10^5 tế bào Hep2 được nuôi cấy trong môi trường DMEM 1x, được bổ sung Hyclone FBS 5%, L-glutamin và các chất kháng sinh, được uom vào các vi đĩa 96 lỗ màu đen có đáy trong suốt và được ủ trong 16-18 giờ (37°C, CO₂ 5%).

Tiếp theo, các nồng độ khác nhau của các kháng thể, bắt đầu ở mức 666nM và được pha loãng 1:5 trong môi trường, được ủ trong 2 giờ (37°C, CO₂ 5%) với RSV kiểu hoang dại (phân nhóm A hoặc B) hoặc các thể đột biến lẫn trốn từ cả phân nhóm A và B, ở mức MOI từ 0,04 đến 0,4. Các đối chứng không chứa virus hoặc các đối chứng chứa virus nhưng không có các kháng thể. Tất cả các dịch pha loãng của kháng thể được thực hiện hai lần như nhau. Sau khi ủ, hỗn hợp kháng thể/virus được bổ sung vào các tế bào và cho phép gây nhiễm trong 3 ngày. Tình trạng lây nhiễm được xác định bằng cách cố định các tế bào trong PFA 2% và ELISA bằng kháng thể kháng RSV của dê/kháng thể HRP kháng của dê được thực hiện. Các chất phản ứng phát quang được bổ sung vào các lỗ và tín hiệu được phát hiện bằng cách sử dụng máy đọc đĩa (Victor X3, Perkin

Elmer). Các trị số về mức phát quang được phân tích bằng phương trình logarit ba thông số trên đường cong đáp ứng 11 điểm (GraphPad Prism).

Các kết quả

Thể đột biến lẫn trộn của các virus hợp bào hô hấp được tạo ra để lập bản đồ vùng liên kết đặc hiệu của H1H3592P3 với RSV-F. Nói một cách vắn gọn, tế bào HEp-2, được gây nhiễm bằng chủng RSV 1540 (phân nhóm A) hoặc 1580 (phân nhóm B) được xử lý bằng H1H3592P3 nằm trong khoảng từ 50ug/ml đến 0,016ug/ml. Sau 6 ngày, các hàm lượng từ mỗi lỗ được sử dụng để gây nhiễm tế bào HEp-2 mới được urom. Việc cấy truyền theo dãy này được tiếp tục cho đến khi quan sát thấy tác dụng gây bệnh tế bào ở tế bào HEp-2 thậm chí khi có mặt liều kháng thể cao nhất, cho thấy sự có mặt của thể đột biến virus RSV được tạo ra dưới áp lực lựa chọn. Nhìn chung, thể đột biến virus được phân lập khỏi mười mảng riêng biệt, đã được xác nhận về khả năng kháng lại phương pháp trung hòa khi có mặt H1H3592P3 và kế tiếp, được giải trình tự.

Phép phân tích trình tự xác nhận rằng các đột biến lẫn trộn của H1H3592P3 đã được phát hiện ở các vị trí axit amin 173 và 174 (S173Y và T174K) của RSV-F (SEQ ID NO: 354), chứng tỏ rằng các axit amin này đóng một vai trò quan trọng trong quá trình liên kết của kháng thể và trung hòa virus. Các báo cáo trước đã xác định được rằng các epitop liên kết của các kháng thể kháng RSV đối chứng I và đối chứng II nằm giữa S255 – N276. Dữ liệu từ các nghiên cứu này cho thấy vị trí liên kết của H1H3592P3 trên RSV-F mà đóng vai trò chính trong quá trình trung hòa virus (xem bảng 12) và khác biệt với vị trí liên kết cần thiết cho các kháng thể đối chứng đã được xác lập trước đó.

Bảng 12: Tính hiệu quả trung hòa của H1H3592P3 và các kháng thể kháng RSV đối chứng đối với chủng RSV phân nhóm A và B và các thể đột biến lẫn trộn đi kèm

Virut	H1H3592P3 (IC ₅₀ , pM)	Đối chứng I (IC ₅₀ , pM)	Đối chứng II (IC ₅₀ , pM)
Phân nhóm A kiểu hoang dại (RSV/A)	177	1140	108
RSV/A S173Y	Kháng thuốc	1710	170
Phân nhóm B kiểu hoang dại (RSV/B)	290	1900	260
RSV/B S173T	Kháng thuốc	1900	177
RSV/B T174K	Kháng thuốc	640	108

RSV/B S173T/T174K	Kháng thuốc	980	218
-------------------	-------------	-----	-----

Ví dụ 8: Xác định epitop liên kết của H1H3592P3 với RSV-F bằng cách sử dụng phương pháp trao đổi hydro-đoteri & phép đo phổ khối

Phương pháp trao đổi hydro/đoteri (trao đổi H/D) kết hợp với phân cắt bằng hệ tiêu hóa và đo phổ khối được thực hiện để xác định epitop liên kết của kháng thể kháng RSV-F H1H3592P3 với RSV-F tái tổ hợp. Hai dạng thức trao đổi H/D (được mô tả chi tiết dưới đây) được sử dụng: Phương pháp ‘dung dịch kết hợp/hạt phân ly’ mà trong đó các đoạn peptit RSV-F mà được bảo vệ bởi H1H3592P3 khỏi quá trình trao đổi ngược giữ lại D₂O và thu được trọng lượng phân tử cao hơn (trị số m/z) bằng phương pháp đo phổ khối và phương pháp đối chứng ‘hạt kết hợp/hạt phân ly’ mà xác lập trị số m/z đường chuẩn cho tất cả các peptit RSV-F. Việc lấy trị số m/z thu được bằng cách sử dụng phương pháp ‘dung dịch kết hợp/hạt phân ly’ trừ đi trị số m/z đối chứng thu được các vùng axit amin nhất định mà thể hiện trị số m/z delta khác không, tức là D₂O dư mà tương ứng với epitop liên kết giữa H1H3592P3 và RSV-F.

Các phương pháp

Dạng thức dung dịch kết hợp/ hạt phân ly

Trong dạng thức ‘dung dịch kết hợp/hạt phân ly’ (trao đổi kết hợp trong dung dịch sau đó là trao đổi phân ly trên hạt), protein RSV-F.mmh (SEQ ID NO: 353) được đoteri hóa trong 5 phút hoặc 10 phút trong dung dịch đệm PBS được điều chế với D₂O, và sau đó, được liên kết với H1H3592P3 được gắn cộng hóa trị với hạt agarosa N-hydroxysuxinimit (NHS) (GE Lifescience) thông qua quá trình ủ 2 phút. Phức hợp hạt RSV-F/H1H3592P3 được rửa bằng dung dịch đệm PBS (được điều chế với H₂O không được đoteri hóa) và được ủ trong dung dịch đệm PBS trong một nửa khoảng thời gian trao đổi kết hợp. Sau khi trao đổi phân ly, RSV-F đã liên kết được rửa giải từ các hạt bằng dung dịch TFA lạnh như băng có độ pH thấp. Sau đó, RSV-F đã được rửa giải được tiêu hóa bằng pepsin được làm bất động (Thermo Scientific) trong 5 phút. Các peptit thu được được khử muối bằng cách sử dụng mũi pipet sắc ký ZipTip và được phân tích ngay lập tức bằng phương pháp đo phổ khối giải hấp ion hóa bằng chiếu laze có sự trợ giúp của cơ chất UltrafleXtreme- thời gian bay (UltrafleXtreme matrix assisted

laser desorption ionization time of flight-MALDI-TOF)-TOF.

Dạng thức hạt kết hợp/hạt phân ly

Trong dạng thức ‘hạt kết hợp/hạt phân ly’ (trao đổi kết hợp trên các hạt sau đó là trao đổi phân ly trên hạt), trước tiên RSV-F.mmh (SEQ ID NO: 353) được liên kết với các hạt agaroza H1H3592P3 và sau đó, được ủ trong 5 phút hoặc 10 phút trong D₂O để trao đổi kết hợp. Phức hợp hạt RSV-F / H1H3592P3 được rửa bằng dung dịch đệm PBS (được điều chế với H₂O không được đơteri hóa) và được ủ trong dung dịch đệm PBS trong một nửa khoảng thời gian trao đổi kết hợp. Sau khi trao đổi phân ly, RSV-F đã liên kết được rửa giải từ các hạt bằng dung dịch TFA lạnh như băng có độ pH thấp. Sau đó, RSV-F đã được rửa giải được tiêu hóa bằng pepsin được làm bất động (Thermo Scientific) trong 5 phút. Các peptit thu được được khử muối bằng cách sử dụng mũi pipet sắc ký ZipTip và được phân tích ngay lập tức bằng phương pháp đo phổ khối MALDI-TOF-TOF. Các trị số trung bình hoặc tỷ lệ giữa khối lượng và điện tích (m/z) trung bình của tất cả các peptit đã được phát hiện được tính và được đem so sánh giữa thử nghiệm này và thử nghiệm ‘dung dịch kết hợp/hạt phân ly’.

Nhận diện peptit

Việc nhận diện các peptit được thực hiện bằng cách sử dụng sắc ký lỏng-Orbitrap Elite (Thermo Scientific).

Các kết quả

Bảng 13 là sự so sánh chi tiết của trị số m/z delta trung bình của tất cả các peptit RSV-F được phát hiện bằng phương pháp đo phổ khối MALDI-TOF sau quá trình trao đổi H/D và phân cắt bằng hệ tiêu hóa. Hai đoạn tương ứng với các axit amin 161-171 (EGEVNKIKSAL, (SEQ ID NO: 355)) và 172-188 (LSTNKAVVSLNGVSVL, (SEQ ID NO: 356)) của SEQ ID NO: 354 có các trị số delta trung bình cao hơn 0,20, ngưỡng quan sát thấy trong nhóm được xem là có tính chỉ báo về sự tiếp xúc kháng thể-protein và vì vậy là về vùng epitop. Cũng cần phải lưu ý rằng peptit tín hiệu tương ứng với các axit amin 161-171 không được định lượng trong thử nghiệm trao đổi kết hợp 10 phút do tỷ lệ tín hiệu-tạp thấp. Tuy nhiên, trị số delta là 0,88, được phát hiện ở thử nghiệm trao

đổi kết hợp 5 phút, là cao hơn nhiều so với ngưỡng 0,2 và có thể được quy cho sự thay đổi đáng kể về tốc độ trao đổi H/D sau khi RSV-F liên kết với H1H3592P3.

Ngoài ra, đoạn peptit tương ứng với các axit amin 172-188 chứa các axit amin của hai thể đột biến lẫn trộn RSV (S173Y và T174K; xem, ví dụ 7), thể đột biến này kháng lại phương pháp điều trị bằng H1H3592P3, chứng tỏ rằng hai axit amin này đóng vai trò nhất định trong quá trình liên kết của kháng thể và trung hòa virus. Vì vậy, dạng kết hợp của việc giải trình tự thể đột biến RSV lẫn trộn cùng với trao đổi H/D hỗ trợ các axit amin 161-188 của SEQ ID NO: 354 xác định ít nhất một phần vùng liên kết trong RSV-F đối với kháng thể H1H3592P3.

Bảng 13. Trị số (m/z) trung bình của các peptit tiêu hóa RSV-F sau quá trình trao đổi ngược sau khi đơteri hóa khi vắng mặt (dung dịch kết hợp/hạt phân ly) và khi có mặt (hạt kết hợp/hạt phân ly) H1H3592P3

Các gốc	Thử nghiệm I trao đổi kết hợp 5 phút /trao đổi phân ly 2,5 phút			Thử nghiệm II trao đổi kết hợp 10 phút /trao đổi phân ly 5 phút		
	hạt kết hợp / hạt phân ly (m/z)	dung dịch kết hợp / hạt phân ly (m/z)	delta	hạt kết hợp / hạt phân ly (m/z)	dung dịch kết hợp / hạt phân ly (m/z)	delta
46-52	791,06	791,10	0,04	791,06	791,15	0,09
48-56	1083,32	1083,37	0,05	1083,32	1083,35	0,03
48-58	1297,42	1297,44	0,02	1297,40	1297,44	0,04
79-92	1665,81	1665,96	0,15	1665,86	1665,89	0,03
94-107	1519,93	1520,00	0,06	1520,01	1520,09	0,07
96-107	1278,64	1278,61	-0,03	1278,61	1278,73	0,12
96-108	1434,61	1434,60	-0,01	1434,50	1434,63	0,13
148-160	1308,97	1309,12	0,16	Không có	Không có	Không có
161-171	1188,72	1189,60	0,88	Không có	Không có	Không có
172-188	1689,44	1691,68	2,24	1689,60	1691,07	1,47
220-230	1390,02	1390,06	0,04	1389,98	1389,93	-0,05
220-232	1632,30	1632,34	0,04	1632,29	1632,37	0,08
223-230	1048,49	1048,54	0,05	1048,44	1048,55	0,11
223-232	1291,16	1291,21	0,05	1291,12	1291,18	0,07
231-236	760,95	760,95	0,00	761,02	760,95	-0,06
233-240	966,29	966,33	0,04	966,20	966,30	0,09
233-249	1780,20	1780,39	0,19	1780,38	1780,38	0,00
261-277	1977,81	1977,91	0,10	1977,92	1977,80	-0,13
261-279	2205,05	2205,12	0,07	2205,10	2205,20	0,10
278-285	958,20	958,34	0,14	958,15	958,29	0,14

278-286	1121,50	1121,57	0,07	1121,54	1121,59	0,05
278-289	1453,19	1453,16	-0,03	1453,14	1453,08	-0,06
280-286	894,20	894,22	0,02	894,29	894,28	-0,02
280-289	1225,75	1225,80	0,05	1225,79	1225,81	0,02
280-290	1312,70	1312,70	-0,01	1312,86	1312,74	-0,13
457-467	1329,73	1329,82	0,09	1329,73	1329,76	0,03
468-477	1180,57	1180,67	0,10	1180,60	1180,42	-0,18
527-545	2132,30	2132,32	0,02	2132,39	2132,38	-0,01
534-545	1318,54	1318,54	0,00	1318,64	1318,50	-0,13
537-545	988,92	988,87	-0,05	988,93	988,84	-0,08
546-557	1528,62	1528,68	0,07	1528,64	1528,64	0,00
Không có ký hiệu nhận diện	743,16	743,06	-0,10	743,10	742,99	-0,11
Không có ký hiệu nhận diện	844,01	843,98	-0,03	844,03	843,96	-0,07
Không có ký hiệu nhận diện	901,26	901,40	0,13	901,36	901,40	0,04
Không có ký hiệu nhận diện	943,15	943,19	0,04	943,24	943,20	-0,04
Không có ký hiệu nhận diện	1090,41	1090,45	0,04	1090,48	1090,51	0,03
Không có ký hiệu nhận diện	1143,51	1143,61	0,10	1143,53	1143,57	0,04
Không có ký hiệu nhận diện	1325,52	1325,56	0,04	1325,54	1325,66	0,12

Không có ký hiệu nhận diện	1353,69	1353,64	-0,06	1353,77	1353,61	-0,16
Không có ký hiệu nhận diện	1550,39	1550,44	0,05	1550,45	1550,40	-0,05
Không có ký hiệu nhận diện	2074,49	2074,41	-0,08	2074,52	2074,36	-0,15
Không có ký hiệu nhận diện	2257,71	2257,70	-0,01	2257,89	2257,85	-0,04
Không có ký hiệu nhận diện	2365,83	2365,72	-0,12	2365,94	2365,87	-0,07
Không có ký hiệu nhận diện	2385,18	2385,17	-0,01	2385,23	2385,25	0,02
Không có ký hiệu nhận diện	2405,22	2405,09	-0,12	2405,17	2405,15	-0,02
Không có ký hiệu nhận diện	2456,18	2456,24	0,07	2456,14	2456,09	-0,05
Không có ký hiệu nhận diện	2513,28	2513,26	-0,01	2513,32	2513,19	-0,14

Ví dụ 9. Các kháng thể protein dung hợp virus hợp bào hô hấp (RSV-F) thể hiện khả năng trung hòa hiệu nghiệm qua chủng phòng thí nghiệm phân nhóm A và B của RSV

H1H3592P3 và các kháng thể đối chứng I và II được kiểm tra trong thử nghiệm trung hòa vi lượng RSV để xác định độ hiệu nghiệm. Nói một cách vắn gọn, 10^4 tế bào HEp-2 được nuôi cấy trong môi trường DMEM 1x, được bổ sung Hyclone FBS 5%, L-glutamin và các chất kháng sinh, được ươm vào các vi đĩa 96 lỗ màu đen có đáy trong suốt và được ủ trong 16-18 giờ (37°C , CO_2 5%). Tiếp theo, các nồng độ khác nhau của các kháng thể, bắt đầu ở mức 666nM với các lần pha loãng kế tiếp 1:5 trong môi trường, được ủ với các chủng phòng thí nghiệm phân nhóm A của RSV khác nhau do ATCC cung cấp ở mức bội nhiễm là 0,042 trong 2 giờ (37°C , CO_2 5%). Bao gồm cả đối chứng kiểu tương đương không có virus và không liên quan.

Sau khi ủ, hỗn hợp kháng thể: virus được bổ sung vào tế bào HEp-2 và tình trạng lây nhiễm được duy trì trong 3 ngày. Mức độ lây nhiễm được xác định bằng cách cố định các tế bào trong PFA 2% và thực hiện ELISA bằng kháng thể kháng RSV của dê/kháng thể HRP kháng của dê. Các chất phản ứng phát quang được bổ sung vào các lỗ và tín hiệu được phát hiện bằng cách sử dụng máy đọc đĩa (Victor X3, Perkin Elmer). Các trị số về mức phát quang được phân tích bằng phương trình logarit ba thông số trên đường cong đáp ứng 11 điểm (GraphPad Prism).

Các kháng thể theo sáng chế đã thể hiện khoảng hoạt tính trung hòa rộng chống các chủng phòng thí nghiệm RSV (bảng 14). Các kháng thể H1H3592P3 và AM22 đã thể hiện độ hiệu nghiệm tương đồng so với đối chứng II của các chủng phòng thí nghiệm phân nhóm A của RSV. So với đối chứng I, H1H3592P3 đã thể hiện độ hiệu nghiệm cao hơn 15-17 lần (IC_{50} 44-140pM), trong khi AM22 đã thể hiện độ hiệu nghiệm cao hơn 9-23 lần (IC_{50} 86-91pM) (bảng 14). Đối với phân nhóm B, kháng thể H1H3592P3 đã thể hiện độ hiệu nghiệm tương đồng so với đối chứng II, nhưng ưu việt hơn AM22 và đối chứng I. So với đối chứng I, H1H3592P3 đã thể hiện độ hiệu nghiệm cao hơn 2-5 lần (IC_{50} 33-230pM), trong khi AM22 đã thể hiện độ hiệu nghiệm cao hơn 0,13-2 lần (IC_{50} 190-2508pM).

Ví dụ này thể hiện tính hiệu quả của các kháng thể theo sáng chế này trong việc trung hòa một vài chủng phòng thí nghiệm của RSV từ cả phân nhóm A và B, *in vitro*, với độ hiệu nghiệm cao hơn đã được thể hiện trước đó đối với các đối chứng đã được xác lập.

Bảng 14

Phân nhóm/chủng	H1H3592P3 IC50 (pM)	Đối chứng I IC50 (pM)	Đối chứng II IC50 (pM)	Đối chứng III IC50 (pM)
A/A2	140	2080	202	91
A/Long	44	752	83	86
B/18537	230	1190	187	660
B/1400	33	113	38	190
B/1A2	48	223	40	580
B/9320	151	338	76	2508

Ví dụ 10. Các kháng thể protein dung hợp virus hợp bào hô hấp (RSV-F) thể hiện khả năng trung hòa hiệu nghiệm qua sản phẩm phân lập lâm sàng phân nhóm A của RSV

H1H3592P3 và các kháng thể đối chứng I, II và III được kiểm tra trong thử nghiệm trung hòa vi lượng RSV để xác định độ hiệu nghiệm. Nói một cách vắn gọn, 10^4 tế bào HEp-2 được nuôi cấy trong môi trường DMEM 1x, được bổ sung Hyclone FBS 5%, L-glutamin và các chất kháng sinh, được ương vào các vi đĩa 96 lỗ màu đen có đáy trong suốt và được ủ trong 16-18 giờ (37°C , CO_2 5%). Tiếp theo, các nồng độ khác nhau của các kháng thể, bắt đầu ở mức 666nM với các lần pha loãng kế tiếp 1:5 trong môi trường, được ủ với sản phẩm phân lập lâm sàng phân nhóm A của RSV khác nhau do Dr. Moore (Emory University) cung cấp ở khoảng MOI từ 0,015 đến 0,128 trong 2 giờ (37°C , CO_2 5%). Bao gồm cả đối chứng kiểu tương đương không có virus và không liên quan.

Sau khi ủ, hỗn hợp kháng thể: virus được bổ sung vào tế bào HEp-2 và tình trạng lây nhiễm được duy trì trong 3 ngày. Mức độ lây nhiễm được xác định bằng cách cố định các tế bào trong PFA 2% và thực hiện ELISA bằng kháng thể kháng RSV của dê/kháng thể HRP kháng của dê. Các chất phản ứng phát quang được bổ sung vào các lỗ và tín hiệu được phát hiện bằng cách sử dụng máy đọc đĩa (Victor X3, Perkin Elmer).

Các trị số về mức phát quang được phân tích bằng phương trình logarit ba thông số trên đường cong đáp ứng 11 điểm (GraphPad Prism).

Các kháng thể theo sáng chế đã thể hiện khoảng hoạt tính trung hòa rộng chống sản phẩm phân lập lâm sàng RSV (bảng 15). Kháng thể H1H3592P3 đã thể hiện độ hiệu nghiệm tương đồng với các đối chứng II và III đối với hầu hết sản phẩm phân lập lâm sàng. So với đối chứng I, H1H3592P3 đã thể hiện độ hiệu nghiệm cao hơn 10-22 lần (IC₅₀ 34-66pM) (bảng 15).

Ví dụ này thể hiện tính hiệu quả của các kháng thể theo sáng chế này trong việc trung hòa một vài sản phẩm phân lập lâm sàng của RSV, *in vitro*, với độ hiệu nghiệm cao hơn đã được thể hiện trước đó đối với các đối chứng đã được xác lập.

Bảng 15. Các kháng thể RSV-F thể hiện khả năng trung hòa hiệu nghiệm qua sản phẩm phân lập lâm sàng phân nhóm A của RSV

	MOI	H1H3592 P3 IC ₅₀ (pM)	Đối chứng I IC ₅₀ (pM)	Đối chứng II IC ₅₀ (pM)	Đối chứng III IC ₅₀ (pM)	Genbank
A2001/2-20	0,01 6	43	935	74	72	JX069798.1
A2001/3-12	0,01 8	66	1259	129	60	JX069799.1
A1997/12- 35	0,01 5	40	478	41	20	JX069800.1
A1998/3-2	0,12 8	35	344	36	31	JX069801.1
A1998/12- 21	0,02 6	34	580	68	43	JX069802.1
A2000/3-4	0,04 0	50	899	88	55	JX069803.1

Ví dụ 11. H1H3592P3 phong bế quá trình xâm nhập của virus bằng cách ức chế quá trình dung hợp của virus và màng tế bào

Nghiên cứu được thực hiện để xác định cơ chế mà theo đó các kháng thể theo sáng chế phong bế tình trạng lây nhiễm virus hợp bào hô hấp (RSV). Một kháng thể tiêu biểu theo sáng chế, H1H3592P3, được kiểm tra để xác định xem liệu nó có hoạt động để

phòng ngừa/ức chế quá trình dung hợp RSV với các tế bào chủ (hình 2A và 2B). Cơ chế tác động của đối chứng I (mAb đối chứng dương mà trên cơ sở trình tự của palivizumab) được mô tả trên đây là ức chế quá trình dung hợp virus với tế bào chủ (Huang *et al.*, J. of Virol., (2010), Aug. 84(16):8132-40). Bởi vì RSV-F là liên can đến cả quá trình gắn kết với tế bào thông qua sự tương tác của thụ thể nucleolin của tế bào chủ, và quá trình dung hợp virus và màng sinh chất, các thử nghiệm được thực hiện để xác định cơ chế của H1H3592P3.

Thử nghiệm gắn kết (hình 2A) được thực hiện bằng cách ủ RSV (phân nhóm A, chủng A2) khi có mặt H1H3592P3 hoặc kháng thể đối chứng dương (đối chứng I), sau đó, ủ hỗn hợp này với tế bào HEp-2 ở 4°C trong một giờ để cho phép liên kết virus với các tế bào. Virus không liên kết được rửa đi, các tế bào được cố định và tỷ lệ phần trăm của virus đã gắn kết được đo bằng ELISA. Heparin, chất này phong bế quá trình gắn kết RSV, được sử dụng làm đối chứng.

Quá trình dung hợp virus được phát hiện bằng cách cho phép gắn kết virus ở 4°C, rửa virus không liên kết đi, sau đó, ủ với H1H3592P3, đối chứng I dương, hoặc kháng thể đối chứng kiểu tương đương âm ở 4°C và di chuyển các tế bào đến nơi có nhiệt độ là 37°C để thúc đẩy quá trình dung hợp và xâm nhập của virus. Mức lây nhiễm virus được đo 3 ngày sau bằng ELISA (hình 2B). RLU: Đơn vị phát quang tương đối.

H1H3592P3, giống như đối chứng I, phong bế quá trình dung hợp RSV và không phong bế quá trình gắn kết RSV với bề mặt tế bào, trong khi mAb đối chứng kiểu tương đương (âm tính) không có tác dụng gì đối với quá trình dung hợp virus (hình 2B). Heparin đã phong bế một cách hữu hiệu quá trình gắn kết RSV với các tế bào (Hallack *et al.*, Virology (2000), 271(2):264-75), trong khi đó cả hai kháng thể đều không ức chế quá trình gắn kết RSV (hình 2A). H1H3592P3 đã phong bế quá trình dung hợp virus trong dạng thức thử nghiệm này với IC_{50} là 230pM, trong khi mAb đối chứng dương (đối chứng I) đã phong bế quá trình dung hợp virus với IC_{50} 1nM (hình 2B). Đã quan sát thấy các kết quả tương đồng với chủng phân nhóm B của RSV (dữ liệu không được thể hiện).

Ví dụ 12. Sự cạnh tranh chéo theo Octet của các kháng thể kháng RSV-F để liên kết với RSV-F

Sự cạnh tranh liên kết giữa bộ thử nghiệm gồm mAb kháng RSV-F được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm giao thoa lớp sinh học không đánh dấu, thời gian thực trên bộ cảm biến sinh học Octet® HTX (Pall ForteBio Corp.). Toàn bộ thử nghiệm được thực hiện ở 25°C trong dung dịch đệm động học HBST (HEPES 0,01M độ pH 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, 0,05% thể tích/thể tích chất hoạt động bề mặt Tween-20, 0,1mg/ml BSA) trong khi vẫn lắc đĩa ở vận tốc là 1000 vòng/phút. Để đánh giá xem liệu hai kháng thể có thể cạnh tranh với nhau để liên kết với các epitop tương ứng của chúng trên protein RSV-F tái tổ hợp được biểu hiện với thẻ myc-myc-hexahistidin có đầu cuối C (RSV-F-mmH) hay không, trước tiên khoảng 0,36nm của RSV-F-mmH được bắt giữ trên cảm biến sinh học Octet được phủ kháng thể kháng Penta-His (ForteBio Inc, Cat# 18-5079) bằng cách ngâm bộ cảm biến sinh học trong 3 phút vào các lỗ chứa 10µg/ml dung dịch của RSV-F-mmH tái tổ hợp. Sau đó, cảm biến sinh học đã bắt kháng thể được làm bão hòa bằng kháng thể đơn dòng kháng RSV-F thứ nhất (sau đây được gọi là mAb-1) bằng cách nhúng vào các lỗ chứa 100-200µg/ml dung dịch mAb-1 trong 10 phút. Sau đó, bộ cảm biến sinh học được nhúng vào các lỗ chứa 100-200µg/ml dung dịch kháng thể đơn dòng kháng RSV-F thứ hai (sau đây được gọi là mAb-2) trong 5 phút để kiểm tra về khả năng mAb-2 liên kết với RSV-F-mmH, chất này được liên kết trước với mAb-1. Bộ cảm biến sinh học được rửa trong dung dịch đệm động học HBST giữa mỗi bước của thử nghiệm. Đáp ứng liên kết thời gian thực được theo dõi suốt tiến trình thử nghiệm và mức đáp ứng liên kết tối đa của tất cả các bước được ghi lại. Mức đáp ứng của mAb-2 liên kết với RSV-F-mmH đã được liên kết trước với mAb-1 được đo và đặc tính cạnh tranh/không cạnh tranh của các kháng thể đơn dòng kháng RSV-F khác nhau được xác định.

Các kết quả

Các nghiên cứu liên kết liên tiếp được thực hiện trên Octet® HTX thể hiện rằng không có kháng thể nào trong số các kháng thể đơn dòng kháng RSV-F cạnh tranh với nhau và có khả năng liên kết không cạnh tranh với RSV-F-mmH. Như được thể hiện trong bảng 16, các ô màu xám đậm với phông chữ màu đen thể hiện đáp ứng liên kết đối với trường hợp tự cạnh tranh. Ô màu trắng với phông chữ màu đen thể hiện là không có sự cạnh tranh giữa các kháng thể, điều này cho thấy rằng mỗi kháng thể có epitop liên kết riêng. Quá trình liên kết của kháng thể đơn dòng kháng RSV-F thứ nhất (mAb-1) với

protein RSV-F-mmH được bắt giữ bởi kháng thể kháng His không ngăn ngừa sự liên kết của kháng thể đơn dòng kháng RSV-F thứ hai (mAb-2). Đối với tất cả các kháng thể đơn dòng kháng RSV-F trong nghiên cứu này, đã phát hiện ra rằng tín hiệu liên kết mAb-2 quan sát được là có thể so sánh được với tín hiệu liên kết mAb-2 quan sát được khi vắng mặt mAb-1 (không có mAb). Ngoài ra, cũng đã phát hiện ra rằng quá trình liên kết quan sát được của mAb-2 đối với tất cả các kháng thể đơn dòng kháng RSV-F là độc lập với trật tự liên kết của kháng thể kháng RSV-F; chứng tỏ rằng tất cả các kháng thể kháng RSV-F đang được nghiên cứu đều có các epitop liên kết riêng biệt.

Bảng 16. Sự cạnh tranh chéo giữa các kháng thể đơn dòng kháng RSV-F.

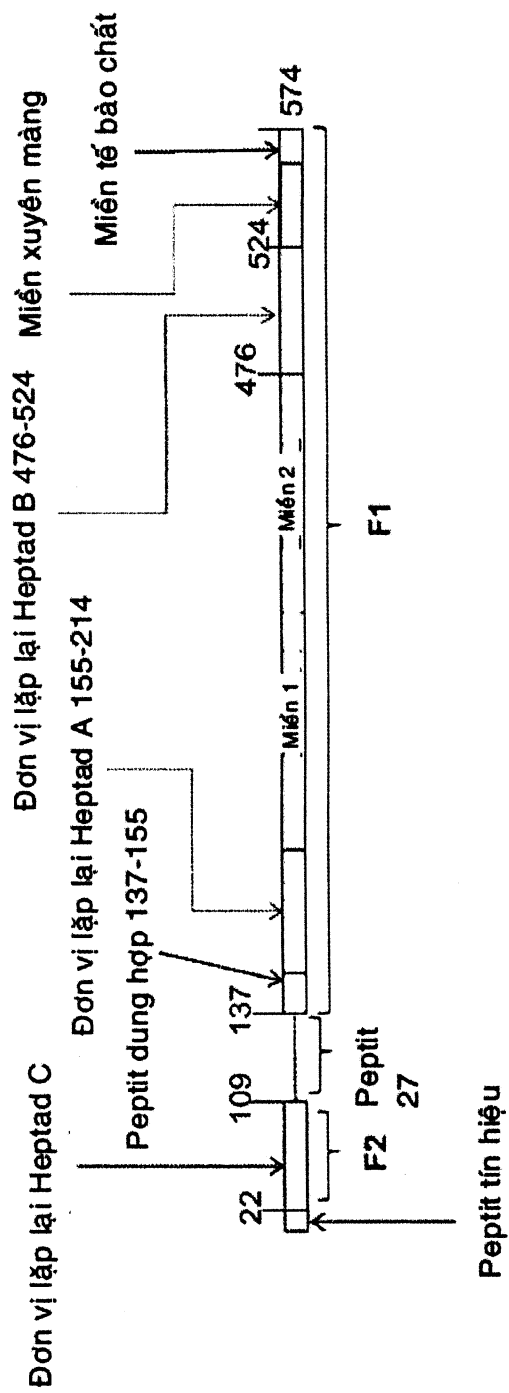
				Khả năng liên kết của mAb-2 với tiền phức hợp của RSV-F-mmH được bắt giữ & mAb-1			
mAb-1	Lượng là 10µg/ml của RSV_F.mmh được bắt giữ ± độ lệch chuẩn (nm)	Lượng là 100-200µg/ml của mAb-1 Binding mức (nm)	mAb số	1	2	3	4
Đối chứng III (AM-22)	0,36 ± 0,01	0,33 ± 0,01	1	0,01	0,34	0,44	0,00
H1H3592P3	0,36 ± 0,01	0,35 ± 0,01	2	0,26	0,00	0,30	0,00
Đối chứng I (Palivizumab)	0,39 ± 0,01	0,45 ± 0,02	3	0,29	0,23	0,01	-0,01
Không có mAb	0,36 ± 0,01	-0,01 ± 0,01	4	0,20	0,17	0,36	0,00

YÊU CẦU BẢO HỘ

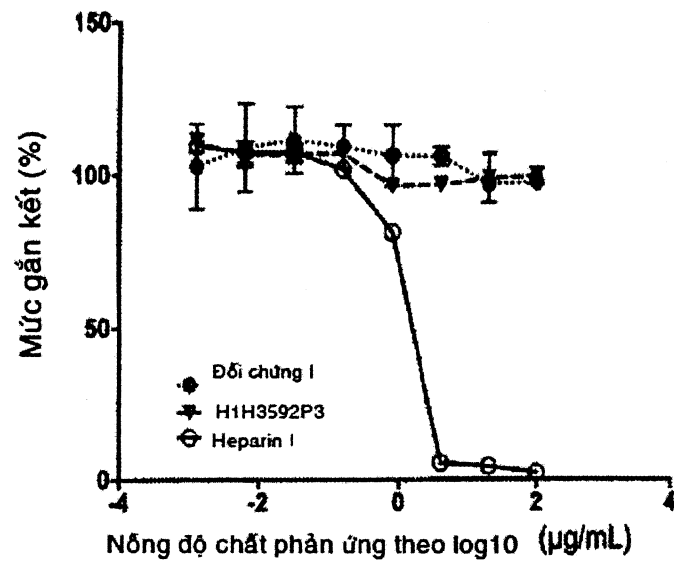
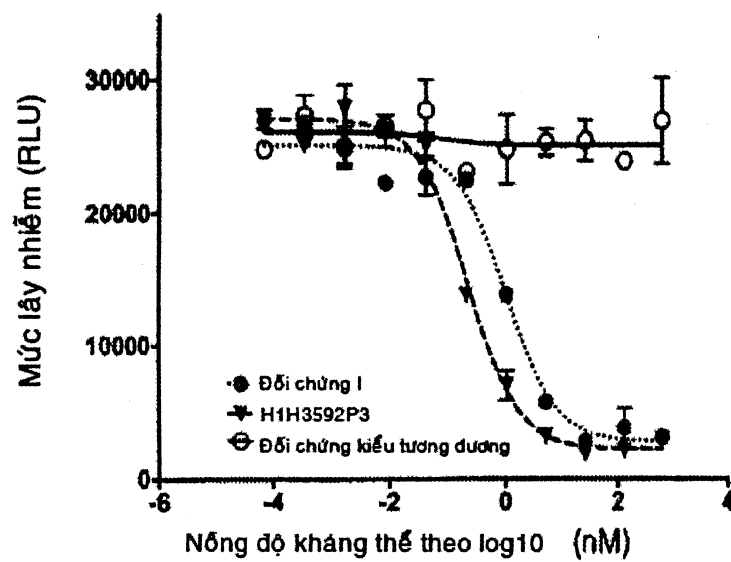
1. Kháng thể người được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với protein F của virus hợp bào hô hấp (Respiratory Syncytial Virus F protein - RSV-F), trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó chứa ba vùng xác định tính hỗ trợ chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) nằm trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 274 của vùng biến đổi chuỗi nặng (Heavy Chain Variable Region (HCVR)); và ba vùng xác định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) nằm trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 282 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (Light Chain Variable Region - LCVR).
2. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể người được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó chứa các miền HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, lần lượt có trình tự axit amin SEQ ID NO: 276-278-280-284-286-288.
3. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 274 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 282.
4. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với trình tự axit amin chứa các gốc axit amin nằm trong phạm vi vị trí 161 đến vị trí 188 của SEQ ID NO: 354.
5. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với một hoặc nhiều gốc nằm trong SEQ ID NO: 355 và SEQ ID NO: 356.
6. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể này hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó liên kết với serin ở vị trí 173 của SEQ ID NO: 354, hoặc threonin ở vị trí

174 của SEQ ID NO: 354, hoặc cả serin ở vị trí 173 của SEQ ID NO: 354 và threonin ở vị trí 174 của SEQ ID NO: 354.

7. Kháng thể được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể này là kháng thể IgG1 hoặc IgG4.
8. Phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 hoặc kháng thể theo điểm 7.
9. Vector biểu hiện chứa phân tử axit nucleic theo điểm 8.
10. Tế bào chủ chứa vector biểu hiện theo điểm 9.
11. Dược phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 hoặc kháng thể theo điểm 7 và chất mang dược dụng.



Hình 1

A**Khả năng gắn kết****B****Khả năng dung hợp****Hình 2**

DANH MỤC TRÌNH TỰ CỦA 1800-WO

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Các kháng thể của người kháng
protein F của virus hợp bào hô hấp và phương pháp sử dụng chúng

<130> 1800A-WO

<140> TBA

<141>

<150> 61/782,215

<151> 14/03/2013

<150> 61/911,093

<151> 03/12/2013

<160> 364

<170> FastSEQ dùng cho Windows phiên bản 4.0

<210> 1

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 1

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccctcagt aataacgctt tcagctgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gttgggaggg ttcaaccoga tctttgatac tgcaaactac
180

gcgcaaaagt tccagggcag aatcacgata accctggacg catccacggg cacagtctac
240

atggaactga gcagcctgag atctgaggac acgggcgtgt attactgcgc ggggaactggg
300

gcccattttg agttctgggg ccaggggaacc ctgggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag
360

ggccca

366

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 2

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

<210> 3

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 3

ggaggcacccc tcagtaataa cgct

24

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 4

Gly	Gly	Thr	Leu	Ser	Asn	Asn	Ala
1				5			

<210> 5

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 5
ttcaacccga tctttgatac tgca

24

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 6
Phe Asn Pro Ile Phe Asp Thr Ala
1 5

<210> 7
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 7
gcggggaactg gggcccatTT tgagttc

27

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 8
Ala Gly Thr Gly Ala His Phe Glu Phe
1 5

<210> 9
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 9
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc ggacaagtca gagcattagc acctatttaa attggtatca gcagaaacca
120

ggaaaagccc ctaagttcct gatctatgct gcatccacct tacaaagtgg ggtcccatca
 180
 aggttcagtg gcagtggatc tcggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agtgtcagtg tcccgtacac ttttggccag
 300
 gggaccaagc tggagatcaa a
 321

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

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

<210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 11
 cagagcatta gcacctat

18

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 12
Gln Ser Ile Ser Thr Tyr
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 13
gctgcatcc

9

<210> 14
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 14
Ala Ala Ser
1

<210> 15
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 15
caacagagtgcagtggtcccgtacact

27

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 16
Gln Gln Ser Val Ser Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 17
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 17
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcaat agttatggca tgcactgggt ccgccaggct
 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtgacattc atatgggtctg atggaagtaa taaatattat
 180
 ttagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat
 240
 ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtat attactgtgc gagaagtgga
 300
 ctagcctcct attattatta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc
 360
 tcctca
 366

<210> 18
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 18
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Thr Phe Ile Trp Ser Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Leu Ala Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 19
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 19

ggattcacct tcaatagtta tggc

24

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 20

Gly Phe Thr Phe Asn Ser Tyr Gly

1

5

<210> 21

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 21

atatggtctg atggaagtaa taaa

24

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 22

Ile Trp Ser Asp Gly Ser Asn Lys

1

5

<210> 23

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 23
gcgagaagtg gactagcctc ctattattat tacggatatg acgtc 45

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 24
Ala Arg Ser Gly Leu Ala Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 25
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 25
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca
120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatggg gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca
180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct
240
gaagattttg ccacttattc ctgtctacag cataatagtt acccgtggac gttcggccaa
300
gggaccaagg tggaaatcaa a
321

<210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 26
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50		55		60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro				
65		70		75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Ser Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp				
	85		90	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys				
	100		105	

<210> 27
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 27
 cagggcatta gaaatgat

18

<210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 28
 Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 29
 ggtgcatcc

9

<210> 30
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 30

Gly Ala Ser
1

<210> 31
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 31
ctacagcata atagttaccc gtggacg

27

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 32
Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 33
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 33
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtcgggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt ccgccaggct
120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggtatatt ctatgggtatg atggaagtaa taaacactat
180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacattgtat
240
ttgcaaata atagtctgag agccgaggac acggctgtat attactgtgc gagaagtgga
300
ctagcctcct attattatta cagtatggac gtctggggcc aaggggaccac ggtcaccgtc
360
tcctca
366

<210> 34
<211> 122

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 34
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Val Phe Leu Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Leu Ala Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 35
 ggattcacct tcagtagtta tggc

24

<210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 36
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

 <400> 37
 ctatggtatg atggaagtaa taaa 24

 <210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Tổng hợp

 <400> 38
 Leu Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5

 <210> 39
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Tổng hợp

 <400> 39
 gcgagaagtg gactagcctc ctattattat tacagtatgg acgtc 45

 <210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Tổng hợp

 <400> 40
 Ala Arg Ser Gly Leu Ala Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Val
 1 5 10 15

 <210> 41
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Tổng hợp

 <400> 41

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag cctggtatca gcagaaacca
 120
 gggaaagccc ctaagcgcct gatctatggg gcatccagtt tacacagtgg ggtcccatca
 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca caatcagcag cctgcagcct
 240
 gaagattttg caacttattc ctgtctacag cataatagtt acccgtggac gttcggccaa
 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a
 321

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 42

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

<210> 43

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 43

cagggcatta gaaatgat

18

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 44
 Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 1 5

<210> 45
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 45
 ggtgcatcc

9

<210> 46
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 46
 Gly Ala Ser
 1

<210> 47
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 47
 ctacagcata atagttaccc gtggacg

27

<210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 48
 Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Trp Thr

1

5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 49
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccctcacc ggctattatc tacactgggt gcgacaggcc
 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta ccagtgggtg cacaaactat
 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag tgcagccttc
 240
 atggagctga gtaggctgag atctgacgac acggccgtgt atcactgtgc gagagaattt
 300
 tggccccacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca
 354

<210> 50
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

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

<210> 51
 <211> 24

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 51
 ggatacaccc tcaccggcta ttat

24

<210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 52
 Gly Tyr Thr Leu Thr Gly Tyr Tyr
 1 5

<210> 53
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 53
 atcaacccta ccagtgggtgg caca

24

<210> 54
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 54
 Ile Asn Pro Thr Ser Gly Gly Thr
 1 5

<210> 55
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 55
gcgagagaat tttggcccca cggatatggac gtc 33

<210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 56
Ala Arg Glu Phe Trp Pro His Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 57
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 57
gccatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggccattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca
120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct tcatccagtt tacaaagtgg ggtcccttca
180
aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct
240
gaagattttg caacttatta ctgtcttgca gattacaaat acacgtggac gttcggccaa
300
gggaccaagg tggaaatcaa a
321

<210> 58
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 58
Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Arg Asn Asp
20 25 30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ser Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Ala Asp Tyr Lys Tyr Thr Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 59
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 59
 caggccatta gaaatgat

18

<210> 60
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 60
 Gln Ala Ile Arg Asn Asp
 1 5

<210> 61
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 61
 gcttcatcc

9

<210> 62
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 62
Ala Ser Ser
1

<210> 63
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 63
cttcagatt acaaatacac gtggacg

27

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 64
Leu Ala Asp Tyr Lys Tyr Thr Trp Thr
1 5

<210> 65
<211> 378
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 65
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacacc cggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgaag cctctggatt cacacttagc agccatgtca tgagctgggt ccgccaggtt
120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcacgt atcagtggtc ctggtggtag tacaaagtat
180
gcggactccg tgcagggccg gttcaccacc tccagagaca actccaagaa caccctgtat
240
ctacaaatga acagcctgat agccgaggac tcggccgcat attactgtgc gaaagggggg
300
ggatatagtg gctacgattg ggacttttat tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc
360
acggtcacccg tctcctca
378

<210> 66

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 66
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser His
 20 25 30
 Val Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Ser Gly Pro Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Thr Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Ile Ala Glu Asp Ser Ala Ala Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Gly Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Asp Phe Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 67
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 67
 ggattcacac ttagcagcca tgtc

24

<210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 68
 Gly Phe Thr Leu Ser Ser His Val
 1 5

<210> 69
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 69

atcagtgggtc ctggtggttag taca

24

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 70

Ile Ser Gly Pro Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 71

<211> 57

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 71

gcgaaagggg ggggatatag tggctacgat tgggactttt attacggtat ggacgtc 57

<210> 72

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 72

Ala Lys Gly Gly Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Asp Phe Tyr Tyr Gly
1 5 10 15
Met Asp Val

<210> 73

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 73

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgct gggcgagtc gggattagc agctggtag cctggtagc gcagaaacca
120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct
240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag actaacagtt tccctctcac tttcggcgga
300
gggaccaaag tggatatcaa a
321

<210> 74

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 74

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

<210> 75

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 75

cagggtagta gcagctgg

18

<210> 76

<211> 6

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 76
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 77
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 77
 gctgcatcc

9

<210> 78
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 78
 Ala Ala Ser
 1

<210> 79
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 79
 caacagacta acagtttccc tctcact

27

<210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 80

Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu Thr

1

5

<210> 81

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 81

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagt ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc

120

ccgggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac aggaaattac
180gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accacggacg aatccacgag cacagcctat
240atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attattgtgc gagagatagc
300agctcgtccc cgaggtacta cggataggac gtctggggcc acgggaccac ggtcacccgc
360

tcctca

366

<210> 82

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 82

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

Gly His Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 83
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 83
 ggaggcacct tcagcagcta tgct

24

<210> 84
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 84
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 85
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 85
 atcatcccta tcttttggtac agga

24

<210> 86
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 86
 Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Gly
 1 5

<210> 87
 <211> 45

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 87
 gcgagagata gcagctcgtc cccgaggtac tacggtatgg acgtc 45

<210> 88
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 88
 Ala Arg Asp Ser Ser Ser Ser Pro Arg Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 89
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 89
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttacc agctacttag cctggtacca acagaaacct
 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gtatccaaga gggccactgg catcccagcc
 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct
 240
 gaagattttg caacttatta ttgtcagcag cgtagcaact ggcctccac cttcggccaa
 300
 gggacacgac tggagattaa a
 321

<210> 90
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 90
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

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

<210> 91
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 91
 cagagtgtta ccagctac

18

<210> 92
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 92
 Gln Ser Val Thr Ser Tyr
 1 5

<210> 93
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 93
 gatgtatcc

9

<210> 94
 <211> 3
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 94

Asp Val Ser

1

<210> 95

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 95

cagcagcgta gcaactggcc tcccacc

27

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 96

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr

1

5

<210> 97

<211> 375

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 97

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgaag cctctggatt cacctttagt acctattgga tgagttgggt ccgccaggct
120

ccaggggaagg ggctagagtg ggtggccaac ataaaacaag atggaagtgt gaaatacttt
180

gtggactctg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat
240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctctgt atcactgtgc gagagagagg
300

cacagagggga gctactacgg ctactacgac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg
 360
 gtcaccgtct cctca
 375

<210> 98
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 98
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Val Lys Tyr Phe Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr His Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Arg His Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Asp Gly Met
 100 105 110
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 99
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 99
 ggattcacct ttagtaccta ttgg

24

<210> 100
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 100
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Trp

1 5

<210> 101
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 101
 ataaaacaag atggaagtgt gaaa 24

<210> 102
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 102
 Ile Lys Gln Asp Gly Ser Val Lys
 1 5

<210> 103
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 103
 gcgagagaga ggcacagagg gagctactac ggctactacg acggtatgga cgtc 54

<210> 104
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 104
 Ala Arg Glu Arg His Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Asp Gly Met
 1 5 10 15
 Asp Val

<210> 105
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 105
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca aacattgac atctatttaa attggtatca ggagaggcca
 120
 gggaaagccc ctaatctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtag tctgcaacct
 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacaata ccccgttcac tttcggcggc
 300
 gggaccaagg tggagatcaa a
 321

<210> 106
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 106
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asp Ile Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Glu Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asn Thr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 107
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 107
caaaacattg acatctat

18

<210> 108
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 108
Gln Asn Ile Asp Ile Tyr
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 109
gctgcatcc

9

<210> 110
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 110
Ala Ala Ser
1

<210> 111
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 111
caacagagtt acaatacccc gttcact

27

<210> 112

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 112
 Gln Gln Ser Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 113
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 113
 gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaaact
 120
 ccaggggaagg gcctggagtg gatctcaggt attagttgga gtagtggtac catagtctat
 180
 gcagactctg tgaagggccg cttcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat
 240
 ctgcaaataa acagtctgag aggtgaggac acggccttgt atcactgtgc aaaagatggg
 300
 tatagggtga agtcctactc gtacgggttg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc
 360
 gtctcctca
 369

<210> 114
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 114
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Ser Ser Gly Thr Ile Val Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Gly	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	His	Cys
				85					90					95	
Ala	Lys	Asp	Gly	Tyr	Arg	Trp	Lys	Ser	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Leu	Asp	Val
			100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120								

<210> 115
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 115
 ggattcacct ttgatgatta tgcc

24

<210> 116
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 116
 Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 117
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 117
 attagttgga gtagtggtac cata

24

<210> 118
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 118

Ile Ser Trp Ser Ser Gly Thr Ile
1 5

<210> 119
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 119
gcaaaagatg ggtataggtg gaagtcctac tcgtacgggtt tggacgtc 48

<210> 120
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 120
Ala Lys Asp Gly Tyr Arg Trp Lys Ser Tyr Ser Tyr Gly Leu Asp Val
1 5 10 15

<210> 121
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 121
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctctctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca ggccagtcga gagggttatc aataacttag cctggtacca gcagaaacct
120
ggccaggctc ccagactcct catcttttgt gcacccctca gggccactgg tatcccagcc
180
agattcagtg gcagtgggtc tgggacagag tttactctca ccatcagcag cctgcagtct
240
gaagattttg cactttatta ctgtcagcag tataataact ggccgctcac cttcggcgga
300
gggaccaagg tggagatcaa a
321

<210> 122
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 122

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

<210> 123

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 123

cagagtgtta tcaataac

18

<210> 124

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223>

<400> 124

Gln	Ser	Val	Ile	Asn	Asn
1				5	

<210> 125

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 125
ggtgcatcc

9

<210> 126
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 126
Gly Ala Ser
1

<210> 127
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 127
cagcagtata ataactggcc gctcacc

27

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 128
Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 129
<211> 369
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 129
gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggagac ttggtacagc ctggcaggct cctgagactc 60
tcctgtgtag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct
120

ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt gttagttgga gtggtagtagt cgtaggctat
 180
 gcggactctg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca acgcccagaa atccctgtat
 240
 ctacaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgt aaaagacgcg
 300
 tataaatgga actactacta ctacgggttg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc
 360
 gtctcctca
 369

<210> 130
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 130
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Val Ser Trp Ser Gly Ser Thr Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Gln Lys Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Lys Asp Ala Tyr Lys Trp Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 131
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 131
 ggattcacct ttgatgatta tgcc

24

<210> 132
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 132
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
1 5

<210> 133
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 133
gttagttgga gtggtagtagc cgta

24

<210> 134
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 134
Val Ser Trp Ser Gly Ser Thr Val
1 5

<210> 135
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 135
gtaaaagacg cgtataaatg gaactactac tactacgggtt tggacgtc

48

<210> 136
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 136

Val Lys Asp Ala Tyr Lys Trp Asn Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10 15

<210> 137
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 137
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gactattctc agcaacttag cctggtacct acagaaacct
 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tctcccagcc
 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct
 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggcctctcac tttcggcgga
 300
 gggaccaagg tggagatcaa a
 321

<210> 138
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 138
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Leu Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Leu Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 139
 <211> 18
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 139

cagactattc tcagcaac

18

<210> 140

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 140

Gln Thr Ile Leu Ser Asn
1 5

<210> 141

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 141

ggtgcatcc

9

<210> 142

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 142

Gly Ala Ser
1

<210> 143

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 143
cagcagtata ataactggcc tctcact

27

<210> 144
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 144
Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 145
<211> 369
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 145
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtggag cctctggatt cacctttagg gactttgaca tgaattgggt ccgtcaggct
120
ccagggaggg ggctggagtg ggtctcaggt attggtggta gtggtggtaa cacatattac
180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccata tccagggaca attccaaaaa cacgctgttt
240
ctgcaaata gaagcctgag agccgaggac acggccgttt attactgtgt gaaagatccc
300
tatggtgact ataggaacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaggagac cacggtcacc
360
gtctcctca
369

<210> 146
<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 146
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Gly Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asp Phe
20 25 30
Asp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val

		35					40					45				
Ser	Gly	Ile	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Val	Lys	Asp	Pro	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Arg	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	
			100					105						110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120									

<210> 147
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

```
<400> 147
ggattcacct ttagggactt tgac
```

24

```
<210> 148
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 148
Gly Phe Thr Phe Arg Asp Phe Asp
1 5

<210> 149
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

```
<400> 149
attggtggta gtggtggtaa caca
```

24

```
<210> 150
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 150
Ile Gly Gly Ser Gly Gly Asn Thr
1 5

<210> 151
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 151
gtgaaagatc cctatggtga ctataggaac tactacggta tggacgtc 48

<210> 152
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 152
Val Lys Asp Pro Tyr Gly Asp Tyr Arg Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 153
<211> 333
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 153
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttgaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctccta catagtaatg gatacaacta tttggattgg
120
tacctgcaga agccagggca gtctccacaa ctctgatct atttgggttc taatcgggcc
180
tccgggggtcc ctgacaggtt caggggcagt ggatcagaca aggactttac actgaaaatc
240
agcagagtgg gggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactatc
300
accttcggcc aaggacacg actggagatt aaa
333

<210> 154
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 154
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Asp Lys Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Gly Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Gln Thr Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 155
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 155
 cagagcctcc tacatagtaa tggatacaac tat

33

<210> 156
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 156
 Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr
 1 5 10

<210> 157
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 157
ttgggttct

9

<210> 158
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 158
Leu Gly Ser
1

<210> 159
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 159
atgcaagctc tacaaactat cacc

24

<210> 160
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 160
Met Gln Ala Leu Gln Thr Ile Thr
1 5

<210> 161
<211> 369
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 161

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtggag cctctggatt catgtttaga aactatgcc aagattgggt ccgccaggct
 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaact attcttgata gtggtgataa cacatattac
 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagggaca attccaagaa cacactgtat
 240
 ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgttt attactgtgc gaaagatccc
 300
 tatggtgact acagggacta ctacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc
 360
 gtctcctca
 369

<210> 162
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 162
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gly Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Gly Ala Ser Gly Phe Met Phe Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Leu Asp Ser Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Pro Tyr Gly Asp Tyr Arg Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 163
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 163
 ggattcatgt ttagaaacta tgcc

24

<210> 164

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 164
 Gly Phe Met Phe Arg Asn Tyr Ala
 1 5

<210> 165
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 165
 attcttgata gtggtgataa caca

24

<210> 166
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 166
 Ile Leu Asp Ser Gly Asp Asn Thr
 1 5

<210> 167
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 167
 gcgaaagatc cctatggtga ctacagggac tactacggta tggacgtc

48

<210> 168
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 168

Ala Lys Asp Pro Tyr Gly Asp Tyr Arg Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 169

<211> 333

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 169

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagctccta catagtaatg gatacaacta tttggattgg
120
tacctgcaga agccagggca gtctccgcaa ctctgatct atttgggttc taatcgggcc
180
tccgggggtcc ctgacaggtt caggggcagt ggatcaggca aagactttac actgaaaatc
240
agcagagtgg aggctgagga tgttggactt tattactgca tgcaagctct acaaactatc
300
accttcggcc aaggacacg actggagatt aaa
333

<210> 170

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 170

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

<210> 171
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 171
 cagagcctcc tacatagtaa tggatacaac tat

33

<210> 172
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 172
 Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr
 1 5 10

<210> 173
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 173
 ttgggttct

9

<210> 174
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 174
 Leu Gly Ser
 1

<210> 175
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 175
atgcaagctc tacaaactat cacc

24

<210> 176
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 176
Met Gln Ala Leu Gln Thr Ile Thr
1 5

<210> 177
<211> 384
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 177
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt ggttactact ggacctggat ccggcagccc
120
ccaggggaagg gactggagtg gattggatat atctattaca gtggggccac caactacaac
180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca ttagacacgt ccaagaacca gttctccctg
240
aaactgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt attgtgcgag agatgggaat
300
tacgatattt tgactgggta ttataactac cactattacg gcatggacgt ctggggccaa
360
gggaccacgg tcaccgtctc ctca
384

<210> 178
<211> 128
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 178
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Asn Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Asn Tyr His Tyr
 100 105 110
 Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 179
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 179
 ggtggctcca tcagtgggta ctac

24

<210> 180
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 180
 Gly Gly Ser Ile Ser Gly Tyr Tyr
 1 5

<210> 181
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 181
 atctattaca gtggggccac c

21

<210> 182
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 182
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ala Thr
 1 5

<210> 183
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 183
 gcgagagatg ggaattacga tattttgact gggtattata actaccacta ttacggcatg 60
 gacgtc 66

<210> 184
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 184
 Ala Arg Asp Gly Asn Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Asn Tyr His
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 20

<210> 185
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 185
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca ggacattggt aattatttag cctgggtttca gcagaaacca
 120
 gggaaagccc ctgagtcctt gatctatgct gcatccattt tacaaagtgg ggtcccatca
 180

aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct
 240
 gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatactt tcccgtggac gttcggccaa
 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a
 321

<210> 186
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 186
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Phe Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 187
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 187
 caggacattg gtaattat

18

<210> 188
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 188
 Gln Asp Ile Gly Asn Tyr

1

5

<210> 189
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 189
 gctgcatcc

9

<210> 190
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 190
 Ala Ala Ser
 1

<210> 191
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 191
 caacagtata atactttccc gtggacg

27

<210> 192
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 192
 Gln Gln Tyr Asn Thr Phe Pro Trp Thr
 1 5

<210> 193
 <211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 193

```
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtcaagc ctggagggtc cctgaggctc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgacctggat ccgtcaggct
120
ccagggaggg ggctggagtg ggtttcatatc attagtgata ctggcagtc cttatactac
180
gcagactctg tgagggggccg attcaccatc tccagggaca acgccaacaaa ctcactgtat
240
ctgcaaatga acaacctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgagatcag
300
gatggggaaa tggaactacg tttctttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc
360
tcctca
366
```

<210> 194

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 194

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

<210> 195

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

 <400> 195
 ggattcacct tcagtgacta ctac 24

 <210> 196
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Tổng hợp

 <400> 196
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
 1 5

 <210> 197
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Tổng hợp

 <400> 197
 attagtgata ctggcagtc a ctta 24

 <210> 198
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Tổng hợp

 <400> 198
 Ile Ser Asp Thr Gly Ser His Leu
 1 5

 <210> 199
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Tổng hợp

 <400> 199
 gcgcgagatc aggatgggga aatggaacta cgtttctttg actac 45

<210> 200
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 200
 Ala Arg Asp Gln Asp Gly Glu Met Glu Leu Arg Phe Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 201
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 201
 gaaatagtgt tgacgcagtc tccagccact ctgtctttgt ctccagggga aagaggcacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtattaac aactacttag cctggtacca gcagaaacct
 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctttgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc
 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag aatagagcct
 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtaccaact ggccgctcac tttcggcgga
 300
 gggaccaagg tggagatcaa a
 321

<210> 202
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 202
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Gly Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ile Glu Pro

65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Trp	Pro	Leu
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 203
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 203
 cagagtatta acaactac

18

<210> 204
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 204
 Gln Ser Ile Asn Asn Tyr
 1 5

<210> 205
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 205
 gatgcatcc

9

<210> 206
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 206
 Asp Ala Ser
 1

<210> 207
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 207
 cagcagcgta ccaactggcc gctcact

27

<210> 208
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 208
 Gln Gln Arg Thr Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 209
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 209
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg cttcatcagt aattactact ggagctggat ccggcagccc
 120
 ccaggggaagg gactggagtg gattggatat atctattata gtgggagcac caagtacaac
 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg
 240
 aagctgagct ctgtgagcgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag agatgggggtt
 300
 gtagcagcag ctggtccccc ttaccactac cactacgggtt tggacgtctg gggccaaggg
 360
 accacgggtca ccgtctcctc a
 381

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

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 210

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

<210> 211

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 211

ggtggccttca tcagtaatta ctac

24

<210> 212

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 212

Gly	Gly	Phe	Ile	Ser	Asn	Tyr	Tyr
1				5			

<210> 213

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 213

atctattata gtgggagcac c

21

<210> 214

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 214

Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 215

<211> 63

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 215

gcgagagatg gggttgtagc agcagctggc ccccttacc actaccacta cggtttgac 60
gtc 63

<210> 216

<211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 216

Ala Arg Asp Gly Val Val Ala Ala Ala Gly Pro Pro Tyr His Tyr His
1 5 10 15

Tyr Gly Leu Asp Val
20

<210> 217

<211> 339

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 217
gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctggggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gaatctttta tacacctcca gcaataagaa ctccttagct
120
tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct gagctgctca tttactgggc atctaccgg
180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cattctcacc
240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtagt
300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa
339

<210> 218
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 218
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Tyr Thr
20 25 30
Ser Ser Asn Lys Asn Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Glu Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Tyr Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110
Lys

<210> 219
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 219
cagaatcttt tatacacctc cagcaataag aactcc

36

<210> 220
<211> 12

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 220
 Gln Asn Leu Leu Tyr Thr Ser Ser Asn Lys Asn Ser
 1 5 10

<210> 221
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 221
 tgggcatct

9

<210> 222
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 222
 Trp Ala Ser
 1

<210> 223
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 223
 cagcaatatt atagtagtcc gtggacg

27

<210> 224
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 224

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 225

<211> 372

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 225

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggaggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgacctggat ccgccagggt 120
 ccaggggaagg gactggagtg ggtttcatat atcagtagta ctgggaataa cagatattac 180
 ggagactctg tgaagggccg attcgccatc tcaagggaca acgccaagaa cttactgttt 240
 ctgcaaatga acagcctgaa agccgaggac acggccgttt attactgtgc aagagagaat 300
 aattggaatc cttacttctt ctactatggg atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca
 372

<210> 226

<211> 124

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 226

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

115

120

<210> 227
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 227
 ggattcacct tcagtgacta ctac

24

<210> 228
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 228
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
 1 5

<210> 229
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 229
 atcagtagta ctgggaataa caga

24

<210> 230
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 230
 Ile Ser Ser Thr Gly Asn Asn Arg
 1 5

<210> 231
 <211> 51

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 231

gcaagagaga ataattggaa tccttacttc ttctactatg gtatggacgt c

51

<210> 232

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 232

Ala Arg Glu Asn Asn Trp Asn Pro Tyr Phe Phe Tyr Tyr Gly Met Asp

1

5

10

15

Val

<210> 233

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 233

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgtc gggcgagtca gggattagc atctgggttag cctgggtatca gcagaaacca

120

gggaaagccc ctaaactcct gatctctgct gcgtccactt tgcaaagtgg ggtcccatca

180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct

240

gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgttgac gttcggccaa

300

gggaccaagg tggaaatcaa a

321

<210> 234

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 234

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

<210> 235

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 235

cagggtatta gcatctgg

18

<210> 236

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 236

Gln	Gly	Ile	Ser	Ile	Trp
1				5	

<210> 237

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 237

gctgcgtcc

9

<210> 238

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 238
 Ala Ala Ser
 1

<210> 239
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 239
 caacaggcta acagtttccc gttgacg

27

<210> 240
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 240
 Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
 1 5

<210> 241
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 241
 caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct
 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatattatg aaggaagtaa tgattactat
 180
 gtagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaaaaa cacgctatat
 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaagggac
 300
 tggaactcct ttgactattg gggccagggc accctgggtca ccgtctcctc a
 351

<210> 242
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 242
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Tyr Tyr Glu Gly Ser Asn Asp Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Asp Trp Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 243
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 243
 ggattcacct tcagtagcta tggc

24

<210> 244
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 244
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1

5

<210> 245

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 245

atatattatg aaggaagtaa tgat

24

<210> 246

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 246

Ile Tyr Tyr Glu Gly Ser Asn Asp

1

5

<210> 247

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 247

gcgagaaggg actggaactc ctttgactat

30

<210> 248

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 248

Ala Arg Arg Asp Trp Asn Ser Phe Asp Tyr

1

5

10

<210> 249

<211> 336

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 249

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgtccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtccagtc gaacctccta aatagaaatg gattcaacta tttggattgg
120
tatttgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcggggc
180
tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc
240
agcagagtgg aggttgagga tgttgggggt tattattgca tgcaagctat acaaactccg
300
tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaa
336

<210> 250

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 250

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

<210> 251

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 251

cagaacctcc taaatagaaa tggattcaac tat

33

<210> 252

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 252

Gln Asn Leu Leu Asn Arg Asn Gly Phe Asn Tyr
1 5 10

<210> 253

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 253

ttgggttct

9

<210> 254

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 254

Leu Gly Ser
1

<210> 255

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 255

atgcaagcta tacaaactcc gtacact

27

<210> 256

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 256

Met Gln Ala Ile Gln Thr Pro Tyr Thr

1

5

<210> 257

<211> 369

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 257

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggagac ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgtag cctctggatt cacctttgat gattatgccca tgcactgggt ccggcaagct
120

ccaggaagg gcctggagtg ggtctcaggt gttagttgga gtggtagtagc cgtaggctat
180

gcggaactctg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca acgcccagaa atccctgtat
240

ctacaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgt aaaagacgcg
300

tataaatata actactacta ctacgggttg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc
360

gtctcctca

369

<210> 258

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 258

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

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

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

Ser Gly Val Ser Trp Ser Gly Ser Thr Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

				85					90					95			
Val	Lys	Asp	Ala	Tyr	Lys	Tyr	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Asp	Val		
			100						105				110				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
			115					120									

<210> 259
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 259
 ggattcacct ttgatgatta tgcc

24

<210> 260
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 260
 Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 261
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 261
 gtttagttgga gtggtagtagtac cgta

24

<210> 262
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 262
 Val Ser Trp Ser Gly Ser Thr Val
 1 5

<210> 263
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 263
 gtaaaagacg cgtataaata caactactac tactacgggtt tggacgtc 48

<210> 264
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 264
 Val Lys Asp Ala Tyr Lys Tyr Asn Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10 15

<210> 265
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 265
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gactattctc agcaacttag cctggtacct acagaaacct
 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tctcccagcc
 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct
 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggcctctcac tttcggcgga
 300
 gggaccaagg tggagatcaa a
 321

<210> 266
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 266

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

<210> 267

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 267

cagactattc tcagcaac

18

<210> 268

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 268

Gln	Thr	Ile	Leu	Ser	Asn
1				5	

<210> 269

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 269

ggtgcatcc

9

<210> 270
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 270
 Gly Ala Ser
 1

<210> 271
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 271
 cagcagtata ataactggcc tctcact

27

<210> 272
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 272
 Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 273
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 273
 gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggagac ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgtag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct
 120
 ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt gttagttgga gtggtagtagtac cgtaggctat
 180

gcggactctg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca acgcccagaa atccctgtat
 240
 ctacaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgt aaaagacgcg
 300
 tataaattca actactacta ctacggtttg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc
 360
 gtctcctca
 369

<210> 274
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 274
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Val Ser Trp Ser Gly Ser Thr Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Gln Lys Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Lys Asp Ala Tyr Lys Phe Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 275
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 275
 ggattcacct ttgatgatta tgcc

24

<210> 276
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 276

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
1 5

<210> 277

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 277

gttagttgga gtggtagtagc cgta

24

<210> 278

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 278

Val Ser Trp Ser Gly Ser Thr Val
1 5

<210> 279

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 279

gtaaaagacg cgtataaatt caactactac tactacgggtt tggacgtc

48

<210> 280

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 280

Val Lys Asp Ala Tyr Lys Phe Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
1 5 10 15

<210> 281
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 281
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gactattctc agcaacttag cctggtacct acagaaacct
 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggg gcatccacca gggccactgg tctcccagcc
 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct
 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggcctctcac tttcggcgga
 300
 gggaccaagg tggagatcaa a
 321

<210> 282
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 282
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Leu Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Leu Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 283
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 283
cagactattc tcagcaac

18

<210> 284
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 284
Gln Thr Ile Leu Ser Asn
1 5

<210> 285
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 285
ggtgcatcc

9

<210> 286
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 286
Gly Ala Ser
1

<210> 287
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 287
cagcagtata ataactggcc tctcact

27

<210> 288
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 288
 Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 289
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 289
 caggtgcagc tggagcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaggatc 60
 tcctgtaagg cttctggcga caccttcacc ggctactata taaactgggt gcgccaggcc
 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaatacta acagtgggtg cacatacttt
 180
 tcacagaaat ttcaggtcag ggtcatcctg accagggaca cgtccatcaa cacagcctac
 240
 atggagttga gcaggctgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gagaatgttt
 300
 tacgatattt tgactaattc tgatattttt gatatttggg gccaagggaac aatgggtcacc
 360
 gtctcttca
 369

<210> 290
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 290
 Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Asn Ser Gly Gly Thr Tyr Phe Ser Gln Lys Phe

50						55						60				
Gln	Val	Arg	Val	Ile	Leu	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Asn	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Met	Phe	Tyr	Asp	Ile	Leu	Thr	Asn	Ser	Asp	Ile	Phe	Asp	Ile	
			100					105					110			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120									

<210> 291
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 291
 ggcgacacct tcaccggcta ctat

24

<210> 292
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 292
 Gly Asp Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
 1 5

<210> 293
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 293
 atcaatacta acagtgggtgg caca

24

<210> 294
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 294

Ile Asn Thr Asn Ser Gly Gly Thr
1 5

<210> 295

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 295

gcgagaatgt ttacgatat ttgactaat tctgatattt ttgatatt 48

<210> 296

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 296

Ala Arg Met Phe Tyr Asp Ile Leu Thr Asn Ser Asp Ile Phe Asp Ile
1 5 10 15

<210> 297

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 297

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggacataaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca
120
gggaaagccc ctaagtcct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct
240
gaagattttg caacttatta ctgtctacaa cataaaaatt acatgtacac ttttggccag
300
gggaccaagt tggagatcaa a
321

<210> 298

<211> 107

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 298
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Cys Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Lys Asn Tyr Met Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 299
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 299
 caggacataa gaaatgat

18

<210> 300
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 300
 Gln Asp Ile Arg Asn Asp
 1 5

<210> 301
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 301
ggtgcatcc

9

<210> 302
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 302
Gly Ala Ser
1

<210> 303
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 303
ctacaacata aaaattacat gtacact

27

<210> 304
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 304
Leu Gln His Lys Asn Tyr Met Tyr Thr
1 5

<210> 305
<211> 345
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 305
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcgctg tctatggtgg gtccctcagt gattactact ggagctggat ccgccagccc
 120
 ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggagacac caactacgac
 180
 ccgtccctca agagtcgact caccatctca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg
 240
 aagctgaact ctgtgaccgc cgcggaacac gctgtgtatt actgtgagag cctgtatttc
 300
 aatttttggg tgtgggggtcg aggagccctg gtcaccgtct cctca
 345

<210> 306

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 306

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

<210> 307

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 307

ggtgggtccc tcagtgatta ctac

24

<210> 308

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 308

Gly Gly Ser Leu Ser Asp Tyr Tyr

1

5

<210> 309

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 309

atcaatcata gtggagacac c

21

<210> 310

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 310

Ile Asn His Ser Gly Asp Thr

1

5

<210> 311

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 311

gcgagcctgt atttcaattt ttggatg

27

<210> 312

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 312

Ala Ser Leu Tyr Phe Asn Phe Trp Met
 1 5

<210> 313
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 313
 gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca ttcttggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg
 120
 cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcttaattt ataagatttc taaccgggttc
 180
 tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt gggacaggga cagatttcac actgaaaatc
 240
 agcaggggtgg aagctgagga tgtcggaatt tattactgca tgcaaactac acaatttccg
 300
 ctcaatttcg gcggaggac caaggtggag atcaaa
 336

<210> 314
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 314
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Ile Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Thr
 85 90 95
 Thr Gln Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 315
 <211> 33
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 315

caaagcctcg tatacagtga tggaaacacc tac

33

<210> 316

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 316

Gln	Ser	Leu	Val	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asn	Thr	Tyr
1				5					10	

<210> 317

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 317

aagatttct

9

<210> 318

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 318

Lys Ile Ser

1

<210> 319

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 319
atgcaaacta cacaattttcc gctcact

27

<210> 320
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 320
Met Gln Thr Thr Gln Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 321
<211> 369
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 321
caggtgcagt tggagcaatc tggggctgag gtgaagaagc ctgggacctc agtgaggatc 60
tcctgcaagg cttctggcga catcttcacc ggctactata tgaactgggt gcgccaggcc
120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaatacta acagtgggtg cacatacttt
180
tcacagagat ttcagggcag ggtcaccctg accagggaca cgtccatcag aacagcctac
240
atggagttga gcaggctgag atctgacgac acggccggtt attactgtgc gagaatgttt
300
tacgatattt tgactggttc tgatgttttt gatatttggg gccaaggac aatggtcacc
360
gtctcttca
369

<210> 322
<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 322
Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp Ile Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

		35					40					45						
Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Asn	Ser	Gly	Gly	Thr	Tyr	Phe	Ser	Gln	Arg	Phe			
	50					55					60							
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Arg	Thr	Ala	Tyr			
65					70					75					80			
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
				85					90					95				
Ala	Arg	Met	Phe	Tyr	Asp	Ile	Leu	Thr	Gly	Ser	Asp	Val	Phe	Asp	Ile			
			100					105					110					
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120											

<210> 323
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

```
<400> 323
ggcgacatct tcaccggcta ctat
```

24

```
<210> 324
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 324
Gly Asp Ile Phe Thr Gly Tyr Tyr
1 5

<210> 325
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

```
<400> 325
atcaatacta acagtgggtgg caca
```

24

```
<210> 326
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 326

Ile Asn Thr Asn Ser Gly Gly Thr

1

5

<210> 327

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 327

gcgagaatgt tttacgatat tttgactggg tctgatgttt ttgatatt

48

<210> 328

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 328

Ala Arg Met Phe Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Ser Asp Val Phe Asp Ile

1

5

10

15

<210> 329

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 329

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgttgaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca ggacataaga aatgatttag gctgggatca ccagaaacca

120

gggaaagccc ctaagtgcct gatctatggg gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatct

180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct

240

gaagattttg caacttatta ctgtctacaa cataaaaatt acatgtacac ttttggccag

300

gggaccaagt tggagatcaa a

321

<210> 330
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 330
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Cys Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Lys Asn Tyr Met Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 331
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 331
 caggacataa gaaatgat

18

<210> 332
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 332
 Gln Asp Ile Arg Asn Asp
 1 5

<210> 333
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 333
ggtgcatcc

9

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 334
Gly Ala Ser
1

<210> 335
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 335
ctacaacata aaaattacat gtacact

27

<210> 336
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 336
Leu Gln His Lys Asn Tyr Met Tyr Thr
1 5

<210> 337
<211> 384
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 337

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccatcagt aattatgaaa tgaactgggt ccgtcaggct
 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtttcatatc attagtacta gtggtattac catatactac
 180
 gcagactctg tgcagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctactgtat
 240
 ctgcaattga acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gcggggatat
 300
 tgtacaaatg gtgtatgcta tccccattac tactactccg atatggacgt ctggggccaa
 360
 gggaccacgg tcaccgtctc ctca
 384

<210> 338
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 338
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Thr Ser Gly Ile Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Tyr Pro His Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Ser Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 339
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 339
 ggattcacca tcagtaatta tgaa

24

<210> 340

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 340
 Gly Phe Thr Ile Ser Asn Tyr Glu
 1 5

<210> 341
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 341
 attagtacta gtggtattac cata

24

<210> 342
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 342
 Ile Ser Thr Ser Gly Ile Thr Ile
 1 5

<210> 343
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 343
 gcgcggggat attgtacaaa tgggtgtatgc tatccccatt actactactc cgatatggac 60
 gtc 63

<210> 344
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 344

Ala Arg Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Tyr Pro His Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Ser Asp Met Asp Val
 20

<210> 345

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 345

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagactcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gaccattagc acctatttaa attggtttca gcagaaagta
 120
 gggaatgccc ctaaactcct gatctattct acatccagtt tgcaaagtgg ggtcccagca
 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta gtcctccgac gttcggccaa
 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a
 321

<210> 346

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 346

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

100

105

<210> 347
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 347
 cagaccatta gcacctat

18

<210> 348
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 348
 Gln Thr Ile Ser Thr Tyr
 1 5

<210> 349
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 349
 tctacatcc

9

<210> 350
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 350
 Ser Thr Ser
 1

<210> 351
 <211> 27

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 351
 caacagagtt acagtagtcc tccgacg

27

<210> 352
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 352
 Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Pro Thr
 1 5

<210> 353
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 353
 Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Pro Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Asp Ala Asn Ile Thr
 20 25 30
 Glu Glu Phe Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu
 35 40 45
 Ser Ala Leu Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu
 50 55 60
 Ser Asn Ile Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys
 65 70 75 80
 Leu Ile Asn Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu
 85 90 95
 Gln Leu Leu Met Gln Ser Thr Thr Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg
 100 105 110
 Glu Leu Pro Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Thr Lys Lys Thr
 115 120 125
 Asn Val Thr Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu
 130 135 140
 Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val
 145 150 155 160
 Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser
 165 170 175

```

Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr
      180      185      190
Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro
      195      200      205
Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile
      210      215      220
Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe
225      230      235      240
Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr
      245      250      255
Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp
      260      265      270
Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser
      275      280      285
Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val
      290      295      300
Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His
305      310      315      320
Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys
      325      330      335
Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val
      340      345      350
Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val
      355      360      365
Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu
      370      375      380
Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr
385      390      395      400
Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile
      405      410      415
Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg
      420      425      430
Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys
      435      440      445
Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys
      450      455      460
Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe
465      470      475      480
Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser
      485      490      495
Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser
      500      505      510
Asp Glu Leu Leu His His Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile
      515      520      525
Met Ile Thr Thr Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly
      530      535      540
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His
545      550      555      560

```

<210> 354
 <211> 574
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 354

Met	Glu	Leu	Pro	Ile	Leu	Lys	Ala	Asn	Ala	Ile	Thr	Thr	Ile	Leu	Ala
1				5					10					15	
Ala	Val	Thr	Phe	Cys	Phe	Ala	Ser	Ser	Gln	Asn	Ile	Thr	Glu	Glu	Phe
			20					25					30		
Tyr	Gln	Ser	Thr	Cys	Ser	Ala	Val	Ser	Lys	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ala	Leu
		35					40					45			
Arg	Thr	Gly	Trp	Tyr	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Ile	Glu	Leu	Ser	Asn	Ile
	50					55					60				
Lys	Glu	Asn	Lys	Cys	Asn	Gly	Thr	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Ile	Asn
65					70					75					80
Gln	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Ala	Val	Thr	Glu	Leu	Gln	Leu	Leu
				85					90					95	
Met	Gln	Ser	Thr	Thr	Ala	Ala	Asn	Asn	Arg	Ala	Arg	Arg	Glu	Leu	Pro
			100					105					110		
Arg	Phe	Met	Asn	Tyr	Thr	Leu	Asn	Asn	Thr	Lys	Lys	Thr	Asn	Val	Thr
		115					120					125			
Leu	Ser	Lys	Lys	Arg	Lys	Arg	Arg	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Gly	Val
	130					135					140				
Gly	Ser	Ala	Ile	Ala	Ser	Gly	Ile	Ala	Val	Ser	Lys	Val	Leu	His	Leu
145					150					155					160
Glu	Gly	Glu	Val	Asn	Lys	Ile	Lys	Ser	Ala	Leu	Leu	Ser	Thr	Asn	Lys
				165					170					175	
Ala	Val	Val	Ser	Leu	Ser	Asn	Gly	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Val
			180					185					190		
Leu	Asp	Leu	Lys	Asn	Tyr	Ile	Asp	Lys	Gln	Leu	Leu	Pro	Ile	Val	Asn
		195					200					205			
Lys	Gln	Ser	Cys	Arg	Ile	Ser	Asn	Ile	Glu	Thr	Val	Ile	Glu	Phe	Gln
	210					215					220				
Gln	Lys	Asn	Asn	Arg	Leu	Leu	Glu	Ile	Thr	Arg	Glu	Phe	Ser	Val	Asn
225					230					235					240
Ala	Gly	Val	Thr	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Tyr	Met	Leu	Thr	Asn	Ser	Glu
				245					250					255	
Leu	Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Asp	Met	Pro	Ile	Thr	Asn	Asp	Gln	Lys	Lys
			260					265					270		
Leu	Met	Ser	Asn	Asn	Val	Gln	Ile	Val	Arg	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Ile
		275					280					285			
Met	Ser	Ile	Ile	Lys	Glu	Glu	Val	Leu	Ala	Tyr	Val	Val	Gln	Leu	Pro
	290					295					300				
Leu	Tyr	Gly	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Cys	Trp	Lys	Leu	His	Thr	Ser	Pro
305					310					315					320
Leu	Cys	Thr	Thr	Asn	Thr	Lys	Glu	Gly	Ser	Asn	Ile	Cys	Leu	Thr	Arg
				325					330					335	
Thr	Asp	Arg	Gly	Trp	Tyr	Cys	Asp	Asn	Ala	Gly	Ser	Val	Ser	Phe	Phe
			340					345					350		
Pro	Gln	Ala	Glu	Thr	Cys	Lys	Val	Gln	Ser	Asn	Arg	Val	Phe	Cys	Asp
		355					360					365			
Thr	Met	Asn	Ser	Leu	Thr	Leu	Pro	Ser	Glu	Val	Asn	Leu	Cys	Asn	Val

370		375		380
Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr				
385		390		400
Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys				
	405		410	415
Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile				
	420		425	430
Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp				
	435		440	445
Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly				
	450		455	460
Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro				
465		470		475
Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn				
	485		490	495
Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu				
	500		505	510
Leu His His Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr				
	515		520	525
Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val				
	530		535	540
Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser				
545		550		555
Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn				560
	565		570	

<210> 355

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 355

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu

1

5

10

<210> 356

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 356

Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val

1

5

10

15

Leu

<210> 357
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp
 AM22 HC

<400> 357

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Thr	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ile	Ser	Gly	His	Thr	Leu	Ile	Lys	Leu
			20					25					30		
Ser	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Gly	Tyr	Glu	Gly	Glu	Val	Asp	Glu	Ile	Phe	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	His	Arg	Leu	Thr	Val	Ile	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Asp	Thr	Val	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Gly	Arg	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
				85					90					95	
Gly	Thr	Leu	Gly	Val	Thr	Val	Thr	Glu	Ala	Gly	Leu	Gly	Ile	Asp	Asp
			100					105					110		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
		115					120					125			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
	130					135					140				
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
145					150					155					160
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
				165					170					175	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
			180					185					190		
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
		195					200					205			
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro
	210					215					220				
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
225					230					235					240
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
				245					250					255	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
			260					265					270		
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
		275					280					285			
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
	290					295					300				
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
305					310					315					320
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro

```

          325          330          335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
          340          345          350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
          355          360          365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
          370          375          380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385          390          395          400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
          405          410          415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
          420          425          430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
          435          440          445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          450

```

<210> 358

<211> 215

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp
AM22 LC

<400> 358

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1          5          10          15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ile Val Ser Arg Asn
          20          25          30
His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35          40          45
Ile Phe Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser
          50          55          60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Gly Leu Ala
65          70          75          80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Ser Ser Asp Ser Ser Ile
          85          90          95
Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Phe Lys Arg Thr Val Ala
          100          105          110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
          115          120          125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
          130          135          140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145          150          155          160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
          165          170          175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
          180          185          190

```

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 359
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp
 Motavizumab HC

<400> 359
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290		295		300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys				
305		310		315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu				320
		325		330
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr				335
		340		345
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu				350
		355		360
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp				365
		370		375
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val				380
385		390		395
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp				400
		405		410
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His				415
		420		425
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro				430
		435		440
				445
Gly Lys				
450				

<210> 360

<211> 213

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

Motavizumab LC

<400> 360

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly				
1		5		10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met				15
		20		25
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr				30
		35		40
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser				45
		50		55
Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp				60
65		70		75
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr				80
		85		90
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro				95
		100		105
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr				110
		115		120
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys				125
		130		135
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu				140
145		150		155
				160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 361

<211> 450

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp
 Palivizumab HC

<400> 361

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

[illegible]

```
<210> 362
<211> 213
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Tổng hợp
Palivizumab LC

```

<400> 362
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
 20          25          30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35          40          45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50          55          60
Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65          70          75          80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85          90          95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100          105          110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115          120          125

```

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 363
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 363
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Val Ser Trp Ser Gly Ser Thr Val Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Gln Lys Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Lys Asp Ala Tyr Lys Phe Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 364

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 364

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

Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
		115					120					125				
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	
	130					135					140					
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
145					150					155					160	
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
				165					170						175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	
			180					185					190			
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	
		195					200					205				
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys											
	210															