



(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)



1-0031878

(51)⁷ C07K 16/10; C12N 15/13; A61K 39/42; (13) B
A61P 31/14

(21) 1-2014-04279

(22) 24/05/2012

(86) PCT/CN2012/076012 24/05/2012

(87) WO 2013/174003 28/11/2013

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/03/2015 324A

(73) Mountgate innoTech (HK) Limited (CN)

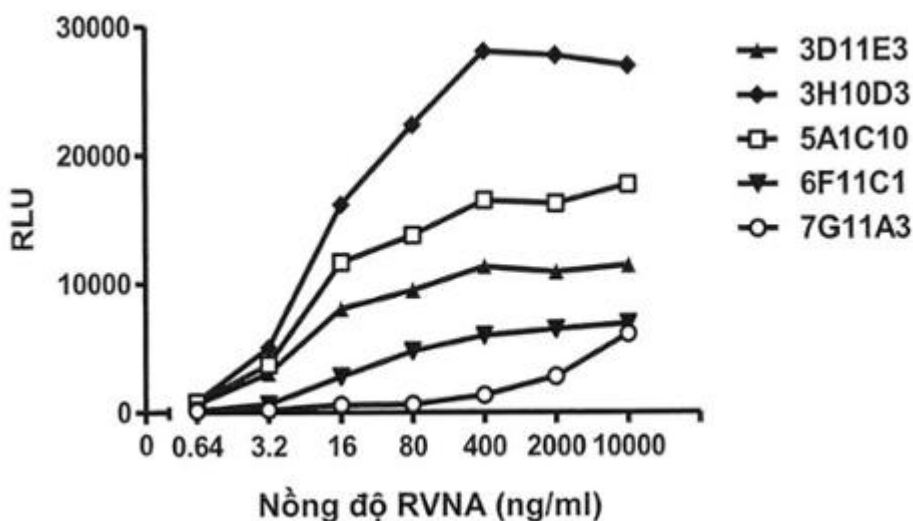
Room 2808, 28/F, Wu Chung House, 213 Queen's Road East, Wan Chai, Hong Kong

(72) SHEN, Enyun (CN); REN, Shiqi (CN).

(74) CÔNG TY LUẬT TRÁCH NHIỆM HỮU HẠN AMBYS HÀ NỘI (AMBYS
HANOI)

(54) KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP, DƯỢC PHẨM VÀ KIT ĐỂ PHÒNG NGỪA VÀ
ĐIỀU TRỊ BỆNH ĐẠI CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng virus đại mà có thể gắn kết với hoặc trung hòa virus đại. Kháng thể theo sáng chế là hữu ích cho sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp với các liệu pháp đã biết trong tình trạng kỹ thuật để điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm virus đại. Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm và kit có chứa kháng thể này để phòng ngừa và điều trị nhiễm virus đại.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa kháng thể kháng virus dại và phương pháp sử dụng chế phẩm này. Cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa kháng thể có khả năng trung hòa virus dại và phương pháp sử dụng chế phẩm này để phòng ngừa và điều trị bệnh dại.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phần mô tả dưới đây được cung cấp để hỗ trợ người đọc hiểu rõ về sáng chế. Không có bất kỳ thông tin nào được cung cấp hoặc được trích dẫn có thể được coi là trình trạng kỹ thuật của phương pháp theo sáng chế.

Bệnh dại là hiện tượng nhiễm virus dại với sự phân bố gần như trên toàn thế giới, ảnh hưởng không chỉ tới động vật hoang dại, động vật nuôi mà còn ảnh hưởng cả con người. Việc nhiễm virus dại gây ra sự tàn phá và nếu không được điều trị, sẽ gây ra sự chết não không thể hồi phục. Mỗi năm có trên 70.000 người chết do nhiễm virus dại, và hàng triệu người khác phải điều trị sau phơi nhiễm.

Virus dại là virus chứa ARN sợi đơn, thẳng, được bao gói, thuộc họ *Rhabdovirus* và chi *Lyssavirus*. Hệ gen của virus dại mã hóa 5 protein: ARN polymeraza phụ thuộc ARN (L), protein nhân (N), protein được phosphoryl hóa (P), protein thể nền (M) định vị ở mặt trong của vỏ protein của virus, và glycoprotein mặt ngoài (G). Protein G (62-67 kDa) là glycoprotein typ I chứa 505 axit amin, với từ 2 đến 4 vị trí N-glycosyl hóa, trong đó chỉ có từ 1 đến 2 vị trí là glycosyl hóa phụ thuộc vào sợi virus. Protein G hình thành nên các mấu lồi bao phủ bề mặt bên ngoài của vỏ virion và đã được biết là có khả năng kích thích sự sản sinh kháng thể trung hòa virus (Gaudin et al, 1999).

Sự nhiễm virus dại có thể được phòng ngừa hoặc điều trị bằng cách gây miễn dịch chủ động hoặc bị động. Việc phòng ngừa sau phơi nhiễm virus dại (post-exposure prophylaxis – PEP) bao gồm việc nhanh chóng chăm sóc vết thương tại chỗ và áp dụng cả biện pháp gây miễn dịch bị động (globulin miễn dịch kháng virus dại) và gây miễn dịch chủ động (vaccine). Hiện tại, globulin miễn dịch kháng virus dại (anti-rabies

immunoglobulin – RIG) được sản xuất từ huyết thanh của người (HRIG) hoặc của ngựa (ERIG). Tuy nhiên, việc sử dụng globulin miễn dịch từ các nguồn này có một số nhược điểm, bao gồm nguy cơ truyền bệnh, chi phí cao, và trong trường hợp globulin miễn dịch của ngựa, phản ứng phụ có thể là sốc phản vệ. Để khắc phục các nhược điểm này, có thể sử dụng kháng thể đơn dòng có khả năng trung hòa virus đại để phòng ngừa sau phơi nhiễm.

Kháng thể đơn dòng của chuột có khả năng trung hòa virus đại là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (Schumacher et al, 1989). Tuy nhiên, việc sử dụng các kháng thể của chuột *in vivo* bị hạn chế bởi các vấn đề liên quan đến việc sử dụng kháng thể của chuột cho người như thời gian bán hủy trong huyết thanh ngắn, không có khả năng kích thích các chức năng bảo vệ ở người và đáp ứng miễn dịch không mong muốn để chống lại kháng thể của chuột trong cơ thể người (phản ứng kháng thể – kháng chuột HAMA ở người). Hiện nay, có nhu cầu về các kháng thể đơn dòng kháng virus đại mới của người có khả năng phòng ngừa sau phơi nhiễm được cải thiện. Rất thuận lợi là các kháng thể này khi sử dụng cùng với vaccine đại không ảnh hưởng đến kháng nguyên của vaccine nên không làm giảm hiệu quả của vaccine.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể trung hòa virus đại mà gắn kết với glycoprotein của virus đại. Một ưu điểm của các kháng thể này là chúng có khả năng làm giảm hoạt tính lây nhiễm của virus đại, nhưng không ảnh hưởng đến hiệu quả của vaccine đại. Các kháng thể trung hòa hiện đang sử dụng cho bệnh đại đồng thời gây ức chế hiệu quả của vaccine khi chúng trung hòa virus. Vì vậy, liều kháng thể truyền thống phải có giới hạn, do đó chỉ tạo ra sự bảo vệ tối thiểu trong suốt những tuần đầu tiên bị nhiễm. Trái lại, các kháng thể được mô tả dưới đây khắc phục được nhược điểm này bằng cách thể hiện hoạt tính trung hòa cao, trong khi đó không ảnh hưởng tới hiệu quả của vaccine. Vì vậy, các kháng thể có thể được sử dụng kết hợp với vaccine đại để điều trị sự nhiễm cấp tính cũng như tạo miễn dịch lâu dài.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà gắn kết với glycoprotein virus đại, trong đó kháng thể này chứa một hoặc nhiều trình tự axit amin CDR chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm DYIML (SEQ ID NO:56), DIYPYYGSTSYNLKFKG (SEQ ID NO:57), QGGDGNYVLFDY (SEQ ID NO:58),

GFAMS (SEQ ID NO:59), TISSGGTYTYSPDSVMG (SEQ ID NO:60), và RLRRNYYSMDY (SEQ ID NO:61), hoặc biến thể của nó chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bảo toàn, và kháng thể chứa một hoặc nhiều trình tự axit amin CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm KASQNVGTTVA (SEQ ID NO:62), SASYRYS (SEQ ID NO:63), QQYNSYPFT (SEQ ID NO:64), KSTKSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:65), LVSNRFS (SEQ ID NO:66), và FQSNYLPFT (SEQ ID NO:67), hoặc biến thể của nó chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bảo toàn.

Theo một phương án, kháng thể chứa trình tự CDR chuỗi nặng: DYIML (SEQ ID NO:56), DIYPYYGSTSYNLKFKG (SEQ ID NO:57), và QGGDGNYVLFDY (SEQ ID NO:58) và trình tự CDR chuỗi nhẹ: KASQNVGTTVA (SEQ ID NO:62), SASYRYS (SEQ ID NO:63), và QQYNSYPFT (SEQ ID NO:64). Theo một phương án, kháng thể chứa trình tự CDR chuỗi nặng: GFAMS (SEQ ID NO:59), TISSGGTYTYSPDSVMG (SEQ ID NO:60), và RLRRNYYSMDY (SEQ ID NO:61) và chứa trình tự CDR chuỗi nhẹ: KSTKSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:65), LVSNRFS (SEQ ID NO:66), và FQSNYLPFT (SEQ ID NO:67).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà gắn kết với glycoprotein của virus đại, trong đó kháng thể này có cùng tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên với kháng thể được sản sinh bởi dòng tế bào khối lai được chọn từ nhóm bao gồm: CGMCC có số hiệu lưu giữ 4805 và 4806.

Theo một phương án, kháng thể có khả năng làm giảm tính lây nhiễm của virus đại và không ảnh hưởng tới tính sinh miễn dịch của vaccine đại. Theo một phương án, kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể đơn dòng, kháng thể của chuột, kháng thể khảm và kháng thể được làm giống như của người.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể RVNA hoặc hỗn hợp của một hoặc nhiều kháng thể RVNA và chất mang được dùng. Theo một phương án, được phẩm chứa hỗn hợp của các kháng thể, trong đó kháng thể thứ nhất chứa trình tự CDR chuỗi nặng: DYIML (SEQ ID NO:56), DIYPYYGSTSYNLKFKG (SEQ ID NO:57), và QGGDGNYVLFDY (SEQ ID NO:58) và trình tự CDR chuỗi nhẹ: KASQNVGTTVA (SEQ ID NO:62), SASYRYS (SEQ ID NO:63), và QQYNSYPFT (SEQ ID NO:64); và trong đó kháng thể thứ hai chứa trình tự CDR

chuỗi nặng: GFAMS (SEQ ID NO:59), TISSGGTYTYSPDSVMG (SEQ ID NO:60), và RLRRNYYSMDY (SEQ ID NO:61) và chứa trình tự CDR chuỗi nhẹ: KSTKSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:65), LVSNRFS (SEQ ID NO:66), và FQSNYLPFT (SEQ ID NO:67).

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể RVNA để sản xuất được phẩm dùng để điều trị sự nhiễm virus đại ở đối tượng cần điều trị. Theo một phương án, kháng thể làm giảm tính lây nhiễm của virus đại nhưng không ảnh hưởng tới tính sinh miễn dịch của vaccine đại.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị sự nhiễm virus đại ở đối tượng cần điều trị bao gồm bước cho đối tượng sử dụng liều có hiệu quả của một hoặc nhiều kháng thể RVNA theo sáng chế. Theo một phương án, kháng thể được sử dụng cho đối tượng trước, sau hoặc đồng thời với vaccine đại. Theo một phương án, kháng thể được sử dụng cho đối tượng trước, sau hoặc đồng thời với globulin miễn dịch kháng virus đại.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kit dùng để điều trị sự nhiễm virus đại ở đối tượng cần điều trị chứa một hoặc nhiều kháng thể gắn kết với glycoprotein của virus đại và hướng dẫn sử dụng kháng thể này, trong đó: kháng thể chứa một hoặc nhiều trình tự axit amin CDR chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm DYIML (SEQ ID NO:56), DIYPYYGSTSYNLKFKG (SEQ ID NO:57), QGGDGNVLFDDY (SEQ ID NO:58), GFAMS (SEQ ID NO:59), TISSGGTYTYSPDSVMG (SEQ ID NO:60), và RLRRNYYSMDY (SEQ ID NO:61), hoặc biến thể của nó chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bảo toàn; và kháng thể chứa một hoặc nhiều trình tự axit amin CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm KASQNVGTTVA (SEQ ID NO:62), SASYRYS (SEQ ID NO:63), QQYNSYPFT (SEQ ID NO:64), KSTKSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:65), LVSNRFS (SEQ ID NO:66), và FQSNYLPFT (SEQ ID NO:67), hoặc biến thể của nó chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bảo toàn.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kit dùng để phát hiện virus đại trong mẫu chứa kháng thể có khả năng gắn kết với glycoprotein của virus đại và hướng dẫn sử dụng kháng thể này, trong đó: kháng thể chứa một hoặc nhiều trình tự axit amin CDR chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm: DYIML (SEQ ID NO:56),

DIYPYYGSTSYNLKFKG (SEQ ID NO:57), QGGDGNYVLFDY (SEQ ID NO:58), GFAMS (SEQ ID NO:59), TISSGGTYTYPDSVMG (SEQ ID NO:60), và RLRRNYYSMDY (SEQ ID NO:61), hoặc biến thể của nó chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bảo toàn; và kháng thể chứa một hoặc nhiều trình tự axit amin CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm: KASQNVGTTVA (SEQ ID NO:62), SASYRYS (SEQ ID NO:63), QQYNSYPFT (SEQ ID NO:64), KSTKSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:65), LVSNRFS (SEQ ID NO:66), và FQSNYLPFT (SEQ ID NO:67), hoặc biến thể của nó chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bảo toàn. Theo một phương án, kháng thể được liên kết với một hoặc nhiều chất đánh dấu có thể phát hiện được. Theo một phương án, kit còn chứa kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể glycoprotein của virus đại. Theo một phương án, kháng thể thứ hai được liên kết với một hoặc nhiều chất đánh dấu có thể phát hiện được.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất axit nucleic phân lập được mã hóa kháng thể RVNA theo sáng chế. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic phân lập được mã hóa kháng thể RVNA theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện đồ thị đường cong gắn kết của 5 kháng thể trung hòa virus đại (RVNA) với glycoprotein RV.

Fig.2 là hình ảnh thâm tách Western thể hiện 5RVNA nhận biết epitop dạng thẳng hoặc dạng cấu hình ở glycoprotein của virus đại (RVGP). Các giếng như sau: Giếng 1: 50µl RVGP khử với 7G11A3; Giếng 2: 5µl RVGP khử với 7G11A3; Giếng 3: 5µl RVGP không khử với 7G11A3; Giếng 4: 50µl RVGP khử với 5A1C10; Giếng 5: 5µl RVGP khử với 5A1C10; Giếng 6: 5µl RVGP khử với 5A1C10; Giếng 7: 50µl RVGP khử với 6F11C1; Giếng 8: 5µl RVGP khử với 6F11C1; Giếng 9: 5µl RVGP không khử với 6F11C1; Giếng 10: 50µl RVGP khử với 3H10D3; Giếng 11: 5µl RVGP khử với 3H10D3; Giếng 12: 5µl RVGP không khử với 3H10D3; Giếng 13: 50µl RVGP khử với 3D11E3; Giếng 14: 5µl RVGP khử với 3D11E3; Giếng 15: 5µl RVGP không khử với 3D11E3.

Các hình vẽ từ Fig.3A đến Fig.3E là các đồ thị thể hiện kết quả minh họa CLEIA gián tiếp, trong đó 5 RVNA minh họa gắn kết với glycoprotein virus đại đã được xử lý

bằng các chất phản ứng khác nhau. Fig.3A: Khả năng gắn kết của 3D11E3 với glycoprotein RV; Fig.3B: Khả năng gắn kết của 3H10D3 với glycoprotein RV; Fig.3C: Khả năng gắn kết của 5A1C10 với glycoprotein RV; Fig.3D: Khả năng gắn kết của 6F11C1 với glycoprotein RV; Fig.3E: Khả năng gắn kết của 7G11A3 với glycoprotein RV.

Các hình vẽ từ Fig.4A đến Fig.4J là các đồ thị thể hiện phần trăm sống sót của chuột được thử nghiệm với các virus đại khác nhau trong thử nghiệm trung hòa chuột (MNT - mouse neutralization test). Fig.4A: YNI (người); Fig.4B: DRV (nai); Fig.4C: HN35 (người); Fig.4D: SC-CD09 (chó); Fig.4E: GN07 (chó); Fig.4F: ZJ-HZ09 (chó); Fig.4G: BD06 (chó); Fig.4H: JX08-45 (lợn); Fig.4I: JX09-27 (lợn); Fig.4J: ZJ-LA (lợn).

Các hình vẽ từ Fig.5A đến Fig.5O là các đồ thị thể hiện kết quả minh họa của các thử nghiệm cạnh tranh sử dụng định dạng CLEIA. Các RVNA 3D11E3, 3H10D3, 5A1C10, 6F11C1 và 7G11A3 cạnh tranh với nhau trong việc gắn kết với glycoprotein virus đại (RVGP). Năm RVNA minh họa được cho gắn kết với glycoprotein cạnh tranh với 3D11E3-HRP (các hình vẽ từ Fig.5A đến Fig.5C), 3H10D3-HRP (các hình vẽ từ Fig.5D đến Fig.5F), 5A1C10-HRP (các hình vẽ từ Fig.5G đến Fig.5I), 6F11C1-HRP (các hình vẽ từ Fig.5J đến Fig.5L) và 7G11A3-HRP (các hình vẽ từ Fig.5M đến Fig.5O).

Các hình vẽ từ Fig.6A đến Fig.6E là các đồ thị thể hiện chuẩn độ RVNA huyết thanh trong chuột BALB/c không thử thách. Chuột trong mỗi nhóm (n=6/nhóm) được cho sử dụng vaccin đại và được xử lý vào ngày 0 bằng: Fig.6A: 50µg/liều 7G11A3; Fig.6B: 50µg/liều 3D11E3; Fig.6C: 50µg/liều 3H10D3; hoặc Fig.6D: 20IU/kg globulin miễn dịch đại của người (HRIG). Chuột trong nhóm đối chứng (Fig.6E) chỉ được sử dụng vaccin Rabipur®. Vào các ngày 1, 3, 7, 14 và 28, thu thập máu chuột rồi trộn 6 huyết thanh chuột thành 3 huyết thanh cho mỗi nhóm. Chuẩn độ RVNA trong mỗi mẫu huyết thanh được xác định bằng thử nghiệm ức chế huỳnh quang nhanh, và chuẩn độ trung bình hình học được tính toán và xây dựng biểu đồ theo thời gian. Đường kẻ dài thể hiện giá trị trung bình, đường kẻ ngắn thể hiện giá trị lớn nhất và nhỏ nhất, một cách tương ứng.

Fig.7 thể hiện đường cong sống sót Kaplan-Meier đối với chuột đồng Syrian (n=10/nhóm) được thử thách bởi virus đại của chó (BD06).

Fig.8 là sơ đồ của vector pCH1A9.

Fig.9 là phân tích SDS PAGE của kháng thể CT.RV 3D11E3 1A9 (giếng 1), Ch1A9 (giếng 2), Hu1A9-1 (giếng 3) và Hu1A9-2 (giếng 4). Invitrogen SeeBlue® Plus2 Prestained Standard (Invitrogen, Grand Island, NY, USA; Cat # LC5925) được sử dụng làm chuẩn trọng lượng phân tử (giếng 5).

Fig.10 là đồ thị của phân tích ELISA thể hiện sự gắn kết của các kháng thể Ch1A9, Hu1A9-1 và Hu1A9-2 với vacxin virut dại bất hoạt (Rabipur®, Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Germany).

Fig.11 là sơ đồ của vector biểu hiện pCh2G11.

Fig.12 là phân tích SDS PAGE của các kháng thể CT.RV 7G11A3 1H5 (giếng 2), Ch2G11 (giếng 3), Hu2G11-1 (giếng 4) và Hu2G11-2 (giếng 5). Các mẫu (5µg mỗi mẫu) được chạy điện di gel SDS PAGE 4-20% dưới điều kiện khử. Invitrogen SeeBlue® Plus2 Prestained Standard (Invitrogen, Grand Island, NY, USA; Cat # LC5925) được sử dụng làm chuẩn trọng lượng phân tử (giếng 1). H và L tương ứng thể hiện vị trí của các chuỗi nặng và nhẹ.

Fig.12 là phân tích SDS PAGE của các kháng thể CT.RV 7G11A3 1H5 (giếng 2), Ch2G11 (giếng 3), Hu2G11-1 (giếng 4) và Hu2G11-2 (giếng 5). Các mẫu (5µg mỗi mẫu) được chạy điện di gel SDS PAGE 4-20% dưới điều kiện khử. Invitrogen SeeBlue® Plus2 Prestained Standard (Invitrogen, Grand Island, NY, USA; Cat # LC5925) được sử dụng làm chuẩn trọng lượng phân tử (giếng 1). H và L tương ứng thể hiện vị trí của các chuỗi nặng và nhẹ.

Fig.13 là sơ đồ ELISA cạnh tranh thể hiện sự gắn kết của các kháng thể Ch2G11, Hu2G11-1 và Hu2G11-2 với vacxin virut dại bất hoạt (Rabipur®, Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Germany). đĩa ELISA được phủ bằng Rabipur®. Sự gắn kết của 7G11A3 1H5 của chuột với Rabipur® được kiểm tra khi có mặt các nồng độ khác nhau của Ch2G11, Hu2G11-1 hoặc Hu2G11-2. 7G11A3 1H5 của chuột được phát hiện bởi IgG kháng chuột của dê được liên hợp với HRP, kháng thể đa dòng, hấp thụ IgG của người đặc hiệu chuỗi Fcγ.

Fig.14A và Fig.14B là các đồ thị của phân tích ELISA đối với sự gắn kết của các kháng thể Ch2G11, Hu2G11-1 và Hu2G11-2 với vacxin virut dại bất hoạt (Rabipur®,

Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Germany). Các đĩa ELISA được phủ bằng 2,5 µg/ml (Fig.14A) hoặc 1,0 µg/ml (Fig.14B) Ch2G11, Hu2G11-1 hoặc Hu2G11-2. Rabipur® được bắt giữ bằng cách phủ các kháng thể được phát hiện bởi 3D10 liên hợp HRP.

Các hình vẽ từ Fig.15A đến Fig.15F là các đồ thị thể hiện đường cong gắn kết của RVNAs 2G11 khảm được làm giống như của người với glycoprotein RV như được xác định bởi CLEIA. 2G11 khảm được làm giống như của người được sử dụng làm kháng thể bắt giữ và phát hiện. Glycoprotein được pha loãng ở các tỷ lệ 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 và 1:1600 sau đó được bổ sung vào các vi đĩa. RV 3D10-HRP của chuột và IgG-HRP kháng người của chuột được sử dụng làm liên hợp enzym. Đơn vị phát quang liên quan (RLU - Related luminescence unit) thể hiện tín hiệu phát quang hóa học.

Các hình vẽ từ Fig.16A đến Fig.16J là các đường cong gắn kết của 1A9 RVNAs của chuột, khảm, được làm giống như của người với glycoprotein RV như được xác định bởi CLEIA. 1A9 khảm và được làm giống như của người được sử dụng làm kháng thể bắt giữ và phát hiện. Glycoprotein được pha loãng ở các tỷ lệ 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 và 1:1600 và sau đó được bổ sung vào vi đĩa. RV 3D10-HRP của chuột và IgG-HRP kháng người của chuột được sử dụng làm liên hợp enzym. Đơn vị phát quang liên quan (RLU) thể hiện tín hiệu phát quang hóa học.

Các hình vẽ từ Fig.17A đến Fig.17F là các đồ thị thể hiện phần trăm sống sót của chuột BALB/C trong các thử nghiệm MNT. Các đường cong sống sót Kaplan-Meier được thể hiện ở các ngày từ 0 đến 21.

Fig.18A và Fig.18B là các đồ thị thể hiện phần trăm sống sót của chuột đồng Syrian (n=5/nhóm) được thử thách bằng RV của chó (BD06) vào ngày 1. Đường cong sống sót Kaplan-Meier được thể hiện ở các ngày từ 0 đến 28.

Fig.19 là các đồ thị thể hiện chuẩn độ RVNA huyết thanh trong chuột BALB/c không thử thách. Chuột trong mỗi nhóm điều trị (n=8/nhóm) được tiêm chủng bằng vắc xin đại và xử lý bằng (1) 5000 IU/kg hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2, (2) 1000 IU/kg hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2, (3) 200 IU/kg hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2, hoặc (4) 20 IU/kg globulin miễn dịch virut đại của người (HRIG) vào ngày 0, chuột trong nhóm

đối chứng dương (5) chỉ được tiêm chủng bằng vaccin, và chuột chỉ được dùng PBS làm nhóm đối chứng âm (6).

Fig.20 là đồ thị thể hiện so sánh giữa hỗn hợp RVNA và HRIG với vaccin trong chuột đồng Syrian.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây. Trong các phương pháp theo sáng chế, nhiều kỹ thuật truyền thống trong sinh học phân tử, hóa sinh học protein, sinh học tế bào, miễn dịch học, vi sinh vật học và ADN tái tổ hợp cũng được sử dụng. Các kỹ thuật này là đã biết, ví dụ như trong các tài liệu *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. I-III, Ausubel, Ed. (1997); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vols. I and II, Glover, Ed. (1985); *Oligonucleotide Synthesis*, Gait, Ed. (1984); *Nucleic Acid Hybridization*, Hames & Higgins, Eds. (1985); *Transcription and Translation*, Hames & Higgins, Eds. (1984); *Animal Cell Culture*, Freshney, Ed. (1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*; the series, *Meth. Enzymol.*, (Academic Press, Inc., 1984); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, Miller & Calos, Eds. (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1987); và *Meth. Enzymol.*, Vols. 154 and 155, Wu & Grossman, and Wu, Eds. Các phương pháp phát hiện và đo mức độ của các sản phẩm biểu hiện gen polypeptit (như mức độ dịch mã) là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm việc sử dụng các phương pháp phát hiện polypeptit như các kỹ thuật phát hiện và định lượng kháng thể (Strachan & Read, *Human Molecular Genetics*, Second Edition. (John Wiley and Sons, Inc., NY, 1999)).

Trừ khi được định nghĩa khác, các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có ý nghĩa thông thường như được hiểu bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Như được sử dụng trong phần mô tả và yêu cầu bảo hộ, các dạng số ít thể hiện cả ý nghĩa số nhiều trừ khi bắt buộc phải thể hiện một ý nghĩa rõ ràng. Ví dụ, “tế bào” còn bao gồm ý nghĩa là 2 hoặc nhiều tế bào, hoặc tương tự. Nhìn chung, các thuật ngữ được sử dụng ở đây, các quy trình thí nghiệm trong tế bào, di truyền phân tử, hóa hữu cơ, hóa phân tích và hóa học axit nucleic và lai hóa

được mô tả dưới đây là đã biết và thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các định nghĩa của các thuật ngữ khác có thể được tìm thấy trong tài liệu *Illustrated Dictionary of Immunology*, 2nd Edition (Cruse, J.M. and Lewis, R.E., Eds., Boca Raton, FL: CRC Press, 1995).

Như được sử dụng ở đây, “sử dụng” một chất hoặc thuốc cho đối tượng bao gồm bất kỳ đường sử dụng nào mà có thể đưa hoặc phân phối tới cho đối tượng một chất để thực hiện chức năng dự tính của nó. Việc sử dụng có thể được thực hiện bằng con đường phù hợp bất kỳ, bao gồm đường uống, trong mũi, ngoài đường tiêu hóa (trong tĩnh mạch, trong cơ, trong màng bụng hoặc dưới da), đường trực tràng, trong hộp sọ, nội tuỷ mạc hoặc tại chỗ. Việc sử dụng cũng bao gồm tự sử dụng và sử dụng bởi người khác.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “axit amin” bao gồm các axit amin tự nhiên và axit amin tổng hợp, cũng như các thể tương tự axit amin và giả axit amin mà chức năng, theo một cách thức nào đó, là tương tự với các axit amin tự nhiên. Các axit amin tự nhiên là các axit amin được mã hóa bởi các bộ ba mã hóa di truyền, cũng như các axit amin mà sau đó được cải biến, ví dụ hydroxyprolin, γ -carboxyglutamat, và O-phosphoserin. Các thể tương tự axit amin liên quan đến các hợp chất có cấu trúc hóa học cơ bản giống như các axit amin tự nhiên, như α -cacbon được liên kết với hydro, nhóm carboxyl, nhóm amin, nhóm R, ví dụ homoserin, norloxin, metionin sulfoxit, metionin metyl sulfonium. Các thể tương tự này có các nhóm R được cải biến (ví dụ norloxin) hoặc các khung peptit được cải biến, nhưng vẫn duy trì được cấu trúc hóa học cơ bản như các axit amin tự nhiên. Các giả axit amin là các hợp chất hóa học có cấu trúc khác với cấu trúc hóa học thông thường của axit amin, nhưng hoạt động chức năng theo cách tương tự với axit amin tự nhiên. Các axit amin có thể được viện dẫn ở đây hoặc bằng ký hiệu 3 chữ cái thông thường hoặc bằng ký hiệu 1 chữ cái theo Hội đồng thuật ngữ hóa sinh IUPAC-IUB. Tương tự, các nucleotit cũng có thể được thể hiện bằng các chữ cái đơn đã được phổ biến.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể” có nghĩa là một polypeptit chứa vùng khung từ gen globulin miễn dịch hoặc các mảnh của nó mà gắn kết và nhận dạng đặc hiệu một kháng nguyên, ví dụ glycoprotein virus dại. Việc sử dụng thuật ngữ kháng thể có nghĩa là bao gồm các kháng thể, gồm kháng thể chuỗi đơn, và các mảnh gắn kết kháng nguyên của nó. Thuật ngữ “kháng thể” bao gồm cả các kháng thể đặc

hiệu kép và kháng thể đa đặc hiệu miễn là chúng thể hiện hoạt tính hoặc chức năng sinh học mong muốn. Thuật ngữ kháng thể cũng dùng để chỉ các mảnh kháng thể gắn kết kháng nguyên, bao gồm các kháng thể chuỗi đơn, mà chỉ chứa (các) vùng biến đổi, hoặc kết hợp với, toàn bộ hoặc một phần của các yếu tố polypeptit sau: vùng bản lề, các vùng CH₁, CH₂, và CH₃ của phân tử kháng thể. Cũng bao gồm trong thuật ngữ này là sự kết hợp bất kỳ của (các) vùng biến đổi và vùng bản lề, các vùng CH₁, CH₂, và CH₃. Các phân tử liên quan đến kháng thể hữu ích trong phương pháp theo sáng chế, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Fab, Fab' và F(ab')₂, Fd, Fvs (scFv) chuỗi đơn, kháng thể chuỗi đơn, Fvs liên kết disulfit (sdFv) và các mảnh chứa hoặc vùng V_L hoặc vùng V_H. Các ví dụ bao gồm: mảnh Fab, mảnh đơn hóa trị chứa các vùng V_L, V_H, C_L và CH₁; (ii) mảnh F(ab')₂, mảnh hóa trị kép chứa hai mảnh Fab được liên kết bởi cầu nối disulfit tại vùng bản lề; (iii) mảnh Fd chứa các vùng V_H và CH₁; (iv) mảnh Fv chứa các vùng V_L và V_H của cánh tay đơn của kháng thể; (v) mảnh dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341: 544-546, 1989), chứa vùng V_H; và (vi) vùng quyết định hỗ trợ phân lập được (CDR). Thuật ngữ “mảnh kháng nguyên” có thể chứa một phần hoặc toàn bộ chiều dài của kháng thể, vùng gắn kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi của nó. Ví dụ về các mảnh kháng thể bao gồm các mảnh Fab, Fab', F(ab')₂, và Fv; kháng thể kép, kháng thể dạng thẳng, phân tử kháng thể chuỗi đơn; và kháng thể đa đặc hiệu được hình thành từ các mảnh kháng thể. Các phân tử kháng thể chuỗi đơn có thể chứa một polyme với rất nhiều phân tử riêng rẽ, ví dụ, đime, trime hoặc các polyme khác.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể khảm” có nghĩa là kháng thể trong đó vùng cố định Fc của kháng thể đơn dòng từ một loài (ví dụ, vùng cố định Fc của chuột) được thay thế, bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp, bởi vùng cố định Fc từ kháng thể của một loài khác (ví dụ, vùng cố định Fc của người).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “epitop” thể hiện một protein xác định khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng thể. Các epitop thường chứa các nhóm bề mặt hoạt hóa hóa học của các phân tử như các axit amin hoặc chuỗi đường bên và thường có đặc tính cấu trúc ba chiều, cũng như các đặc tính điện tích đặc biệt. Các epitop dạng cầu hình và không cầu hình được phân biệt ở khả năng gắn kết sớm sau đó bị mất đi khi có mặt dung môi biến tính. Theo một phương án, một epitop của glycoprotein virut đại là vùng của protein mà kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với nó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng có hiệu quả” hoặc “lượng có hiệu quả được dùng” hoặc “lượng có hiệu quả trị liệu” của một chế phẩm, là lượng đạt được hiệu quả trị liệu và/hoặc dự phòng mong muốn, ví dụ lượng có hiệu quả phòng ngừa, hoặc làm giảm triệu chứng liên quan đến bệnh cần điều trị, ví dụ nhiễm virus dại. Lượng chế phẩm theo sáng chế được sử dụng cho đối tượng sẽ phụ thuộc vào loại và tình trạng bệnh và các đặc tính của cơ thể, như là tình trạng sức khỏe chung, độ tuổi, giới tính, trọng lượng cơ thể và sự dung nạp thuốc. Nó cũng phụ thuộc vào mức độ, tình trạng và loại bệnh. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ quyết định liều phù hợp phụ thuộc vào các yếu tố đó. Chế phẩm theo sáng chế cũng có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều chế phẩm trị liệu khác. Ví dụ, chế phẩm theo sáng chế có thể được kết hợp để dự phòng sau phơi nhiễm cho cá thể bị phơi nhiễm virus dại, và được sử dụng kết hợp với các thuốc trị liệu đã biết như vaccine phòng dại. Các kháng thể theo sáng chế là phù hợp cho việc sử dụng kết hợp với vaccine dại bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vaccine tế bào phôi gà tinh chế (PCECV; RabAvert®, Novartis, Basel, Switzerland; Rabipur®, Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Germany), vaccine tế bào lưỡng bội của người (HDCV; Imovax®, Sanofi Pasteur, Swiftwater, PA, USA), vaccine dại hấp thụ (RVA), và globulin miễn dịch dại của người (HRIG). Theo một phương án, “lượng có hiệu quả” là lượng kháng thể kháng dại theo sáng chế mà có hiệu quả trung hòa một phần hoặc toàn bộ virus dại.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “virus dại” dùng để chỉ các virus thuộc chi *Lyssavirus*, họ *Rhabdoviridae*, bộ *Mononegavirales*. *Lyssavirus* xoắn đối xứng, với chiều dài khoảng 180nm và đường kính ngang khoảng 75nm. Virus này được bao gói và có hệ gen ARN sợi đơn thẳng không mã hóa. Thông tin di truyền được mã hóa ở dạng phức hệ ribonucleoprotein, trong đó ARN được liên kết chặt chẽ bởi nucleoprotein của virus. Hệ gen ARN của virus mã hóa 5 gen được xếp theo trật tự về mức độ bảo thủ như sau: nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), protein nền (M), glycoprotein (G) và ARN polymeraza của virus ADN (L).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ dạng “được làm giống như của người” của các kháng thể không phải của người (ví dụ, của chuột) là các kháng thể khả năng chứa trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ globulin miễn dịch của người. Đối với phần lớn còn lại, các kháng thể được làm giống như của người là các globulin miễn dịch của người, trong đó các gốc vùng siêu biến đổi của thể nhận bị thay thế bởi các gốc vùng siêu

biến từ các loài không phải người (kháng thể nhận) như chuột, chuột nhắt, thỏ hoặc linh trưởng không phải người có tính đặc hiệu, ái lực và khả năng mong muốn. Trong một số trường hợp, các gốc vùng khung Fv (FR - framework region) của globulin miễn dịch của người bị thay thế bởi các gốc không phải – người tương ứng. Hơn nữa, các kháng thể được làm giống như của người có thể chứa các gốc không có trong kháng thể thể nhận hoặc trong kháng thể thể cho. Những sự cải biến này được tạo ra để sàng lọc sự thể hiện của kháng thể, ví dụ như ái lực gắn kết. Nói chung, kháng thể được làm giống như của người sẽ chứa gần như tất cả của ít nhất là một, điển hình là hai, vùng biến đổi, trong đó tất cả hoặc gần như tất cả các vòng siêu biến tương ứng với các vòng siêu biến của trình tự globulin miễn dịch của người và tất cả hoặc gần như tất cả các vòng siêu biến của các vùng FR là của trình tự globulin miễn dịch của người mặc dù các vùng FR có thể chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin để cải thiện ái lực gắn kết. Nhiều sự thay thế axit amin này trong FR không nhiều hơn 6 trong chuỗi H, và trong chuỗi L là không nhiều hơn 3. Kháng thể được làm giống như của người tùy ý cũng có thể chứa ít nhất một phần của vùng cố định globulin miễn dịch (Fc), điển hình là globulin miễn dịch của người. Để hiểu chi tiết hơn, tham khảo tài liệu Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, Nature 332:323-329 (1988); và Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vùng siêu biến” dùng để chỉ các gốc axit amin chịu trách nhiệm về sự gắn kết kháng nguyên. Vùng siêu biến thường chứa các gốc axit amin từ một “vùng xác định bổ trợ” hoặc CDR (ví dụ, các gốc khoảng 24-34 (L1), 50-56 (L2) và 89-97 (L3) trong V_L, và các gốc khoảng 31-35B (H1), 50-65 (H2) và 95-102 (H3) trong V_H (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) và/hoặc các gốc từ “vùng siêu biến” (ví dụ, các gốc 26-32 (L1), 50-52 (L2) và 91-96 (L3) trong V_L, và 26-32 (H1), 52A-55 (H2) và 96-101 (H3) trong V_H (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “giống hệt” hoặc phần trăm “giống nhau”, khi được sử dụng trong tình huống có hai hoặc nhiều trình tự axit amin hoặc polypeptit, thể hiện hai hoặc nhiều trình tự hoặc phân nhóm trình tự mà giống hệt nhau hoặc có phần trăm đặc hiệu của các gốc axit amin hoặc protein là giống hệt nhau (ví dụ, khoảng 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99%, hoặc cao hơn đối với các vùng đặc hiệu) (như trình tự nucleotit mã hóa kháng thể được thiết kế ở đây hoặc trình tự axit amin của kháng thể được mô tả ở đây), khi so sánh và sắp thẳng hàng tương đồng tối đa qua cửa sổ so sánh hoặc vùng được thiết kế) như được đo bằng cách sử dụng logarit so sánh trình tự BLAST hoặc BLAST 2.0 với các thông số mặc định được mô tả dưới đây, hoặc bởi hướng dẫn sử dụng và tham khảo trên trang web của NCBI). Các trình tự này sau đó được coi là “gần như giống hệt”. Thuật ngữ này dùng để chỉ, hoặc được sử dụng cho sự tương đồng của trình tự thử nghiệm. Thuật ngữ này cũng bao hàm các trình tự có sự xóa bỏ và/hoặc thêm, cũng như sự thay thế. Như được mô tả dưới đây, các thuật toán có thể đếm các khoảng trống và tương tự. Theo một phương án, sự giống hệt tồn tại ở các vùng có chiều dài ít nhất là 25 axit amin hoặc nucleotit, hoặc 50-100 axit amin hoặc nucleotit.

Polypeptit “phân lập được” hoặc “tinh chế” hoặc phần có hoạt tính sinh học của nó nghĩa là gần như không chứa vật liệu tế bào hoặc các polypeptit tạp nhiễm khác từ tế bào hoặc mô từ nguồn khác với nguồn gốc của polypeptit đó, hoặc gần như không chứa các tiền chất hóa học hoặc các chất hóa học khác khi được tổng hợp hóa học. Ví dụ, kháng thể kháng đại phân lập được không chứa các chất mà có thể tương tác với tác dụng chẩn đoán hoặc điều trị của tác nhân quan tâm. Các chất tương tác này có thể là enzym, hormon và các chất hòa tan là protein hoặc không phải là protein khác. Ngoài ra, glycoprotein đại phân lập được, mà phản ứng miễn dịch với kháng thể kháng đại theo sáng chế, hầu như không chứa các chất mà có thể tương tác với tác dụng chẩn đoán hoặc điều trị của polypeptit.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phản ứng miễn dịch chéo” và “phản ứng miễn dịch” thường được sử dụng thay thế cho nhau để thể hiện một kháng nguyên phản ứng đặc hiệu với một kháng thể mà được sinh ra bằng cách sử dụng kháng nguyên giống nó (phản ứng miễn dịch) hoặc khác nó (phản ứng miễn dịch chéo). Nói chung, kháng nguyên là glycoprotein đại, biến thể hoặc phân nhóm trình tự của nó.

Như được sử dụng ở đây, “điều kiện phản ứng miễn dịch chéo” có nghĩa là các điều kiện cho phép một kháng thể, được sinh ra để kháng lại một epitop của một kháng nguyên, gắn kết với epitop đó ở mức độ lớn hơn có thể phát hiện được so với kháng thể gắn kết với gần như tất cả các epitop khác, nói chung ít nhất là 2 lần so với sự gắn kết thông thường, hoặc ít nhất là 5 lần so với mức độ thông thường. Các điều kiện

phản ứng miễn dịch chéo phụ thuộc vào định dạng của phản ứng gắn kết kháng thể và điển hình là các phản ứng hữu dụng trong các quy trình thử nghiệm miễn dịch. Tham khảo tài liệu Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988) mô tả các định dạng và điều kiện của các thử nghiệm miễn dịch.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tình trạng lâm sàng” bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tình trạng hoặc bệnh bất kỳ thể hiện ở một hoặc nhiều triệu chứng có thể điều trị hoặc ngăn ngừa, và bao gồm các bệnh đã có từ trước hoặc mới được phát hiện và các rối loạn khác. Ví dụ, tình trạng lâm sàng có thể là nhiễm virus đại.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” được sử dụng để chỉ kháng thể có nguồn gốc từ các kháng thể gần như tương đồng, ví dụ các kháng thể của cá thể chứa quần thể giống hệt nhau ngoại trừ các dạng đột biến tự nhiên mà thường chỉ xảy ra với lượng rất nhỏ. Ví dụ, kháng thể đơn dòng có thể là kháng thể có nguồn gốc từ dòng đơn, bao gồm dòng nhân chuẩn, nhân sơ hoặc thể thực khuẩn bất kỳ, và không có phương pháp nào cũng có thể sản sinh ra chúng được. Chế phẩm kháng thể đơn dòng thể hiện tính đặc hiệu gắn kết đơn và ái lực đối với một epitop cụ thể. Các kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao, kháng trực tiếp một vị trí kháng nguyên đơn lẻ. Hơn nữa, đối lập với chế phẩm kháng thể truyền thống (đa dòng) mà thường chứa các kháng thể khác nhau kháng các quyết định tổ (epitop) khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng kháng trực tiếp một quyết định tổ đơn trên kháng nguyên. Kháng thể đơn dòng được cải biến dùng để chỉ đặc tính của kháng thể bắt nguồn từ quần thể đồng nhất của kháng thể, và không bị phân giải khi sản xuất kháng thể bằng phương pháp bất kỳ. Các kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này ví dụ như, nhưng không chỉ giới hạn ở, khối lai, tái tổ hợp, và các kỹ thuật biểu hiện qua thực khuẩn thể. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế có thể được tạo ra bởi phương pháp khối lai được mô tả trong tài liệu Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975), hoặc được tạo ra bằng phương pháp ADN tái tổ hợp (Patent Mỹ số 4,816,567). Các kháng thể đơn dòng cũng có thể được phân lập từ thư viện kháng thể thực khuẩn bằng cách sử dụng kỹ thuật được mô tả ví dụ như trong tài liệu Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991) và Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể đa dòng” dùng để chỉ chế phẩm kháng thể có nguồn gốc từ ít nhất là hai (2) dòng tế bào sản sinh kháng thể khác nhau. Việc sử dụng thuật ngữ này bao hàm chế phẩm của ít nhất hai (2) kháng thể chứa các kháng thể gắn kết đặc hiệu với các epitop hoặc các vùng khác nhau của kháng nguyên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polypeptit”, “peptit” và “protein” được sử dụng thay thế lẫn nhau để thể hiện một polyme chứa hai hoặc nhiều axit amin liên kết với nhau bằng các liên kết peptit hoặc các liên kết peptit được cải biến, ví dụ, isoste peptit. Polypeptit thể hiện cả các chuỗi ngắn, thường là peptit, glycopeptit hoặc oligome, và cả các chuỗi dài, thường là protein. Các polypeptit có thể chứa các axit amin nhiều hơn 20 axit amin được mã hóa bởi gen. Các polypeptit bao gồm các trình tự axit amin được cải biến hoặc bởi quá trình tự nhiên, như là quá trình sau dịch mã, hoặc bởi các kỹ thuật cải biến hóa học đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các cải biến này được mô tả trong các khái niệm cơ bản hoặc chi tiết trong các tài liệu chuyên khảo, cũng như trong các sách chuyên ngành. Theo một phương án, polypeptit chứa các trình tự polypeptit từ protein kháng thể đại.

Như được sử dụng ở đây, “phòng ngừa sau phơi nhiễm” hoặc “PEP” dùng để thể hiện chế độ điều trị được chỉ định cho những người bị phơi nhiễm với động vật dữ tợn. Sự phơi nhiễm có thể là bị cắn (thâm nhập bất kỳ vào da bởi răng) bao gồm động vật cắn, và phơi nhiễm không do cắn. PEP thường bao gồm việc sử dụng kháng thể kháng dại cùng với vacxin dại, như vacxin tế bào phôi gà tinh chế (PCEC) (RabAvert®, Novartis, Basel, Switzerland; Rabipur®, Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Germany), vacxin tế bào lưỡng bội của người (HDCV; Imovax®, Sanofi Pasteur, Swiftwater, PA, USA), vacxin đại hấp thụ (RVA). PEP thường bao gồm việc sử dụng globulin miễn dịch dại của người (HRIG), globulin gama kháng dại lấy từ huyết tương thể nhận của người được gây siêu miễn dịch. HRIG là một tác nhân miễn dịch điển hình được sử dụng cho cá thể sau khi bị phơi nhiễm với virus dại.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tái tổ hợp” khi đi cùng với, ví dụ, tế bào hoặc axit nucleic, protein hoặc vector, để chỉ tế bào, axit nucleic, protein hoặc vector được cải biến bằng cách đưa vào axit nucleic hoặc protein khác loại hoặc thay thế axit nucleic hoặc protein tự nhiên, hoặc các chất có nguồn gốc từ tế bào được cải biến. Vì vậy, ví dụ, tế bào tái tổ hợp biểu hiện gen không có trong tự nhiên (không tái tổ hợp)

của tế bào hoặc biểu hiện các gen tự nhiên được biểu hiện một cách không bình thường, ít biểu hiện hoặc không được biểu hiện.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu” thể hiện sự liên kết giữa kháng thể kháng đại và kháng nguyên với ái lực gắn kết ít nhất là 10^{-6} M. Theo một phương án, kháng thể gắn kết đặc hiệu với ái lực ít nhất khoảng 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, hoặc 10^{-12} M.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đối tượng” thể hiện con người hoặc động vật không phải người, ví dụ động vật nuôi trong nhà (ví dụ, chó, mèo hoặc động vật tương tự), gia súc (ví dụ, bò, cừu, lợn, ngựa và động vật tương tự), động vật hoang dại (dơi, gấu trúc, cáo, chồn hôi, sóc, chuột, thỏ hoặc động vật tương tự), và động vật thí nghiệm (ví dụ, khỉ, chuột, chuột nhắt, thỏ, lợn guinea và động vật tương tự).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thay thế” là một trong số các đột biến thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các biến thể thay thế có ít nhất một gốc axit amin trong phân tử kháng thể kháng đại bị thay thế bởi một gốc khác. Vị trí đáng quan tâm nhất đối với đột biến gen thay thế bao gồm các vùng siêu biến, nhưng sự thay thế FR cũng đáng quan tâm. Sự thay thế có thể là bảo toàn, nghĩa là, một axit amin bị thay thế bởi một axit amin có hình dạng và điện tích tương tự. Thay thế bảo toàn là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự thay thế: alanin thành serin; arginin thành lysin; asparagin thành glutamin hoặc histidin; aspartat thành glutamat; cystein thành serin; glutamine thành asparagin; glutamat thành aspartat; glyxin thành prolin; histidin thành asparagin hoặc glutamin; isoleuxin thành loxin hoặc valin; loxin thành valin hoặc isoleuxin; lysin thành arginin; metionin thành loxin hoặc isoleuxin; phenylalanin thành tyrosin, loxin hoặc metionin; serin thành threonin; threonin thành serin; tryptophan thành trosin; tyrosin thành tryptophan hoặc phenylalanin; và valin thành isoleuxin hoặc loxin. Ngoài ra, sự thay thế có thể là không-bảo toàn khi mà chức năng hoặc hoạt tính của polypeptit bị ảnh hưởng. Sự thay thế không-bảo toàn điển hình bao gồm sự thay thế một gốc này bằng một gốc khác không tương đồng về mặt hóa học, như axit amin phân cực hoặc tích điện bị thay thế bởi axit amin không phân cực hoặc không tích điện, hoặc ngược lại.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “điều trị” hoặc “làm thuyên giảm” dùng để thể hiện cả điều trị triệu chứng và dự phòng hoặc phòng ngừa, trong đó mục đích là để

phòng ngừa hoặc làm giảm nhẹ (giảm bớt) tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn đích. Đối tượng được điều trị bệnh đại hoặc rối loạn liên quan đến bệnh đại thành công nếu, sau khi nhận được lượng trị liệu của kháng thể trung hòa virus đại theo sáng chế, đối tượng thể hiện sự giảm có thể quan sát được và/hoặc có thể đo được, hoặc không xuất hiện, một hoặc nhiều dấu hiệu và triệu chứng của tình trạng hoặc sự nhiễm bệnh đại. Có thể đánh giá rằng nhiều chế độ điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng bệnh lý như được mô tả ở đây là quan trọng, trong đó bao gồm tổng số nhưng cũng có thể ít hơn điều trị hoặc phòng ngừa tổng số, và trong đó một số kết quả liên quan về mặt sinh học hoặc y học là có thể đạt được.

I. Chế phẩm

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng đại, mà có thể gắn kết với glycoprotein đại và trung hòa tính gây nhiễm của virus đại. Các kháng thể này là hữu dụng để điều trị hoặc phòng ngừa virus đại gây nhiễm cho người hoặc động vật không phải-người bị phơi nhiễm với virus đại. Theo đó, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất, và các thao tác với kháng thể kháng đại. Các kháng thể theo sáng chế là hữu dụng khi sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp với các phương pháp trị liệu kháng đại đã biết để điều trị hoặc phòng ngừa nhiễm đại. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp sử dụng kháng thể kháng đại theo sáng chế cho đối tượng cần dùng nó.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể kháng đại mà gắn kết với glycoprotein của virus đại. Theo một phương án, các kháng thể này bao gồm các kháng thể được liệt kê trong Bảng 1.

Bảng 1: Các kháng thể kháng đại		
Kháng thể	Loại	Mô tả
3D11E3	Kháng thể đơn dòng của chuột	Gắn kết với epitop II của glycoprotein virus đại
3H10D3	Kháng thể đơn dòng của chuột	Gắn kết với epitop III của glycoprotein virus đại
5A1C10	Kháng thể đơn dòng của chuột	Gắn kết với epitop IV của glycoprotein virus đại
6F11C1	Kháng thể đơn dòng của chuột	Gắn kết với epitop I của glycoprotein virus đại
7G11A3	Kháng thể đơn dòng của chuột	Gắn kết với epitop I của glycoprotein virus đại

Việc lưu giữ các vật liệu sinh học theo sáng chế được thực hiện ở Trung tâm lưu giữ chủng vi sinh vật Trung Quốc (China General Microbiological Culture

Collection Center -CGMCC), China Committee for Culture Collection of Microorganisms, P.O. Box 2714, Beijing 100080, The People's Republic of China và được mô tả chi tiết trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2: Lưu giữ sinh học			
Tên đối tượng lưu giữ	Vật liệu	Ngày	Số hiệu lưu giữ
RV3D11E31A9	Khối lai chuột - chuột	12/05/2011	CGMCC 4805
RV7G11A32G11	Khối lai chuột - chuột	12/05/2011	CGMCC 4806
RV5A1C103C4	Khối lai chuột - chuột	10/11/2011	CGMCC 5471

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop dạng cấu hình cũng như epitop dạng thẳng hoặc dạng không cấu hình. Như được đề cập ở trên, epitop dạng cấu hình hoặc không cấu hình phân biệt ở chỗ gắn kết với dạng ban đầu nhưng sau đó bị mất đi khi có mặt dung môi biến tính.

Kháng thể kháng đại theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể đơn dòng, đa dòng, khảm, được làm giống như của người, kháng thể kép và kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng của người mà gắn kết đặc hiệu với glycoprotein đại, thể tương đồng, dẫn xuất hoặc mảnh của nó. Các kháng thể hữu ích cho các phương pháp được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, IgG (gồm IgG₁, IgG₂, IgG₃, và IgG₄), IgA (gồm IgA₁ và IgA₂), IgD, IgE, hoặc IgM, và IgY.

Theo một phương án, các kháng thể kháng đại theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với glycoprotein đại. Theo một phương án, các kháng thể có khả năng làm giảm tính gây nhiễm của virus đại và không làm giảm tính sinh miễn dịch của vaccine đại. Theo một phương án, các kháng thể này là kháng thể đơn dòng, kháng thể của chuột, kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm giống như của người.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa một hoặc nhiều trình tự axit amin CDR chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm DYIML (SEQ ID NO:57), DIYPYYGSTSYNLKFKG (SEQ ID NO:58), QGGDGNYVLFDY (SEQ ID NO:59), GFAMS (SEQ ID NO:60), TISSGGTYTYPDSVMG (SEQ ID NO:61), RLRRNYYSMDY (SEQ ID NO:62), hoặc biến thể của nó chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bảo toàn. Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế chứa một hoặc nhiều trình tự axit amin CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm

KASQNVGTTVA (SEQ ID NO:63), SASYRYS (SEQ ID NO:64), QQYNSYPFT (SEQ ID NO:65), KSTKSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:66), LVSNRFS (SEQ ID NO:67), FQSNYLPFT (SEQ ID NO:68), hoặc biến thể của nó có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bảo toàn.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa kháng thể trung hòa virus đại hoặc mảnh của nó. Theo một phương án, sáng chế đề xuất tế bào chủ hoặc axit nucleic chứa axit nucleic phân lập mã hóa kháng thể.

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng idiotyp đối với kháng thể theo sáng chế. Kháng thể theo sáng chế có thể là đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép, đặc hiệu ba hoặc đa đặc hiệu lớn hơn. Các kháng thể đa đặc hiệu có thể đặc hiệu với các epitop khác nhau của glycoprotein đại hoặc có thể đặc hiệu với cả glycoprotein đại cũng như với cả chế phẩm khác loại, như polypeptit khác loại hoặc vật liệu hỗ trợ dạng rắn. Tham khảo tài liệu WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60-69 (1991); patent Mỹ số 5,573,920, 4,474,893, 5,601,819, 4,714,681, 4,925,648; 6,106,835; Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148: 1547-1553 (1992). Kháng thể này có thể có nguồn gốc từ động vật tự nhiên bất kỳ bao gồm chim và động vật có vú. Theo một phương án, kháng thể này là của người, chuột, thỏ, dê, lợn guinea, lạc đà, ngựa hoặc gà. Theo một phương án, kháng thể này được làm giống như của người.

Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp với chế phẩm khác. Ví dụ, kháng thể trung hòa virus đại có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều liệu pháp kháng đại đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như được mô tả trên đây. Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng cần nó trước, lần lượt, hoặc đồng thời với việc sử dụng một hoặc nhiều liệu pháp kháng đại bổ sung, chẳng hạn như vaccin đại.

Kháng thể theo sáng chế có thể được dung hợp tái tổ hợp với một polypeptit khác loại ở đầu tận cùng N hoặc C hoặc được liên kết hóa học (bao gồm liên kết cộng hóa trị và liên kết không cộng hóa trị) với các polypeptit hoặc chế phẩm khác. Ví dụ, các kháng thể có thể được dung hợp tái tổ hợp hoặc được liên kết với các phân tử như chất đánh dấu trong các thử nghiệm phát hiện và các phân tử đáp ứng (phân tử tác động) như polypeptit khác loại, thuốc hoặc chất độc. Tham khảo tài liệu

WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; patent Mỹ số 5,314,995; và EP 0 396 387.

A. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng đại

Việc sản xuất kháng thể kháng đại đặc hiệu với glycoprotein virus đại được minh họa trong Ví dụ 1 dưới đây. Nên hiểu là không chỉ kháng thể tự nhiên phù hợp với sáng chế, mà các kháng thể tái tổ hợp và mảnh kháng thể, ví dụ, polypeptit liên quan đến kháng thể, hướng trực tiếp đến glycoprotein đại và các mảnh của nó cũng phù hợp. Các kháng thể kháng đại có thể là đối tượng trực tiếp của các kỹ thuật nêu dưới đây bao gồm kháng thể đơn dòng và đa dòng, và các mảnh kháng thể như Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, scFv, kháng thể kép, chuỗi nhẹ kháng thể, chuỗi nặng kháng thể và/hoặc các mảnh kháng thể. Các phương pháp hữu dụng để sản xuất với năng suất cao các polypeptit chứa Fv của kháng thể, ví dụ, Fab' và F(ab')₂ các mảnh kháng thể đã được mô tả. Tham khảo patent Mỹ số 5,648,237.

Kháng thể đơn dòng. Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đơn dòng kháng đại. Ví dụ, theo một phương án, kháng thể đơn dòng kháng đại có thể là kháng thể đơn dòng kháng đại của người hoặc của chuột. Để sản xuất kháng thể đơn dòng kháng một glycoprotein đại cụ thể, hoặc dẫn xuất, mảnh, thể tương đồng hoặc thể tương tự hoặc đồng đẳng của nó, phương pháp bất kỳ để sản xuất phân tử kháng thể bằng quần thể dòng tế bào liên tục có thể được sử dụng. Các kỹ thuật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kỹ thuật khối lai (Kohler & Milstein, 1975. Nature 256: 495-497); kỹ thuật trioma; kỹ thuật khối lai tế bào B của người (Kozbor, *et al.*, 1983. Immunol. Today 4: 72) và kỹ thuật khối lai EBV để sản xuất kháng thể đơn dòng của người (Cole, *et al.*, 1985. In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Các kháng thể đơn dòng của người có thể được sử dụng trong sáng chế này và có thể được sản xuất bằng cách sử dụng khối lai của người (Cote, *et al.*, 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030) hoặc bằng cách chuyển nhiễm tế bào B của người vào virus Epstein Barr *in vitro* (Cole, *et al.*, 1985. In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Ví dụ, quần thể axit nucleic mã hóa các vùng của kháng thể có thể phân lập được. Các môi trường trong PCR từ các trình tự mã hóa các vùng bảo toàn của kháng thể được sử dụng để khuếch đại các trình tự mã hóa các phần của kháng thể từ quần thể và sau đó các ADN tái cấu trúc mã hóa kháng thể hoặc mảnh của nó, như các

vùng biến đổi, từ các trình tự được khuếch đại. Các trình tự được khuếch đại này cũng có thể được dung hợp với ADN mã hóa các protein khác – ví dụ, vỏ thể thực khuẩn, hoặc protein bề mặt tế bào vi khuẩn – để biểu hiện và thể hiện các polypeptit dung hợp hoặc thực khuẩn thể hoặc vi khuẩn. Các trình tự được khuếch đại sau đó có thể được biểu hiện và được chọn lọc hoặc phân lập dựa trên, ví dụ, ái lực của kháng thể biểu hiện hoặc mảnh của nó đối với kháng nguyên hoặc epitop biểu hiện trên glycoprotein đại. Ngoài ra, khối lai biểu hiện các kháng thể đơn dòng kháng đại có thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch cho đối tượng và sau đó phân lập khối lai từ lách của đối tượng bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường (Milstein *et al.*, (Galfre and Milstein, *Methods Enzymol* (1981) 73: 3-46). Việc sàng lọc khối lai bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn sẽ tạo ra các kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu (đối với các epitop khác nhau) và ái lực khác nhau. Kháng thể đơn dòng được chọn lọc với đặc tính mong muốn (ví dụ, gắn kết với virus đại, có thể được sử dụng như là được biểu hiện bởi khối lai, có thể được liên kết với phân tử như polyetylen glycol (PEG) để thay đổi đặc tính của nó, hoặc cADN mã hóa nó có thể được phân lập, được giải trình tự và được điều khiển bằng các cách thức khác nhau. Các nhánh tổng hợp có thể được bổ sung vào các chuỗi bên axit amin phản ứng, ví dụ lysin để tăng cường đặc tính sinh miễn dịch của glycoprotein đại. Tương tự, kỹ thuật CPG-dinucleotit có thể được sử dụng để tăng cường các đặc tính sinh miễn dịch của glycoprotein đại. Các thao tác khác bao gồm sự thay thế hoặc loại bỏ các gốc axit amin cụ thể mà góp phần vào sự ổn định của kháng thể trong quá trình bảo quản hoặc sau khi sử dụng cho đối tượng, và kỹ thuật trưởng thành ái lực để cải thiện ái lực của kháng thể của glycoprotein đại.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể đơn dòng kháng đại được sản sinh bởi khối lai chứa tế bào B có nguồn gốc từ động vật chuyển gen không phải-người, ví dụ chuột chuyển gen, có hệ gen chứa gen chuyển chuỗi nặng của người và gen chuyển chuỗi nhẹ của người dung hợp với tế bào bất tử. Kỹ thuật khối lai bao gồm các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này được nêu trong tài liệu Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 349 (1988); Hammerling *et al.*, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, 563-681 (1981). Các phương pháp khác để sản sinh khối lai và kháng thể đơn dòng là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn. Các kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách ứng dụng ADN tái tổ hợp và kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn. Ví dụ, các kháng thể kháng đại, có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trong phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn, các vùng kháng thể chức năng được biểu hiện trên bề mặt của mảnh thực khuẩn thể mà chứa các trình tự polynucleotit mã hóa chúng. Thể thực khuẩn có đặc tính gắn kết mong muốn được chọn lọc từ thư mục hoặc thư viện kháng thể kết hợp (ví dụ, của người hoặc của chuột) bằng cách chọn lọc trực tiếp với kháng nguyên, điển hình là kháng nguyên gắn kết với hoặc bị giữ bởi một bề mặt hoặc hạt rắn. Thể thực khuẩn được sử dụng trong phương pháp này điển hình là thể thực khuẩn dạng sợi chứa fd và M13 với Fab, Fv hoặc các vùng kháng thể Fv được cố định bởi disulfit được dung hợp tái tổ hợp hoặc với protein gen III hoặc gen VIII của thể thực khuẩn. Bên cạnh đó, các phương pháp có thể phù hợp với cấu trúc thư viện biểu hiện Fab (Huse, *et al.*, *Science* 246: 1275-1281, 1989) cho phép xác định nhanh và hiệu quả mảnh Fab đơn dòng với tính đặc hiệu mong muốn đối với polypeptit của virus đại, ví dụ, polypeptit hoặc dẫn xuất, mảnh, thể tương tự hoặc đồng đẳng của nó. Các ví dụ khác về phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể theo sáng chế bao gồm các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp hữu dụng để biểu hiện polypeptit trên bề mặt của mảnh thể thực khuẩn bằng cách gắn polypeptit thông qua liên kết disulfit được mô tả trong tài liệu Lohning, patent Mỹ số 6,753,136. Sau khi chọn lọc thể thực khuẩn, các vùng mã hóa kháng thể từ thể thực khuẩn có thể được phân lập và sử dụng để tạo ra toàn bộ kháng thể, bao gồm kháng thể của người, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên khác bất kỳ, và biểu hiện trong vật chủ được thiết kế bao gồm tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, tế bào thực vật, nấm men và vi khuẩn. Ví dụ, kỹ thuật để sản sinh tái tổ hợp các mảnh Fab, Fab' và F(ab')₂ cũng có thể sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này như được bộc lộ trong WO 92/22324; Mullinax *et al.*, *BioTechniques* 12: 864-869, 1992; và Sawai *et al.*, *AJRI* 34: 26-34, 1995; và Better *et al.*, *Science* 240: 1041-1043, 1988.

Nói chung, các kháng thể lai hoặc mảnh kháng thể lai được tách dòng vào vector biểu hiện có thể được chọn lọc kháng lại kháng nguyên tương ứng để xác định các biến thể mà duy trì đặc tính gắn kết tốt, bởi vì kháng thể hoặc mảnh kháng thể sẽ có mặt trên bề mặt của thể thực khuẩn hoặc mảnh thể thực khuẩn. Tham khảo tài liệu

Barbas III *et al.*, *Phage Display, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001). Tuy nhiên, các dạng vector khác cũng có thể được sử dụng cho quá trình này, như là tách dòng thư viện mảnh kháng thể vào vector thể thực khuẩn phân giải (T7 cải biến hoặc hệ thống Lambda Zap) để chọn lọc và/hoặc sàng lọc.

Biểu hiện kháng thể kháng đại tái tổ hợp. Như đã nêu trên, các kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Cấu trúc polypeptit tái tổ hợp mã hóa kháng thể kháng đại theo sáng chế điển hình chứa trình tự điều khiển biểu hiện được liên kết với trình tự mã hóa chuỗi kháng thể kháng đại, bao gồm các vùng khởi đầu gắn kết tự nhiên hoặc khác loại. Theo một phương án, các vector chứa một hoặc nhiều trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể kháng đại theo sáng chế. Để biểu hiện tái tổ hợp một hoặc nhiều polypeptit theo sáng chế, axit nucleic chứa tất cả hoặc một phần trình tự nucleotit mã hóa kháng thể kháng đại được chèn vào vector tách dòng tương ứng, hoặc vector biểu hiện (ví dụ, vector chứa yếu tố cần thiết cho sự phiên mã hoặc dịch mã trình tự mã hóa polypeptit được chèn vào) bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp đã biết trong lĩnh vực này được mô tả dưới đây. Các phương pháp sản xuất các quần thể đa dạng của vector được mô tả trong tài liệu Lerner *et al.*, patent Mỹ số 6,291,160; 6,680,192.

Nói chung, các vector biểu hiện hữu dụng trong kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng plasmit. Trong bản mô tả này, plasmit và vector có thể được sử dụng thay thế cho nhau vì plasmit phần lớn thường ở dạng vector. Tuy nhiên, sáng chế cũng dự tính bao gồm cả các dạng khác của vector biểu hiện mà không phải là plasmit về mặt kỹ thuật, như vector virus (ví dụ retrovirus thiếu hụt nhân bản, adenovirus và virus liên quan đến adeno), mà hoạt động với các chức năng tương đương. Các vector virus này cho phép lây nhiễm vào đối tượng và các trình tự biểu hiện là hệ thống khởi đầu của sinh vật nhân chuẩn trong vector có thể biến đổi hoặc chuyển nhiễm vào tế bào chủ của sinh vật nhân chuẩn. Một khi vector được gắn vào vật chủ tương ứng, vật chủ được duy trì ở điều kiện phù hợp để biểu hiện ở mức cao các trình tự nucleotit mã hóa kháng thể kháng đại, và sự thu thập và tinh chế kháng thể kháng đại, ví dụ, kháng thể kháng đại phản ứng chéo (Đơn đăng ký sáng chế Mỹ số 20020199213). Các vector biểu hiện này được nhân bản điển hình trong vật chủ hoặc ở dạng episom hoặc ở dạng phần gắn kết vào ADN nhiễm sắc thể của tế bào chủ. Thông thường, vector biểu hiện chứa chất đánh

dấu chọn lọc, ví dụ kháng ampicillin hoặc kháng hygromycin, để cho phép phát hiện các tế bào này được chuyển nhiễm bởi trình tự ADN thiết kế. Các vector cũng có thể mã hóa peptit tín hiệu, ví dụ, pectat lyaza, hữu dụng để điều khiển sự tiết các mảnh kháng thể ngoại bào.

Các vector biểu hiện theo sáng chế chứa axit nucleic mã hóa chất có đặc tính gắn kết với virus đại ở dạng phù hợp để biểu hiện axit nucleic trong tế bào chủ, điều này có nghĩa là các vector biểu hiện chứa một hoặc nhiều trình tự điều hòa, được chọn trên cơ sở các tế bào chủ được sử dụng để biểu hiện mà được liên kết thực tế với trình tự axit nucleic được biểu hiện. Trong vector biểu hiện tái tổ hợp, được liên kết thực tế có nghĩa là trình tự nucleotit quan tâm được liên kết với (các) trình tự điều hòa theo cách thức cho phép biểu hiện trình tự nucleotit (ví dụ, trong hệ thống phiên mã/dịch mã *in vitro* hoặc trong tế bào chủ khi vector được đưa vào tế bào chủ). Thuật ngữ “trình tự điều hòa” bao gồm đoạn khởi đầu, đoạn tăng cường và các yếu tố biểu hiện khác (ví dụ, tín hiệu polyadenyl hóa). Các trình tự điều hòa này được mô tả, ví dụ, trong Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Các trình tự điều hòa bao gồm các trình tự mà điều khiển sự biểu hiện của trình tự nucleotit trong rất nhiều loại tế bào chủ và các trình tự mà điều khiển sự biểu hiện của trình tự nucleotit chỉ trong những tế bào chủ nhất định (ví dụ, trình tự điều khiển đặc hiệu mô). Các chuyên gia trong lĩnh vực này cũng đánh giá rằng việc thiết kế các vector biểu hiện có thể phụ thuộc vào các yếu tố như sự lựa chọn của tế bào chủ để được chuyển nhiễm, mức biểu hiện polypeptit mong muốn, v.v.. Các trình tự điều hòa điển hình hữu dụng làm đoạn khởi đầu cho sự biểu hiện polypeptit tái tổ hợp (ví dụ, kháng thể kháng đại), bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở 3-phosphoglycerat kinaza và các enzym phân giải glycol khác. Đoạn khởi đầu của nấm men có thể cảm ứng bao gồm, đoạn khởi đầu từ alcohol dehydrogenaza, isocytocrom C, và các enzym có vai trò trong việc phân giải maltozo và galactozo. Theo một phương án, polynucleotit mã hóa kháng thể kháng đại theo sáng chế được liên kết với đoạn khởi đầu araB và có thể biểu hiện trong tế bào chủ (patent Mỹ số 5,028,530). Các vector biểu hiện theo sáng chế có thể được đưa vào tế bào chủ để qua đó sản sinh polypeptit hoặc peptit, bao gồm các polypeptit dung hợp, được mã hóa bởi axit nucleotit như được mô tả ở đây (ví dụ, kháng thể kháng đại, v.v.).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tế bào chủ biểu hiện kháng thể kháng đại, chứa axit nucleic mã hóa một hoặc nhiều kháng thể kháng đại. Các vector biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế có thể được thiết kế để biểu hiện kháng thể kháng đại trong tế bào nhân sơ và nhân chuẩn. Ví dụ, kháng thể kháng đại có thể biểu hiện trong tế bào vi khuẩn như *Escherichia coli*, tế bào côn trùng (sử dụng vector biểu hiện baculovirus), tế bào nấm, ví dụ, tế bào nấm men hoặc tế bào động vật có vú. Các tế bào chủ phù hợp được đề cập trong tài liệu Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Ngoài ra, vector biểu hiện tái tổ hợp có thể được phiên mã và dịch mã *in vitro*, ví dụ, bằng cách sử dụng trình tự điều hòa T7 và T7 polymeraza. Các phương pháp hữu dụng để sàng lọc polypeptit có đặc tính biết trước, ví dụ kháng thể kháng đại, thông qua biểu hiện trình tự polynucleotit được tạo ra một cách ngẫu nhiên đã được mô tả (patent Mỹ số 5,763,192; 5,723,323; 5,814,476; 5,817,483; 5,824,514; 5,976,862; 6,492,107; 6,569,641).

Sự biểu hiện polypeptit trong sinh vật nhân sơ thường được thực hiện trong *E. coli* với các vector chứa các đoạn khởi đầu mẫn cảm hoặc cấu trúc mà điều khiển sự biểu hiện của polypeptit dung hợp hoặc không dung hợp. Các vector dung hợp bổ sung rất nhiều axit amin vào polypeptit được mã hóa ở đây, thường là vào đầu amino của polypeptit tái tổ hợp. Các vector dung hợp như vậy thường hoạt động nhằm 3 mục đích: (i) làm gia tăng sự biểu hiện của polypeptit tái tổ hợp; (ii) làm gia tăng sự ổn định của polypeptit tái tổ hợp; và (iii) hỗ trợ sự tinh chế polypeptit tái tổ hợp bằng cách hoạt động như là chất gắn trong sự tinh chế ái lực. Thông thường, trong vector biểu hiện dung hợp, vị trí cắt phân giải protein được đưa vào phần ghép nối của nửa dung hợp và polypeptit tái tổ hợp để cho phép phân tách polypeptit tái tổ hợp khỏi nửa dung hợp để tinh chế polypeptit dung hợp. Các enzym như vậy, và trình tự nhận diện tương đồng của chúng, bao gồm yếu tố Xa, thrombin và enterokinaza. Vector biểu hiện dung hợp điển hình bao gồm pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, 1988. Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) và pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) mà dung hợp glutathion S-transferaza (GST), polypeptit gắn kết maltose E, hoặc polypeptit A, với polypeptit tái tổ hợp đích.

Ví dụ về vector biểu hiện của *E. coli* không dung hợp có tính mẫn cảm phù hợp bao gồm pTrc (Amrann *et al.*, (1988) Gene 69: 301-315) và pET 11d (Studier *et al.*,

GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89). Các phương pháp đối với tập hợp đích peptit hoạt tính hoặc vùng protein để thu được polypeptit đa chức năng thông qua dung hợp polypeptit đã được mô tả trong tài liệu Pack *et al.*, patent Mỹ số 6,294,353; 6,692,935. Một kỹ thuật để tối ưu hóa biểu hiện polypeptit tái tổ hợp, ví dụ kháng thể kháng đại, trong *E. coli* để biểu hiện polypeptit trong vi khuẩn chủ với khả năng được sửa chữa để phân tách phân giải protein polypeptit tái tổ hợp. Tham khảo tài liệu Pack *et al.*, patent Mỹ số 6,294,353; 6,692,935. Phương pháp khác để thay đổi trình tự axit nucleic của axit nucleic được chèn vào vector biểu hiện để mà các bộ ba riêng lẻ đối với mỗi axit amin được sử dụng trong vật chủ biểu hiện, ví dụ *E. coli* (Wada, *et al.*, 1992. Nucl. Acids Res. 20: 2111-2118). Sự thay đổi này của trình tự axit nucleic theo sáng chế có thể được thực hiện bằng kỹ thuật tổng hợp ADN.

Theo một phương án, vector biểu hiện kháng thể kháng đại là vector biểu hiện của nấm men. Ví dụ về vector biểu hiện trong nấm men *Saccharomyces cerevisiae* bao gồm pYepSec1 (Baldari, *et al.*, 1987. EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, *Cell* 30: 933-943, 1982), pJRY88 (Schultz *et al.*, *Gene* 54: 113-123, 1987), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.), và picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.). Ngoài ra, kháng thể kháng đại có thể được biểu hiện trong tế bào côn trùng bằng cách sử dụng vector biểu hiện baculovirus. Vector baculovirus có thể dùng để biểu hiện polypeptit, ví dụ, kháng thể kháng đại, trong tế bào côn trùng được nuôi cấy (ví dụ, tế bào SF9) chứa chuỗi pAc (Smith, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156-2165, 1983) và chuỗi pVL (Lucklow and Summers, 1989. *Virology* 170: 31-39).

Theo một phương án, axit nucleic mã hóa kháng thể kháng đại theo sáng chế được biểu hiện trong tế bào động vật có vú bằng cách sử dụng vector biểu hiện của động vật có vú. Ví dụ về vector động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, pCDM8 (See. *Nature* 329: 840, 1987) và pMT2PC (Kaufman, *et al.*, *EMBO J.* 6: 187-195, 1987). Khi được sử dụng trong tế bào động vật có vú, chức năng điều khiển của vector biểu hiện thường được tạo ra bởi các yếu tố điều hòa của virus. Ví dụ, các đoạn khởi đầu thường được sử dụng có nguồn gốc từ polyoma, adenovirus 2, cytomegalovirus, và thể tương tự virus 40. Các hệ biểu hiện phù hợp khác đối với cả tế bào nhân sơ và nhân chuẩn để biểu hiện kháng thể kháng đại theo sáng chế được bộc lộ trong chương 16 và 17 của tài liệu Sambrook, *et al.*, MOLECULAR CLONING: A

LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

Theo một phương án, vector biểu hiện tái tổ hợp của động vật có vú có thể điều khiển sự biểu hiện của axit nucleic trong một loại tế bào cụ thể (ví dụ, các yếu tố điều hòa đặc hiệu mô được sử dụng để biểu hiện axit nucleic). Các yếu tố điều hòa đặc hiệu mô là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các ví dụ về đoạn khởi đầu đặc hiệu mô phù hợp bao gồm đoạn khởi đầu albumin (đặc hiệu gan; Pinkert, *et al.*, *Genes Dev.* 1: 268-277, 1987), đoạn khởi đầu đặc hiệu bạch huyết (Calame and Eaton, *Adv. Immunol.* 43: 235-275, 1988), trong các đoạn khởi đầu cụ thể của thụ thể tế bào T (Winoto and Baltimore, *EMBO J.* 8: 729-733, 1989) và các globulin miễn dịch (Banerji, *et al.*, 1983. *Cell* 33: 729-740; Queen and Baltimore, *Cell* 33: 741-748, 1983.), đoạn khởi đầu đặc hiệu tế bào thần kinh (ví dụ, đoạn khởi đầu sợi thần kinh; Byrne and Ruddle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477, 1989), đoạn đặc hiệu tụy (Edlund, *et al.*, 1985. *Science* 230: 912-916), và đoạn khởi đầu đặc hiệu tuyến vú (ví dụ, đoạn khởi đầu bột sữa; patent Mỹ số 4,873,316 và công bố đơn châu Âu No. 264,166). Các đoạn khởi đầu điều hòa – phát triển cũng được bao hàm, ví dụ đoạn khởi đầu của chuột (Kessel and Gruss, *Science* 249: 374-379, 1990) và đoạn khởi đầu α -fetoprotein (Campes and Tilghman, *Genes Dev.* 3: 537-546, 1989).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp gắn vào tế bào chủ vector biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế. Thuật ngữ “tế bào chủ” và “tế bào chủ tái tổ hợp” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này. Có thể hiểu rằng các thuật ngữ này không chỉ thể hiện tế bào chủ cụ thể mà còn thể hiện các thế hệ con cháu và thế hệ con cháu tiềm năng của tế bào chủ này. Vì những sự cải biến nhất định có thể xảy ra trong các thế hệ tiếp theo do hoặc là đột biến hoặc là ảnh hưởng của môi trường, thế hệ như vậy thực tế không thể giống hệt tế bào cha mẹ, nhưng vẫn được bao hàm trong phạm vi của thuật ngữ được sử dụng ở đây.

Các tế bào chủ có thể là tế bào nhân chuẩn, hoặc tế bào nhân sơ. Ví dụ, kháng thể kháng đại có thể được biểu hiện trong các tế bào vi khuẩn như *E. coli*, tế bào côn trùng, nấm men hoặc tế bào động vật có vú. Các tế bào động vật có vú là vật chủ phù hợp để biểu hiện các mảnh nucleotit mã hóa globulin miễn dịch hoặc mảnh của nó (Winnacker, *From Genes To Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987)). Rất nhiều dòng tế bào chủ thích hợp có thể tiết protein khác loại nguyên vẹn đã biết trong lĩnh vực kỹ

thuật này, và bao gồm dòng tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), các dòng tế bào COS, tế bào HeLa, tế bào L và dòng tế bào u tủy. Theo một phương án, các tế bào này không phải là của người. Các vector biểu hiện đối với các tế bào này có thể chứa trình tự điều khiển biểu hiện, như điểm khởi đầu sao chép, đoạn khởi đầu và đoạn tăng cường, và vị trí xử lý thông tin cần thiết, như vị trí gắn kết ribosom, vị trí nối ARN, vị trí polyadenin hóa, và trình tự tận cùng dịch mã (Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89: 49, 1986). Các trình tự điều khiển biểu hiện minh họa là các đoạn khởi đầu có nguồn gốc từ các gen nội sinh, cytomegalovirut, SV40, adenovirut, papilomavirut ở bò, và tương tự (Co *et al.*, *J Immunol.* 148: 1149, 1992). Các tế bào chủ thích hợp khác là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Vector ADN có thể được đưa vào tế bào nhân sơ hoặc nhân chuẩn thông qua kỹ thuật biến đổi hoặc chuyển nhiễm. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ biến đổi và chuyển nhiễm dùng để chỉ các kỹ thuật đưa axit nucleic ngoại lai (ví dụ, ADN) vào tế bào chủ, bao gồm canxi phosphat hoặc đồng kết tủa canxi clorit, chuyển nhiễm qua trung gian DEAE-dextran, lipofection, hoặc đục lỗ điện, chuyển nhiễm dựa trên vận vi sinh vật hoặc virut có thể được sử dụng đối với các vật chủ tế bào khác. Các phương pháp khác được sử dụng để biến đổi tế bào động vật có vú bao gồm việc sử dụng polybren, dung hợp protoplast, liposom, đục lỗ điện, và vi tiêm (Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning*). Các phương pháp thích hợp để biến đổi hoặc chuyển nhiễm tế bào chủ được bộc lộ trong tài liệu Sambrook, *et al.* (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), và các tài liệu hướng dẫn kỹ thuật thí nghiệm khác. Các vector chứa các mảnh ADN quan tâm có thể được chuyển nhiễm vào tế bào chủ bằng các phương pháp đã biết, phụ thuộc vào loại tế bào chủ.

Đã biết để chuyển nhiễm ổn định vào tế bào chủ, phụ thuộc vào vector biểu hiện và kỹ thuật chuyển nhiễm được sử dụng, chỉ một phân đoạn nhỏ của tế bào có thể gắn ADN ngoại lai vào hệ gen của chúng. Để xác định và chọn lọc các thể gắn này, gen mã hóa chất đánh dấu chọn lọc (ví dụ, kháng kháng sinh) thường được đưa vào tế bào chủ cùng với gen quan tâm. Nhiều chất đánh dấu chọn lọc khác nhau bao gồm chất có tính kháng thuốc, như G418, hygromyxin và methotrexat. Axit nucleic mã hóa chất đánh dấu chọn lọc có thể được đưa vào tế bào chủ trên cùng một vector mà mã hóa kháng thể

kháng đại hoặc có thể được đưa vào một vector khác. Các tế bào ổn định được chuyển nhiễm với axit nucleic có thể được xác định bằng cách chọn lọc thuốc (ví dụ, các tế bào được gắn gen đánh dấu có thể chọn lọc sẽ sống sót, trong khi các tế bào khác thì chết).

Một tế bào chủ chứa kháng thể kháng đại theo sáng chế, như tế bào chủ nhân sơ hoặc nhân chuẩn, có thể được sử dụng để sản xuất (ví dụ, biểu hiện) kháng thể kháng đại tái tổ hợp. Theo một phương án, phương pháp bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ (nơi mà vector biểu hiện tái tổ hợp mã hóa kháng thể kháng đại được đưa vào) trong môi trường thích hợp để kháng thể kháng đại được sản sinh. Theo một phương án, phương pháp này còn bao gồm bước phân lập kháng thể kháng đại từ môi trường hoặc tế bào chủ. Mỗi lần biểu hiện, việc thu thập kháng thể kháng đại hoặc polypeptit liên quan đến kháng thể kháng đại được tinh chế từ môi trường nuôi cấy và tế bào chủ. Kháng thể kháng đại có thể được tinh chế theo quy trình chuẩn trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm tinh chế HPLC, sắc ký cột, điện di gel và tương tự. Theo một phương án, kháng thể kháng đại được đưa vào sinh vật chủ bằng phương pháp nêu trong tài liệu patent Mỹ số 4,816,397. Thông thường, chuỗi kháng thể kháng đại được biểu hiện với trình tự tín hiệu và vì vậy được giải phóng vào môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, nếu chuỗi kháng thể kháng đại không được tiết tự nhiên bởi tế bào chủ, thì kháng thể kháng đại có thể được giải phóng bằng cách xử lý bởi chất phản ứng nhẹ. Việc tinh chế polypeptit tái tổ hợp là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm sự kết tủa amoni sulfat, kỹ thuật tinh chế sắc ký ái lực, sắc ký cột, sắc ký trao đổi ion, điện di gel, và tương tự (Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982).

Polypeptit mã hóa kháng thể kháng đại, ví dụ trình tự mã hóa kháng thể kháng đại, có thể được gắn vào gen chuyển để đưa vào hệ gen của động vật chuyển gen và biểu hiện trong sữa của động vật chuyển gen (Patent Mỹ số 5,741,957, 5,304,489, và 5,849,992). Các gen chuyển thích hợp bao gồm các trình tự mã hóa chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng trong cầu nối với đoạn khởi đầu và đoạn tăng cường từ gen đặc hiệu tuyến vú, như là casein hoặc β -lactoglobulin. Để tạo ra động vật chuyển gen, các gen chuyển có thể được vi tiêm vào tế bào trứng đã được thụ tinh, hoặc có thể được gắn vào hệ gen của các tế bào gốc phôi, và nhân của các tế bào này có thể được chuyển vào tế bào trứng đã được khoét nhân.

Do sự thoái hóa của trình tự mã hóa axit nucleic, các trình tự khác mã hóa trình tự về cơ bản giống với trình tự protein tự nhiên có thể được sử dụng theo sáng chế. Điều này cũng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự axit nucleic bao gồm tất cả hoặc một phần trình tự axit nucleic mã hóa các polypeptit trên, mà bị biến đổi bởi sự thay thế các bộ ba khác nhau mã hóa gốc axit amin tương đồng về mặt chức năng trong trình tự, vì vậy tạo ra sự thay đổi câm. Người ta cũng cho rằng trình tự nucleotit của globulin miễn dịch theo sáng chế dung nạp các biến thể tương đồng về trình tự đến 25% như được tính toán bởi các phương pháp chuẩn ("Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp. 127-149, 1998, Alan R. Liss, Inc.) miễn là một biến thể hình thành nên một kháng thể có hiệu lực mà nhận dạng các glycoprotein của virus đại hoặc giống virus đại. Ví dụ, một hoặc nhiều gốc axit amin trong trình tự polypeptit có thể được thế bởi một axit amin khác có tính phân cực tương tự mà hoạt động như một biến thể tương đương về chức năng, dẫn đến sự biến đổi câm. Những sự thay thế axit amin trong trình tự có thể được chọn lọc từ các thành viên khác của lớp mà axit amin thuộc về đó. Ví dụ, các axit amin không phân cực (kỵ nước) bao gồm alanin, leucin, isoleucin, valin, prolin, phenylalanin, tryptophan và metionin. Các axit amin trung tính phân cực bao gồm glyxin, serin, threonin, cystein, tyrosin, asparagin, và glutamin. Các axit amin tích điện dương (bazơ) bao gồm arginin, lysin và histidin. Các axit amin tích điện âm (axit) bao gồm axit aspartic và axit glutamic. Sáng chế cũng đề xuất các protein hoặc mảnh hoặc dẫn xuất của nó được cải biến khác nhau trong hoặc sau khi dịch mã, ví dụ bởi sự glycosyl hóa, phân cắt protein, liên kết với phân tử kháng thể hoặc các chất gắn tế bào khác. Kỹ thuật bất kỳ để gây đột biến là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đột biến điểm *in vitro*, và tương tự (*J. Biol. Chem.* 253:6551, use of Tab linkers (Pharmacia)).

Kháng thể chuỗi đơn. Theo một phương án, kháng thể kháng đại theo sáng chế là kháng thể kháng đại chuỗi đơn. Theo sáng chế, các kỹ thuật có thể phù hợp để sản xuất các kháng thể chuỗi đơn đặc hiệu với glycoprotein đại (patent Mỹ số 4,946,778). Ví dụ về các kỹ thuật có thể được sử dụng để sản xuất các Fv chuỗi đơn và kháng thể theo sáng chế được mô tả trong các tài liệu patent Mỹ số 4,946,778 và 5,258,498; Huston *et al.*, *Methods in Enzymology*, 203: 46-88, 1991; Shu, L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7995-7999, 1993; và Skerra *et al.*, *Science* 240: 1038-1040, 1988.

Kháng thể khảm và kháng thể được làm giống như của người. Theo một phương án, kháng thể kháng đại theo sáng chế là kháng thể kháng đại khảm. Theo một phương án, kháng thể kháng đại theo sáng chế là kháng thể kháng đại được làm giống như của người. Theo một phương án, kháng thể cho và nhận là các kháng thể đơn dòng (để tối thiểu hóa tính kháng nguyên ở người), trong trường hợp đó kháng thể ghép-CDR thu được gọi là kháng thể “được làm giống như của người”.

Các kháng thể kháng đại tái tổ hợp, như kháng thể đơn dòng khảm hoặc được làm giống như của người, chứa cả các phần của người và không phải của người, có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Đối với một số ứng dụng, bao gồm việc sử dụng *in vivo* kháng thể kháng đại theo sáng chế ở người cũng như sử dụng các kỹ thuật phát hiện tác nhân này *in vitro*. Có thể sử dụng các kháng thể kháng đại khảm, được làm giống như của người hoặc của người. Các kháng thể đơn dòng khảm và được làm giống như của người này có thể được sản xuất bởi các kỹ thuật ADN tái tổ hợp đã biết.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất cấu trúc của các kháng thể kháng đại được làm giống như của người mà không chắc chắn tạo ra đáp ứng kháng thể kháng chuột của người (sau đây được gọi là HAMA), trong khi đó vẫn có chức năng hỗ trợ kháng thể hiệu quả. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “của người” hoặc “được làm giống như của người”, trong mối quan hệ với kháng thể, liên quan đến kháng thể mà được mong đợi là tạo ra đáp ứng miễn dịch yếu có khả năng trị liệu ở người. Theo một phương án, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng đại được làm giống như của người, các globulin miễn dịch chuỗi nhẹ và chuỗi nặng.

Kháng thể CDR. Theo một phương án, kháng thể kháng đại theo sáng chế là kháng thể CDR kháng đại. Các kháng thể cho và nhận nói chung được sử dụng để tạo ra kháng thể CDR kháng đại là các kháng thể đơn dòng từ các loài khác nhau; kháng thể nhận điển hình là kháng thể của người (để tối thiểu hóa tính kháng nguyên của nó ở người), trong trường hợp đó kháng thể ghép-CDR thu được được gọi là kháng thể “được làm giống như của người”. Sự ghép có thể là CDR đơn (hoặc thậm chí là phần của CDR đơn) trong V_H hoặc V_L đơn của kháng thể nhận, hoặc có thể là các CDR đa trong một hoặc cả hai V_H và V_L . Thông thường cả ba CDR trong tất cả các vùng biến đổi của kháng thể nhận sẽ bị thay thế bởi các CDR cho tương ứng, mặc dù chỉ cần một sự thay thế là đủ để cho phép gắn kết tương ứng của kháng thể ghép-CDR thu được

với MetAp3. Các phương pháp để tạo ra kháng thể ghép-CDR và kháng thể được làm giống như của người được bộc lộ trong tài liệu patent Mỹ số 5,585,089, patent Mỹ số 5,693,761; patent Mỹ số 5,693,762; và Winter U.S. 5,225,539; và EP 0682040. Các phương pháp hữu dụng để tạo ra polypeptit V_H và V_L được đề cập trong tài liệu Winter *et al.*, patent Mỹ số 4,816,397; 6,291,158; 6,291,159; 6,291,161; 6,545,142; EP 0368684; EP0451216; EP0120694.

Sau khi chọn lọc vùng khung phù hợp làm ứng cử viên từ cùng một họ và/hoặc thành viên của họ, hoặc cả hai vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được sản xuất bằng cách ghép các CDR từ các loài nguyên thủy vào các vùng khung lai. Tập hợp các kháng thể lai hoặc mảnh kháng thể lai có các vùng chuỗi biến đổi lai theo khía cạnh bất kỳ nêu trên có thể kết hợp bằng cách sử dụng các phương pháp truyền thống đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, các trình tự ADN mã hóa các vùng biến đổi lai được mô tả ở đây (ví dụ, các vùng khung dựa trên các loài đích và các CDR từ các loài nguyên thủy) có thể được sản xuất bằng cách tổng hợp oligonucleotit và/hoặc PCR. Axit nucleic mã hóa các vùng CDR cũng có thể được phân lập từ kháng thể của các loài nguyên thủy bằng cách sử dụng các enzym giới hạn phù hợp và gắn vào khung loài đích bằng cách gắn với các enzym gắn thích hợp. Ngoài ra, vùng khung của chuỗi biến đổi của kháng thể các loài nguyên thủy có thể được thay đổi bởi đột biến điểm.

Vì thể lai được cấu trúc từ sự lựa chọn trong số rất nhiều ứng cử viên tương ứng với mỗi vùng khung, những thể lai này tồn tại rất nhiều sự kết hợp của các trình tự mà chịu trách nhiệm cho việc cấu trúc tương ứng với các nguyên tắc được mô tả ở đây. Theo đó, thư viện thể lai có thể được tập hợp gồm các thành viên với sự kết hợp khác nhau của các vùng khung riêng lẻ. Thư viện như vậy có thể là sự tập hợp của các dữ liệu điện tử của các trình tự hoặc tập hợp của các thể lai.

Quá trình này không làm thay đổi FR của kháng thể nhận mà ảnh hưởng đến CDR ghép. Tuy nhiên, chuyên gia trong lĩnh vực này có thể cải thiện ái lực gắn kết kháng nguyên của kháng thể ghép CDR kháng đại thụ được bằng cách thay thế các gốc nhất định của FR để tạo ra FR tương tự nhiều hơn so với FR tương ứng của kháng thể cho. Các vị trí phù hợp của sự thay thế bao gồm các gốc axit amin cạnh CDR, hoặc có thể tương tác với CDR (US 5,585,089, cột 12-16). Chuyên gia trong lĩnh vực này có thể bắt đầu với FR thể cho và cải biến nó để giống hơn so với FR thể nhận hoặc FR consensus của người. Kỹ thuật tạo ra các cải biến này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật

này. Cụ thể là, nếu FR thu được phù hợp với FR consensus của người ở vị trí đó, hoặc nếu giống ít nhất 90% hoặc nhiều hơn so với consensus đó, làm như vậy có thể không gia tăng tính kháng nguyên của kháng thể CDR kháng đại cải biến thu được so với cùng kháng thể đó với FR đầy đủ của người.

Protein dung hợp. Theo một phương án, kháng thể kháng đại theo sáng chế là protein dung hợp. Kháng thể kháng đại theo sáng chế, khi dung hợp với protein thứ hai, có thể được sử dụng như một đuôi có tính kháng nguyên. Ví dụ về vùng có thể dung hợp với polypeptit bao gồm không chỉ các trình tự tín hiệu khác loại, mà còn là các vùng chức năng khác loại. Sự dung hợp không cần trực tiếp, nhưng cũng có thể được xử lý để cải thiện đặc tính của kháng thể kháng đại. Chẳng hạn như, một vùng axit amin bổ sung, cụ thể là axit amin tích điện, có thể được bổ sung vào đầu tận cùng N của kháng thể kháng đại để cải thiện tính ổn định và tính bền trong quá trình tinh chế từ tế bào chủ hoặc quá trình thao tác và bảo quản. Tương tự, các nửa peptit có thể được bổ sung vào kháng thể kháng đại để tạo thuận lợi cho sự tinh chế. Các vùng này có thể được loại bỏ trước bước sản xuất kháng thể kháng đại cuối cùng. Việc bổ sung các nửa peptit để tạo thuận lợi cho việc thao tác polypeptit là các kỹ thuật quen thuộc và thường xuyên trong lĩnh vực này. Kháng thể kháng đại theo sáng chế có thể được dung hợp với các trình tự đánh dấu, như là peptit mà tạo thuận lợi cho sự tinh chế của polypeptit dung hợp. Theo một phương án, trình tự axit amin đánh dấu là peptit 6-histidin, như các đuôi trong vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), trong đó, rất nhiều loại được bán trên thị trường. Như được bộc lộ trong tài liệu Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 821-824, 1989, 6-histidin tạo thuận lợi cho việc tinh chế protein dung hợp. Các đuôi peptit khác là hữu dụng cho việc tinh chế, đuôi HA, tương hợp với epitop có nguồn gốc từ protein hemagglutinin cúm (Wilson *et al.*, *Cell* 37: 767, 1984). Vì vậy, bất kỳ sự dung hợp nào trên đây cũng có thể được xử lý bằng cách sử dụng polynucleotit hoặc polypeptit theo sáng chế. Tương tự, protein dung hợp có thể thể hiện sự gia tăng thời gian bán hủy *in vivo*.

Các protein dung hợp có cấu trúc dime liên kết disulfit (dựa vào IgG) có thể có hiệu quả tốt hơn trong việc gắn kết và trung hòa các phân tử khác, so với proteinmonome được tiết hoặc mảnh protein (Fountoulakis *et al.*, *J. Biochem.* 270: 3958-3964, 1995).

Tương tự, EP-A-O 464 533 (Canadian counterpart 2045869) đề cập đến protein dung hợp chứa các phần khác nhau của vùng cố định của các phân tử globulin miễn dịch cùng với một protein khác của người hoặc phần của nó. Trong nhiều trường hợp, phần Fc trong protein dung hợp là có ích đối với trị liệu và chẩn đoán, và vì vậy có thể dẫn đến, ví dụ các đặc tính được động được cải thiện (EP-A 0232 262). Ngoài ra, việc loại bỏ phần Fc sau khi protein dung hợp được biểu hiện, phát hiện và tinh chế, có thể được thiết kế. Ví dụ, phần Fc có thể cản trở liệu pháp điều trị hoặc chẩn đoán nếu protein dung hợp được sử dụng như kháng nguyên để gây miễn dịch. Trong các khám phá về thuốc, ví dụ, protein của người như hIL-5, đã được dung hợp với các phần Fc để dùng trong thử nghiệm sàng lọc năng suất cao để xác định chất đối kháng của hIL-5 (Bennett *et al.*, *J. Molecular Recognition* 8: 52-58, 1995; Johanson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270: 9459-9471, 1995).

Kháng thể kháng đại được đánh dấu. Theo một phương án, kháng thể kháng đại theo sáng chế được bắt cặp với nửa đánh dấu, ví dụ nhóm có thể phát hiện được. Nhóm đánh dấu hoặc có thể phát hiện được được liên kết với kháng thể kháng đại không phải là 1 khía cạnh đối lập của sáng chế, miễn là nó không ảnh hưởng một cách có ý nghĩa tới sự gắn kết của kháng thể kháng đại theo sáng chế với glycoprotein đại hoặc glycoprotein giống virus đại. Nhóm có thể phát hiện được có thể là chất bất kỳ có được tính vật lý hoặc hóa học có thể phát hiện được. Chất đánh dấu có thể phát hiện được như vậy được phát triển trong lĩnh vực thử nghiệm miễn dịch và hình ảnh, nói chung, phân lớp chất đánh dấu bất kỳ hữu dụng trong phương pháp này đều có thể được áp dụng trong sáng chế. Vì vậy, chất đánh dấu là chế phẩm bất kỳ có thể phát hiện được bởi kỹ thuật quang phổ, quang hóa, sinh hóa, hóa miễn dịch, điện tử, quang học hoặc hóa học. Các chất đánh dấu hữu dụng theo sáng chế bao gồm cả các hạt từ tính (ví dụ, Dynabeads™), chất huỳnh quang (ví dụ, sothiocyanat huỳnh quang, đỏ Texas, rhodamin và tương tự), chất đánh dấu phóng xạ (ví dụ, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , ^{121}I , ^{131}I , ^{112}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), các tác nhân hình ảnh khác như vi bóng (đối với hình ảnh siêu thanh), ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O (đối với chụp cắt lớp phát xạ positron), $^{99\text{m}}\text{TC}$, ^{111}In (đối với chụp cắt lớp phát xạ photon đơn), enzym (ví dụ, peroxidaza củ cải ngựa, phosphataza kiềm và các chất khác được dùng trong ELISA) và chất đánh dấu nhiệt lượng như cộng hợp vàng hoặc các hạt kính màu hoặc nhựa (ví dụ, polystyren, polypropylen, latex, và tương tự). Các patent mô tả việc sử dụng các chất đánh dấu này bao gồm patent Mỹ số

3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; và 4,366,241, được kết hợp vào đây để tham khảo. Ngoài ra, có thể tham khảo tài liệu Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6th Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene OR.).

Chất đánh dấu có thể được bắt cặp một cách trực tiếp hoặc gián tiếp với thành phần của một thử nghiệm theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Như nêu trên, rất nhiều chất đánh dấu có thể được sử dụng, cùng với sự chọn lựa của chất đánh dấu phụ thuộc vào tính miễn cảm cần thiết, dễ dàng liên kết với hợp chất, tính ổn định, cách thức sử dụng và cách thức sắp xếp bố trí.

Các chất đánh dấu không-phóng xạ thường được gắn bởi các cách thức gián tiếp. Nói chung, phân tử gắn (ví dụ, biotin) được liên kết cộng hóa trị với phân tử. Chất gắn sau đó liên kết với phân tử kháng chất gắn (ví dụ, streptavidin) mà hoặc liên kết có thể phát hiện được hoặc cộng hóa trị với hệ thống tín hiệu, như enzym có thể phát hiện được, hợp chất huỳnh quang hoặc hợp chất quang hóa. Rất nhiều chất gắn và kháng gắn có thể được sử dụng. Khi chất gắn có một chất kháng gắn tự nhiên, ví dụ, biotin, tyroxin, và cortisol, nó có thể được sử dụng trong việc liên kết với chất kháng gắn tự nhiên được đánh dấu. Ngoài ra, hợp chất kháng nguyên hoặc hapten có thể sử dụng được để sự kết với với kháng thể, ví dụ, kháng thể kháng đại.

Các phân tử cũng có thể liên kết trực tiếp với hợp chất tạo tín hiệu, ví dụ, bằng cách liên kết với một enzym hoặc chất huỳnh quang. Các enzym quan tâm như chất đánh dấu sẽ chủ yếu là hydrolaza, cụ thể là phosphataza, esteraza và glycosidaza, hoặc oxidoreductaza, cụ thể là peroxidaza. Các hợp chất huỳnh quang hữu dụng làm nửa đánh dấu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất huỳnh quang và dẫn xuất của nó, rhodamin và dẫn xuất của nó, dasyt, umbelliferon, và hợp chất tương tự. Các hợp chất quang hóa hữu dụng làm nửa đánh dấu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, luxiferin, và 2,3-dihydrophthalazinedion, *ví dụ*, luminol. Để tìm hiểu về hệ thống đánh dấu và sinh tín hiệu, có thể tham khảo tài liệu patent Mỹ số 4,391,904.

Các phương thức để phát hiện chất đánh dấu là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Vì vậy, ví dụ, khi chất đánh dấu là chất đánh dấu phóng xạ, thì phương thức phát hiện bao gồm máy đếm tín hiệu nhấp nháy hoặc phim chụp ảnh như trong máy tự chụp bằng tia phóng xạ. Khi chất đánh dấu là chất đánh dấu huỳnh quang, nó có thể được

phát hiện bằng cách kích thích huỳnh quang với chiều dài bước sóng phù hợp, bằng phương thức của phim chụp ảnh, bằng cách sử dụng phát phát hiện điện từ như dụng cụ cặp đôi tích điện (CCDs) hoặc máy nhân quang và tương tự. Tương tự, chất đánh dấu enzym có thể được phát hiện bằng cách cung cấp các cơ chất phù hợp đối với enzym và phát hiện sản phẩm phản ứng thu được. Các chất đánh dấu đo màu đơn giản cuối cùng có thể được phát hiện một cách đơn giản bằng cách quan sát màu liên kết với chất đánh dấu. Vì vậy, trong các thử nghiệm que đo độ sâu, cộng hợp vàng thường thể hiện màu hồng, trong khi các hạt gắn kết khác thường có màu của hạt.

Một số dạng thử nghiệm không đòi hỏi sử dụng các thành phần đánh dấu. Chẳng hạn như, thử nghiệm ngưng kết có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của kháng thể đích, ví dụ, kháng thể kháng dại. Trong trường hợp này, các hạt được phủ bởi kháng nguyên được ngưng kết bởi các mẫu chứa kháng thể đích. Trong dạng này, không thành phần nào cần được đánh dấu và sự có mặt của kháng thể đích được phát hiện bởi sự kiểm tra đơn giản bằng mắt thường.

B. Xác định và mô tả đặc điểm của kháng thể kháng dại theo sáng chế

Các phương pháp hữu dụng để xác định và sàng lọc các kháng thể kháng dại và các polypeptit liên quan đến virus dại có tính đặc hiệu mong muốn đối với glycoprotein dại bao gồm kỹ thuật qua trung gian miễn dịch bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Các thành phần của đáp ứng miễn dịch có thể được phát hiện *in vitro* bởi các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, (1) các tế bào lympho T gây độc tế bào bằng cách loại bỏ tính phóng xạ, (2) tế bào lympho T hỗ trợ có thể được ủ với kháng nguyên và tế bào trình diện kháng nguyên và sự tổng hợp và tiết của các cytokin được đo bằng các phương pháp chuẩn (Windhagen A; *et al.*, *Immunity*, 2: 373-80, 1995); (3) các tế bào trình diện kháng nguyên có thể được ủ với toàn bộ kháng nguyên protein và sự có mặt của kháng nguyên đó trên MHC được phát hiện bởi hoặc là thử nghiệm hoạt hóa tế bào lympho T hoặc là phương pháp lý sinh (Harding *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 4230-4, 1989); (4) các tế bào khổng lồ có thể được ủ với các chất phản ứng mà liên kết ngang các thụ thể Fc-epsilon của chúng và loại bỏ histamin được đo bằng thử nghiệm miễn dịch enzym (Siraganian *et al.*, *TIPS*, 4: 432-437, 1983); và (5) thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA).

Tương tự, các sản phẩm của đáp ứng miễn dịch trong sinh vật mẫu (ví dụ, chuột) hoặc người cũng có thể được phát hiện bằng các phương pháp khác nhau đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, (1) sản phẩm của kháng thể trong đáp ứng với việc tiêm chủng có thể được phát hiện bằng các phương pháp chuẩn hiện được sử dụng trong phòng thí nghiệm lâm sàng, ví dụ, ELISA; (2) sự di trú của các tế bào miễn dịch tới vị trí viêm có thể phát hiện được bằng cách nạo bề mặt da và đặt vào vật chứa vô trùng để bắt giữ các tế bào di trú qua vị trí nạo (Peters *et al.*, *Blood*, 72: 1310-5, 1988); (3) sự tăng sinh của tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMCs) trong đáp ứng với các chất gây giãn phân hoặc phản ứng tế bào lympho có thể được đo bằng cách sử dụng ^3H -thymidine; (4) khả năng thực bào của các tế bào hạt, đại thực bào, và các thực bào khác trong PBMCs có thể được đo bằng cách đặt PBMCs vào giếng cùng với các hạt được đánh dấu (Peters *et al.*, *Blood*, 72: 1310-5, 1988); và (5) sự biệt hóa của các tế bào hệ miễn dịch có thể được đo bằng cách đánh dấu PBMCs với kháng thể vào các phân tử CD như CD4 và CD8 và đo phân đoạn PBMCs biểu hiện các chất đánh dấu này.

Theo một phương án, kháng thể kháng đại theo sáng chế được chọn lọc bằng cách sử dụng sự biểu hiện của peptit đại trên bề mặt các thể di truyền có thể nhân bản được (patent Mỹ số 5,514,548; 5,837,500; 5,871,907; 5,885,793; 5,969,108; 6,225,447; 6,291,650; 6,492,160; EP 585 287; EP 605522; EP 616640; EP 1024191; EP 589 877; EP 774 511; EP 844 306). Các phương pháp hữu dụng để sản xuất/chọn lọc các hạt thể thực khuẩn dạng sợi chứa hệ gen thể thực khuẩn mã hóa phân tử gắn kết với các tính đặc hiệu mong muốn (EP 774 511; US 5871907; US 5969108; US 6225447; US 6291650; US 6492160).

Theo một phương án, kháng thể kháng đại theo sáng chế được chọn lọc bằng cách sử dụng sự biểu hiện của các peptit đại trên bề mặt của tế bào chủ nấm men. Các phương pháp hữu dụng để phân lập polypeptit scFv bằng cách thể hiện trên bề mặt nấm men được mô tả trong tài liệu Kieke *et al.*, *Protein Eng.* 1997 Nov; 10(11): 1303-10.

Theo một phương án, kháng thể kháng đại theo sáng chế được chọn lọc bằng cách thể hiện ribosom. Các phương pháp hữu dụng để xác định chất gắn trong thư viện peptit bằng cách sử dụng thể hiện ribosom được mô tả trong tài liệu Mattheakis *et al.*,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9022-26, 1994; và Hanes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4937-42, 1997.

Theo một phương án, kháng thể kháng đại theo sáng chế được chọn lọc bằng cách sử dụng biểu hiện tARN peptit đại. Phương pháp hữu dụng *in vitro* để chọn lọc chất gắn bằng cách sử dụng thể hiện tARN được mô tả trong tài liệu Merryman *et al.*, *Chem. Biol.*, 9: 741-46, 2002.

Theo một phương án, kháng thể kháng đại theo sáng chế được chọn lọc bằng cách sử dụng biểu hiện ARN. Các phương pháp hữu dụng để chọn lọc peptit và protein bằng cách sử dụng thư viện biểu hiện ARN được mô tả trong tài liệu Roberts *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12297-302, 1997; và Nemoto *et al.*, *FEBS Lett.*, 414: 405-8, 1997. Các phương pháp hữu dụng để chọn lọc peptit và protein bằng cách sử dụng thư viện biểu hiện ARN không tự nhiên được mô tả trong tài liệu Frankel *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13: 506-12, 2003.

Theo một phương án, các kháng thể kháng đại theo sáng chế được biểu hiện ở tế bào chất của vi khuẩn gram âm và trộn với glycoprotein đại được đánh dấu (WO 02/34886). Trong các dòng biểu hiện polypeptit tái tổ hợp với ái lực với glycoprotein đại, nồng độ của glycoprotein đại được đánh dấu liên kết với kháng thể kháng đại được gia tăng và cho phép các tế bào được phân lập khỏi phần còn lại của thư viện như được bộc lộ trong tài liệu Harvey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 22: 9193-98 2004 và Công bố đơn Mỹ số 2004/0058403.

Sau khi chọn lọc kháng thể kháng đại mong muốn, người ta dự tính rằng nó có thể được sản xuất với số lượng lớn bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ biểu hiện tế bào nhân sơ hoặc nhân chuẩn và tương tự. Các kháng thể kháng đại là, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể lai kháng đại hoặc mảnh của nó có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các kỹ thuật truyền thống để cấu trúc nên một vector biểu hiện mã hóa chuỗi nặng kháng thể trong đó các CDR và, nếu cần thiết, một phần tối thiểu của khung vùng biến đổi cần để duy trì tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể loài nguyên thủy (như xử lý bằng kỹ thuật nêu ở đây) có nguồn gốc từ kháng thể loài nguyên thủy và phần còn lại của kháng thể có nguồn gốc từ các globulin miễn dịch loài đích có thể được thao tác như được mô tả ở đây, qua đó tạo ra vector biểu hiện chứa chuỗi nặng của kháng thể lai.

Đo sự gắn kết của virus dại. Theo một phương án, thử nghiệm gắn kết virus dại thể hiện dạng thử nghiệm trong đó glycoprotein dại và kháng thể kháng dại được trộn trong điều kiện phù hợp để gắn kết giữa các glycoprotein dại hoặc giống virus dại và kháng thể kháng dại và đánh giá số lượng gắn kết giữa glycoprotein dại hoặc giống virus dại với kháng thể kháng dại. Số lượng gắn kết được so sánh với đối chứng phù hợp, mà có thể là số lượng gắn kết khi vắng mặt glycoprotein dại, số lượng gắn kết khi có mặt chế phẩm globulin miễn dịch không đặc hiệu, hoặc cả hai. Số lượng gắn kết có thể được tính toán bằng phương pháp phù hợp bất kỳ. Phương pháp thử nghiệm gắn kết bao gồm, ví dụ, ELISA, thử nghiệm phóng xạ miễn dịch, thử nghiệm đo nhấp nháy, thử nghiệm chuyển năng lượng huỳnh quang, sắc ký lỏng, thử nghiệm lọc qua màng, và tương tự. Các thử nghiệm lý sinh để đo trực tiếp sự gắn kết của glycoprotein dại với kháng thể kháng dại là, ví dụ, cộng hưởng từ hạt nhân, huỳnh quang, sự phân cực huỳnh quang, cộng hưởng plasmon bề mặt (BIACOR chips) và tương tự. Sự gắn kết đặc hiệu được xác định bằng các thử nghiệm chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, thử nghiệm gắn kết chất gắn phóng xạ, ELISA, FRET, kết tủa miễn dịch, SPR, NMR (2D-NMR), quang phổ khối và tương tự. Nếu gắn kết đặc hiệu của kháng thể kháng dại quan tâm nhiều hơn ít nhất là 1% so với khi vắng mặt kháng thể kháng dại quan tâm, thì kháng thể kháng dại quan tâm là hữu dụng để làm kháng thể kháng dại theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất đồng tinh thể của glycoprotein dại và kháng thể kháng dại như là phương pháp để xác định sự tương tác phân tử. Các điều kiện phù hợp để gắn kết giữa kháng thể kháng dại và glycoprotein dại phụ thuộc vào hợp chất và chất gắn của nó và có thể được xác định trực tiếp bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Đo sự trung hòa virus dại. Như được sử dụng ở đây, “sự trung hòa virus dại” dùng để thể hiện sự làm giảm tính gây nhiễm của virus dại thông qua việc gắn kết của một kháng thể kháng dại. Khả năng của kháng thể kháng dại theo sáng chế để trung hòa virus dại có thể được đánh giá *in vitro* hoặc *in vivo* bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp *in vitro* minh họa bao gồm test ức chế huỳnh quang nhanh (RFFIT), như được mô tả trong tài liệu Smith *et al.*, “A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody,” Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H, eds. Laboratory

techniques in rabies. 4th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization 1996;181-192. Các phương pháp *in vivo* minh họa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, test trung hòa ở chuột (MNT), như được mô tả trong tài liệu Hasse, *et al.*, 13(2) J. Biol. Stand. 123-28 (1985). Các kết quả minh họa của RFFIT và MNT được thể hiện trong các ví dụ dưới đây. Theo một phương án, tính gây nhiễm của virus dại được trung hòa ít nhất là 5%, ít nhất là 10%, ít nhất là 15%, ít nhất là 25%, ít nhất là 50%, ít nhất là 60%, ít nhất là 75%, ít nhất là 85%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 99%, ít nhất là 99,5%, ít nhất là 99,9%, hoặc ít nhất là 100%.

Đo sự ảnh hưởng của vaccin dại. Các kháng thể kháng dại theo sáng chế có khả năng trung hòa virus dại ở đối tượng cần nó, mà không ảnh hưởng đến hiệu quả của vaccin dại. Khía cạnh này của sáng chế là một trong các giá trị đặc biệt vì các liệu pháp đại diện hình có sự đồng sử dụng vaccin dại và kháng thể. Mức độ ảnh hưởng của kháng thể kháng dại có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, như các phương pháp được mô tả trong các ví dụ dưới đây. Một cách ngắn gọn, vaccin dại có thể được sử dụng cho động vật cùng với hoặc không cùng với kháng thể kháng dại. Sau khi điều trị hiệu quả bằng vaccin để tạo ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng, thì các chuẩn độ đặc hiệu-vaccin ở đối tượng chỉ được sử dụng vaccin có thể được so sánh với đối tượng được sử dụng cả vaccin và kháng thể. Mức độ ảnh hưởng của kháng thể kháng dại đến vaccin được phản ánh ở chuẩn độ kháng thể đặc hiệu-vaccin. Các kết quả minh họa của thí nghiệm này được thể hiện trong các ví dụ dưới đây. Theo một phương án, kháng thể ảnh hưởng đến đáp ứng miễn dịch do vaccin dại tạo ra dưới 0,1%, dưới 0,5%, dưới 1%, dưới 2%, dưới 5%, dưới 10%, dưới 20%, dưới 25%, dưới 50%, hoặc dưới 75% so với đối tượng đối chứng được sử dụng vaccin nhưng không được sử dụng kháng thể.

Đo mức độ phòng bệnh sau phơi nhiễm. Các kháng thể kháng dại có thể được đánh giá về mức độ phòng bệnh sau phơi nhiễm ở đối tượng bị phơi nhiễm bởi virus dại bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như các phương pháp được mô tả trong phần ví dụ dưới đây. Một cách ngắn gọn, động vật phơi nhiễm với virus dại có thể được sử dụng một hoặc nhiều kháng thể kháng dại ở dạng thành phần điều trị sau phơi nhiễm. Các kháng thể này có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với các phương pháp trị liệu virus dại đã biết như vaccin. Sau thời gian điều trị hiệu quả sự nhiễm dại để đảm bảo tỷ lệ sống sót của đối tượng được sử dụng

kháng thể so với đối chứng tương ứng không được sử dụng kháng thể. Sự giảm tính gây nhiễm virus đại được phản ánh qua tỷ lệ gia tăng hoặc kéo dài thời gian sống sót của đối tượng được sử dụng kháng thể khi so với đối chứng. Các kết quả minh họa của thử nghiệm này được thể hiện trong các ví dụ dưới đây.

II. Sử dụng kháng thể kháng đại theo sáng chế

A. Sử dụng kháng thể kháng đại để chẩn đoán

Các kháng thể kháng đại theo sáng chế là hữu dụng trong các phương pháp chẩn đoán. Sáng chế đề xuất phương pháp sử dụng kháng thể để chẩn đoán sự nhiễm virus đại ở đối tượng. Các kháng thể kháng đại theo sáng chế có thể được chọn lọc để có tính đặc hiệu gắn kết epitop bất kỳ và ái lực gắn kết cao với glycoprotein đại. Nhìn chung, ái lực gắn kết của một kháng thể càng cao thì điều kiện rửa càng nghiêm ngặt có thể được thực hiện trong thử nghiệm miễn dịch để loại bỏ các vật liệu liên kết không đặc hiệu mà không loại bỏ polypeptit đích. Theo đó, kháng thể kháng đại theo sáng chế hữu dụng trong thử nghiệm chẩn đoán thường có ái lực gắn kết ít nhất là 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} hoặc 10^{12} M. Hơn nữa, có thể thiết kế để kháng thể kháng đại được sử dụng làm chất chẩn đoán có động học hiệu quả để đạt được sự cân bằng dưới các điều kiện chuẩn ở ít nhất 12 giờ, ít nhất 5 giờ hoặc ít nhất 1 giờ.

Các kháng thể kháng đại có thể được sử dụng để phát hiện glycoprotein đại hoặc giống-dại phản ứng miễn dịch trong các dạng thử nghiệm chuẩn khác nhau. Các dạng như vậy bao gồm kết tủa miễn dịch, thẩm tách tây, ELISA, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, và thử nghiệm immunometric. Tham khảo tài liệu Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988); Patent Mỹ số 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,879,262; 4,034,074, 3,791,932; 3,817,837; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; và 4,098,876. Các mẫu sinh học có thể lấy từ mô hoặc dịch cơ thể của đối tượng.

B. Sử dụng kháng thể kháng đại trong phòng bệnh và trị liệu

Các kháng thể kháng đại theo sáng chế hữu dụng trong liệu pháp phòng bệnh sau phơi nhiễm (PEP) cho đối tượng phơi nhiễm virus đại. Sự phơi nhiễm có thể bao gồm phơi nhiễm do cắn (ví dụ, xâm nhập qua da bởi răng) bao gồm cắn do động vật hoặc phơi nhiễm không do cắn. Phơi nhiễm không do cắn bao gồm việc tiếp xúc với động

vật nhiễm hoặc sản phẩm của động vật, ví dụ như, nhưng không chỉ giới hạn ở tóc, ví dụ, máu, mô, phân, nước tiểu và nước bọt. Liệu pháp PEP điển hình bao gồm việc sử dụng kháng thể kháng đại cho đối tượng cần điều trị cùng với vaccin đại.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cùng với các phân tử hữu dụng trong phòng bệnh và/hoặc điều trị phơi nhiễm đại hoặc nhiễm đại. Ví dụ, chúng có thể được sử dụng đồng thời với một hoặc nhiều vaccin kháng virus đại. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trước hoặc sau khi dùng một hoặc nhiều vaccin. Các kháng thể này có thể được sử dụng kết hợp với các vaccin đại, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ vaccin tế bào phôi gà tinh chế (PCECV; RabAvert[®], Novartis, Basel, Switzerland; Rabipur[®], Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Germany), vaccin tế bào lưỡng bội của người (HDCV; Imovax[®], Sanofi Pasteur, Swiftwater, PA, USA), và vaccin hấp phụ (RAV). Chế phẩm theo sáng chế còn có thể được sử dụng kết hợp với globulin miễn dịch đại của người (HRIG) hoặc globulin miễn dịch đại của ngựa (ERIG).

Chế phẩm theo sáng chế tùy ý có thể được sử dụng ở dạng liều đơn cho đối tượng cần dùng nó. Ngoài ra, chế độ liều dùng có thể bao gồm việc sử dụng đa liều tại các thời điểm khác nhau sau phơi nhiễm. Ví dụ, chế độ liều dùng có thể chứa 5 liều vaccin đại tiêm trong cơ và/hoặc trong màng bụng vào các ngày 0, 3, 7, 14 và 28 sau phơi nhiễm. Vị trí sử dụng có thể khác nhau liên quan đến vị trí phơi nhiễm đại. Ví dụ, chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng vào trong hoặc xung quanh vết thương vào ngày 0 hoặc sớm nhất có thể sau khi phơi nhiễm, với thể tích không đối tiêm trong cơ tại vị trí cách xa vị trí ban đầu. Bên cạnh đó, tất cả các chế phẩm có thể được sử dụng ở vị trí cách xa vị trí phơi nhiễm. Các chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng ở cùng vị trí hoặc vị trí khác với vị trí của vaccin đại.

Việc sử dụng có thể được thực hiện theo đường bất kỳ, bao gồm đường uống, trong mũi, ngoài đường tiêu hóa (trong tĩnh mạch, trong cơ, trong màng bụng, hoặc dưới da), qua trực tràng, trong sọ não, trong tuỷ hoặc tại chỗ. Việc sử dụng bao gồm tự sử dụng hoặc sử dụng bởi người khác. Có thể cho rằng các dạng khác nhau của sự điều trị hoặc phòng bệnh của điều kiện y học như được mô tả ở đây được dự tính cho phương thức "thực chất", bao gồm tổng số nhưng cũng không kém hơn điều trị tổng số hoặc phòng bệnh, và trong đó một số kết quả liên quan đến sinh học hoặc y học có thể đạt được.

Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế chứa trong dược phẩm có thể được sử dụng cho đối tượng cần nó trong một hoặc nhiều liều. Các chế độ liều có thể được điều chỉnh để tạo ra các đáp ứng mong muốn (ví dụ, đáp ứng điều trị hoặc phòng bệnh).

Thông thường, lượng có hiệu quả của chế phẩm theo sáng chế, hiệu quả để đạt được hiệu quả điều trị hoặc phòng bệnh, thay đổi từ khoảng 0,000001 mg/kg trọng lượng/ngày đến khoảng 10.000 mg/kg trọng lượng/ngày. Cụ thể, liều dùng từ khoảng 0,0001 mg/kg trọng lượng/ngày đến khoảng 100 mg/kg trọng lượng/ngày. Để sử dụng kháng thể kháng đại, liều dùng từ khoảng 0,0001 đến 100 mg/kg, và khoảng 0,01 đến 5 mg/kg mỗi tuần, mỗi 2 tuần hoặc mỗi 3 tuần, theo trọng lượng cơ thể. Ví dụ, liều có thể là 1 mg/kg trọng lượng hoặc 10mg/kg trọng lượng mỗi tuần, mỗi hai tuần hoặc mỗi 3 tuần hoặc trong vòng từ 1-10 mg/kg mỗi tuần, mỗi 2 tuần hoặc mỗi 3 tuần. Theo một phương án, liều đơn kháng thể từ 0,1-10.000 microgam/kg trọng lượng. Theo một phương án, nồng độ kháng thể trong chất mang từ 0,2 đến 200 $\mu\text{g/ml}$ phân phối. Chế độ điều trị minh họa đòi hỏi việc sử dụng một lần mỗi 2 tuần hoặc một lần một tháng hoặc một lần mỗi 3 đến 6 tháng. Các kháng thể kháng đại có thể được sử dụng trong nhiều trường hợp. Khoảng cách giữa các liều đơn có thể là hàng giờ, hàng ngày, hàng tuần, hàng tháng hoặc hàng năm. Khoảng cách cũng có thể là không theo quy luật như được chỉ định bằng cách đo mức máu của kháng thể ở đối tượng. Theo một phương án, liều có thể được điều chỉnh để đạt được nồng độ kháng thể trong huyết thanh ở đối tượng từ khoảng 75 $\mu\text{g/mL}$ đến khoảng 125 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ đến khoảng 150 $\mu\text{g/mL}$, từ khoảng 125 $\mu\text{g/mL}$ đến khoảng 175 $\mu\text{g/mL}$, hoặc từ khoảng 150 $\mu\text{g/mL}$ đến khoảng 200 $\mu\text{g/mL}$. Ngoài ra, các kháng thể kháng đại có thể được sử dụng ở dạng chế phẩm giải phóng duy trì, trong trường hợp đó việc sử dụng với tần suất ít hơn là cần thiết. Liều lượng và tần suất khác nhau phụ thuộc vào thời gian bán hủy của kháng thể ở đối tượng. Liều lượng và tần suất của việc sử dụng có thể khác nhau phụ thuộc vào việc liệu sự điều trị là phòng bệnh hay chữa bệnh. Trong phòng bệnh, liều tương đối thấp có thể được sử dụng trong khoảng thời gian không thường xuyên trong khoảng thời gian dài. Trong điều trị, liều tương đối cao trong khoảng thời gian tương đối ngắn thường xuyên cần cho đến khi diễn biến của bệnh giảm hoặc kết thúc, hoặc cho đến khi đối tượng thể hiện sự cải thiện triệu chứng bệnh một phần hoặc toàn phần. Sau đó, bệnh nhân có thể được sử dụng chế độ phòng bệnh.

Độc tính. Tốt nhất là, lượng có hiệu quả (ví dụ, liều) kháng thể kháng đại được mô tả ở đây sẽ đem lại hiệu quả trị liệu mà không gây ra độc tính ở đối tượng. Độc tính của kháng thể kháng đại được mô tả ở đây có thể được xác định bằng các quy trình được chuẩn trong tế bào hoặc động vật thí nghiệm, ví dụ, bằng cách xác định LD₅₀ (liều gây chết 50% quần thể) hoặc LD₁₀₀ (liều gây chết 100% quần thể). Tỷ lệ liều giữa hiệu quả gây độc và trị liệu là chỉ số trị liệu. Dữ liệu thu được từ các thử nghiệm tế bào này và nghiên cứu ở động vật có thể được sử dụng trong việc tính toán liều không độc để sử dụng ở người. Liều kháng thể kháng đại được mô tả ở đây nằm trong khoảng nồng độ tuần hoàn bao gồm liều hiệu quả mà ít hoặc không độc. Liều có thể khác nhau trong khoảng này phụ thuộc vào dạng liều được sử dụng và đường dùng. Chế phẩm cụ thể, đường dùng và liều dùng có thể được lựa chọn bởi chuyên gia trong lĩnh vực dựa trên tình trạng của đối tượng (Fingl *et al.*, In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ch. 1 (1975)).

Dược phẩm. Theo phương pháp theo sáng chế, kháng thể kháng đại có thể được kết hợp trong dược phẩm để sử dụng. Dược phẩm thường chứa kháng thể tái tổ hợp hoặc tự nhiên được tinh chế tự nhiên và chất mang được dùng ở dạng thích hợp cho sử dụng ở đối tượng. Chất mang được dùng được xác định bởi chế phẩm cụ thể được sử dụng, cũng như bởi các phương pháp cụ thể được sử dụng đối với người sử dụng chế phẩm. Ngoài ra, có nhiều dạng dược phẩm thích hợp để sử dụng chế phẩm kháng thể (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA 18th ed., 1990). Dược phẩm được tạo ra ở dạng vô trùng, đẳng trương và đáp ứng đầy đủ các tiêu chuẩn về sản xuất hàng hóa (Good Manufacturing Practice -GMP) của Hiệp hội Thuốc và Thực phẩm.

Các thuật ngữ “chất mang được dùng”, “có thể dung nạp về mặt lý sinh”, và các dạng thể hiện khác của chúng, được dùng để chỉ chế phẩm, chất mang, chất pha loãng và chất phản ứng, được sử dụng thay thế cho nhau và thể hiện rằng các chất này có thể được sử dụng cho đối tượng mà không gây ra các ảnh hưởng về lý sinh không mong muốn đến mức phải hạn chế việc sử dụng chế phẩm. Ví dụ, “chất phụ gia được dùng” thể hiện chất phụ gia hữu dụng trong việc sản xuất dược phẩm an toàn, không độc, và đáng mong muốn, và bao gồm các chất phụ gia có thể chấp nhận được trong thú y cũng như trong dược phẩm dùng cho người. Các chất phụ gia này có thể ở dạng rắn, lỏng, bán rắn, hoặc trong trường hợp chế phẩm dạng sol khí, dạng khí. “Muối hoặc

este được dùng” thể hiện các muối hoặc este được chấp nhận về mặt dược học và có đặc tính dược lý mong muốn. Các muối này chứa muối có thể được hình thành khi các proton axit thể hiện trong chế phẩm có thể phản ứng với các bazơ vô cơ hoặc hữu cơ. Các muối vô cơ phù hợp bao gồm các muối được hình thành với kim loại kiềm, ví dụ, Na, P, Mg, Ca và Al. Các muối hữu cơ thích hợp bao gồm các dạng được hình thành với bazơ hữu cơ như bazơ amin, ví dụ, etanolamin, dietanolamin, trietanolamin, tromethamin, N-methylglucamin, và tương tự. Các muối này cũng bao gồm muối bổ sung axit được hình thành cùng axit hữu cơ (ví dụ, axit hydrochloric và axit hydrobromic) và axit hữu cơ (ví dụ, axit axetic, axit xitrix, axit malic, và axit alkane-sulfonic và axit aren-sulfonic như axit metansulfonic và axit benzensulfonic). Các este được dùng bao gồm các este được hình thành từ các nhóm cacboxy, sulfonyloxy, và phosphonoxy có trong kháng thể kháng đại, ví dụ C₁₋₆ alkyl este. Khi có mặt 2 nhóm axit, muối được dùng hoặc este có thể là mono-axit-mono-muối hoặc este hoặc muối kép hoặc este, và tương tự khi có nhiều hơn hai nhóm axit, một vài hoặc tất cả các nhóm này có thể được muối hóa hoặc este hóa. Các kháng thể kháng đại theo sáng chế có thể ở dạng không muối hóa hoặc không este hóa, hoặc dạng muối hóa và/hoặc este hóa, và kháng thể kháng đại này có thể được dự tính để có trong hợp chất ban đầu (không muối hóa và không este hóa) và muối hoặc este được dùng của nó. Tương tự, sáng chế cũng đề xuất nhiều hơn một dạng đồng phân lập thể, và các kháng thể kháng đại như vậy được dự tính có trong tất cả các dạng đồng phân lập thể và tất cả các hỗn hợp (raxemic hoặc dạng khác) của các đồng phân lập thể này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, sẽ không khó để xác định thời gian phù hợp, trình tự và liều lượng sử dụng các thuốc và chế phẩm theo sáng chế.

Ví dụ về các chất mang hoặc chất pha loãng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước, nước bọt, dung dịch Ringer, dung dịch dextrose, và albumin huyết thanh người 5%. Liposom và các dụng cụ không chứa nước như dầu cố định cũng có thể được sử dụng. Việc sử dụng các môi trường hợp chất này cho các chất hoạt tính là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoại trừ trong phạm vi môi trường truyền thống bất kỳ hoặc hợp chất không tương hợp với kháng thể kháng đại, việc sử dụng các chế phẩm là đã được dự tính trước. Các chất hoạt tính bổ sung cũng có thể được kết hợp vào chế phẩm.

Dược phẩm theo sáng chế được tạo ra để tương thích với đường sử dụng dự tính của nó. Chế phẩm kháng thể kháng đại theo sáng chế có thể được sử dụng ngoài đường tiêu hóa, khu trú, trong ven, đường uống, dưới da, trong động mạch, trong da, qua da, qua trực tràng, trong sọ, trong tủy sống, trong màng bụng, trong mũi, hoặc trong cơ hoặc dạng xông. Kháng thể kháng đại tùy ý có thể được sử dụng kết hợp với các tác nhân khác ít nhất có hiệu quả từng phần trong việc điều trị các bệnh khác nhau bao gồm các bệnh liên quan đến actin hoặc vi sợi.

Dung dịch hoặc dịch huyền phù được sử dụng ngoài đường tiêu hóa, trong da hoặc dưới da có thể bao gồm các thành phần sau: chất pha loãng tiệt trùng như nước để tiêm, dung dịch muối, dầu cố định, polyetylen glycol, glyxerin, propylen glycol hoặc các dung môi tổng hợp, các hợp chất kháng khuẩn như benzyl alcohol hoặc metyl paraben; chất chống oxy hóa như axit ascorbic hoặc natri bisulfit; hợp chất chelat như axit etylenediaminetetraaxetic (EDTA); các đệm như axetat, xitrat hoặc phosphat, và các hợp chất để điều chỉnh tính đẳng trương như NaCl hoặc dextrozơ. pH có thể được điều chỉnh bằng axit hoặc bazơ, như axit hydrochloric hoặc natri hydroxit. Chế phẩm ngoài đường tiêu hóa có thể được đóng trong các ống tiêm, bơm tiêm dùng 1 lần, hoặc các ống chứa nhiều liều làm bằng thủy tinh hoặc nhựa.

Dược phẩm phù hợp để tiêm chứa dung dịch chất lỏng vô trùng (có thể là dung dịch nước) hoặc các bột vô trùng và phân tán để tạo ra nhanh dung dịch tiêm vô trùng hoặc phân tán. Để sử dụng trong ven, chất mang thích hợp bao gồm muối sinh lý, nước kim khuẩn, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.) hoặc muối đệm photphat (PBS). Trong mọi trường hợp, chế phẩm phải tiệt trùng và nên ở dạng lỏng để dễ sử dụng ở dạng tiêm. Nó phải ổn định ở các điều kiện sản xuất hoặc bảo quản và phải được bảo quản để chống lại sự tạp nhiễm vi sinh vật như vi khuẩn và nấm. Chất mang có thể là dung môi hoặc môi trường phân tán chứa, ví dụ, nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, polyetylen glycol, và polyetylen glycol dạng lỏng, và tương tự), và hỗn hợp phù hợp của nó. Dạng lỏng phù hợp có thể được duy trì, ví dụ bằng cách sử dụng chất phủ như lectin, bằng cách duy trì kích cỡ hạt cần thiết trong trường hợp phân tán và bằng cách sử dụng các chất hoạt động bề mặt. Việc ngăn chặn hoạt động của các vi sinh vật có thể đạt được bằng các hợp chất kháng khuẩn và kháng nấm khác nhau, ví dụ, paraben, clorobutanol, phenol, axit ascorbic, thimerosal, và hợp chất tương tự. Trong nhiều trường hợp, có thể thiết kế để bao gồm các hợp chất đẳng trương, ví dụ,

đường, polyalcohol như manitol, sorbitol, NaCl trong chế phẩm. Sự hấp thụ kéo dài trong các chế phẩm tiêm có thể thực hiện bằng cách cho vào chế phẩm hợp chất có tác dụng trì hoãn hấp thụ, ví dụ nhôm monostearat và gelatin.

Dung dịch vô trùng để tiêm có thể được tạo ra bằng cách kết hợp kháng thể kháng đại với lượng mong muốn vào dung môi phù hợp với một hoặc kết hợp của các thành phần nêu trên, nếu cần, có thể vô trùng bằng cách lọc. Nói chung, dạng phân tán có thể được tạo ra bằng cách kết hợp kháng thể kháng đại vào vật chứa vô trùng chứa môi trường phân tán cơ bản và các thành phần cần thiết khác nêu trên. Trong trường hợp hợp chất bột vô trùng để tạo ra dung dịch tiêm vô trùng, phương pháp tạo ra là khô trong chân không và sấy thăng hoa để thu được bột của hoạt chất cùng với các thành phần bổ sung mong muốn bất kỳ từ dung dịch lọc vô trùng trước đó của nó. Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng tiêm chứa trong vật chứa hoặc chế phẩm ở dạng implant mà có thể được tạo ra ở dạng cho phép duy trì hoặc giải phóng thành phần hoạt tính.

Chế phẩm dạng uống thường chứa chất pha loãng trợ hoặc chất mang có thể ăn được. Chúng có thể được đóng trong nang gelatin hoặc nén trong viên nén. Để sử dụng theo đường uống, kháng thể kháng đại có thể được kết hợp với chất phụ gia và ở dạng viên nén, viên ngậm, hoặc viên nang. Chế phẩm đường uống cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chất mang dạng lỏng để sử dụng như thuốc sát trùng để súc miệng, trong đó hợp chất trong chất mang dạng lỏng được sử dụng theo đường uống, và/hoặc chất phụ gia có thể được chứa trong đó như một phần của chế phẩm. Viên nén, viên thuốc, viên nang, viên ngậm và tương tự có thể chứa thành phần bất kỳ sau, hoặc hợp chất của dạng tự nhiên tương tự: chất liên kết như xenlulozơ vi tinh thể, gồm tragacanth hoặc gelatin, chất phụ gia như tinh bột hoặc lactozơ, hợp chất phân hủy như axit alginic, primogel, tinh bột ngô, chất bôi trơn như magiê stearat hoặc sterot, chất kết dính như keo silicon đioxit, chất tạo ngọt như sucrozơ hoặc saccarin, hoặc chất tạo mùi vị như peppermint, metyl salixilat hoặc chất tạo vị cam.

Để sử dụng theo cách hít, kháng thể kháng đại được phân phối ở dạng sol khí từ vật chứa có áp lực hoặc thể phân tán chứa tác nhân đẩy phù hợp, ví dụ, khí như cacbon đioxit, hoặc khí dung.

Việc sử dụng toàn thân cũng có thể thực hiện bằng cách sử dụng qua niêm mạc hoặc qua da. Để sử dụng qua cơ hoặc qua da, tác nhân đẩy phù hợp để ngăn chặn bị thấm vào được sử dụng trong chế phẩm. Các tác nhân đẩy này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, và bao gồm, ví dụ, để sử dụng qua cơ, chất phản ứng, muối mật, và dẫn xuất của axit fusidic. Việc sử dụng qua niêm mạc có thể được thực hiện thông qua việc sử dụng dạng phun qua mũi hoặc dạng viên đạn. Để sử dụng qua da, kháng thể kháng đại có thể được sản xuất thành dạng thuốc mỡ, sáp, gel, hoặc kem như đã biết trong lĩnh vực này.

Kháng thể kháng đại cũng có thể được sản xuất thành dược phẩm ở dạng viên đạn (ví dụ, với chất nền viên đạn truyền thống như bơ cacao và các glyxerit khác) hoặc dụng cụ thụt duy trì để dùng trong trực tràng.

Theo một phương án, kháng thể kháng đại được sản xuất cùng chất mang có tác dụng bảo vệ kháng thể kháng đại chống lại sự đào thải nhanh khỏi cơ thể, như chế phẩm giải phóng có kiểm soát, bao gồm hệ thống cấy dưới da và vi bao. Các polyme có thể phân giải bởi vi khuẩn, tương hợp sinh học có thể được sử dụng như etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste, và axit polylactic. Các phương pháp sản xuất các chế phẩm này là đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Các vật liệu cũng có thể mua được trên thị trường từ các công ty như Alza Corporation và Nova Pharmaceuticals, Inc. Huyền phù liposom (chứa các lyposom hướng đích tế bào nhiễm với kháng thể đơn dòng tới kháng nguyên của virus) cũng có thể được sử dụng làm chất mang dược dụng. Chúng được sản xuất bằng các phương pháp đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này (patent Mỹ số 4,522,811).

C. Kit

Sáng chế đề xuất kit để chẩn đoán, phòng bệnh, và/hoặc điều trị nhiễm virus đại, chứa ít nhất một kháng thể theo sáng chế, hoặc biến thể chức năng của chúng. Tùy ý, các thành phần này của kit được bao gói trong vật chứa phù hợp và được dán nhãn chỉ dẫn việc chẩn đoán, phòng bệnh, và/hoặc điều trị bệnh. Các thành phần nêu trên có thể được đặt trong đơn vị chứa hoặc vật chứa đa liều, ví dụ ampul được dán kín, ống, chai, xi lanh, và ống thí nghiệm, ở dạng dung dịch dạng lỏng, tiệt trùng hoặc chế phẩm dạng đông khô tiệt trùng để hoàn nguyên. Kit còn có thể chứa vật chứa thứ hai chứa chất

pha loãng phù hợp để pha loãng được phẩm đến thể tích lớn hơn. Chất pha loãng phù hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất phụ gia được dụng và dung dịch muối. Hơn nữa, kit có thể chứa hướng dẫn pha loãng được phẩm và/hoặc hướng dẫn sử dụng được phẩm, có thể pha loãng hoặc không. Vật chứa có thể được hình thành từ nhiều vật liệu như thủy tinh hoặc nhựa và có thể có phần vô trùng (ví dụ, vật chứa có thể là gói dung dịch dùng trong tĩnh mạch hoặc ống có dụng cụ hãm để tiêm được bằng kim tiêm qua da). Kit cũng có thể chứa các vật chứa đựng đệm được dụng, như muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextrose. Nó cũng có thể chứa các vật liệu được thiết kế từ các nguyên liệu có trên thị trường, bao gồm các đệm, chất pha loãng, bộ phận lọc, kim tiêm, xi lanh, môi trường nuôi cấy cho một hoặc nhiều vật chủ thích hợp. Các kit cũng tùy ý có thể chứa hướng dẫn sử dụng bao gồm các bao gói thương mại của các sản phẩm điều trị, phòng bệnh hoặc chẩn đoán, mà chứa các thông tin về, ví dụ, chỉ dẫn, cách sử dụng, liều dùng, nơi sản xuất, chỉ định, chống chỉ định, và/hoặc cách bảo quản liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm điều trị, phòng bệnh hoặc chẩn đoán này.

Kit hữu dụng để phát hiện sự có mặt của glycoprotein virus đại phản ứng miễn dịch hoặc glycoprotein giống virus đại phản ứng miễn dịch trong mẫu sinh học, ví dụ, dịch cơ thể bất kỳ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, huyết thanh, huyết tương, dịch bạch huyết, dịch nang, nước tiểu, phân, dịch não tủy, dịch cổ trướng hoặc máu và bao gồm các mẫu sinh thiết của mô cơ thể. Ví dụ, kit có thể chứa: một hoặc nhiều kháng thể kháng đại có thể gắn kết với glycoprotein virus đại hoặc glycoprotein giống virus đại trong mẫu sinh học (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó có tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên của kháng thể được sản sinh bởi dòng tế bào đã nộp lưu được chọn từ nhóm bao gồm CGMCC có số hiệu lưu giữ 4805 và 4806); các phương thức để xác định số lượng glycoprotein virus đại hoặc giống virus đại trong mẫu; và cách thức so sánh số lượng glycoprotein virus đại phản ứng miễn dịch hoặc glycoprotein virus giống virus đại phản ứng miễn dịch trong mẫu với số liệu chuẩn. Một hoặc nhiều kháng thể kháng đại có thể được đánh dấu. Các thành phần của kit (ví dụ, chất tẩy) có thể được bao gói trong vật chứa phù hợp. Kit cũng có thể chứa hướng dẫn sử dụng để sử dụng kit để phát hiện glycoprotein virus đại phản ứng miễn dịch hoặc glycoprotein virus giống virus đại phản ứng miễn dịch.

Đối với các kit dựa trên kháng thể, kit có thể chứa, ví dụ, 1) kháng thể thứ nhất, ví dụ được gắn với chất hỗ trợ dạng rắn, mà gắn kết với glycoprotein đại tương hợp theo sáng chế; và, tùy ý; 2) kháng thể khác thứ hai gắn kết với hoặc glycoprotein đại hoặc với kháng thể thứ nhất và được liên kết với chất đánh dấu có thể phát hiện được.

Kit cũng có thể chứa, ví dụ, tác nhân đệm, chất bảo quản hoặc tác nhân ổn định protein. Kit cũng có thể chứa các thành phần cần thiết để phát hiện chất đánh dấu có thể phát hiện được, ví dụ, enzym hoặc cơ chất. Kit cũng có thể chứa mẫu đối chứng hoặc một loạt mẫu đối chứng, cái mà được thử nghiệm và so sánh với mẫu thử nghiệm. Mỗi thành phần của kit có thể được đóng trong vật chứa đơn và tất cả các vật chứa khác nhau có thể có trong bao gói đơn, theo hướng dẫn giải thích kết quả của thử nghiệm được thể hiện khi sử dụng kit. Kit theo sáng chế có thể chứa sản phẩm được viết trên hoặc trong vật chứa kit. Sản phẩm viết mô tả cách thức sử dụng các chất có trong kit, ví dụ, để phát hiện glycoprotein virus đại *in vitro* hoặc *in vivo*, hoặc để điều trị hoặc phòng nhiễm virus đại ở cá thể cần điều trị. Theo một phương án, việc sử dụng các chất này có thể theo các phương pháp theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây nhằm mục đích minh họa các phương án chọn lọc theo sáng chế. Các ví dụ này không nhằm làm giới hạn phạm vi của sáng chế, như được bộc lộ trong các yêu cầu bảo hộ.

Các ví dụ dưới đây chứng minh thành phần, đặc tính và cách sử dụng các kháng thể kháng đại theo sáng chế. Ví dụ 1 thể hiện việc tạo ra kháng thể đơn dòng của chuột. Các ví dụ từ 2 đến 7 chứng minh tính đặc hiệu của các kháng thể kháng glycoprotein virus đại, khả năng của kháng thể trong việc trung hòa virus đại, cạnh tranh với các kháng thể để gắn kết với glycoprotein virus đại, mức độ ảnh hưởng của kháng thể đối với tính sinh miễn dịch của vaccine đại. Các ví dụ 8-15 thể hiện sự sản xuất các dạng kháng thể và được làm giống như của người của 2 kháng thể minh họa, và đặc tính gắn kết đặc hiệu của chúng, khả năng trung hòa virus đại, và sử dụng trong bảo vệ sau phơi nhiễm để kháng lại sự nhiễm virus đại.

Ví dụ 1: Thành phần và đặc tính của kháng thể trung hòa virus đại của chuột

Kháng thể trung hòa virus đại của chuột có thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy khối lai mà, nói cách khác, có thể đạt được bằng cách gây miễn dịch cho chuột bằng

glycoprotein đại và sau đó dung hợp với tế bào lách hoặc tế bào u lympho từ chuột hoặc tế bào u tủy của chuột. Quy trình tạo ra kháng thể kháng đại được mô tả chi tiết dưới đây với sự tham khảo từ các bước chi tiết nêu trên. Phương pháp này để tạo ra kháng thể theo sáng chế được dự tính chỉ để minh họa cho phương pháp sản xuất mà không nhằm làm giới hạn nó. Các quy trình đã biết khác cũng có thể được sử dụng.

Sáng chế sử dụng glycoprotein virus đại (GenBank Accession No. ABY1950) làm chất sinh miễn dịch để tạo ra kháng thể có thể trung hòa virus đại. Chất sinh miễn dịch tạo ra được trộn với tá dược, như tá dược hoàn toàn hoặc không hoàn toàn của Freund và được sử dụng cho chuột. Đường sử dụng thích hợp để gây miễn dịch cho động vật thí nghiệm bao gồm tiêm dưới da, trong màng bụng, trong tĩnh mạch, trong da, và trong cơ, tốt hơn là tiêm dưới da và trong màng bụng. Việc gây miễn dịch tùy ý được thực hiện theo liều đơn hoặc các liều nhắc lại với khoảng thời gian thích hợp. Sản phẩm kháng thể của động vật thí nghiệm được xác định bởi mức huyết thanh của kháng thể đặc hiệu kháng nguyên. Khi đạt được chuẩn độ cao của kháng thể, động vật có thể được sử dụng làm nguồn sản xuất tế bào sản sinh kháng thể. Nói chung, các tế bào sản sinh kháng thể có thể được thu thập sau 3-5 ngày sau mũi tiêm gây miễn dịch cuối cùng.

Các tế bào lympho và plasma thu được từ phản thích hợp của động vật là các tế bào tiền thân để sản sinh kháng thể. Nguồn tế bào lympho hoặc plasma bao gồm lách, u lympho, máu ngoại vi hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng, với các tế bào lách là nguồn phổ biến nhất. Sau mũi tiêm nhắc lại cuối cùng, huyền phù tế bào lympho đơn được tạo ra từ mô lympho trong đó chứa các tế bào sản sinh kháng thể. Kỹ thuật dung hợp bao gồm bước rửa lách và các tế bào u tủy bằng môi trường không chứa huyết thanh (như RPMI 1640) hoặc muối đệm photphat (sau đây gọi là PBS) để tỷ lệ số tế bào lách trên tế bào u tủy xấp xỉ 5:1 và 10:1, và sau đó ly tâm. Sau khi dịch nổi được loại bỏ và cặn tế bào được làm rời, 1ml môi trường không chứa huyết thanh chứa 50%(w/v) polyetylen glycol (trọng lượng phân tử từ 1.000 đến 4.000) được bổ sung bằng cách nhỏ giọt hoặc trộn. Sau đó, 10ml môi trường không chứa huyết thanh được bổ sung chậm và sau đó ly tâm. Dịch nổi lại được loại bỏ, và tế bào cặn được hòa lại với thể tích phù hợp của môi trường HAT chứa dung dịch gồm hypoxanthin, aminopterin và thymidin (sau đây gọi là HAT).

Các tế bào từ dòng tế bào chuột được tạo ra trở thành nguồn tế bào u tủy để dung hợp, bao gồm P3X63Ag8U.1 (P3-U1), P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1), SP2/0-Ag14 (SP-2), P3X63Ag8.653 và P3X63Ag8 (X63), có thể lấy từ ATCC. Dòng tế bào chọn lọc được chuyển vào môi trường thích hợp, như môi trường 8-azaguanin. Môi trường 8-azaguanin bao gồm môi trường Dulbecco cải biến của Iscove (sau đây gọi là IMDM), môi trường Eagle cải biến (sau đây gọi là DMEM). Môi trường RPMI- 1640 được bổ sung glutamin, 2-mercaptoetanol, gentamixin, huyết thanh bào thai (sau đây gọi là "FCS"), và 8-azaguanin.

Sau khi dung hợp, các tế bào u tủy không dung hợp bất kỳ và dạng dung hợp u tủy-u tủy bất kỳ không thể sống sót trong môi trường HAT. Ngược lại, dạng dung hợp của các tế bào sản sinh kháng thể với nhau, cũng như khối lai của các tế bào sản sinh kháng thể với tế bào u tủy có thể sống sót. Dạng đầu tiên chỉ có đời sống giới hạn. Theo đó, việc ủ tiếp theo trong môi trường HAT dẫn đến sự chọn lọc chỉ khối lai mong muốn. Các khối lai thu được phát triển thành khuẩn lạc sau đó được chuyển sang môi trường HAT không chứa aminopterin (môi trường HT). Sau đó, ước số của dịch nổi nuôi cấy được loại bỏ để xác định chuẩn độ kháng thể bằng cách, ví dụ, ELISA. Khối lai thể hiện kháng thể đặc hiệu sau đó được chuyển vào đĩa khác để tách dòng.

Khối lai chuột – chuột RV3D11E31A9 và RV7G11A32G11, là cơ sở cho kháng thể theo sáng chế, được nộp lưu ở CGMCC ngày 12 tháng 05 năm 2011 với số hiệu lưu giữ lần lượt là CGMCC 4805 và 4806.

Sau khi thu được khối lai sản sinh kháng thể, việc nuôi cấy khối lai chọn lọc được mở rộng. Dịch nổi từ nuôi cấy quy mô lớn được thu gom và tinh chế bằng phương pháp phù hợp, như sắc ký ái lực và lọc gel. Khối lai cũng có thể phát triển trong màng bụng trong chuột được tiêm, như chuột BALB/c hoặc chuột nu/nu, để thu được sung cổ trướng chứa kháng thể đơn dòng kháng đại với số lượng lớn.

Ví dụ 2: Hoạt tính gắn kết của kháng thể trung hòa virus đại của chuột

Hoạt tính gắn kết của 5 kháng thể trung hòa virus đại của chuột (RVNA) đối với glycoprotein Rv của virus đại được nghiên cứu trong ví dụ này. Các RVNA của chuột và các vật liệu sinh học khác được sử dụng trong các ví dụ 1-6 được thể hiện trong Bảng 3. Các động vật được sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm chuột BALB/c, con

cái, 6-8 tuần, trọng lượng 20-30g, hạng SPF, và chuột đồng Syrian, 2-3 tháng, trọng lượng 100g, hạng SPF.

Bảng 3. Chất phản ứng sinh học

Loại	Tên	Nồng độ (mg/ml)	Nhà sản xuất
Kháng thể kháng đại	3D11E3	2,15	Xem Ví dụ 1
Kháng thể kháng đại	3H10D3	0,88	Xem Ví dụ 1
Kháng thể kháng đại	5A1C10	1,38	Xem Ví dụ 1
Kháng thể kháng đại	6F11C1	2,45	Xem Ví dụ 1
Kháng thể kháng đại	7G11A3	2,62	Xem Ví dụ 1
Kháng thể thứ cấp	IgG2a-HRP kháng chuột của dê	-	Southernbiotech
Kháng thể thứ cấp	IgG2b-HRP kháng chuột của dê	-	Southernbiotech
Kháng thể thứ cấp	Ig(H+L)-HRP kháng chuột của dê	-	Southernbiotech
Globulin đại	Globulin miễn dịch đại của người	100 IU/ml	Shuanglin Pharmaceutical
Vacxin đại	Vacxin đại	-	Rabipur [®] , Chiron Behring

Đường cong gắn kết của 5 RVNA với glycoprotein RV được xác định bằng thử nghiệm enzym quang hóa gián tiếp (CLEIA) được thể hiện trên Fig.1. Glycoprotein được pha loãng 1:500 trong PBS và sau đó được phủ lên vi đĩa. 5 dòng RVNA được pha loãng 10000, 2000, 400, 80, 16, 3,2 và 0,64 ng/mL. IgG2a-HRP kháng chuột của dê và IgG2b-HRP kháng chuột của dê được sử dụng làm kháng thể thứ hai liên kết với enzym. Đơn vị huỳnh quang tương ứng thể hiện tín hiệu huỳnh quang hóa học.

Các kết quả này thể hiện rằng kháng thể kháng đại theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với glycoprotein virus đại, và chúng hữu dụng để dùng trong phương pháp liên quan đến gắn kết đặc hiệu, bao gồm phương pháp phát hiện glycoprotein virus đại trong mẫu, hoặc điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm đại ở đối tượng cần nó và phương pháp tạo ra sự bảo vệ sau phơi nhiễm chống lại sự nhiễm đại ở đối tượng cần nó.

Ví dụ 3: Khả năng trung hòa của RVNA của chuột và sự đặc hiệu epitop

Khả năng trung hòa *in vitro* của 5 RVNA và epitop trung hòa được nhận dạng bằng các RVNA được xác định như được mô tả dưới đây. Để tạo ra virus CVS-11, lớp đơn tế bào u nguyên bào thần kinh được gây nhiễm bởi virus chuẩn 11 (CVS-11) hoặc các virus khác với bội số gây nhiễm (multiplicity of infection - MOI) từ 0,3 đến 15 phút ở 37°C/0,5% CO₂. Chất nhiễm truyền virus sau đó được loại bỏ, môi trường sạch được bổ sung vào tế bào, việc ủ được tiếp tục trong 40 giờ ở 37°C/0,5% CO₂. Dịch nổi nuôi cấy được thu thập và bảo quản ở -80°C để sử dụng sau.

Thử nghiệm ức chế huỳnh quang nhanh chuẩn (RFFITs) để trung hòa được thực hiện như mô tả trong tài liệu Smith *et al.* (A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) để xác định kháng thể trung hòa virus dại (Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H, eds. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization 1996;181-192)). Để xác định khả năng trung hòa của mỗi RVNA, chuẩn độ trung hòa 50% của chúng được so sánh với chuẩn độ trung hòa 50% của chuẩn (GB chuẩn, được xác định là 21,4 IU/mL. Các kết quả của thử nghiệm RFFIT sử dụng virus dại CVS-11 được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4. Khả năng trung hòa <i>in vitro</i> của các RVNA		
Số	Dòng	Khả năng trung hòa (IU/mg)
1	3D11E3	3676
2	3H10D3	3101
3	5A1C10	2110
4	6F11C1	4244
5	7G11A3	701

Để xác định đặc tính của epitop glycoprotein được nhận dạng bởi 3D11E3, 3H10D3, 5A1C10, 6F11C1 và 7G11A3, thử nghiệm thẩm tách Western và CLEIA được thực hiện. Đối với thẩm tách Western, các glycoprotein khử và không khử được phân tách bằng điện di SDS-PAGE, và được dò bằng 5 RVNA (Fig.2). Đối với các RVNA, sử dụng 1 µg/mL kháng thể. Kháng thể thứ hai là Ig(H+L)-HRP kháng chuột của dê, được pha loãng 1:2000. Người ta cũng thấy rằng glycoprotein virus dại được nhận dạng bởi cả 5 RVNA dưới các điều kiện không khử. Tuy nhiên, chỉ 3D11E3, 3H10D3 và 5A1C10 có thể nhận dạng glycoprotein khử. Các kết quả xác nhận rằng epitop được nhận dạng bởi 3D11E3, 3H10D3 hoặc 5A1C10 là epitop dạng thẳng, trong khi epitop được nhận dạng bởi 6F11C1 hoặc 7G11A3 là epitop dạng cầu hình.

Năm RVNA gắn kết với glycoprotein virus dại (RVGP) đã được xử lý bởi các đệm khác nhau. Glycoprotein được pha loãng trong đệm cacbonat (CB), đệm cacbonat

chứa 0,1% sodium dodecyl sulfat (CB + 0,1% w/v SDS) và đệm cacbonat chứa 0,1% Sodium dodecyl sulfat và 0,1% β -Mercaptoetanol (CB + 0,1% w/v SDS + β -ME), và sau đó được phủ lên vi đĩa. Năm RVNA được pha loãng đến nồng độ 10000, 2000, 400, 80, 16, 3,2 và 0,64 ng/mL, và sau đó được phản ứng với RVGP. IgG2a-HRP kháng chuột của dê và IgG2b-HRP kháng chuột của dê đã pha loãng 1:2000 được sử dụng làm cộng hợp enzym của kháng thể thứ hai. Tín hiệu quang hóa (RLU) được thể hiện trong các hình vẽ từ Fig.3A đến Fig.3F. kết quả thể hiện rằng epitop được nhận dạng bởi 6F11C1 hoặc 7G11A3 là nhạy cảm với SDS hơn so với epitop được nhận dạng bởi 3D11E3, 3H10D3 hoặc 5A1C10. Vì vậy, các kết quả từ 2 phương pháp đều cho thấy rằng 3D11E3, 3H10D3 và 5A1C10 nhận dạng các epitop thẳng và 6F11C1 và 7G11A3 nhận dạng các epitop dạng cấu hình.

Các kết quả này thể hiện rằng các kháng thể kháng đại theo sáng chế trung hòa tính gây nhiễm của virus đại, và rằng chúng hữu dụng trong các phương pháp liên quan đến sự trung hòa virus đại, bao gồm các phương pháp điều trị hoặc phòng nhiễm đại ở đối tượng cần nó, và các phương pháp bảo vệ sau phơi nhiễm chống lại virus đại ở đối tượng cần nó.

Ví dụ 4: Mức độ trung hòa kháng virus đại

Bảng 5. Mức độ trung hòa kháng virus đại						
Virut Lyssa	6F11C1	3H10D3	5A1C10	7G11A3	3D11E3	Đối chứng
Chó, BD06, Hebei	★	★	7/8	6/8	4/8	0/8
Chó, GN07, Guangdong	★	★	★	7/8	7/8	0/8
Chó, ZJ-HZ09, Zhejiang	★	★	6/8	7/8	6/8	0/8
Chó, SC-CD09,	★	★	★	★	★	0/8

Sichuan						
Lũng Ferret, ZJ- LA, Zhejiang	★	★	★	★	7/8	0/8
Lũng Ferret, JX08-45, Jiangxi	★	★	7/8	★	★	0/8
Lũng Ferret, JX09-27, Jiangxi	★	7/8	★	★	★	0/8
Người, HN35, Hunan	7/8	★	★	★	★	0/8
Người, YN1, Yunnan	7/8	7/8	★	7/8	7/8	0/8
Hươu, DRV, Jilin	★	★	★	★	7/8	0/8

Dữ liệu phản ánh sự sống sót của đối tượng 20 ngày sau khi tiêm virus đại;

Số liệu cho thấy số lượng đối tượng sống sót trong mỗi nhóm;

Ngôi sao(★) thể hiện sự sống sót của cả 8 đối tượng trong nhóm

Để phân tích mức độ trung hòa, mức độ của 5 RVNA (3D11E3, 3H10D3, 5A1C10, 6F11C1 và 7G11A3) kháng lại dãy đại diện của 10 virus đại (Rv) được xác định bằng thử nghiệm trung hòa chuột (MNT) (Hasse, *et al.*, 13(2) J. Biol. Stand. 123-28 (1985). Các kết quả được thể hiện trong Fig.4I-J và tổng hợp trong Bảng 5. Tất cả các RVNA đều tạo ra sự bảo vệ chống lại phần lớn các RV. Mặc dù chỉ có rất ít đối

tượng trong nhóm thí nghiệm chết, nhưng sự chết xảy ra muộn hơn ít nhất 2 ngày so với nhóm đối chứng (Fig.4). Nói chung, các kết quả cho thấy tất cả 5 RVNA đều có khả năng trung hòa các RV.

Kết quả này thể hiện rằng kháng thể kháng đại theo sáng chế trung hòa tính gây nhiễm của virus đại, và rằng chúng hữu dụng trong các phương pháp liên quan đến sự trung hòa virus đại, bao gồm các phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm đại ở đối tượng cần nó, và phương pháp bảo vệ sau phơi nhiễm chống lại virus đại ở đối tượng cần nó.

Ví dụ 5: Cạnh tranh giữa các kháng thể trung hòa kháng đại

Để điều tra xem liệu các kháng thể 3D11E3, 3H10D3, 5A1C10, 6F11C1 và 7G11A3 cạnh tranh với nhau trong việc gắn kết với glycoprotein virus đại, và bộ các thử nghiệm cạnh tranh được thực hiện bằng cách sử dụng CLEIA (các hình vẽ từ Fig.5A đến Fig.5O). Một cách ngắn gọn, đĩa 96 giếng được phủ bởi glycoprotein virus đại pha loãng 1:500 tổng PBS. 50µL kháng thể kháng đại đã pha loãng và 50µL kháng thể kháng đại mAb-HRP được bổ sung vào mỗi giếng và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Sau khi ủ, đĩa được rửa bằng dung dịch rửa và 50µL dung dịch cơ chất quang hóa được bổ sung. Đĩa được giữ trong phòng tối trong 3 phút và sau đó cường độ quang hóa được đo.

RLU của giếng không chứa mAb kháng đại và chỉ chứa cộng hợp mAb-HRP kháng đại được xác định là B0. RLU của các giếng khác chứa cả mAb kháng đại và cộng hợp mAb-HRP kháng đại được xác định là B. Tỷ lệ gắn kết bằng B chia B0. Kháng thể không đặc hiệu không ngăn chặn sự gắn kết của 5 RVNA được đánh dấu HRP (Fig.5C, F, I, L, O), đóng vai trò làm đối chứng âm. Tỷ lệ gắn kết càng thấp, sự cạnh tranh của RVNA với RVNA được đánh dấu HRP càng cao. Kết quả thể hiện rằng 7G11A3 không ảnh hưởng đến sự gắn kết của 3D11A3-HRP (Fig.5A, B, C), 3H10D3-HRP (Fig.5D, E, F), 5A1C10-HRP (Fig.5G, H, I) hoặc 6F11C1-HRP (Fig.5J, K, L) với glycoprotein. Sự cạnh tranh của 3H10D3 hoặc 3D11E3 là nhỏ so với sự cạnh tranh của 3 RVNA tới sự gắn kết của 7G11A3-HRP với RVGP (Fig.5M, N, O). Nhìn chung, sự cạnh tranh giữa 3D11E3, 3H10D3, và 7G11A3 là tương đối nhỏ so với các thành phần khác. Trên cơ sở này, 3D11E3, 3H10D3, và 7G11A3 được chọn lọc cho các thử nghiệm tiếp sau.

Ví dụ 6: Tính sinh miễn dịch của vaccin ở chuột đồng Syrian không-thử thách được xử lý bằng 3D11E3, 3H10D3, 7G11A3, hoặc các globulin miễn dịch virus dại của người

Trong phòng bệnh sau phơi nhiễm (PEP), tồn tại khả năng việc sử dụng các RVNA và vaccin làm giảm sự ảnh hưởng của vaccin đến các mức ngưỡng của kháng thể trung hòa cần để bảo vệ. Do đó, quan trọng là đánh giá mức độ ảnh hưởng của việc điều trị bằng mAb đến vaccin. Để xác định ảnh hưởng của RVNA đến khả năng của vaccin, các thử nghiệm động vật *in vivo* được thực hiện khi không có RV (Fig.6). Đối với PEP, chuột BALB/c được sử dụng ở mức 50 µg/liều RVNA cùng vaccin hoặc 20IU/kg globulin miễn dịch dại của người (HRIG) cùng vaccin. Chuột đối chứng chỉ được sử dụng vaccin. Có 6 con chuột trong mỗi nhóm thí nghiệm. Vào các ngày 1, 3, 7, 14 và 28, máu được thu thập từ ổ mắt. Các cặp mẫu được gộp chung trong mỗi nhóm, thu thập tổng 3 mẫu huyết thanh đối với mỗi điều kiện. Chuẩn độ RVNA được đo vào các ngày 1, 3, 7, 14 và 28 sau khi điều trị. Kết quả được tổng hợp trên Fig.6.

Vào các ngày 1 và 3, chuẩn độ RVNA huyết thanh cao ở chuột được nhận 50 µg /liều RVNA (các hình vẽ từ Fig.6A đến Fig.6C). Chuẩn độ thấp hơn ở đối tượng được sử dụng 20 IU/kg HRIG cùng với vaccin, nhưng vẫn trong giới hạn của WHO là >0,5IU/ml (Fig.6D). Chuẩn độ không được phát hiện ở đối tượng chỉ được sử dụng vaccin (Fig.6E). Các chuẩn độ RVNA ở chuột được nhận 50 µg /liều 7G11A3 (Fig.6A) hoặc 50 µg /liều 3D11E3 (Fig.6B) duy trì ở mức cao trong thời gian từ ngày 7 đến ngày 28, và không cao hơn mức tương đương ở đối tượng chỉ được sử dụng vaccin (Fig.6E). Tuy nhiên, chuẩn độ RVNA ở chuột được nhận 50 µg /liều 3H10D3 giảm có ý nghĩa từ ngày 7 đến ngày 28 (Fig.6C). Kết quả này thể hiện rằng 7G11A3 và 3D11E3 không ảnh hưởng đến khả năng của vaccin đến việc sản xuất kháng thể trung hòa, và 3H10D3 ảnh hưởng đến tính hiệu quả của vaccin.

Các kết quả này thể hiện rằng kháng thể kháng dại theo sáng chế trung hòa tính gây nhiễm của virus dại mà không làm giảm tính sinh miễn dịch của vaccin dại. Do đó, chúng hữu dụng trong các phương pháp liên quan đến sự trung hòa virus dại trong môi trường liên kết với việc sử dụng vaccin dại, kể cả phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm virus dại ở đối tượng cần nó và các phương pháp tạo ra sự bảo vệ sau phơi nhiễm kháng lại sự nhiễm dại ở đối tượng cần nó.

Ví dụ 7: Thể hiện *in vivo* sự trung hòa hỗn hợp các mAb kháng đại so với HRIG đa dòng

Để đánh giá *in vivo* sự trung hòa của hỗn hợp 3D11E3/7G11A3, nghiên cứu ở chuột Syrian được thực hiện. Chuột đồng (n=10/nhóm) được gây nhiễm bởi Rv của chó (BD06) vào ngày 1. Các động vật được tiêm chủng bằng vacxin đại (Rabipur®, Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Germany), vacxin tế bào lưỡng bội ở người (HDCV; Imovax®, Sanofi Pasteur, Swiftwater, PA, USA) vào ngày 0 và sau đó được xử lý bằng hỗn hợp 3D11E3/7G11A3 chứa lượng tương đương của 3D11E3 và 7G11A3 (0,5 mg/kg) hoặc 20 IU/kg globulin miễn dịch đại của người (*Shuanglin Pharmaceutical*) với sự suy yếu giờ thứ 24 hoặc 72, được sử dụng ở vị trí tiêm chủng virus (ví dụ, cơ sinh đôi cẳng chân phải). Liều vacxin bổ sung được sử dụng đơn lẻ hoặc không được xử lý. Chuột đồng được kiểm tra hàng ngày xem có biểu hiện dấu hiệu lâm sàng của việc nhiễm virus đại hay không. Các dấu hiệu lâm sàng của bệnh đại bao gồm: lơ đãng, sốt, nôn, chán ăn. Các dấu hiệu tiến triển hàng ngày dẫn đến rối loạn chức năng não, rối loạn chức năng thần kinh trung ương, mất khả năng điều hòa, yếu mệt, liệt, co giật, khó thở, khó nuốt, tiết nhiều dãi, cử động bất thường, dễ kích động, và/hoặc tự gây tổn thương cho cơ thể. Các kết quả này được tổng hợp trong Fig.7.

Nhóm đối chứng âm không được điều trị có tỷ lệ sống sót khoảng 10%, thể hiện rằng sự nhiễm virus có hiệu quả. Với sự phân rã 24 ngày, đối tượng được sử dụng vacxin cùng với hỗn hợp 3D11E3/7G11A3 thể hiện tỷ lệ sống sót 90% (9/10), và nhóm được sử dụng vacxin cùng với HRIG thể hiện tỷ lệ sống sót 80% (8/10). Ngược lại, với sự phân rã 72 ngày, các đối tượng được sử dụng vacxin cùng với hỗn hợp 3D11E3/7G11A3 và HRIG tỷ lệ sống sót giảm xuống tương ứng tới 50% (5/10) và 20% (2/10).

Các kết quả này thể hiện rằng sự kết hợp của kháng thể kháng đại theo sáng chế làm trung hòa tính gây nhiễm virus đại, và chúng hữu dụng trong các phương pháp liên quan đến sự trung hòa virus đại, kể cả các phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm đại ở đối tượng cần nó và các phương pháp tạo ra sự bảo vệ sau phơi nhiễm chống lại sự nhiễm đại ở đối tượng cần nó.

Ví dụ 8: Tạo ra các kháng thể 3D11E3-1A9 khảm và được làm giống như của người

Ví dụ này mô tả việc tạo ra các dạng khảm và được làm giống như của người của kháng thể 3D11E3-1A9 được mô tả trong Ví dụ 2-7 nêu trên.

Tách dòng và giải trình tự các gen vùng biến đổi 1A9 của chuột. Các khối tế bào lai của chuột CT.RV 3D11E3 1A9 (gọi là 1A9 trong ví dụ này) được sinh trưởng trong Hybridoma-SFM (Invitrogen, Carlsbad, CA) chứa 12% huyết thanh bào thai bê (FBS; HyClone, Logan, UT) ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ 7,5% CO₂. ARN tổng số được tách chiết khoảng 10⁷ tế bào khối lai bằng cách sử dụng hóa chất TRIzol (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Oligo cDNA được môi dT 5'-RACE được tổng hợp bằng cách sử dụng kit khuếch đại cADN SMARTer RACE (Clontech, Mountain View, CA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. cADN vùng biến đổi của chuỗi nặng 1A9 và chuỗi nhẹ được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR) với Phusion ADN polymeraza (New England Biolabs, Beverly, MA) sử dụng các môi 3' bắt cặp tương đồng với các vùng cố định chuỗi gamma-2a và kappa của chuột, và môi 5'-RACE (Universal Primer A Mix hoặc Nested Universal Primer A) được cung cấp trong kit khuếch đại cADN SMARTer RACE. Để khuếch đại PCR vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H), 2 môi 3' được sử dụng. Chúng có trình tự 5'-GCCAGTGGATAGACCGATGG-3' (SEQ ID NO: 1) và 5'-ACAGTCACTGAGCTGC-3' (SEQ ID NO: 2). Đối với khuếch đại PCR vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L), môi 3' có trình tự 5'-GATGGATACAGTTGGTGCAGC-3' (SEQ ID NO: 3). Các cADN V_H và V_L đã khuếch đại được tách dòng vào vector pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) để xác định trình tự. Việc giải trình tự ADN được thực hiện bằng máy Tcore (Menlo Park, CA). Một số dòng chuỗi nhẹ và nặng đã được giải trình tự và các dạng trình tự tương đồng với các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng được xác định. Không có đặc tính bất thường nào được phát hiện trong trình tự axit amin V_H và V_L.

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 4) của cADN V_H 1A9 của chuột được thể hiện trong Bảng 6 cùng với trình tự axit amin được tạo ra (SEQ ID NO: 5). Trình tự pepit tín hiệu được in nghiêng. Gốc axit amin đầu tận cùng N (E) của V_H trưởng thành được gạch dưới 2 gạch. Các trình tự CDR được đánh số theo Kabat và các đồng tác giả (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991) được gạch dưới.

Bảng 6. Các trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 4) và axit amin (SEQ ID NO: 5) của cADN V_H 1A9 của chuột

ATGGGAGGGATCTGGATCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGGAACTGCAGGTGCCCACTCTGAG
 M G G I W I F L F L L S G T A G A H S E
 ATCCAGCTGCAGCAGACTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCC
 I Q L Q Q T G P E L V K P G A S V K I S
 TGCAAGGCTTCTGGTTATTCATTCACTGACTACATCATGCTCTGGGTGAAGCAGAGCCAT
 C K A S G Y S F T D Y I M L W V K Q S H
 GGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTTATCCTTACTATGGTAGTACTAGCTACAAT
 G K S L E W I G D I Y P Y Y G S T S Y N
 CTGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCTTCCAGCACAGCCTACATG
 L K F K G K A T L T V D K S S S T A Y M
 CAGCTCAACAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGGCAGGGCGGG
 Q L N S L T S E D S A V Y Y C A R Q G G
 GATGGTAACTACGTCCTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
 D G N Y V L F D Y W G Q G T T L T V S S

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 6) của cADN V_L 1A9 của chuột được thể hiện trong Bảng 7 cùng với trình tự axit amin được tạo ra (SEQ ID NO: 7). Trình tự pepit tín hiệu được in nghiêng. Gốc axit amin đầu tận cùng N (D) của V_L trưởng thành được gạch dưới 2 gạch. Các trình tự CDR được đánh số theo Kabat và các đồng tác giả (1991) được gạch dưới.

Bảng 7. Các trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 6) và axit amin (SEQ ID NO: 7) của cADN V_L 1A9 của chuột

ATGGAGTCACAGACTCAGGTCTTTGTATACATGTTGCTGTGGTGTCTGGTGTGATGGA
 M E S Q T Q V F V Y M L L W L S G V D G
 GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGC
 D I V M T Q S Q K F M S T S V G D R V S
 GTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTACTGTTGCCTGGTATCAACAGAAACCA
 V T C K A S Q N V G T T V A W Y Q Q K P
 GGACAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGAT
 G Q S P K A L I Y S A S Y R Y S G V P D
 CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCT
 R F T G S G S G T D F T L T I S N V Q S
 GAAGACTTGGCAGAATATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCATTCACGTTCCGGCTCG
 E D L A E Y F C Q Q Y N S Y P F T F G S
 GGGACAAAGTTGGAAATAAAA
 G T K L E I K

Cấu trúc của kháng thể 1A9 IgG1/□ khảm

Gen mã hóa V_H 1A9 được tạo ở dạng exon chứa tín hiệu ghép thể cho và vị trí enzym giới hạn tương thích bằng cách sử dụng PCR với cADN V_H 1A9 làm khuôn, 5'-GCAACTAGTACCACCATGGGAGGGATCTGGATC-3' (SEQ ID NO: 8) (vị trí SpeI được gạch dưới) làm môi 5', và 5'-GGGAAAGCTTGTTTAAAGGACTCACCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCC-3' (SEQ ID NO: 9) (vị trí HindIII được gạch dưới) làm môi 3'. Trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 10) của gen V_H Ch1A9 được thiết kế được bổ sung vị trí cắt SpeI và HindIII (gạch dưới) được thể hiện trong Bảng 8 cùng với trình tự axit amin được tạo ra (SEQ ID NO: 11). Trình tự peptit tín hiệu được in nghiêng. Gốc axit amin đầu tận cùng N (E) của V_H trưởng thành được gạch dưới 2 gạch. Các trình tự CDR được đánh số theo Kabat và các đồng tác giả (1991) được gạch dưới. Trình tự intron được in nghiêng.

Bảng 8. Các trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 10) và axit amin (SEQ ID NO: 11) của cADN V_H 1A9 khảm

ACTAGTACCACCATGGGAGGGATCTGGATCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGGAAGTGCAGGT
 M G G I W I F L F L L S G T A G
 GCCCACTCTGAGATCCAGCTGCAGCAGACTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCA
 A H S E I Q L Q Q T G P E L V K P G A S
 GTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTATTCATTCAGTACTACATCATGCTCTGGGTG
 V K I S C K A S G Y S F T D Y I M L W V
 AAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTTATCCTTACTATGGTAGT

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

Tương tự, gen mã hóa V_L Ch1A9 được tạo ra ở dạng exon chứa tín hiệu thể nhận
 ghép và vị trí enzyme giới hạn tương thích bởi PCR bằng cách sử dụng cADN V_L
 Ch1A9 làm khuôn, 5'-GCTGCTAGCACCACCATGGAGTCACAGACTCAG-3'
 (SEQ ID NO: 12) (vị trí NheI được gạch dưới) làm môi 5', và 5'-
 GGGGAATTCGCAAAAGTCTACTTACGTTTTATTTCCTCAACTTTGTCCCCGA-3'
 (SEQ ID NO: 13) (vị trí EcoRI được gạch dưới) làm môi 3'.

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 14) của gen V_L Ch1A9 được củng cố bởi các vị
 trí NheI và EcoRI (gạch dưới) được thể hiện trong Bảng 9 cùng với trình tự axit amin
 được tạo ra (SEQ ID NO: 15). Trình tự peptit tín hiệu được in nghiêng. Gốc axit amin
 đầu tận cùng N (D) của V_L trưởng thành được gạch dưới 2 gạch. Các trình tự CDR
 được đánh số theo Kabat và các đồng tác giả (1991) được gạch dưới. Trình tự intron
 được in nghiêng.

Bảng 9. Các trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 14) và axit amin (SEQ ID NO: 15) của cADN V_L 1A9 khảm

GCTAGCACCACCATGGAGTCACAGACTCAGGTCTTTGTATACATGTTGCTG
TGGTTGTCT
M E S Q T Q V F V Y M L L W L S
 GGTGTTGATGGAGACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACA
 TCAGTAGGA
G V D G D I V M T Q S Q K F M S T S V G
 GACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTACTGT
 TGCCTGGTAT
D R V S V T C K A S Q N V G T T V A W Y
 CAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTAC
 CGGTACAGT
Q Q K P G Q S P K A L I Y S A S Y R Y S
 GGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
 ACCATCAGC
G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S
 AATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAATATTTCTGTCAGCAATATAACAGC
 TATCCATTC

N V Q S E D L A E Y F C Q Q Y N S Y P F
 ACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGTAAGTAGACTTTTGCGA
ATTC
T F G S G T K L E I K

Các tín hiệu thể cho ghép của các exon V_H và V_L Ch1A9 có nguồn gốc từ các trình tự JH2 và Jk4 dòng phôi của chuột. Các mảnh được khuếch đại PCR được tinh chế gel bằng cách sử dụng kit NucleoSpin Extraction II (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA) và được tách dòng vào vector pCR4Blunt-TOPO để xác định trình tự. Các mảnh V chính xác được phân giải bằng SpeI và HindIII (đối với V_H) hoặc NheI và EcoRI (đối với V_L), tinh chế gel và tách dòng vào vector biểu hiện của động vật có vú chứa các vùng cố định gamma-1 và kappa của người để sản xuất kháng thể IgG1/κ Ch1A9 khảm. Sơ đồ cấu trúc của vector biểu hiện thu được, pCh1A9, được thể hiện trên Fig.8.

Thiết kế gen V_H và V_L 1A9 được làm giống như của người

Các trình tự CDR cùng với các gốc axit amin vùng khung quan trọng đối với việc duy trì cấu trúc CDR được ghép từ V_H và V_L 1A9 vào các trình tự khung của người được chọn lọc tương ứng. Các thể tương đồng trình tự V_H đối với vùng khung V_H 1A9 được nghiên cứu trong dữ liệu của Ngân hàng gen, và trình tự V_H được mã hóa bởi cADN của người DA980102 (V_H DA980102) (GenBank accession number; Kimura *et al.*, Genome Res. 16:55-65, 2006) được chọn làm chất nhận đối với quá trình làm tương thích với người. Các trình tự CDR của V_H 1A9 được chuyển lần đầu vào vị trí tương ứng của V_H DA980102.

Dựa vào tra cứu tương đồng với trình tự vùng khung V_L1A9, vùng V□□ của người được mã hóa bởi cADN CB958542 (CB958542 V_L) (GenBank accession number; NIH-MGC EST Sequencing Project, 1999) được chọn làm chất nhận đối với quá trình làm tương thích với người. Các trình tự CDR của V_L1A9 đầu tiên được chuyển vào vị trí tương ứng của V_L CB958542. Tiếp theo, tại vị trí vùng khung 46, gốc axit amin từ V_L1A9 của chuột được thế bởi gốc tương ứng của người. Trong khi Ala ở vị trí 46 trong V_L 1A9 của chuột được định vị ở vị trí vùng khung quan trọng đối với sự hình thành cấu trúc CDR, được phân tích chi tiết trong vùng biến đổi 1A9 mà gốc axit amin ở vị trí 46 trong V_L1 Hu1A9 có thể được thay thế bởi gốc tương ứng của người, Val, trong V_L CB958542 mà không làm mất ái lực gắn kết kháng nguyên. Để giảm thiểu tính sinh miễn dịch tiềm năng của kháng thể 1A9 được làm giống như của

người, V_L thứ hai (Hu1A9 V_{L2}) được thiết kế, trong đó Ala ở vị trí thứ 46 trong Hu1A9 V_{L1} được thay thế bằng Val.

Cấu trúc của các gen V_H 1A9 và V_L được làm giống như của người

Gen mã hóa V_H Hu1A9 được thiết kế ở dạng exon chứa peptit tín hiệu, tín hiệu chất cho ghép, và các vị trí enzym giới hạn thích hợp cho việc tách dòng vào vector biểu hiện của động vật có vú. Tín hiệu chất cho ghép của exon V_H Hu1A9 có nguồn gốc từ trình tự dòng phôi JH1 của người. Do peptit tín hiệu mã hóa bởi gen 1A9 V_H của chuột được dự đoán là ở dưới điều kiện tốt nhất cho sự phân cắt chính xác bởi phần mềm dự đoán peptit tín hiệu SIG-Pred, trình tự peptit tín hiệu của gen V_H DA980102 của người được sử dụng trong Hu1A9 V_H.

Mỗi gen mã hóa Hu1A9 V_{L1} và V_{L2} được thiết kế làm exon chứa một peptit tín hiệu, một tín hiệu chất cho ghép, và các vị trí enzym giới hạn thích hợp để tách dòng phụ vào vector biểu hiện của động vật có vú. Tín hiệu chất cho ghép của các exon có nguồn gốc từ trình tự dòng phôi J $\square$ 2 của người. Trình tự peptit tín hiệu trong mỗi exon Hu1A9 V_{L1} và V_{L2} được làm giống như của người có nguồn gốc từ trình tự 1A9 V_L bổ sung của chuột.

Các gen Hu1A9 V_H ADN V_L được tạo ra bởi GenScript USA (Piscataway, NJ). Sau khi phân giải bằng SpeI và HindIII (đối với V_H) hoặc NheI và EcoRI (đối với V_L), các gen Hu1A9 V_H và V_L được tách dòng phụ vào các vị trí tương ứng trong vector biểu hiện của động vật có vú để sản xuất dạng IgG1/ κ của người. Vector biểu hiện thu được, pHu1A9-1, biểu hiện kháng thể được làm giống như của người chứa các vùng Hu1A9 V_H và V_{L1} (Hu1A9-1). Tương tự, pHu1A9-2 biểu hiện kháng thể được làm giống như của người chứa Hu1A9 V_H và V_{L2} (Hu1A9-2).

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 16) của gen Hu1A9 V_H chứa vị trí cắt của SpeI và HindIII (gạch dưới) được thể hiện trong Bảng 10 cùng với trình tự axit amin tương ứng (SEQ ID NO: 17). Trình tự peptit tín hiệu được in nghiêng. Gốc axit amin đầu tận cùng N (Q) của V_H trưởng thành được gạch dưới 2 gạch. Các trình tự CDR theo định nghĩa của Kabat và các đồng tác giả (1991) được gạch dưới. Trình tự intron được in nghiêng.

Bảng 10. Các trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 16) và axit amin (SEQ ID NO: 17) của gen Hu1A9 V_H được làm giống như của người

ACTAGTACCACCATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTTTTGGTGGCAGCAGCCACAGGT

M D W T W R I L F L V A A A T G
 GCCCACTCCCAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCCTCA
A H S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S
 GTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATACTCATTCACTGACTATATCATGCTTTGGGTG
V K V S C K A S G Y S F T D Y I M L W V
 CGCCAGGCCCCTGGACAAAGGCTTGAGTGGATTGGAGATATCTATCCTTACTATGGCAGT
R Q A P G Q R L E W I G D I Y P Y Y G S
 ACAAGCTATAATCTGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTCACCGTCGACACATCCGCGAGC
T S Y N L K F K G K A T L T V D T S A S
 ACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAAGACACCGCTGTGTATTACTGTGCC
T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A
 AGGCAGGGCGGCGATGGAACTACGTCCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC
R Q G G D G N Y V L F D Y W G Q G T L V
 ACCGTCTCCTCAGGTGAGTCTGCTGTACTAAGCTT
T V S S

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 18) của gen Hu1A9 VL1 được bổ sung các vị trí NheI và EcoRI (gạch dưới) được thể hiện trong Bảng 11 cùng trình tự axit amin tương ứng (SEQ ID NO: 19). Trình tự peptit tín hiệu được in nghiêng. Gốc axit amin đầu tận cùng N (D) của VL trưởng thành được gạch dưới 2 gạch. Các trình tự CDR theo định nghĩa của Kabat và các đồng tác giả (1991) được gạch dưới. Trình tự intron được in nghiêng.

Bảng 11. Các trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 18) và axit amin (SEQ ID NO: 19) của gen Hu1A9 VL1 được làm giống như của người

*GCTAGCACCA*CCATGGAGTCACAGACTCAGGTCTTTGTGTACATGTTGCTGTGGTTGTCT
M E S Q T Q V F V Y M L L W L S
 GGTGTTGATGGAGACATTCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCCGCATCAGTCGGA
G V D G D I Q M T Q S P S S L S A S V G
 GACAGGGTCACCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTACTGTTGCCTGGTAT
D R V T I T C K A S Q N V G T T V A W Y
 CAACAGAAACCAGGAAAAGCCCCTAAAGTCCTGATTTACTCCGCATCCTATCGGTACAGT
Q Q K P G K A P K V L I Y S A S Y R Y S
 GGAGTCCCTTCACGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S
 AGTCTGCAGCCTGAAGACTTTGCAACTTATTACTGTCAGCAATATAACAGCTATCCATTC
S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S Y P F
 ACGTTCGGCCAGGGGACAAAGTTGGAAATCAAACGTAAGTACTTTTTCCGAATTC
I F G Q G T K L E I K

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 20) của gen Hu1A9 VL2 được bổ sung các vị trí NheI và EcoRI (gạch dưới) được thể hiện trong Bảng 12 cùng trình tự axit amin tương

ứng (SEQ ID NO: 21). Trình tự peptit tín hiệu được in nghiêng. Gốc axit amin đầu tận cùng N (D) của V_L trưởng thành được gạch dưới 2 gạch. Các trình tự CDR theo định nghĩa của Kabat và các đồng tác giả (1991) được gạch dưới. Trình tự intron được in nghiêng.

Bảng 12. Các trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 20) và axit amin (SEQ ID NO: 21) của gen 1A9 V_L2 được làm giống như của người

GCTAGCACCACCATGGAGTCACAGACTCAGGTCTTTGTGTACATGTTGCTGTGGTTGTCT
M E S Q T Q V F V Y M L L W L S
 GGTGTTGATGGAGACATTTCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCCGCATCAGTCGGA
G V D G D I Q M T Q S P S S L S A S V G
 GACAGGGTCACCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTACTGTTGCCTGGTAT
D R V T I T C K A S Q N V G T T V A W Y
 CAACAGAAACCAGGAAAAGCCCCTAAAGTCCTGATTTACTCCGCATCCTATCGGTACAGT
Q Q K P G K A P K V L I Y S A S Y R Y S
 GGAGTCCCTTCACGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S
 AGTCTGCAGCCTGAAGACTTTGCAACTTATTACTGTCAGCAATATAACAGCTATCCATTC
S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S Y P F
ACGTTTCGGCCAGGGGACAAAGTTGGAAATCAAACGTAAGTACTTTTTTCCGAATTC
T F G Q G T K L E I K

Tạo ra thể chuyển nhiễm ổn định NS0 sản sinh kháng thể 1A9 IgG1/□ khảm và được làm giống như của người.

Để tạo ra các dòng tế bào lai sản sinh ổn định các kháng thể Ch1A9, Hu1A9-1 và Hu1A9-2. Các vectơ biểu hiện pCh1A9, pHu1A9-1 và pHu1A9-2 được đưa vào các nhiễm sắc thể của dòng tế bào u tủy NS0 của chuột (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, UK). Các tế bào NS0 được nuôi trong môi trường DME chứa 10% FBS ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ 7,5% CO₂. Việc chuyển nhiễm ổn định vào NS0 được thực hiện bằng đục lỗ điện như được mô tả bởi Bebbington và các đồng tác giả (Bio/Technology 10: 169-175, 1992). Trước khi chuyển nhiễm, mỗi vectơ biểu hiện được được duỗi thẳng bằng cách sử dụng FspI. Khoảng 10⁷ tế bào được chuyển nhiễm với 20µg plasmit thẳng, được tạo huyền phù trong môi trường DME chứa 10% FBS, và được đặt vào các đĩa 96 giếng. Sau 48 giờ, môi trường chọn lọc (DME chứa 10% FBS, môi trường HT bổ sung (Sigma, St. Louis, MO), 0,25 mg/ml xanthin và 1 µg/ml axit mycophenolic) được sử dụng. Khoảng 10 ngày sau khi bắt đầu chọn lọc, dịch nổi nuôi cấy được thử nghiệm để sản xuất kháng thể.

Sự biểu hiện của các kháng thể Ch1A9, Hu1A9-1 và Hu1A9-2 được đo bằng thử nghiệm ELISA. Trong một thử nghiệm điển hình, một đĩa ELISA được phủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C bởi 100 µl/giếng kháng thể đa dòng đặc hiệu - chuỗi – Fcγ IgG kháng người của dê (Sigma) được pha loãng 1/2.000 lần trong PBS, được rửa bằng đệm rửa (PBS chứa 0,05% Tween 20), và được ngừng phản ứng trong 0,5 giờ ở nhiệt độ phòng bằng 300 µl/giếng đệm ngừng phản ứng (PBS chứa 2% Skim Milk và 0,05% Tween 20). Sau khi rửa bằng đệm rửa, 100 µl/giếng của mẫu được pha loãng trong đệm ELISA (PBS chứa 1% Skim Milk và 0,025% Tween 20) được sử dụng cho đĩa ELISA. Một kháng thể IgG1/κ được làm giống như của người được sử dụng làm chuẩn. Sau khi ủ đĩa ELISA trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng và rửa bằng đệm rửa, các kháng thể liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng 100 µl/giếng kháng thể đa dòng của dê kháng chuỗi kappa của người cộng hợp-HRP (SouthernBiotech) được pha loãng 1/2.000 lần. Sau khi ủ trong 0,5 giờ ở nhiệt độ phòng và rửa bằng đệm rửa, sự hiện màu được thực hiện bằng cách bổ sung 100 µl/giếng cơ chất ABTS (bioWORLD, Dublin, OH). Sự hiện màu được ngừng bằng cách bổ sung 100 µl/giếng axit oxalic 2%. Mức độ hấp thụ được đo ở bước sóng 405nm. Thể chuyển nhiễm ổn định NS0 sản sinh ở mức cao các kháng thể Ch1A9, Hu1A9-1 và Hu1A9-2 (NS0-Ch1A9 1C11, NS0-Hu1A9-1 3F9, và NS0-Hu1A9-2 3C9) phù hợp để phát triển trong môi trường không chứa huyết thanh sử dụng khối lai-SFM.

Tính chuẩn xác của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được sản sinh trong NS0-Ch1A9 1C11, NS0-Hu1A9-1 3F9, và NS0-Hu1A9-2 3C9 được xác nhận bằng cách giải trình tự AND. Trình tự nucleotit thu được của vùng mã hóa cho mỗi chuỗi nặng Ch1A9, chuỗi nhẹ Ch1A9, chuỗi nặng Hu1A9-1, chuỗi nhẹ Hu1A9-1, chuỗi nặng Hu1A9-2, và chuỗi nhẹ Hu1A9-2 bắt cặp hoàn toàn với trình tự bổ sung trong vector pCh1A9, pHu1A9-1 hoặc pHu1A9-2 (Bảng 13).

Bảng 13. Trình tự của các vùng mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ pCh1A9		
Mô tả	Trình tự nucleotit	Trình tự axit amin
Vùng mã hóa của chuỗi nặng gamma-1 trong pCh1A9	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23
Vùng mã hóa của chuỗi nhẹ kapa trong pCh1A9	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25
Vùng mã hóa của chuỗi nặng gamma-1 trong pHu1A9-1 và pHu1A9-2	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27

Vùng mã hóa của chuỗi nhẹ kappa trong pHu1A9-1	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29
Vùng mã hóa của chuỗi nhẹ kappa trong pHu1A9-2	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31

Ví dụ 9: Đặc trưng của các kháng thể Ch1A9, Hu1A9-1 và Hu1A9-2

Các tế bào NS0-Ch1A9 1C11, NS0-Hu1A9-1 3F9, và NS0-Hu1A9-2 3C9 được nuôi cấy trong khối lai-SFM trong chai lăn đến mật độ khoảng 10^6 /ml, được nuôi dưỡng bằng 1/10 lần thể tích của 60 mg/ml Ultrafiltered Soy Hydrolysate (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) hòa trong môi trường SFM4MAb (HyClone), được nuôi dưỡng tiếp cho đến khi khả năng sống sót của tế bào đạt dưới 50%. Sau khi ly tâm và lọc, dịch nuôi cấy được tải vào cột protein-A Sepharose (HiTrap MABSelect SuRe, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Cột được rửa bằng PBS trước khi kháng thể rửa giải bằng 0,1 M glyxin-HCl (pH 3,0). Sau khi trung hòa bằng 1 M Tris-HCl (pH 8), đệm của kháng thể được rửa giải được chuyển thành PBS bằng cách thẩm tách. Nồng độ kháng thể được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 280 nm ($1 \text{ mg/ml} = 1,4 \text{ OD}$). Năng suất thu được là 8,2mg đối với Ch1A9 (từ 1.000ml dịch nuôi cấy), 7,7mg đối với Hu1A9-1 (từ 500 ml) và 10,8 mg đối với Hu1A9-2 (từ 500 ml).

Ch1A9, Hu1A9-1 và Hu1A9-2 đã tinh chế được xác định đặc tính bằng kỹ thuật SDS-PAGE theo quy trình chuẩn. Phân tích dưới điều kiện khử thể hiện rằng mỗi một trong số 3 kháng thể được so sánh của một chuỗi nặng với trọng lượng phân tử của khoảng 50kDa và một chuỗi nhẹ với trọng lượng phân tử của khoảng 25 kDa (Fig.90). Độ tinh sạch của mỗi kháng thể được thể hiện là trên 95%.

Sự gắn kết kháng nguyên của các kháng thể Ch1A9, Hu1A9-1 và Hu1A9-2 được thử nghiệm bằng kỹ thuật ELISA. Trong một thí nghiệm điển hình, đĩa ELISA được phủ bằng 100 μ l/giếng của vacxin virus dại bất hoạt (Rabipur[®], Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Germany) đã được pha loãng 1/500 lần trong đệm 0,2M natri carbonat (pH 9,4) qua đêm ở nhiệt độ 4°C, được rửa bằng đệm rửa, và ngừng phản ứng trong 0,5 giờ ở nhiệt độ phòng bằng 300 μ l/giếng của đệm ngừng phản ứng. Sau khi rửa bằng đệm rửa, 100 μ l/giếng của mẫu đã được pha loãng trong đệm ELISA được cho vào đĩa ELISA. Sau khi ủ đĩa ELISA trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng và rửa bằng đệm rửa, các kháng thể liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng 100 μ l/giếng IgG kháng người của dê cộng hợp-HRP đã được pha loãng 1/2000 lần, kháng thể đa dòng

đặc hiệu-chuỗi Fc γ (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Sau khi ủ trong 0,5 giờ ở nhiệt độ phòng và rửa bằng đệm rửa, sự hiện màu được thể hiện bằng cách bổ sung 100 μ l/giếng cơ chất ABST. Sự hiện màu được ngừng bằng cách bổ sung 100 μ l/giếng axit oxalic 2%. Sự hấp thụ được đọc ở bước sóng 405nm. Giá trị EC₅₀ được tính toán bằng cách sử dụng GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) là 0,052 μ g/ml đối với Ch1A9, 0,025 μ g/ml đối với Hu1A9-1, và 0,016 μ g/ml đối với Hu1A9-2 (Fig.10). Kết quả này thể hiện rằng cả Hu1A9-1 và Hu1A9-2 đều giữ lại ái lực gắn kết kháng nguyên của kháng thể 1A9 khảm.

Các kết quả này thể hiện rằng kháng thể kháng đại theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với glycoprotein virus đại, và rằng chúng hữu dụng trong các phương pháp liên quan đến các gắn kết đặc hiệu này, kể cả các phương pháp phát hiện glycoprotein virus đại trong mẫu, hoặc điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm đại ở đối tượng cần nó và các phương pháp bảo vệ sau phơi nhiễm chống lại sự nhiễm đại ở đối tượng cần bảo vệ.

Ví dụ 10: Tạo ra kháng thể 2G11 được làm giống như của người

Ví dụ này mô tả việc tạo ra các dạng khảm và được làm giống như của người của kháng thể 7G11A3 2G11 được mô tả trong các ví dụ 1-6 nêu trên.

Tách dòng và giải trình tự các gen vùng biến đổi 2G11 của chuột

Các tế bào khối lai CT.RV 7G11A3 2G11 của chuột (còn được gọi là 2G11 trong ví dụ này) được nuôi cấy trong khối lai-SFM (Invitrogen, Carlsbad, CA) chứa 12% huyết thanh bào thai bò (FBS; HyClone, Logan, UT) ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ 7,5% CO₂ ARN tổng số được tách chiết từ khoảng 10⁷ tế bào lai bằng cách sử dụng hóa chất TRIzol (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Oligo cADN được môi dT đối với 5'-RACE được tổng hợp bằng cách sử dụng kit khuếch đại SMARTer RACE cDNA (Clontech, Mountain View, CA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các cADN vùng biến đổi đối với các chuỗi nặng và nhẹ 2G11 được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi trùng hợp polymeraza (PCR) với Phusion DNA polymeraza (New England Biolabs, Beverly, MA) bằng cách sử dụng các môi 3' ủ với các vùng cố định chuỗi kappa và gama-2a của chuột, và môi 5'-RACE (Universal Primer A Mix or Nested Universal Primer A) được cung cấp trong kit khuếch đại SMARTer RACE cDNA. Đối với khuếch đại PCR vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H), môi 3' có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1. Đối với khuếch đại PCR vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L), môi 3' có trình tự

nêu trong SEQ ID NO: 3. Các cADN V_H và V_L đã khuếch đại được tách dòng vào vector pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) để xác định trình tự. Việc xác định trình tự ADN được thực hiện ở Tocore (Menlo Park, CA). Một số dòng chuỗi nặng và nhẹ được giải trình tự và các trình tự tương đồng duy nhất với các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của chuột điển hình được xác định.

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 32) của cADN 2G11 V_H của chuột được thể hiện trong Bảng 14 cùng với trình tự axit amin tương ứng (SEQ ID NO: 33). Trình tự peptit tín hiệu được in nghiêng. Gốc axit amin đầu tận cùng N (E) của V_H trưởng thành được gạch dưới 2 gạch. Các trình tự CDR theo Kabat và các đồng tác giả (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991) được gạch dưới.

Bảng 14. Các trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 32) và axit amin (SEQ ID NO: 33) của cADN V _H 2G11 của chuột
ATGAACTTTGTGCTCAGCCTGATTTTCCTTGCCCTCATTTTAAGAGGTGTCC CGTGTGAA <i>M N F V L S L I F L A L I L R G V P C E</i> GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCT GATACTCTCC V Q L V E S G G G L V K P G G S L I L S TGTGCAGCCTCAGGATTCACCTTTCAGTGGCTTTGCCATGTCTTGGGTTCGCC AGACTCCG C A A S G F T F S <u>G F A M S</u> W V R Q T P GAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTAGTGGTGGTACTTATAC CTACTCTCCA E K R L E W V A <u>T I S S G G T Y T Y S P</u> GACAGTGTGATGGGTCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAC CCTGTACCTG <u>D S V M G R F T I S R D N A K N T L Y L</u> CAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAG ACGATTACGT Q M S S L R S E D T A M Y Y C A R <u>R L R</u> CGGAATTACTACTCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTC TCCTCA <u>R N Y Y S M D Y</u> W G Q G T S V T V S S

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 34) của cADN V_L 2G11 của chuột được thể hiện trong Bảng 15 cùng với trình tự axit amin tương ứng (SEQ ID NO: 35). Các gốc axit amin được thể hiện bằng các chữ cái đơn. Trình tự peptit tín hiệu được in nghiêng.

Gốc axit amin đầu tận cùng N (D) của V_L trưởng thành được gạch dưới 2 gạch. Các trình tự CDR theo Kabat và các đồng tác giả (1991) được gạch dưới.

Bảng 15. Các trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 34) và axit amin (SEQ ID NO: 35) của cADN V_L 2G11 của chuột

ATGAAGCTGCCTGTTCTGCTAGTGGTGCTGCTATTGTTACGAGTCCAGCCTCAAGCAGT
M K L P V L L V V L L L F T S P A S S S
 GATGTTGTTCTGACCCAAGCTCCACTCTCTCTGCCTGTCAATATTGGAGATCAAGCCTCT
D V V L T Q A P L S L P V N I G D Q A S
 ATCTCTTGCAAGTCTACTAAGAGTCTTCTGAATAGTGATGGATTCACTTATTTGGACTGG
I S C K S T K S L L N S D G F T Y L D W
 TACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTAATATATTTGGTTTCTAATCGATTT
Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L V S N R F
 TCTGGAGTTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGAACAGATTTCACTCAAGATC
S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
 AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAATTTATTTTGGCTTCCAGAGTAACTATCTTCCA
S R V E A E D L G I Y F C F Q S N Y L P
 TTCACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA
F T F G S G T K L E I K

Cấu trúc của kháng thể 2G11 IgG1/κ khảm

Gen mã hóa V_H2G11 được tạo ra ở dạng exon chứa tín hiệu thể cho ghép và các vị trí enzym giới hạn bằng PCR bằng cách sử dụng cADN V_H2G11 làm khuôn, 5'-GCAACTAGTACCACCATGAACTTTGTGCTCAGC-3' (SEQ ID NO: 37) làm mỗi 5', và 5'-GGGAAGCTTGAGAGGCCATTCTTACCTGAGGAGACGGTGACTGAGGT-3' (SEQ ID NO: 37) làm mỗi 3'. Trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 38) của gen V_H2G11 được bổ sung các vị trí cắt của SpeI và HindIII (gạch dưới) được thể hiện trong Bảng 16 cùng với trình tự axit amin tương ứng (SEQ ID NO: 39). Trình tự peptit tín hiệu được in nghiêng. Gốc axit amin đầu tận cùng N của V_H trưởng thành được gạch dưới 2 gạch. Các trình tự CDR theo Kabat và các đồng tác giả (1991) được gạch dưới. Trình tự intron được in nghiêng.

Bảng 16. Các trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 38) và axit amin (SEQ ID NO: 39) của gen V_H2G11 khảm

ACTAGTACCACCATGAACTTTGTGCTCAGCCTGATTTTCCTTGCCCTCATTTTAAGAGGT
M N F V L S L I F L A L I L R G
 GTCCCGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCC
V P C E V Q L V E S G G G L V K P G G S
 CTGATACTCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTCATTTTCAGTGGCTTTGCCATGTCTTGGGTT
L I L S C A A S G F T F S G F A M S W V
 CGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGCAACCATTAGTAGTGGTGGTACTTAT

R Q T P E K R L E W V A T I S S G G T Y
 ACCTACTCTCCAGACAGTGTGATGGGTCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC
T Y S P D S V M G R F T I S R D N A K N
 ACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCA
 T L Y L Q M S S L R S E D T A M Y Y C A
 AGACGATTACGTCGGAATTACTACTCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACC
R R L R R N Y Y S M D Y W G Q G T S V T
 GTCTCCTCAGGTGAGTCCTTAAAAGCTT
 V S S

Tương tự, gen mã hóa V_L 2G11 được tạo ra ở dạng exon chứa tín hiệu chất cho
 ghép và các vị trí enzym giới hạn bằng PCR. Trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 40) của
 gen V_L 2G11 được thiết kế được bổ sung các vị trí *NheI* và *EcoRI* (gạch dưới) được
 thể hiện trong Bảng 18 cùng với trình tự axit amin tương ứng (SEQ ID NO: 41). Trình
 tự peptit tín hiệu được in nghiêng. Gốc axit amin đầu tận cùng N (D) của V_L trưởng
 thành được gạch dưới 2 gạch. Các trình tự CDR theo Kabat và các đồng tác giả (1991)
 được gạch dưới. Trình tự intron được in nghiêng.

Bảng 17. Các trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 40) và axit amin (SEQ ID NO: 41) của gen V_L 2G11
khảm

GCTAGCACCACCATGAAGCTGCCTGTTCTGCTAGTGGTGCTGCTATTGTTACGAGTCCA
M K L P V L L V V L L L F T S P
 GCCTCAAGCAGTGATGTTGTTCTGACCCAAGCTCCACTCTCTCTGCCTGTCAATATTGGA
A S S S D V V L T Q A P L S L P V N I G
 GATCAAGCCTCTATCTCTTGCAAGTCTACTAAGAGTCTTCTGAATAGTGATGGATTCACT
D Q A S I S C K S T K S L L N S D G F T
 TATTTGGACTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTAATATATTTGGTT
Y L D W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L V
 TCTAATCGATTTTCTGGAGTTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGAACAGATTTC
S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F
 AACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAATTTATTTTGGCTTCCAGAGT
T L K I S R V E A E D L G I Y F C F Q S
 AACTATCTTCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGTAAGTAGACT
N Y L P F T F G S G T K L E I K
TTTGCGAATTC

Các tín hiệu chất cho ghép của các exon V_H và V_L 2G11 có nguồn gốc từ các
 trình tự JH2 và Jκ4 dòng phôi của chuột. Các mảnh được khuếch đại PCR được tinh
 chế bằng gel bằng cách sử dụng kit tách chiết NucleoSpin II (Macherey-Nagel,
 Bethlehem, PA) và được tách dòng vào vector pCR4Blunt-TOPO để xác định trình tự.
 Các mảnh V chính xác được phân giải bằng *SpeI* và *HindIII* (đối với V_H) hoặc *NheI* và
EcoRI (đối với V_L), tinh chế bằng gel và tách dòng vào vector biểu hiện của động vật

có vú chứa các vùng cố định gamma-1 và kappa của người để sản xuất kháng thể khảm 2G11 (Ch2G11) IgG1/ κ . Sơ đồ cấu trúc của vector biểu hiện thu được, pCh2G11, được thể hiện trên Fig.13.

Thiết kế các gen V_H và V_L 2G11 được làm giống như của người

Các trình tự CDR cùng với các gốc axit amin vùng khung để duy trì cấu trúc CDR được ghép từ V_H và V_L 2G11 vào các trình tự vùng khung của người được chọn lọc tương ứng. Các trình tự V_H của người tương đồng với vùng khung V_H 2G11 được tìm trong dữ liệu Ngân hàng gen, và trình tự V_H mã hóa bởi cADN U96282 của người (U96282 V_H) (GenBank accession number; Rassenti and Kipps, J. Exp. Med. 185:1435-1445, 1997) được chọn làm chất nhận đối với quá trình làm tương thích với người. Các trình tự CDR của V_H 2G11 được chuyển vào các vị trí tương ứng của V_H U96282. Không có sự thể của các gốc axit amin vùng khung của người được dự đoán là cần thiết để duy trì cấu trúc CDR.

Trong khi mẫu 3 chiều của các vùng thay đổi 2G11 của chuột thể hiện rằng các gốc axit amin ở vị trí 19 của V_H được xác định vị trí từ CDR và không nên làm ảnh hưởng tới sự hình thành của cấu trúc CDR, sự có mặt của gốc isoloxin ở vị trí này, chứ không phải là gốc lysin và arginin điển hình, là không bình thường và không nên ảnh hưởng đến bản chất chức năng và/hoặc sinh hóa của kháng thể. V_H thứ hai được làm giống như của người vì vậy được thiết kế trong đó gốc arginin trong V_H 1 Hu2G11 ở vị trí 19 được thay thế bởi gốc isoloxin.

Dựa vào sự tìm kiếm tương đồng với các trình tự vùng khung V_L 2G11, vùng V_L của người được mã hóa bởi cADN X72466 (X72466 V_L) (Số hiệu lưu giữ trong Ngân hàng gen; Klein *et al.*, Eur. J. Immunol. 23:3248-3262, 1993) được chọn làm chất nhận cho quá trình làm giống như của người. Các trình tự CDR của V_L 2G11 đầu tiên được chuyển vào các vị trí tương ứng của V_L X72466. Không có sự thể của các gốc axit amin vùng khung của người được dự đoán là cần thiết để duy trì cấu trúc CDR.

Cấu trúc của các gen V_H và V_L 2G11 được làm giống như của người

Mỗi gen mã hóa V_{H1} và V_{H2} Hu2G11 được thiết kế làm exon chứa một peptit tín hiệu, một tín hiệu chất cho ghép, và các vị trí SpeI và HindIII bổ sung để tách dòng vào vector biểu hiện của động vật có vú. Tín hiệu chất cho ghép được sử dụng trong các exon V_{H1} và V_{H2} Hu2G11 có nguồn gốc từ trình tự JH3 dòng phôi của người. Do

peptit tín hiệu được mã hóa bởi các gen V_H 2G11 được dự đoán là dưới điều kiện tốt nhất để bị phân cắt nghiêm ngặt bởi phần mềm dự đoán tín hiệu SIG-Pred, để mà các trình tự peptit tín hiệu của gen V_H U96282 được sử dụng trong V_{H1} và V_{H2} Hu2G11.

Gen mã hóa V_L Hu2G11 được thiết kế làm exon chứa một peptit tín hiệu, một tín hiệu chất cho ghép, và các vị trí $NheI$ và $EcoRI$ bổ sung để tách dòng vào một vector biểu hiện của động vật có vú. Tín hiệu chất cho ghép có nguồn gốc từ trình tự dòng phôi J $\square$ 4 của người. Peptit tín hiệu được mã hóa bởi gen V_L 2G11 của chuột được dự đoán là ở dưới điều kiện tốt nhất để bị phân cắt nghiêm ngặt bởi phần mềm dự đoán tín hiệu SIG-Pred, để mà các trình tự peptit tín hiệu của gen V_L X72466 được sử dụng trong V_L Hu2G11.

Các gen V_{H1} , V_{H2} và V_L Hu2G11 được tạo cấu trúc bởi GenScript USA (Piscataway, NJ). Sau khi phân giải bằng $SpeI$ và $HindIII$ (đối với V_H) hoặc $NheI$ và $EcoRI$ (đối với V_L), các gen V_{H1} , V_{H2} và V_L Hu2G11 được tạo dòng phụ vào trong các vị trí tương ứng trong vector biểu hiện của động vật có vú để sản xuất kháng thể trong dạng IgG1/ κ của người. Vector biểu hiện thu được, pHu2G11-1, biểu hiện một kháng thể được làm giống như của người chứa V_{H1} Hu2G11 và V_L (Hu2G11-1). Tương tự, pHu2G11-2 biểu hiện một kháng thể được làm giống như của người chứa V_{H2} Hu2G11 và V_L (Hu2G11-1).

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 42) của gen V_{H2} Hu2G11 (còn gọi là V_{HR19I}) được bổ sung các vị trí $SpeI$ và $HindIII$ (gạch dưới) được thể hiện trong Bảng 18 cùng với trình tự axit amin tương ứng (SEQ ID NO: 43). Trình tự peptit tín hiệu được in nghiêng. Gốc axit amin đầu tận cùng N (E) của V_H trưởng thành được gạch dưới 2 gạch. Các trình tự CDR theo Kabat và các đồng tác giả (1991) được gạch dưới. Vị trí axit amin được đóng khung thể hiện sự khác nhau giữa V_{H1} và V_{H2} Hu2G11. Trình tự intron được in nghiêng.

Bảng 18. Các trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 42) và axit amin (SEQ ID NO: 43) của gen V_H 2G11 được làm giống như của người

<u>ACTAGT</u> ACCACCATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTTGTTGCTATTCTGGAAGGC
<i>M E L G L S W V F L V A I L E G</i>
GTCCAGTGTGAAGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTCGTCCAGCCTGGGGGCTCC
<i>V Q C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S</i>
CTGATCCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTGGCTTTGCCATGAGCTGGGTC
<u>L</u> <u>I</u> L S C A A S G F T F S <u>G F A M S W V</u>
CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTCGAGTGGGTTGCCACCATTAGTAGTGGCGGAACTTAT

R Q A P G K G L E W V A T I S S G G T Y
 ACCTACTCTCCAGACTCTGTGATGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC
T Y S P D S V M G R F T I S R D N A K N
 TCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCTGTGTATTACTGTGCC
 S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
 AGACGACTGCGTCGGAATTACTACTCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACC
 R R L R R N Y Y S M D Y W G Q G T M V T
 GTCTCCTCAGGTAAGATGGGCTTTCCTAAGCTT
 V S S

Trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 44) của gen V_L Hu2G11 được bổ sung các vị trí
 NheI và EcoRI (gạch dưới) được thể hiện trong Bảng 19 cùng với trình tự axit amin
 tương ứng (SEQ ID NO: 45). Trình tự peptit tín hiệu được in nghiêng. Gốc axit amin
 đầu tận cùng N (D) của V_L trưởng thành được gạch dưới 2 gạch. Các trình tự CDR
 theo Kabat và các đồng tác giả (1991) được gạch dưới. Trình tự intron được in
 nghiêng.

Bảng 19. Các trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 44) và axit amin (SEQ ID NO: 45) của gen V_L 2G11
 được làm giống như của người

GCTAGCACCACCATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTGATGCTCTGGGTCTCT
M R L P A Q L L G L L M L W V S
 GGATCCAGTGGGGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCCTGGA
G S S G D I V M T Q S P L S L P V T P G
 GAGCCTGCCTCCATCTCCTGCAAGTCTACTAAGAGCCTCCTGAATAGTGATGGATTCACT
E P A S I S C K S T K S L L N S D G F T
 TATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGTT
Y L D W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L V
 TCTAATCGGTTTTCCGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTT
S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F
 AACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGCGTTTATTACTGCTTCCAAAGT
T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q S
 AACTATCTTCCTTTCACTTTTCGGCGGCGGAACCAAAGTCGAGATCAAACGTAAGTGCACT
N Y L P F T F G G G T K V E I K
TTCCTAGAATTC

Tạo ra thể chuyển nhiễm NS0 sản sinh các kháng thể 2G11 IgG1/□□□khảm và
 được làm giống như của người

Để thu được các dòng tế bào ổn định sản sinh các kháng thể Ch2G11, Hu2G11-1
 và Hu2G11-2, các vector biểu hiện pCh2G11, pHu2G11-1 và pHu2G11-2, lần lượt

được đưa vào các nhiễm sắc thể của dòng tế bào u tủy NS0 của chuột (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, UK). Các tế bào NS0 được nuôi cấy trong môi trường DME chứa 10% FBS ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ 7,5% CO₂. Việc chuyển nhiễm ổn định vào NS0 được thực hiện bằng kỹ thuật đục lỗ điện được mô tả trong tài liệu của Bebbington và các đồng tác giả (Bio/Technology 10: 169-175, 1992). Trước khi chuyển nhiễm, mỗi vector biểu hiện được duỗi thẳng bằng cách sử dụng FspI. Khoảng 10⁷ tế bào được chuyển nhiễm với 20µg plasmit đã duỗi thẳng. Sau 48 giờ, môi trường chọn lọc (môi trường DME chứa 10% PBS, môi trường HT bổ sung (Sigma, St. Louis, MO), 0,25 mg/ml xanthin và 1 µg/ml axit mycophenolic được sử dụng. Khoảng 10 ngày sau khi bắt đầu chọn lọc, dịch nổi nuôi cấy được thử nghiệm về khả năng sản sinh kháng thể.

Sự biểu hiện của các kháng thể Ch2G11, Hu2G11-1 và Hu2G11-2 được đo bằng kỹ thuật ELISA. Trong một thử nghiệm điển hình, đĩa ELISA được phủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C với 100 µl/giếng kháng thể đa dòng của dê kháng IgG của người đặc hiệu-chuỗi- Fcγ (Sigma) được pha loãng 1/2000 lần trong PBS, được rửa bằng đệm rửa (PBS chứa 0,05% Tween 20), và được ngừng phản ứng trong 0,5 giờ ở nhiệt độ phòng với 300 µl/giếng đệm ngừng phản ứng (PBS chứa 2% Skim Milk và 0,05% Tween 20) được sử dụng cho đĩa ELISA. Kháng thể IgG1/κ được làm giống như của người tương ứng được sử dụng làm chuẩn. Sau khi ủ đĩa ELISA trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng và rửa bằng đệm rửa, các kháng thể đã gắn kết được phát hiện bằng cách sử dụng 100 µl/giếng kháng thể đa dòng của dê kháng chuỗi kappa của người liên hợp-RHP (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA). được pha loãng 1/2000 lần. Sau khi ủ trong 0,5 giờ ở nhiệt độ phòng và rửa bằng đệm rửa, sự hiện màu được thể hiện bằng cách bổ sung 100 µl/giếng axit oxalic 2%. Sự hấp thụ được đo ở bước sóng 405nm. Các thể chuyển nhiễm NS0 ổn định sản sinh mức cao các kháng thể Ch2G11, Hu2G11-1 và Hu2G11-2 (NS0-Ch2G11 1E7, NS0-Hu2G11-1 1E5, và NS0-Hu2G11-2 1A7, tương ứng) được nuôi cấy trong môi trường không chứa huyết thanh bằng cách sử dụng khối lai-SFM.

Tính chuẩn xác của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được sản sinh trong NS0-Ch2G11 1E7, NS0-Hu2G11-1 1E5, và NS0-Hu2G11-2 1A7 được xác nhận bằng việc giải trình tự cADN. Trình tự nucleotit thu được của vùng mã hóa mỗi chuỗi nặng Ch2G11, chuỗi nhẹ Ch2G11, chuỗi nặng Hu2G11-1, chuỗi nhẹ Hu2G11-1, chuỗi nặng

Hu2G11-2 và chuỗi nhẹ Hu2G11-2 được thể hiện trong các Bảng 24-28. Các trình tự này bắt cặp hoàn toàn với trình tự tương ứng trong vector pCh2G11, pHu2G11-1 hoặc pHu2G11-2.

Bảng 20. Trình tự của vùng mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ pCh2G11		
Mô tả	Trình tự nucleotit	Trình tự axit amin
Vùng mã hóa chuỗi nặng gama-1 trong pCh2G11	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 47
Vùng mã hóa chuỗi nhẹ kappa trong pCh2G11	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 49
Vùng mã hóa chuỗi nặng gama-1 trong pCh2G11-1	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 51
Vùng mã hóa chuỗi nặng gama-1 trong pCh2G11-2	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 53
Vùng mã hóa chuỗi nhẹ kappa trong pCh2G11-1 và pCh2G11-2	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 55

Ví dụ 11: Tinh chế các kháng thể Ch2G11, Hu2G11-1 và Hu2G11-2

Các tế bào NS0-Ch2G11 1E7, NS0-Hu2G11-1 1E5, và NS0-Hu2G11-2 1A7 được nuôi cấy trong khối lai_SFM trong chai lần đến mật độ khoảng 10^6 /ml, được nuôi bằng 1/10 lần thể tích của 60 mg/ml Ultrafiltered Soy Hydrolysate (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) được hòa trong môi trường SFM4MAb (HyClone), và nuôi tiếp cho đến khi khả năng sống sót của tế bào đến dưới 50%. Sau khi ly tâm và lọc, dịch nuôi cấy được tra vào cột protein-A Sepharose (HiTrap MABSelect SuRe, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Cột được rửa bằng PBS trước khi kháng thể được giải hấp bằng 0,1 M glyxin-HCl (pH 3,0). Sau khi trung hoà bằng 1M Tris-HCl (pH 8), đệm chứa kháng thể được giải hấp được thay đổi thành PBS để thẩm tách. Nồng độ kháng thể được xác định bằng cách đo sự hấp thụ ở bước sóng 280nm ($1 \text{ mg/ml} = 1,4 \text{ OD}$). Năng suất là 2,8 mg đối với Ch2G11 (từ 500 ml dịch nuôi cấy), 3,4 mg đối với Hu2G11-1 (từ 500 ml) và 1,1 mg đối với Hu2G11-2 (từ 500 ml).

Các kháng thể Ch2G11, Hu2G11-1 và Hu2G11-2 đã tinh chế được xác định đặc tính bằng SDS-PAGE theo quy trình chuẩn. Phân tích dưới điều kiện khử thể hiện rằng mỗi trong số 3 kháng thể đều chứa 1 chuỗi nặng có trọng lượng phân tử khoảng 50kDa và một chuỗi nhẹ có trọng lượng phân tử khoảng 25kDA (Fig.12). Độ tinh sạch của mỗi kháng thể là trên 90%.

Ví dụ 12: Đặc tính của các kháng thể Ch2G11, Hu2G11-1 và Hu2G11-2

Sự gắn kết kháng nguyên của các kháng thể Ch2G11, Hu2G11-1 và Hu2G11-2 được kiểm tra bằng kỹ thuật ELISA gắn kết cạnh tranh. Đĩa ELISA được phủ 100 μ l/giếng vacxin virut đại bất hoạt (Rabipur[®], Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Germany) được pha loãng 1-200 lần trong 0,2 M đệm natri bicarbonat (pH 9,4) qua đêm ở nhiệt độ 4°C, được rửa bằng đệm rửa (PBS), và được ngừng phản ứng bằng 300 μ l/giếng đệm ngừng phản ứng (3% BSA PBS) trong 0,5 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa bằng đệm rửa, hỗn hợp kháng thể 7G11A3 1H5 của chuột (0,2 μ g/ml; cung cấp bởi Asia Vision) và kháng thể cạnh tranh (Ch2G11, Hu2G11-1 hoặc Hu2G11-2; bắt đầu ở nồng độ 100 μ g/ml và dãy các nồng độ được pha loãng 3 lần) trong đệm ELISA được sử dụng ở nồng độ 100 μ l/giếng lặp lại 2 lần. Sau khi ủ đĩa ELISA trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng và rửa bằng đệm rửa, các kháng thể 7G11A3 1H5 đã gắn kết được phát hiện bằng cách sử dụng 100 μ l/giếng kháng thể đa dòng của dê kháng IgG của chuột, hấp thụ IgG của người, đặc hiệu – chuỗi Fc γ , liên hợp –RHP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) được pha loãng 1/2000 lần. Sau khi ủ 0,5 giờ ở nhiệt độ phòng và rửa bằng đệm rửa, sự hiện màu được thể hiện bằng cách bổ sung 100 μ l/giếng cơ chất ABTS và ngừng phản ứng bằng 100 μ l/giếng axit oxalic 2%. Sự hấp thụ được đọc ở bước sóng 405nm. Giá trị IC₅₀ được tính toán bằng cách sử dụng GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) là 0,11 μ g/ml đối với Ch2G11, 0,20 μ g/ml đối với Hu2G11-1, và 0,23 μ g/ml đối với Hu2G11-2 (Fig.13). Kết quả này thể hiện rằng cả Hu2G11-1 và Hu2G11-2 đều giữ lại ái lực gắn kết kháng nguyên của kháng thể 2G11 của chuột.

Sự gắn kết kháng nguyên của Ch2G11, Hu2G11-1 và Hu2G11-2 cũng được kiểm tra bằng ELISA như nêu trên. Đĩa ELISA được phủ bằng 2,5 μ g/ml Ch2G11, Hu2G11-1 hoặc Hu2G11-2 trong PBS qua đêm ở nhiệt độ 4°C và được ngừng phản ứng như nêu trên. Sau khi rửa bằng đệm rửa, 100 μ l/giếng Rabipur[®] đã được pha loãng 1/50, 1/100 hoặc 1/200 lần trong đệm ELISA được bổ sung và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa bằng đệm rửa, Rabipur[®] được bắt giữ bằng kháng thể trong mỗi thí nghiệm được phát hiện bằng cách sử dụng 100 μ l/giếng kháng thể đơn dòng 3D10 của chuột liên hợp – HRP đã pha loãng 1/1000 lần được cung cấp bởi Asia Vision. Sau khi ủ trong 0,5 giờ ở nhiệt độ phòng và rửa trong đệm rửa, sự hiện màu được thực hiện như nêu trên. Sự hấp thụ được đọc ở bước sóng 405nm. Thứ tự của tín hiệu từ cao đến

thấp là Hu2G11-2, Ch2G11 và Hu2G11-1 (Fig.14), thể hiện rằng Hu2G11-2 có thể gắn kết với kháng nguyên tốt hơn là Hu2G11-1.

Các kết quả này cho thấy rằng các kháng thể kháng đại theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với glycoprotein virut, và rằng chúng hữu dụng trong các phương pháp liên quan đến sự gắn kết đặc hiệu này, bao gồm các phương pháp phát hiện glycoprotein virut đại trong mẫu, hoặc điều trị hoặc phòng ngừa sự nhiễm virut đại ở đối tượng cần điều trị và phương pháp bảo vệ sau phơi nhiễm chống lại sự nhiễm đại ở đối tượng cần nó.

Ví dụ 13: Hoạt tính gắn kết của các RVNA được làm giống như của người

Hoạt tính gắn kết của các RVNA được làm giống như của người với glycoprotein RV được nghiên cứu trong ví dụ này. RVNA được làm giống như của người và các chất sinh học khác được sử dụng trong các ví dụ được thể hiện trong Bảng 21. Các động vật được sử dụng trong các nghiên cứu này bao gồm chuột BALB/c, 6-8 tuần tuổi, trọng lượng từ 20 đến 3g, mức SPF và chuột đồng Syrian, 2-3 tháng tuổi, trọng lượng 100g, mức SPF.

Bảng 21. Các chất phản ứng sinh học		
Loại	Tên gọi	Nồng độ (mg/ml)
Kháng thể kháng đại của chuột	m-G11	2,3
Kháng thể kháng đại khảm	Ch2G11	0,5
Kháng thể kháng đại được làm giống như của người	Hu2G11	1,0
Kháng thể kháng đại của chuột	m-1A9	1,9
Kháng thể kháng đại khảm	Ch1A9	1,0
Kháng thể kháng đại được làm giống như của người	Hu1A9-1	1,4
Kháng thể kháng đại được làm giống như của người	Hu1A9-2	1,8
Kháng thể kháng đại của chuột	RV-3D10A6	1,2
Liên hợp enzym	3D10A6-HRP	-
Kháng thể thứ hai	IgG 3G2 của chuột kháng người	1,35
Kháng thể thứ cấp	IgG 3G2-HRP của chuột kháng người	-
Globulin đại	Globulin miễn dịch đại của người	100 IU/ml
Vaccin đại	Vaccin đại	-

Sự gắn kết của các RVNA 2G11 khảm và được làm giống như của người với glycoprotein RV được xác định bằng CLEIA (Fig.15). Các phiên bản khảm và được làm giống như của người của 2G11 được sử dụng làm kháng thể bắt giữ (các hình vẽ

từ Fig.15A đến Fig.15C) và kháng thể phát hiện (các hình vẽ từ Fig.15D đến Fig.15F) và sau đó được bổ sung vào vi đĩa. RV 3D10-HRP của chuột và IgG-HRP của chuột kháng người được sử dụng làm liên hợp enzym. RLU (related luminescence unit: đơn vị phát quang liên quan) thể hiện tín hiệu quang hóa. Kết quả này thể hiện rằng hoạt tính gắn kết của Ch2G11 khảm với RVGP tốt hơn so với dạng khảm.

Sự gắn kết của các RVNA 1A9 được làm giống như của người, khảm và của chuột với RVGP được xác định bằng CLEIA (Fig.16). 1A9 khảm và được làm giống như của người được sử dụng làm kháng thể kháng thể bắt giữ (các hình vẽ từ Fig.16A đến Fig.16E) và kháng thể phát hiện (Fig.16F-J). RVGP được pha loãng đến tỷ lệ 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 và 1:1600 và sau đó được bổ sung vào vi đĩa. RV 3D10-HRP của chuột và IgG-HRP của chuột kháng người được sử dụng làm liên hợp enzym. RLU (related luminescence unit: đơn vị phát quang liên quan) thể hiện tín hiệu quang hóa. Kết quả này thể hiện rằng hoạt tính gắn kết của Ch1A9 khảm tốt hơn so với dạng được làm giống như của người.

Các kết quả này cho thấy các kháng thể kháng đại theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với glycoprotein virus đại, và rằng chúng hữu dụng cho các phương pháp liên quan đến gắn kết đặc hiệu này, bao gồm các phương pháp phát hiện glycoprotein virus đại trong mẫu, hoặc điều trị hoặc phòng ngừa nhiễm đại ở đối tượng và các phương pháp bảo vệ sau phơi nhiễm chống lại nhiễm đại ở đối tượng cần nó.

Ví dụ 14: Hiệu lực trung hòa *in vitro* của các RVNA được làm giống như của người

Khả năng trung hòa *in vitro* của các RVNA được đo bằng kỹ thuật ức chế huỳnh quang nhanh (RFFIT) và kỹ thuật trung hòa virus kháng thể huỳnh quang (FAVN) sử dụng virus đại CVS-11. Kết quả được thể hiện trong Bảng 22. Các kết quả của 2 kỹ thuật cho thấy mức hiệu lực trung hòa *in vitro* của 2G11 được làm giống như của người thấp hơn so với 2G11 khảm, Hu1A9-1 được làm giống như của người có hoạt tính trung hòa tốt nhất trong số bốn kháng thể 1A9.

Bảng 22. Hiệu lực trung hòa <i>in vitro</i> của các RVNA được làm giống như của người được đo bằng RFFIT và FAVN			
STT	Tên gọi	Hiệu lực trung hòa IU/mg)	
		RFFIT	FAVN
1	m-G11	1667	8309
2	Ch2G11	1261	8309

3	Hu2G11	1261	2631
4	m-1A9	1261	308
5	Ch1A9	1261	533
6	Hu1A9-1	2289	2104
7	Hu1A9-2	1306	405

Để so sánh hoạt tính trung hòa của 7G11A32G11 hoặc 3D11E31A9 được làm giống như của người với RVNA của chuột và dạng khảm, thử nghiệm trung hòa chuột (MNT- mouse neutralization test) được thực hiện. 100LD₅₀/0,03ml virus đại CVS-11 được trung hòa bằng thể tích tương ứng của các RVNA ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ và sau đó được tiêm vào não chuột BALB/C (n=8/nhóm). Nhóm đối chứng được tiêm virus không-trung hòa. Chuột được kiểm tra hàng ngày, và nếu chúng biểu hiện các dấu hiệu lâm sàng của nhiễm đại chúng sẽ được làm chết. Các chuột BALB/C sống sót được quan sát (**Fig.17**). Tất cả các động vật đối chứng đều chết trong vòng 9 ngày, cho thấy rằng thí nghiệm có hiệu quả. Không có sự khác nhau về phần trăm sống sót giữa nhóm của chuột và nhóm được làm giống như của người khi nồng độ của RVNA cao hơn 0,02 mg/mL. Tuy nhiên, biểu hiện trung hòa của 2G11 của chuột tốt hơn so với dạng khảm và được làm giống như của người khi nồng độ giảm xuống 0,004 mg/mL. Sự gia tăng lượng điều trị của 7G11A32G11 được làm giống như của người có thể giúp cải thiện biểu hiện trung hòa. Bên cạnh đó, tỷ lệ sống sót của chuột được điều trị bằng 0,004 mg/mL Hu1A9-1 được làm giống như của người hoặc m-A19 của chuột đạt 100% (8/8) và 50% (4/8), một cách tương ứng.

Các kết quả này cho thấy các kháng thể kháng đại theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với glycoprotein virus đại, và rằng chúng hữu dụng đối với các phương pháp liên quan đến gắn kết đặc hiệu này, bao gồm các phương pháp phát hiện glycoprotein virus đại trong mẫu, hoặc điều trị hoặc phòng ngừa nhiễm đại ở đối tượng và các phương pháp bảo vệ sau phơi nhiễm chống lại nhiễm đại ở đối tượng cần nó.

Ví dụ 15: Khả năng bảo vệ sau phơi nhiễm của hai RVNA được làm giống như của người

Để đánh giá khả năng bảo vệ sau phơi nhiễm của 2G11 và 1A9 được làm giống như của người, nghiên cứu chuột đồng Syrian được thực hiện để RVNA được làm giống như của người được so sánh với RVNA của chuột và khảm. Chuột (n=5/nhóm) được cho nhiễm RV dạng đại (BD06) vào ngày 1. Động vật được điều trị bằng lượng tương đương của 2G11 hoặc 1A9 của chuột, khảm hoặc được làm giống như của

người (1 mg/kg) với 16 giờ suy giảm, được sử dụng ở vị trí tiêm virus (ví dụ, cơ sinh đôi cẳng chân phải). Nhóm đối chứng không được điều trị. Chuột được kiểm tra hàng ngày, và nếu chúng biểu hiện các dấu hiệu lâm sàng của nhiễm đại, chúng sẽ được làm chết. Các chuột BALB/C sống sót được quan sát (**Fig.18**). Tất cả các động vật đối chứng đều chết trong vòng 9 ngày, cho thấy rằng thí nghiệm có hiệu quả. Đối với 2G11, không có sự khác nhau về phần trăm sống sót giữa nhóm của chuột và nhóm được làm giống như của người. Tuy nhiên, tỷ lệ sống sót của chuột được điều trị với 1A9 được làm giống như của người hoặc 1A9 của chuột đạt 100% (5/5) và 60% (3/5), một cách tương ứng.

Các kết quả này cho thấy các kháng thể kháng đại theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với glycoprotein virus đại, và rằng chúng hữu dụng cho các phương pháp liên quan đến gắn kết đặc hiệu này, bao gồm các phương pháp phát hiện glycoprotein virus đại trong mẫu, hoặc điều trị hoặc phòng ngừa nhiễm đại ở đối tượng và các phương pháp bảo vệ sau phơi nhiễm chống lại nhiễm đại ở đối tượng cần nó.

Ví dụ 16: Tính sinh miễn dịch vacxin trong động vật được điều trị bằng hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2 hoặc HRIG

Để đánh giá khả năng bảo vệ sau phơi nhiễm của hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2 được làm giống như của người, nghiên cứu động vật được thực hiện. Các lớp đơn của tế bào u nguyên bào thần kinh được nhiễm với thử thách virus chuẩn -11 (CVS-11) hoặc các virus khác ở bội số gây nhiễm (MOI) 0,3 trong 15 phút ở nhiệt độ 37°C/0,5% CO₂. Chất tiêm chủng virus sau đó được loại bỏ, môi trường sạch được bổ sung vào tế bào, và tiếp tục ủ trong 40 giờ ở 37°C/0,5% CO₂. Dịch nổi nuôi cấy được thu thập và bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng. Các RFFIT chuẩn để trung hòa được thực hiện như nêu trên. Để xác định khả năng trung hòa của mỗi kháng thể trung hòa virus đại (RVNA). Các chuẩn độ trung hòa 50% của chúng được so sánh với chuẩn độ trung hòa 50% của chuẩn (GB chuẩn) được xác định là 21,4 IU/mL.

Trong phòng bệnh sau phơi nhiễm (PEP), có thể là sử dụng đồng thời các RVNA và vacxin làm giảm khả năng của vacxin dẫn đến làm giảm mức ngưỡng của kháng thể trung hòa cần để bảo vệ. Vì vậy, quan trọng là đánh giá mức độ ảnh hưởng của điều trị bằng hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2 đến sự tiêm chủng. Để xác định ảnh hưởng của hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2 đến khả năng của vacxin, thí nghiệm động

vật *in vivo* được thực hiện khi không có RV (Fig.19). Đối với PEP, chuột BALB/c được sử dụng 3 liều hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2 cùng vaccin hoặc 20 IU/kg HRIG cùng vaccin. Ba liều hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2 tương ứng là 5000 IU/kg, 1000 IU/kg hoặc 200 IU/kg. Chuột chỉ được sử dụng vaccin được làm đối chứng. Có 8 con chuột trong mỗi nhóm thí nghiệm. Tương tự, 6 con chuột chỉ được sử dụng PBS làm đối chứng âm. Vào các ngày 1, 2, 4, 8, 16 và 32, lấy máu từ ổ mắt chuột. Huyết thanh của 8 con chuột được trộn thành 4 huyết thanh trong mỗi nhóm thí nghiệm và sau đó được xác định chuẩn độ RVNA huyết thanh. Vào các ngày 1, 2 và 4, các chuẩn độ RVNA huyết thanh là cao ở chuột được dùng hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2, thấp ở chuột dùng 20 IU/kg HRIG (chỉ 2 huyết thanh đáp ứng điều kiện của WHO, 0,5 IU/mL) và không thể phát hiện được ở chuột chỉ được dùng vaccin. Chuẩn độ RVNA ở chuột được dùng hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2 duy trì ở mức cao trong từ 8 đến 32 ngày, cao hơn hoặc tương đương với chuẩn độ RVNA ở chuột dùng HRIG. Kết quả này cho thấy rằng hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2 không ảnh hưởng đến vaccin tạo ra kháng thể trung hòa. Ngoài ra, chuẩn độ RVNA ở chuột dùng hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2 thể hiện ảnh hưởng phụ thuộc vào liều quan sát trong 8-32 ngày: liều hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2 càng cao thì chuẩn độ RVNA gây ra ở chuột càng cao.

Các kết quả này cho thấy các kháng thể kháng đại theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với glycoprotein virus đại, và rằng chúng hữu dụng cho các phương pháp liên quan đến gắn kết đặc hiệu này, bao gồm các phương pháp phát hiện glycoprotein virus đại trong mẫu, hoặc điều trị hoặc phòng ngừa nhiễm đại ở đối tượng và các phương pháp bảo vệ sau phơi nhiễm chống lại nhiễm đại ở đối tượng cần nó.

Ví dụ 17: Khả năng trung hòa *in vivo* của hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2 so với HRIG đa dòng

Để đánh giá khả năng trung hòa *in vivo* của hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2, nghiên cứu chuột Syrian được thực hiện. Chuột (n=10/nhóm) được cho nhiễm RV dạng đại của chó (BD06). Động vật được tiêm chủng bằng vaccin đại (*Rabipur*, *Chiron Behring*) vào ngày 0 và sau đó được xử lý bằng 1000, 500, 200 IU/kg hỗn hợp hoặc Hu2G11-1/Hu1A9-2 hoặc 20 IU/kg globulin miễn dịch đại của người (*Shuanglin Pharmaceutical*) với 24 giờ suy giảm, được sử dụng ở vị trí tiêm chủng virus (ví dụ, cơ sinh đôi cẳng chân phải). Liều bổ sung của vaccin được sử dụng ở cơ sinh đôi cẳng chân trái vào các ngày 3, 7, 14 và 28. Các nhóm đối chứng chỉ được dùng vaccin hoặc

không được điều trị. Chuột được kiểm tra hàng ngày, và nếu chúng biểu hiện các dấu hiệu lâm sàng của nhiễm đại, chúng sẽ được gây chết. Sự sống sót của chuột Syrian được quan sát (Fig.20). Nhóm đối chứng âm có tỷ lệ sống sót 20% thể hiện rằng thí nghiệm có hiệu quả. Với 24 giờ suy giảm, tỷ lệ sống sót có thể được quan sát bằng việc điều trị bằng vacxin và hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2 đem lại tỷ lệ sống sót 100% (10/10) và tỷ lệ sống sót của chuột được điều trị bằng vacxin và HRIG là 90% (9/10). Kết quả này cho thấy rằng khả năng trung hòa *in vivo* của hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2 là rất mạnh.

Các kết quả này cho thấy các kháng thể kháng đại theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với glycoprotein virus đại, và rằng chúng hữu dụng đối với các phương pháp liên quan đến gắn kết đặc hiệu này, bao gồm các phương pháp phát hiện glycoprotein virus đại trong mẫu, hoặc điều trị hoặc phòng ngừa nhiễm đại ở đối tượng và các phương pháp bảo vệ sau phơi nhiễm chống lại nhiễm đại ở đối tượng cần nó.

Ví dụ 18: Khả năng bảo vệ sau phơi nhiễm ở người của hai RVNA được làm giống như của người

Ví dụ này minh họa khả năng bảo vệ sau phơi nhiễm của 2G11 và 1A9 được làm giống như của người ở người đối với virus đại. Người bị phơi nhiễm hoặc nghi ngờ phơi nhiễm virus đại được sử dụng 2G11 hoặc 1A9 khảm hoặc được làm giống như của người (1 mg/kg) trong 16 giờ suy giảm, được sử dụng ở vị trí tiêm chủng virus (ví dụ, vị trí bị động vật cắn). Người ta mong đợi rằng đối tượng được điều trị có tỷ lệ sống sót 100%, sẽ thể hiện ít hơn hoặc không có triệu chứng lâm sàng của bệnh đại so với đối tượng không được điều trị, và sẽ thể hiện nhanh hơn hoặc hoàn toàn khỏi sự phơi nhiễm đại so với đối tượng không được điều trị.

Các kết quả này cho thấy các kháng thể kháng đại theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với glycoprotein virus đại, và rằng chúng hữu dụng cho các phương pháp liên quan đến gắn kết đặc hiệu này, bao gồm các phương pháp phát hiện glycoprotein virus đại trong mẫu, hoặc điều trị hoặc phòng ngừa nhiễm đại ở đối tượng và các phương pháp bảo vệ sau phơi nhiễm chống lại nhiễm đại ở đối tượng cần nó.

Ví dụ 19: Khả năng trung hòa *in vivo* của hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2 so với HRIG đa dòng

Ví dụ này minh họa khả năng trung hòa *in vivo* của hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2 ở người bị phơi nhiễm virus dại. Người bị phơi nhiễm hoặc nghi ngờ phơi nhiễm virus dại được sử dụng 1000, 500, 200 IU/kg hỗn hợp Hu2G11-1/Hu1A9-2 với 24 giờ suy giảm, được sử dụng ở vị trí tiêm chủng virus (ví dụ, vị trí bị động vật cắn). Người ta mong đợi rằng đối tượng được điều trị có tỷ lệ sống sót 100%, sẽ thể hiện ít hơn hoặc không có triệu chứng lâm sàng của bệnh dại so với đối tượng không được điều trị, và sẽ thể hiện nhanh hơn hoặc hoàn toàn khỏi sự phơi nhiễm dại so với đối tượng không được điều trị.

Các kết quả này cho thấy các kháng thể kháng dại theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với glycoprotein virus dại, và rằng chúng hữu dụng đối với các phương pháp liên quan đến gắn kết đặc hiệu này, bao gồm các phương pháp phát hiện glycoprotein virus dại trong mẫu, hoặc điều trị hoặc phòng ngừa nhiễm dại ở đối tượng và các phương pháp bảo vệ sau phơi nhiễm chống lại nhiễm dại ở đối tượng cần nó.

Biến thể tương đương

Sáng chế không giới hạn ở các thuật ngữ trong các phương án cụ thể được sử dụng trong bản mô tả này, mà chỉ nhằm mục đích minh họa các khía cạnh riêng lẻ của sáng chế. Nhiều cải biến và biến thể của công nghệ có thể được tạo ra mà không nằm ngoài tinh thần và phạm vi của sáng chế, cũng như là hiển nhiên đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp và thiết bị tương đương về chức năng trong phạm vi của sáng chế, ngoài sự liệt kê ở đây, là hiển nhiên đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này xuất phát từ bản mô tả này. Các cải biến và các biến thể như vậy cũng được dự tính trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ. Sáng chế không chỉ giới hạn bởi các thuật ngữ trong yêu cầu bảo hộ, cũng với phạm vi đầy đủ của các biến thể tương đương với yêu cầu bảo hộ là được cho phép. Cũng cần hiểu rằng sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương pháp, chất phản ứng, hợp chất, chế phẩm hoặc hệ thống sinh học riêng lẻ, mà nó còn có thể biến đổi. Cũng nên hiểu rằng hệ thống thuật ngữ được sử dụng ở đây chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, mà không nhằm giới hạn chúng. Các phương án khác được thể hiện trong các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Các tài liệu tham khảo được trích dẫn được kết hợp vào đây bằng cách tham khảo nguyên văn của chúng và vì tất cả các mục đích đối với cùng một phạm vi như công

bồ riêng lẻ, bằng độc quyền sáng chế hoặc đơn đăng ký sáng chế được kết hợp đặc biệt hoặc riêng lẻ bằng cách tham khảo toàn văn của chúng cho mọi mục đích.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập mà gắn kết với glycoprotein virus đại, trong đó:

a. kháng thể này chứa các trình tự CDR chuỗi nặng: DYIML (SEQ ID NO:56), DIYPYYGSTSYNLKFKG (SEQ ID NO:57), và QGGDGNYVLFDY (SEQ ID NO:58), lần lượt tương ứng với CDR1, CDR2 và CDR3, và chứa các trình tự CDR chuỗi nhẹ: KASQNVGTTVA (SEQ ID NO:62), SASYRYS (SEQ ID NO:63), và QQYNSYPFT (SEQ ID NO:64), lần lượt tương ứng với CDR1, CDR2, và CDR3; hoặc

b. kháng thể này chứa các trình tự CDR chuỗi nặng: GFAMS (SEQ ID NO:59), TISSGGTYTYSPDSVMG (SEQ ID NO:60), và RLRRNYYSMDY (SEQ ID NO:61) lần lượt tương ứng với CDR1, CDR2 và CDR3 và chứa trình tự CDR chuỗi nhẹ: KSTKSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:65), LVSNRFS (SEQ ID NO:66), và FQSNYLPFT (SEQ ID NO:67) lần lượt tương ứng với CDR1, CDR2, và CDR3.

2. Kháng thể được phân lập theo điểm 1, trong đó kháng thể này có khả năng làm giảm tính lây nhiễm của virus đại và không ảnh hưởng tới tính sinh miễn dịch của vaccine đại.

3. Kháng thể được phân lập theo điểm 1, trong đó kháng thể này được lựa chọn từ nhóm gồm kháng thể đơn dòng, kháng thể của chuột, kháng thể khảm và kháng thể được làm giống như của người.

4. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 1 và chất mang dược dụng.

5. Dược phẩm theo điểm 4, trong đó dược phẩm này chứa hỗn hợp của các kháng thể trong đó kháng thể thứ nhất chứa các trình tự CDR chuỗi nặng: DYIML (SEQ ID NO:56), DIYPYYGSTSYNLKFKG (SEQ ID NO:57), và QGGDGNYVLFDY (SEQ ID NO:58), lần lượt tương ứng với CDR1, CDR2, và CDR3, và chứa các trình tự CDR chuỗi nhẹ: KASQNVGTTVA (SEQ ID NO:62), SASYRYS (SEQ ID NO:63), và QQYNSYPFT (SEQ ID NO:64), lần lượt tương ứng với CDR1, CDR2, và CDR3; và trong đó kháng thể thứ hai chứa các trình tự CDR chuỗi nặng: GFAMS (SEQ ID NO:59), TISSGGTYTYSPDSVMG (SEQ ID NO:60), và RLRRNYYSMDY (SEQ ID NO:61), lần lượt tương ứng với CDR1, CDR2, và CDR3, và chứa các trình tự CDR chuỗi nhẹ: KSTKSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:65), LVSNRFS (SEQ ID NO:66), và FQSNYLPFT (SEQ ID NO:67), lần lượt tương ứng với CDR1, CDR2 và CDR3.

6. Kit dùng để điều trị hoặc phát hiện virus dại trong mẫu chứa kháng thể theo điểm 1 và hướng dẫn sử dụng.
7. Kit theo điểm 6, trong đó kháng thể được liên kết với một hoặc nhiều chất đánh dấu có thể phát hiện được.
8. Kit theo điểm 6, trong đó bộ kit còn bao gồm kháng thể thứ cấp mà gắn kết đặc hiệu với kháng thể glycoprotein virus dại.
9. Axit nucleic phân lập được mã hóa kháng thể theo điểm 1.
10. Tế bào chủ chứa axit nucleic phân lập được theo điểm 9.

FIG.1

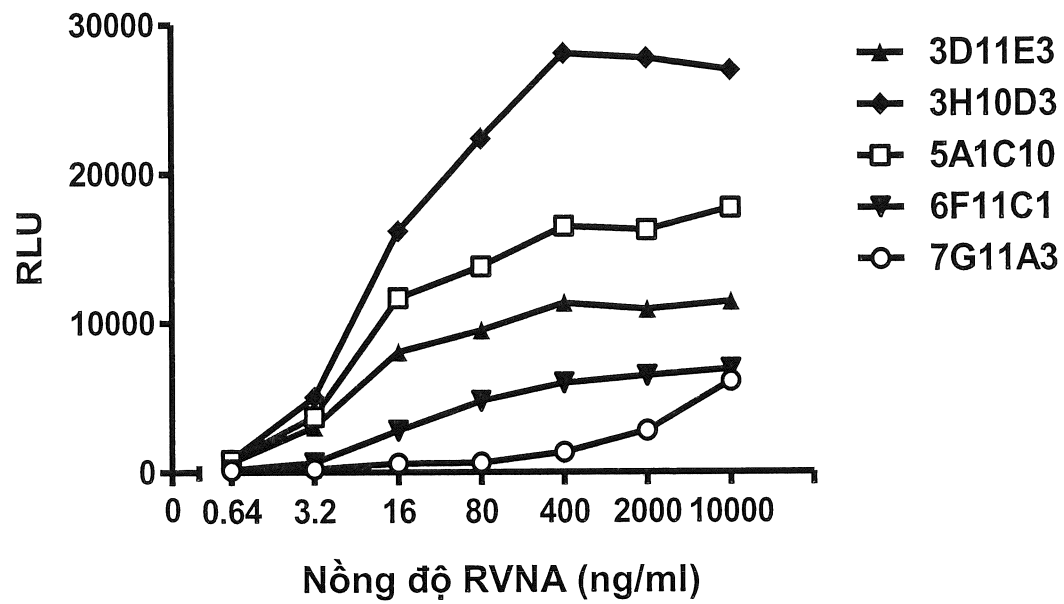


FIG.2

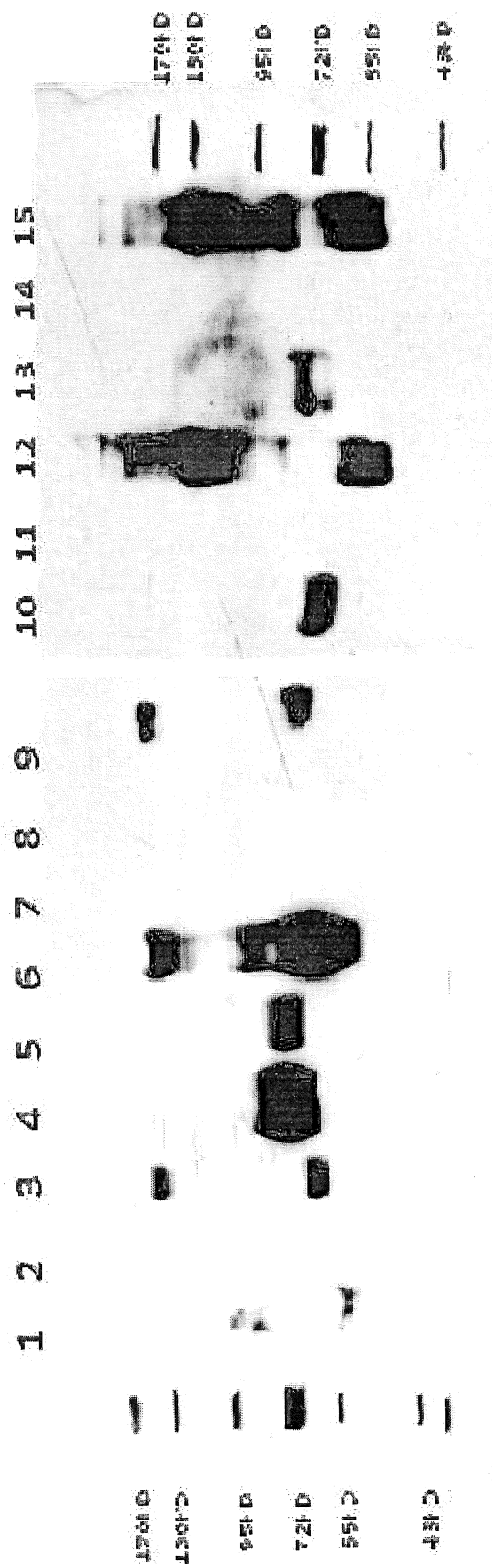


FIG.3A

Đường cong gắn kết của 3D11E3 với glycoprotein RV
được xử lý bằng các phương pháp khác nhau

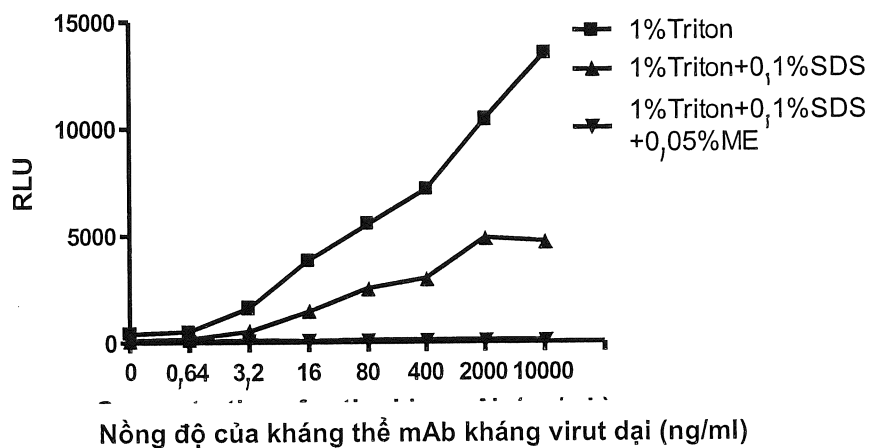


FIG.3B

Đường cong gắn kết của 3H10D3 với glycoprotein RV
được xử lý bằng các phương pháp khác nhau

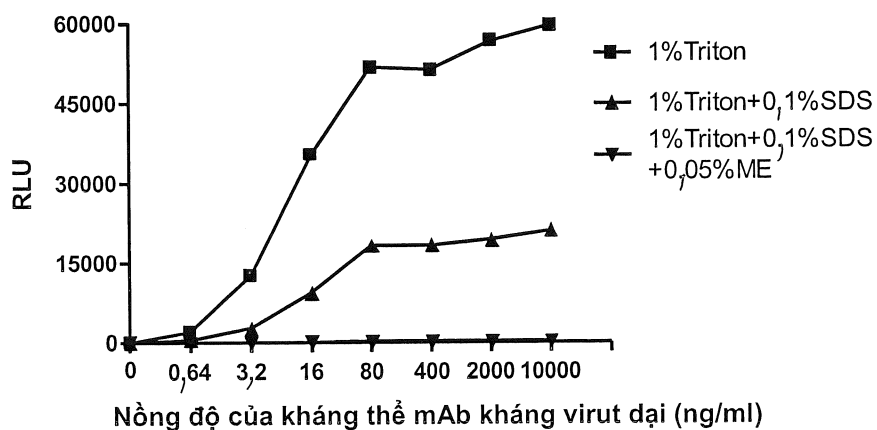


FIG.3C

Đường cong gắn kết của 5A1C10 với glycoprotein RV
được xử lý bằng các phương pháp khác nhau

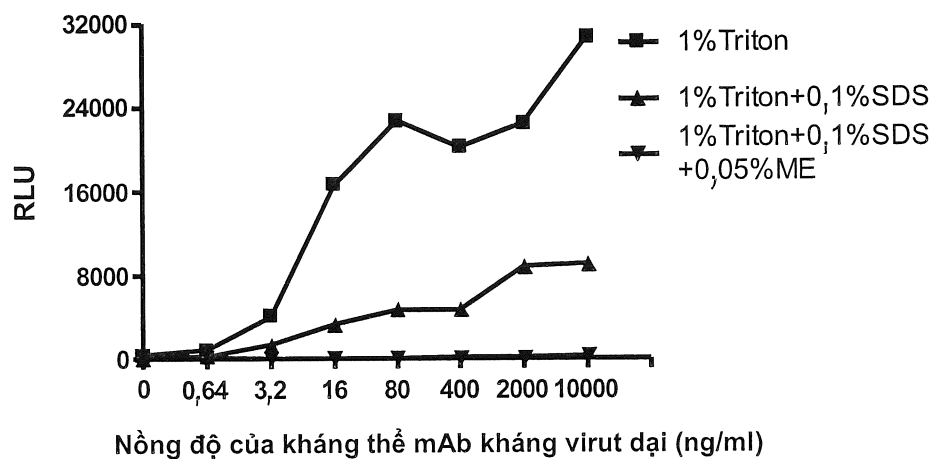


FIG.3D

Đường cong gắn kết của 6F11C1 với glycoprotein RV
được xử lý bằng các phương pháp khác nhau

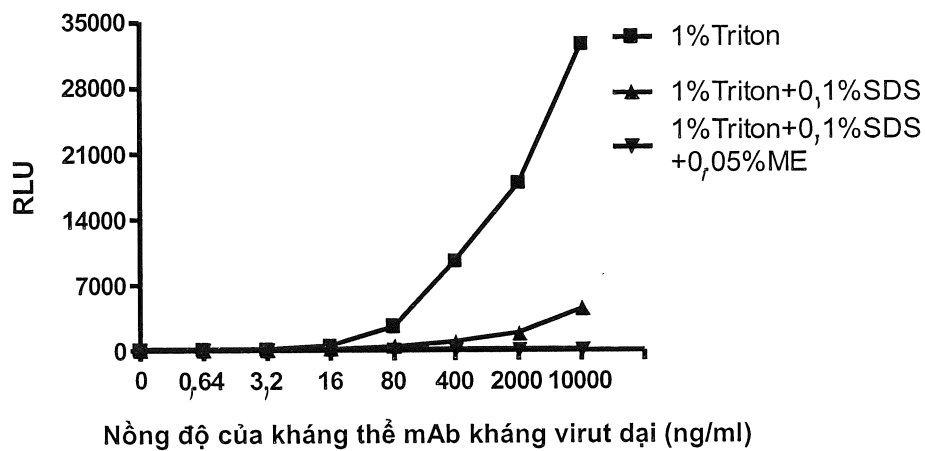


FIG.3E

Đường cong gắn kết của 7G11A3 với glycoprotein RV
được xử lý bằng các phương pháp khác nhau

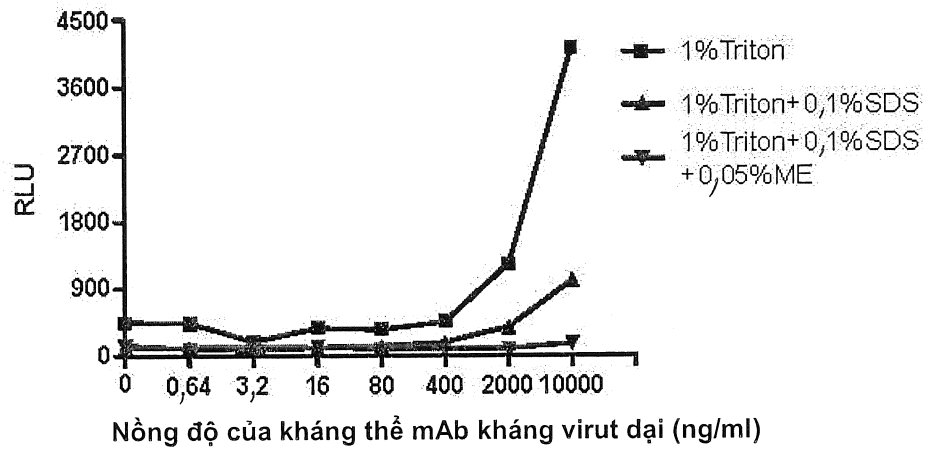


FIG.4A

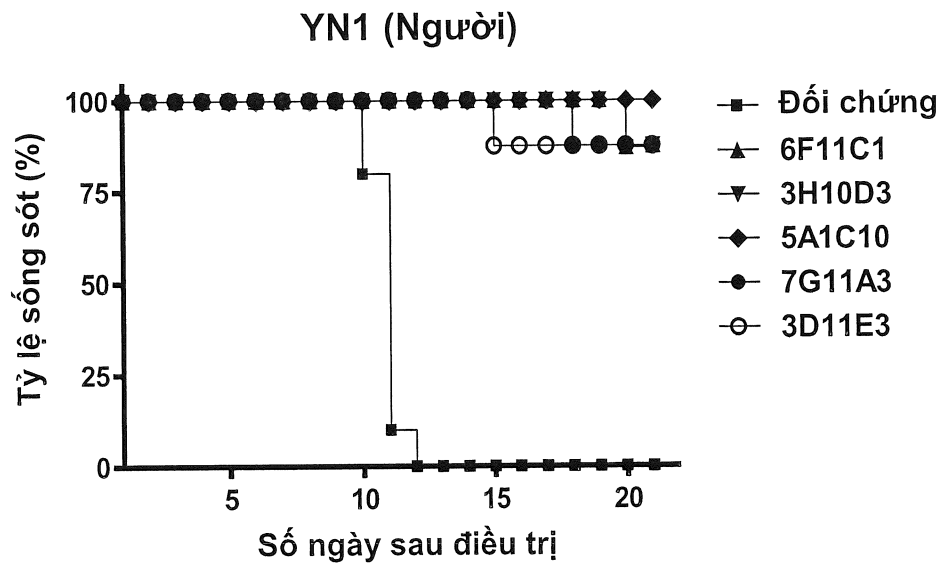


FIG.4B

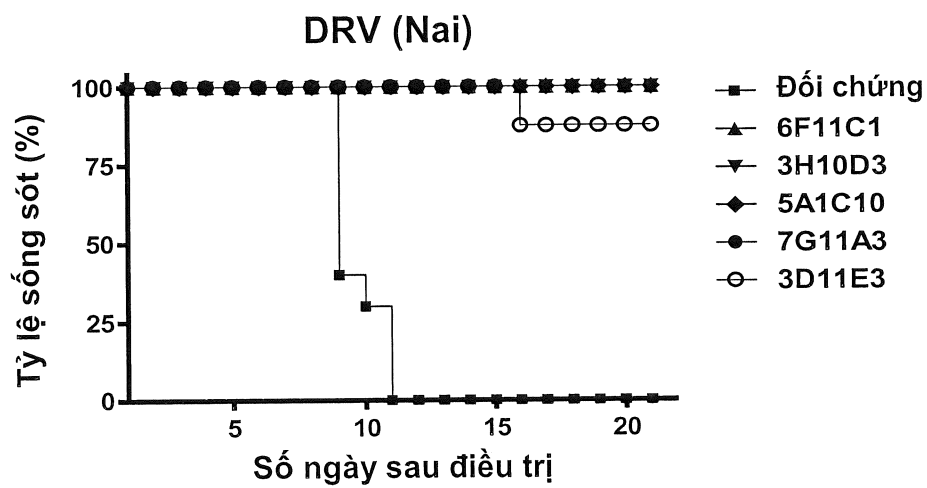


FIG.4C

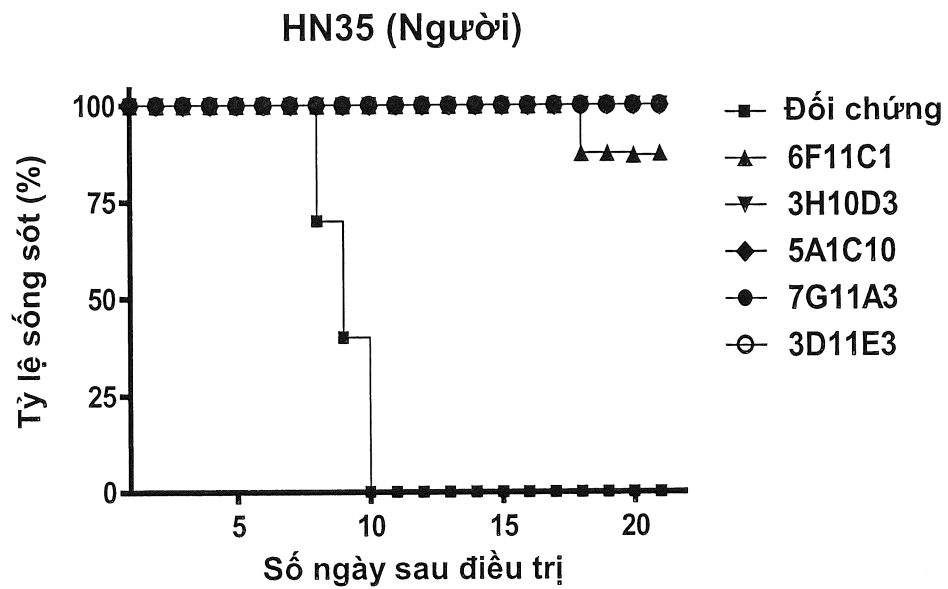


FIG.4D

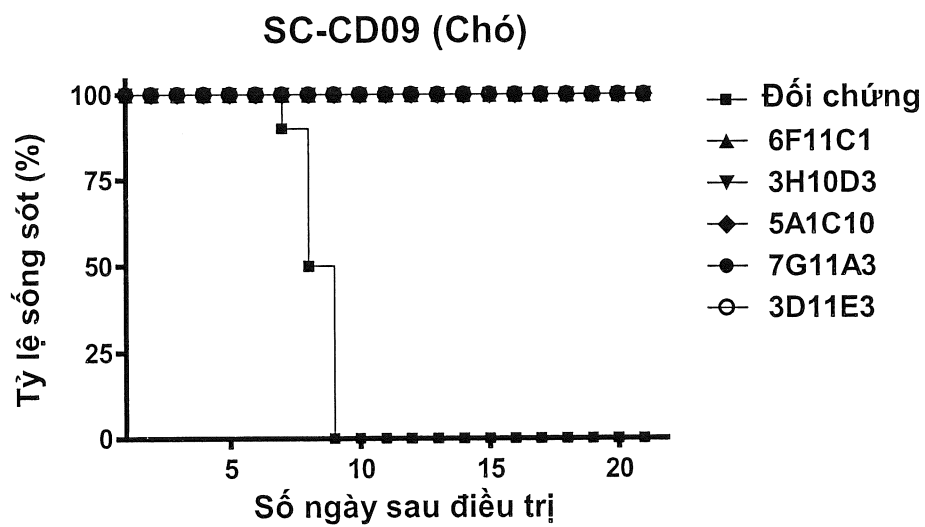


FIG.4E

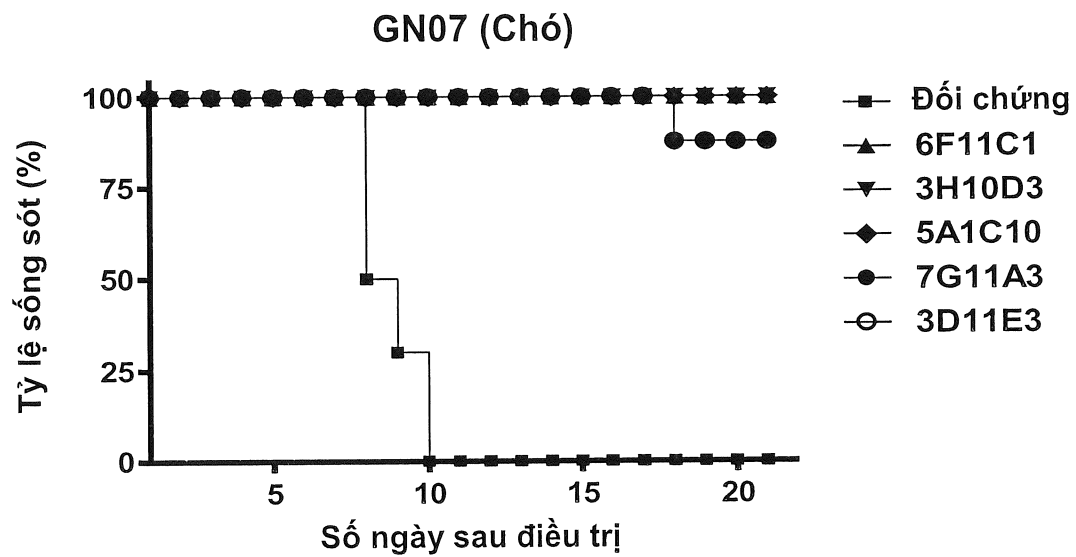


FIG.4F

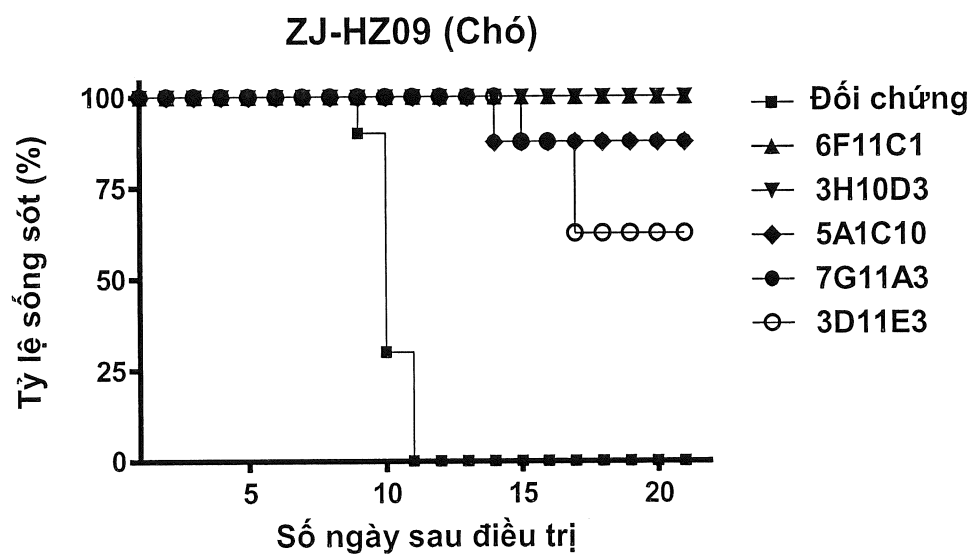


FIG.4G

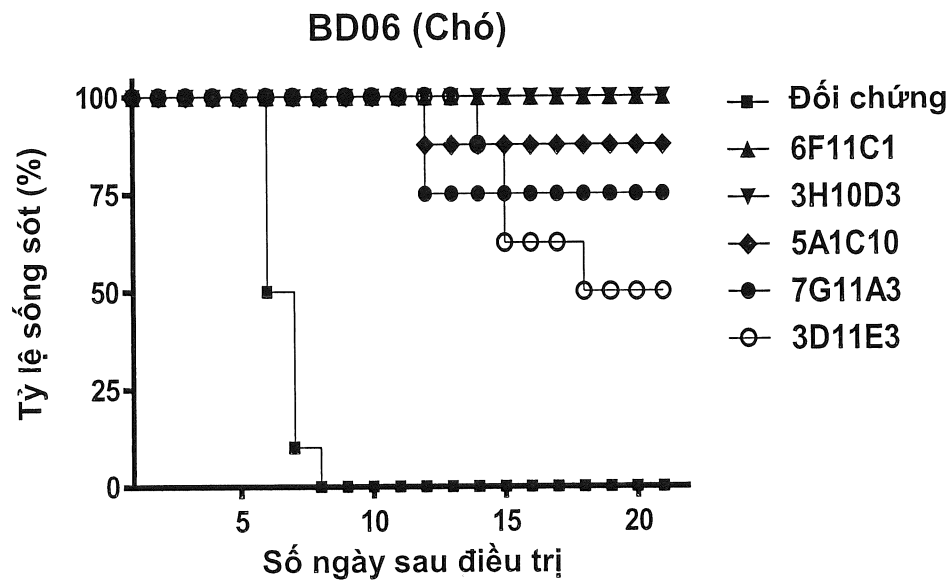


FIG.4H

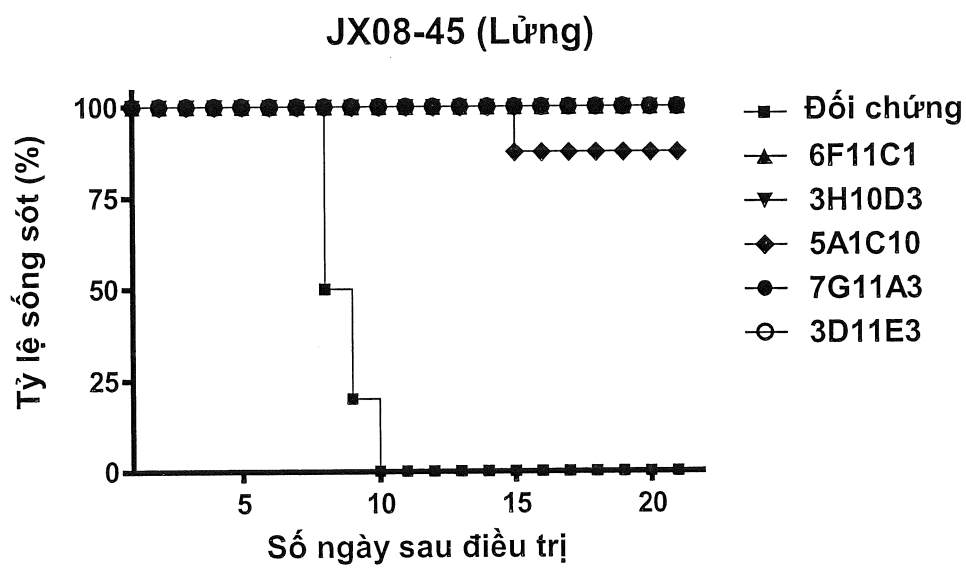


FIG.4I

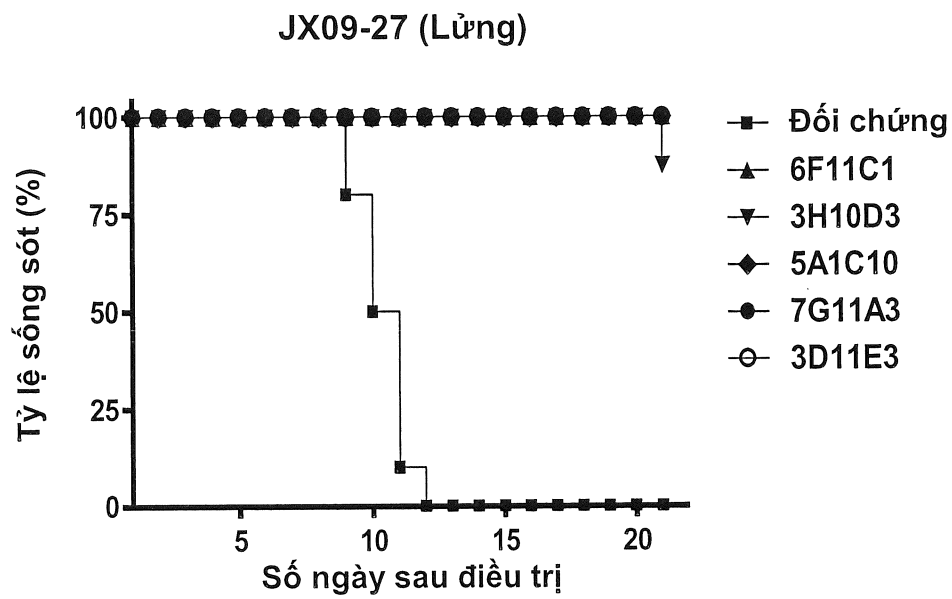


FIG.4J

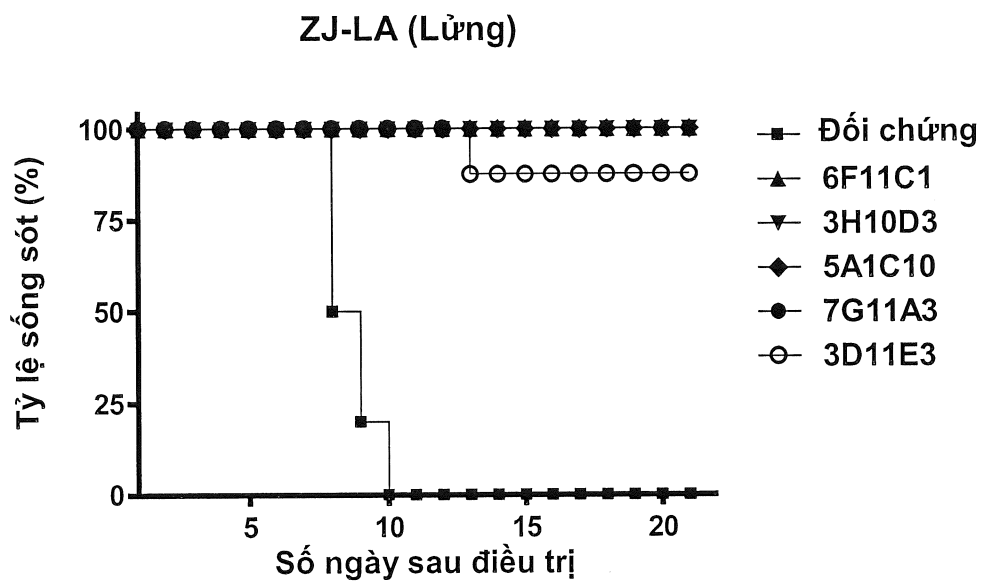


FIG.5A

Gắn kết cạnh tranh của 3D11E3-HRP với glycoprotein RV

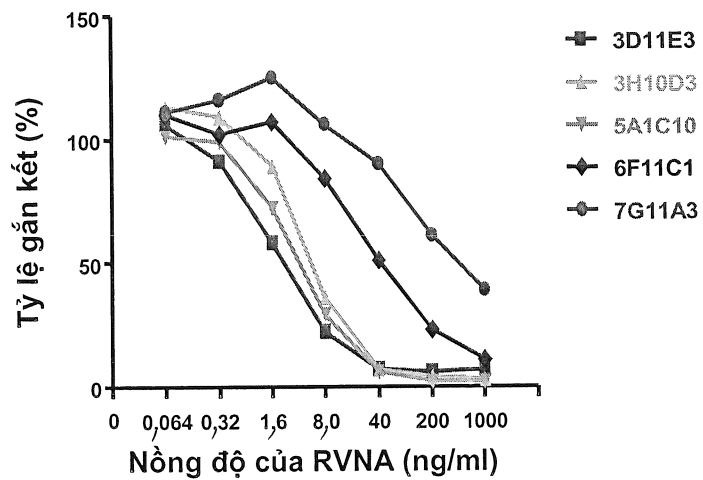


FIG.5B

Gắn kết cạnh tranh của 3D11E3-HRP với glycoprotein RV

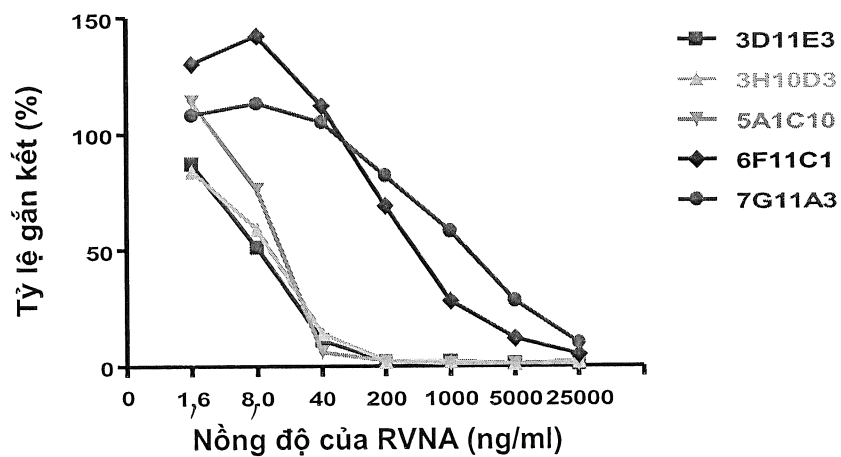


FIG.5C

Gắn kết cạnh tranh của 3D11E3-HRP với glycoprotein RV

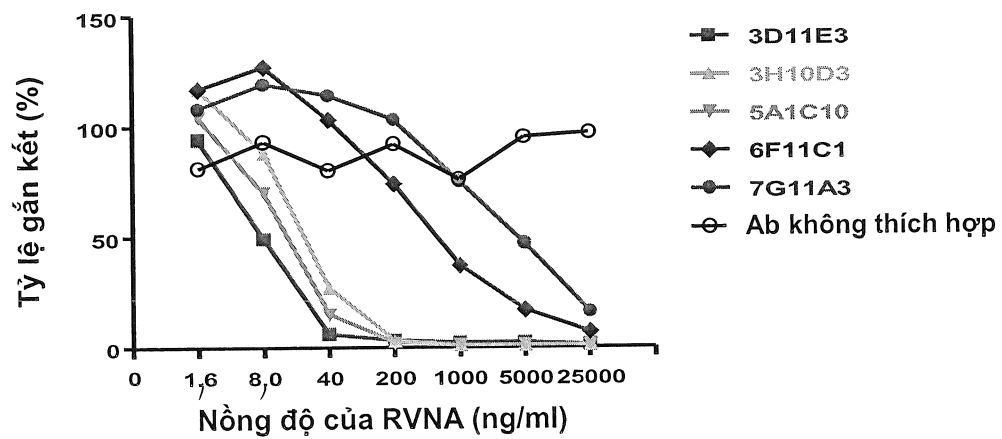


FIG.5D

Gắn kết cạnh tranh của 3H10D3-HRP với glycoprotein RV

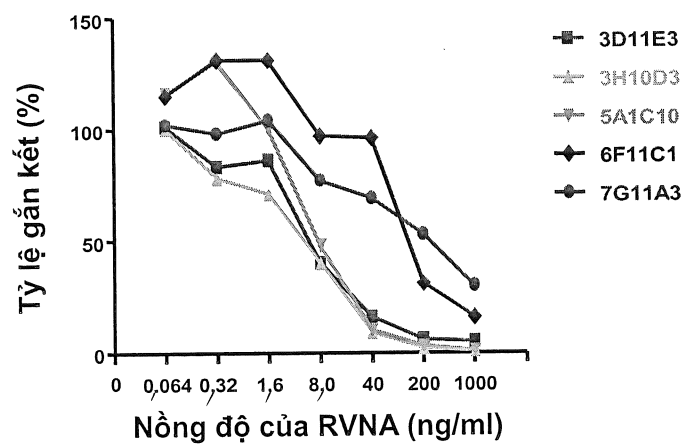


FIG.5E

Gắn kết cạnh tranh của 3H10D3-HRP với glycoprotein RV

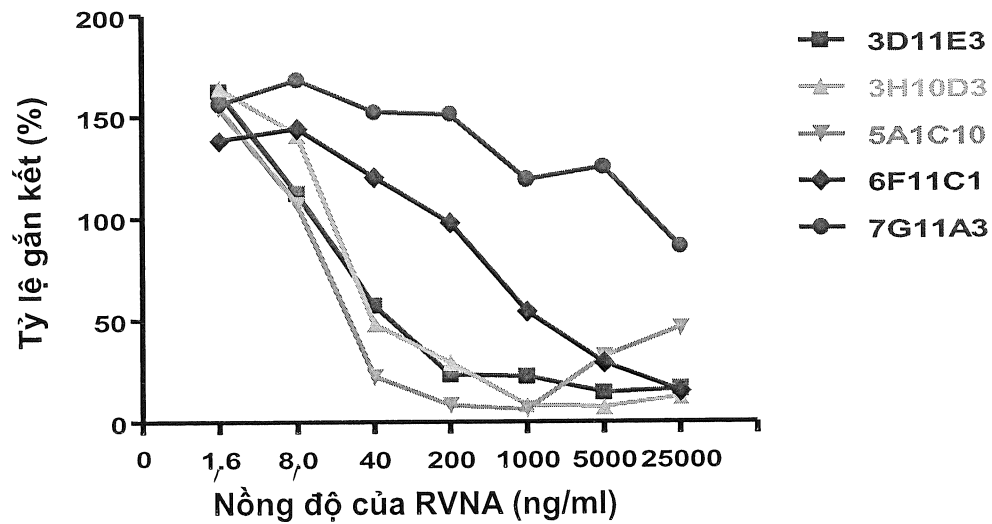


FIG.5F

Gắn kết cạnh tranh của 3H10D3-HRP với glycoprotein RV

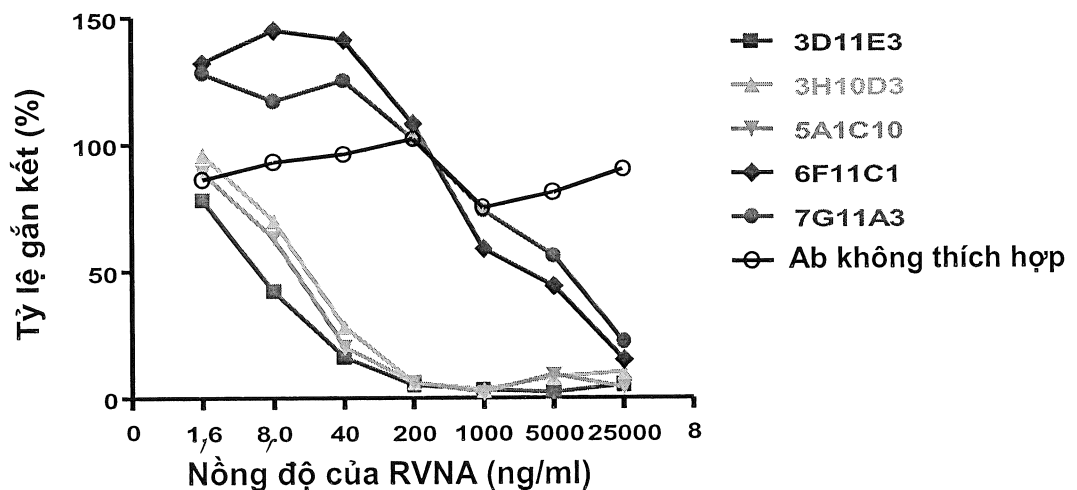


FIG.5G

Gắn kết cạnh tranh của 5A1C10-HRP với glycoprotein RV

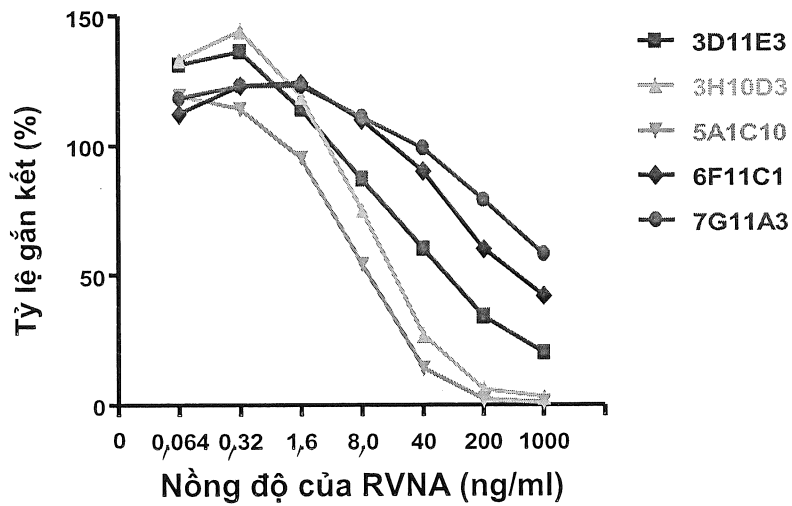


FIG.5H

Gắn kết cạnh tranh của 5A1C10-HRP với glycoprotein RV

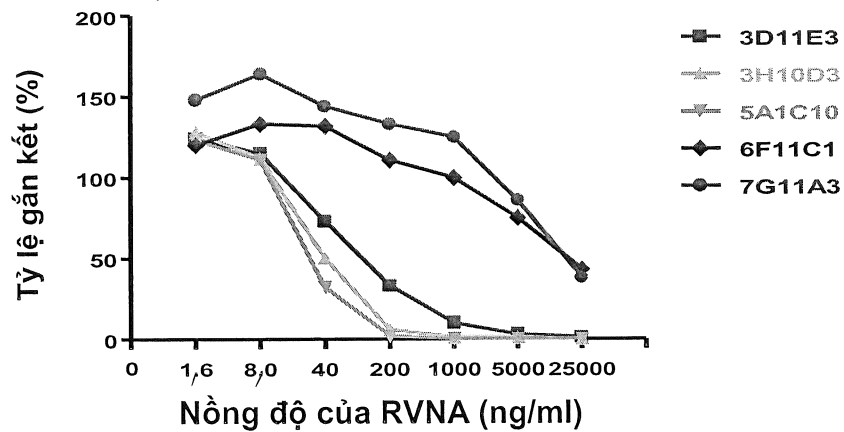


FIG.5I

Gắn kết cạnh tranh của 5A1C10-HRP với glycoprotein RV

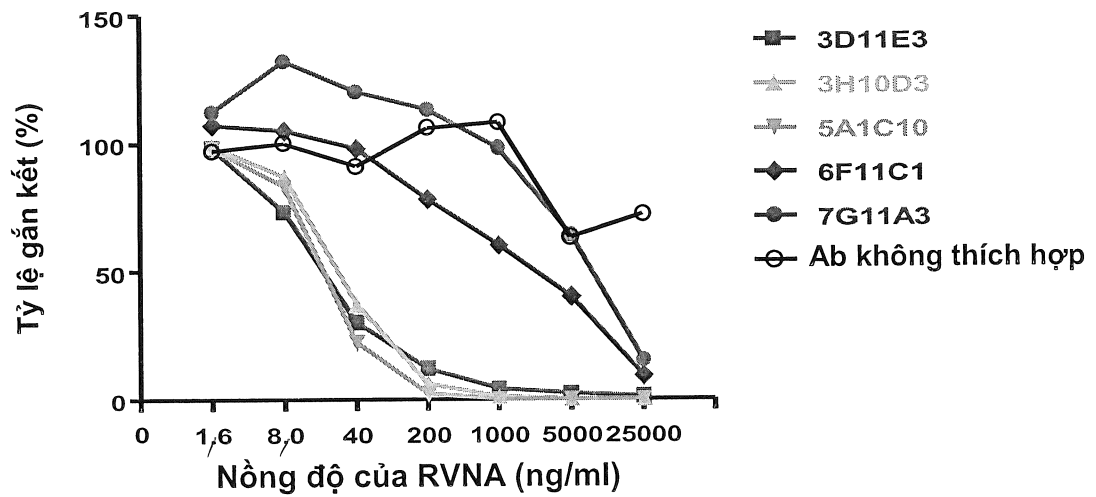


FIG.5J

Gắn kết cạnh tranh của 6F11C1-HRP với glycoprotein RV

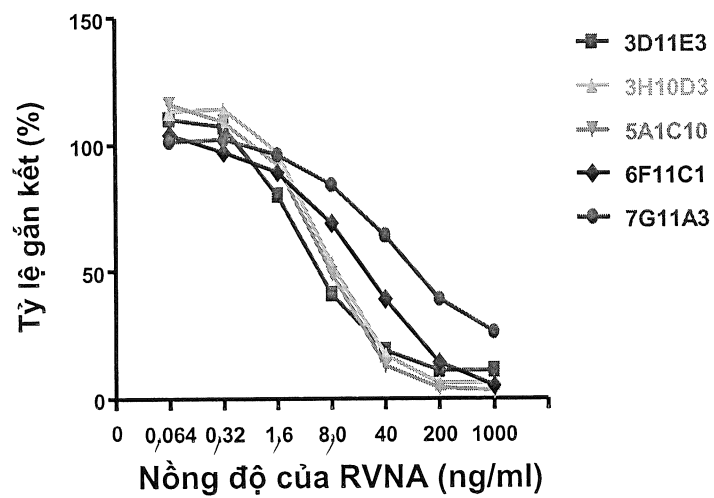


FIG.5K

Gắn kết cạnh tranh của 6F11C1-HRP với glycoprotein RV

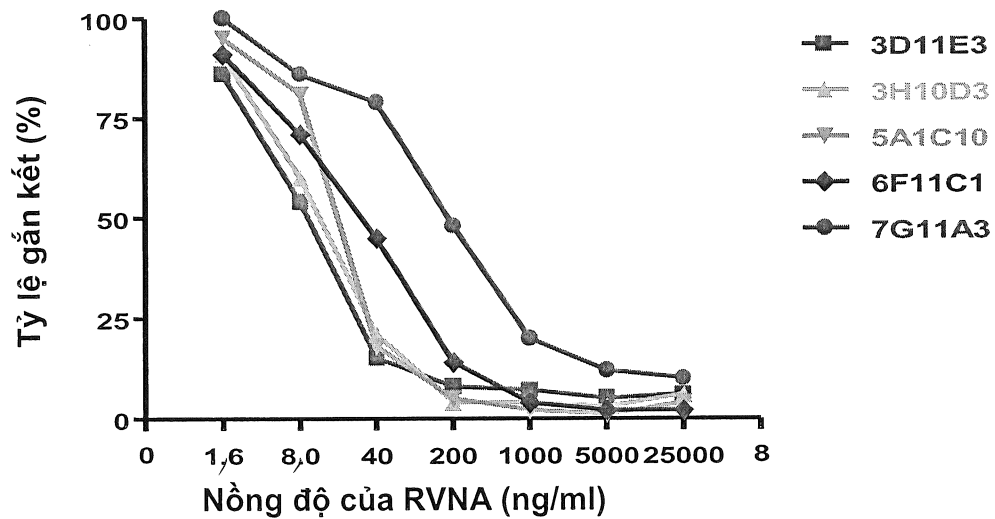


FIG.5L

Gắn kết cạnh tranh của 6F11C1-HRP với glycoprotein RV

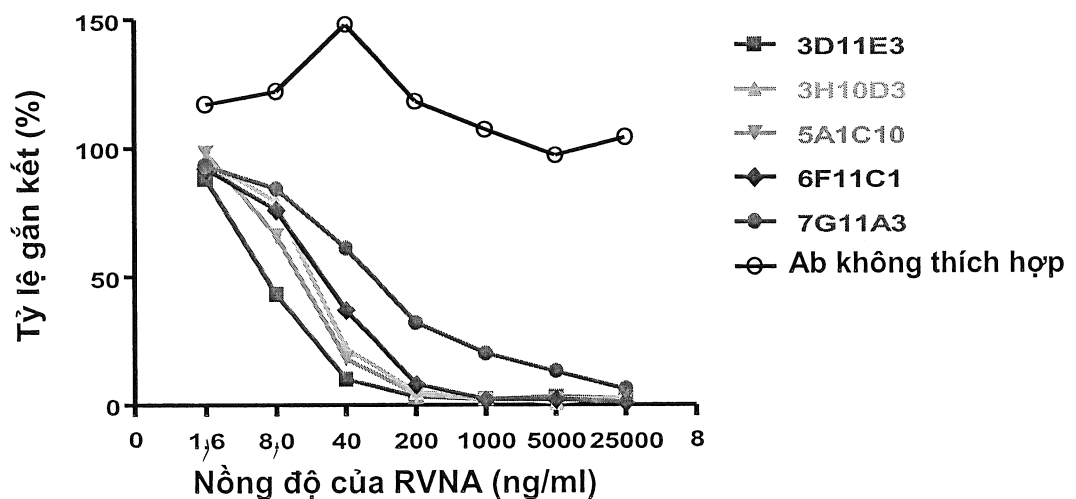


FIG.5M

Gắn kết cạnh tranh của 7G11A3-HRP với glycoprotein RV

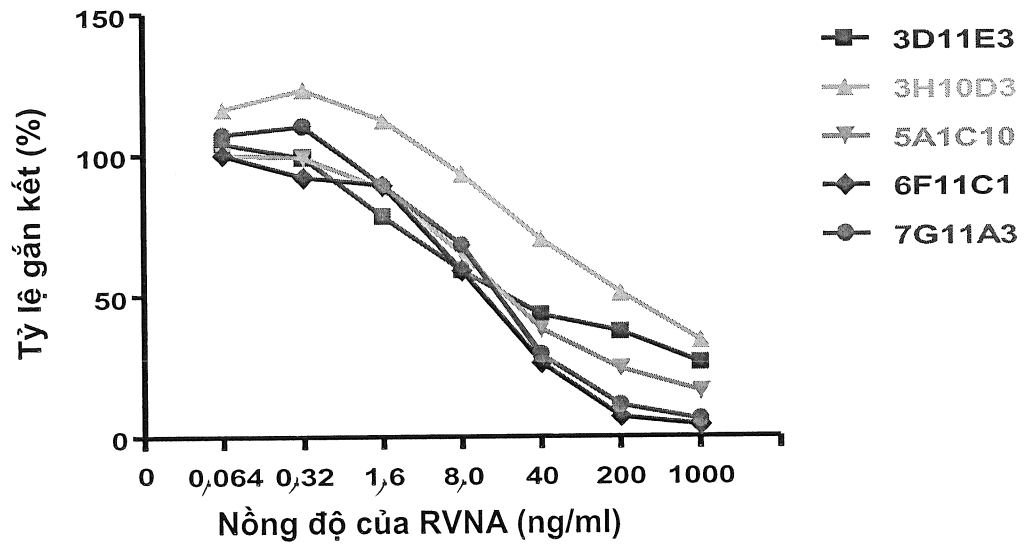


FIG.5N

Gắn kết cạnh tranh của 7G11A3-HRP với glycoprotein RV

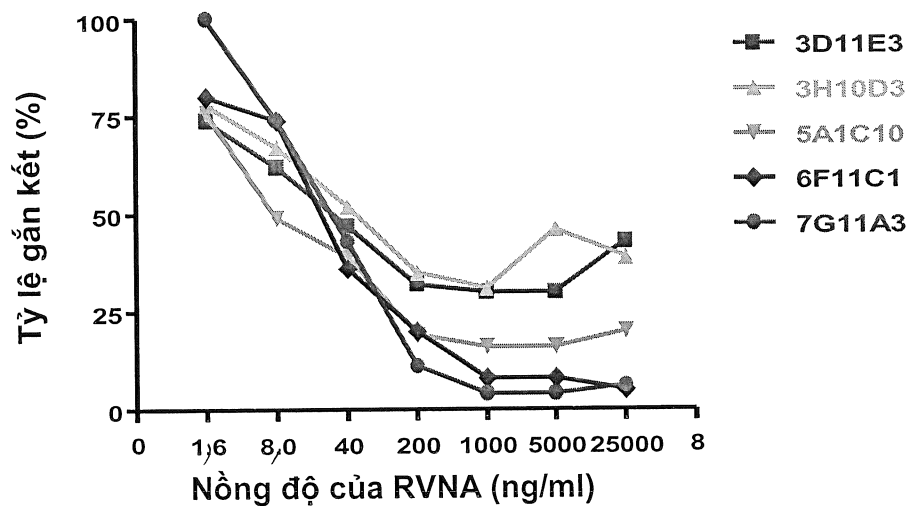


FIG.50

Gắn kết cạnh tranh của 7G11A3-HRP với glycoprotein RV

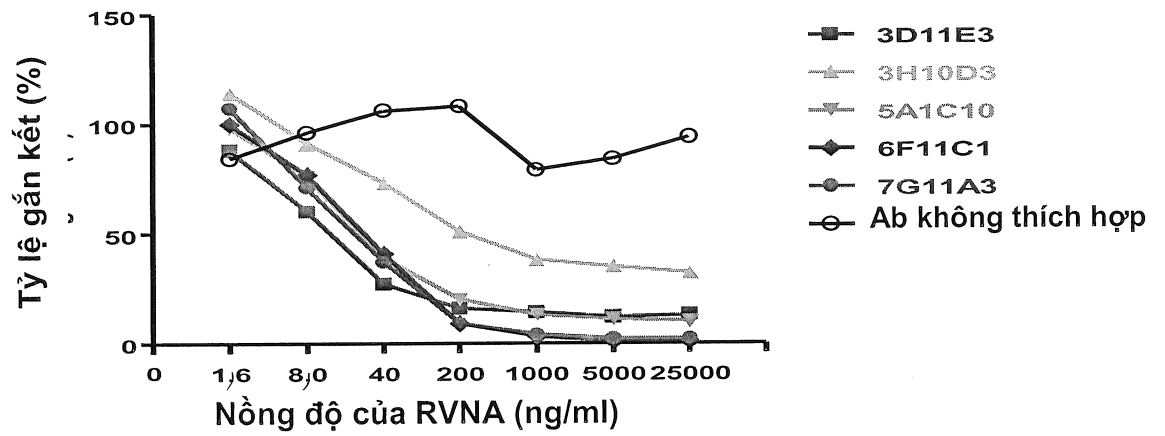


FIG.6A

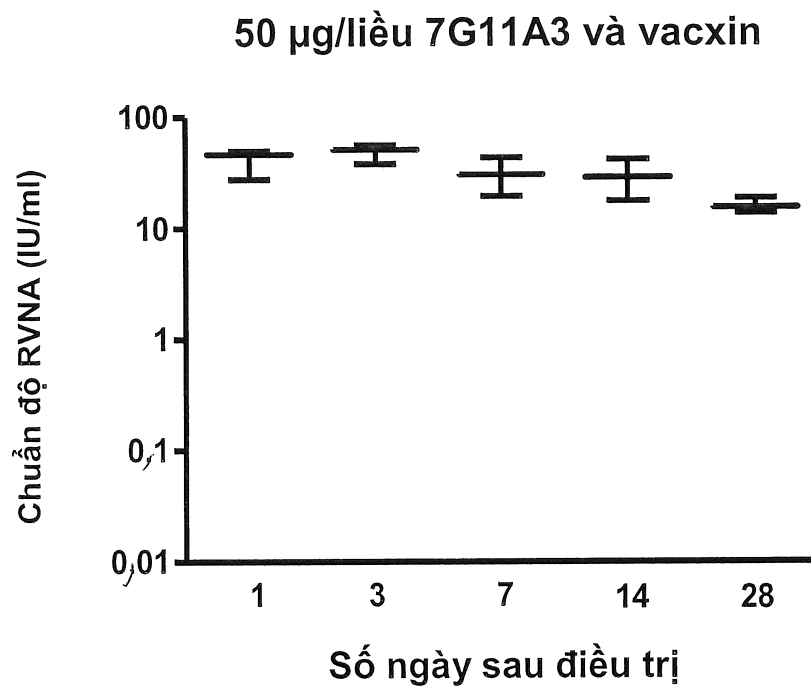


FIG.6B

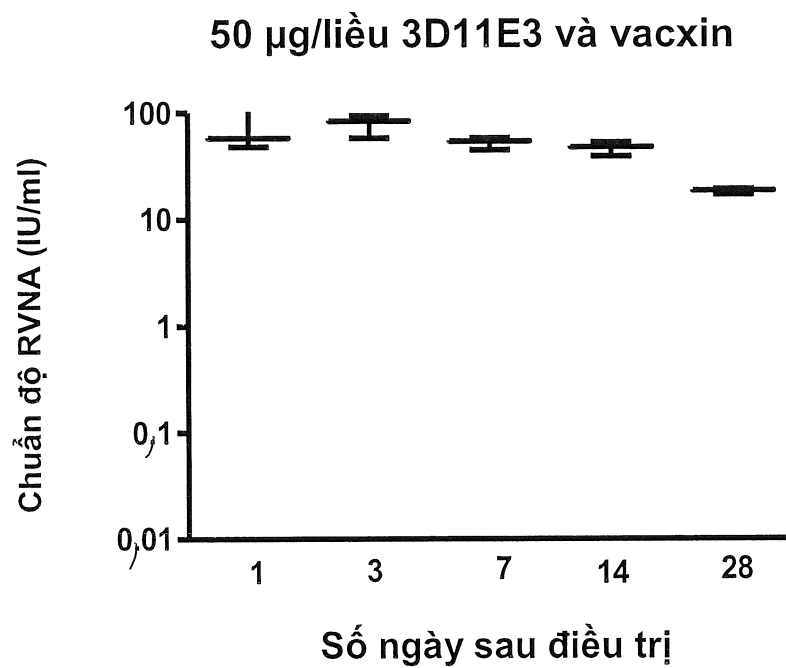


FIG.6C

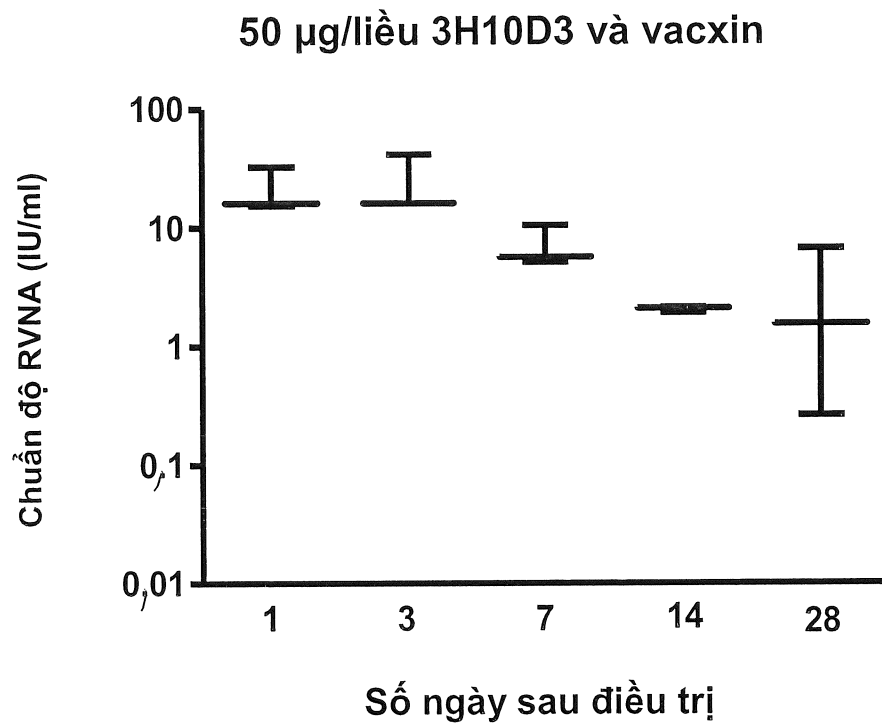


FIG.6D

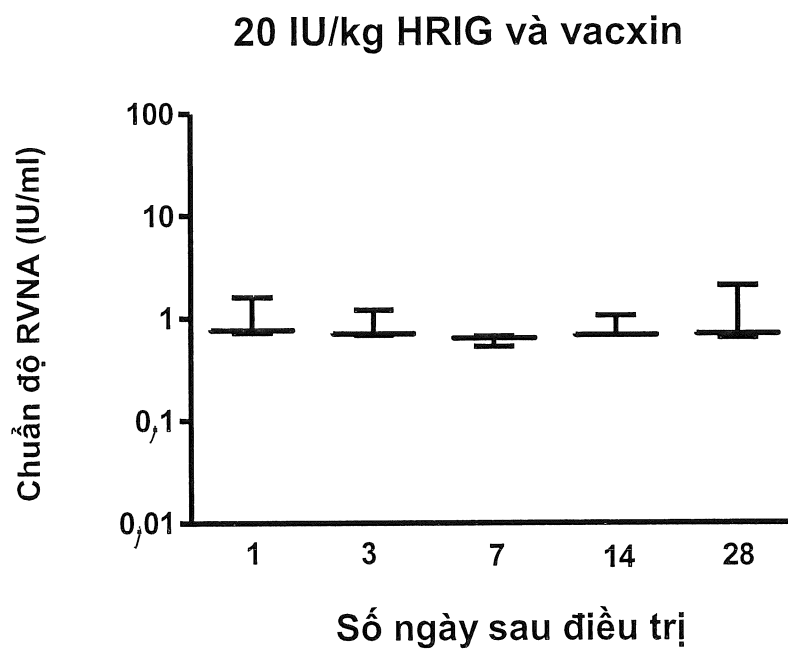


FIG.6E

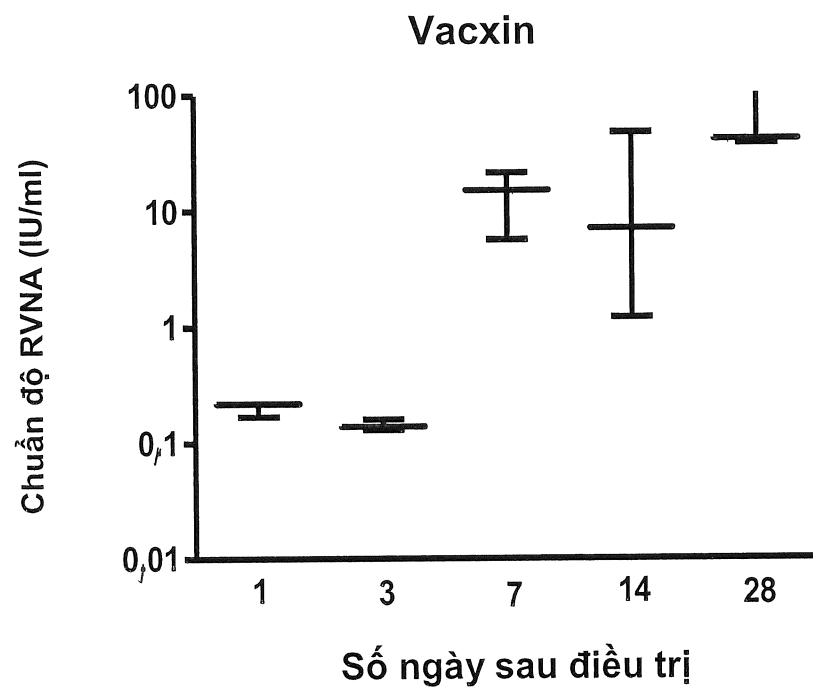


FIG.7

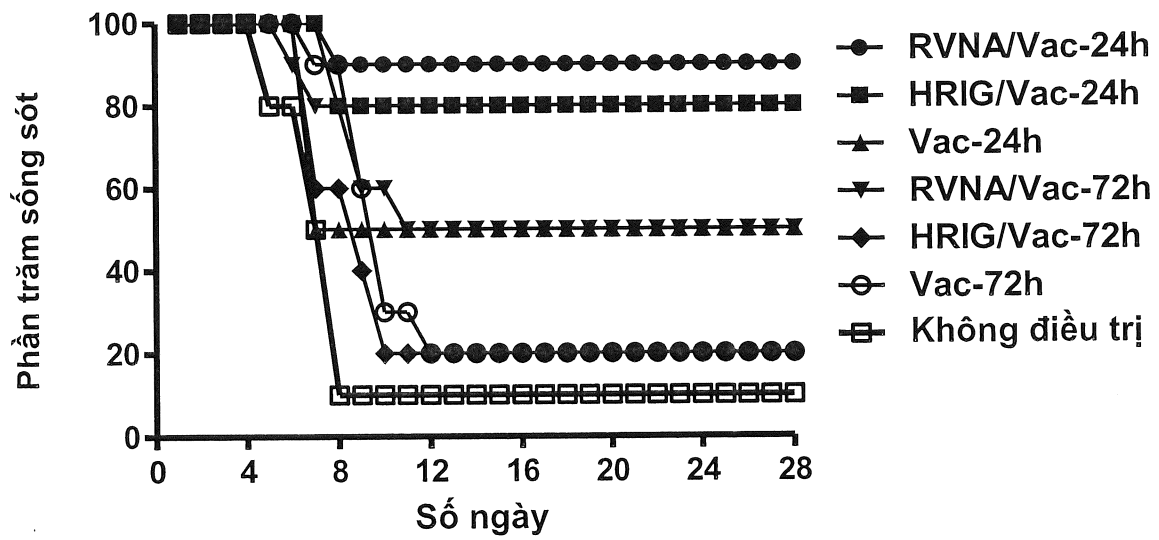


FIG.8

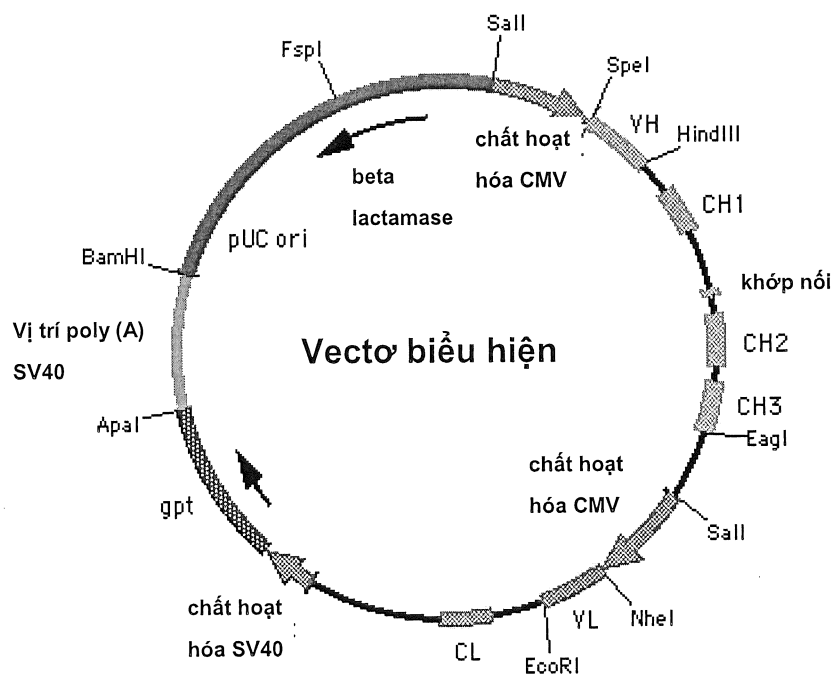


FIG.9

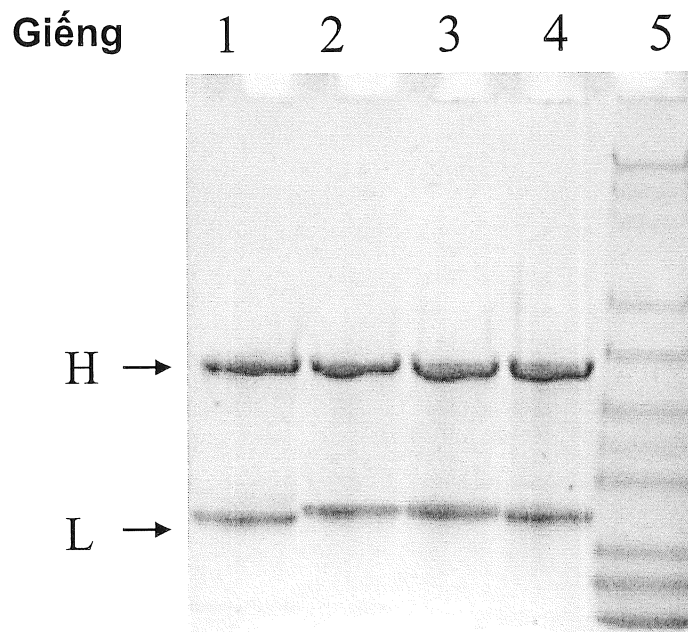


FIG.10

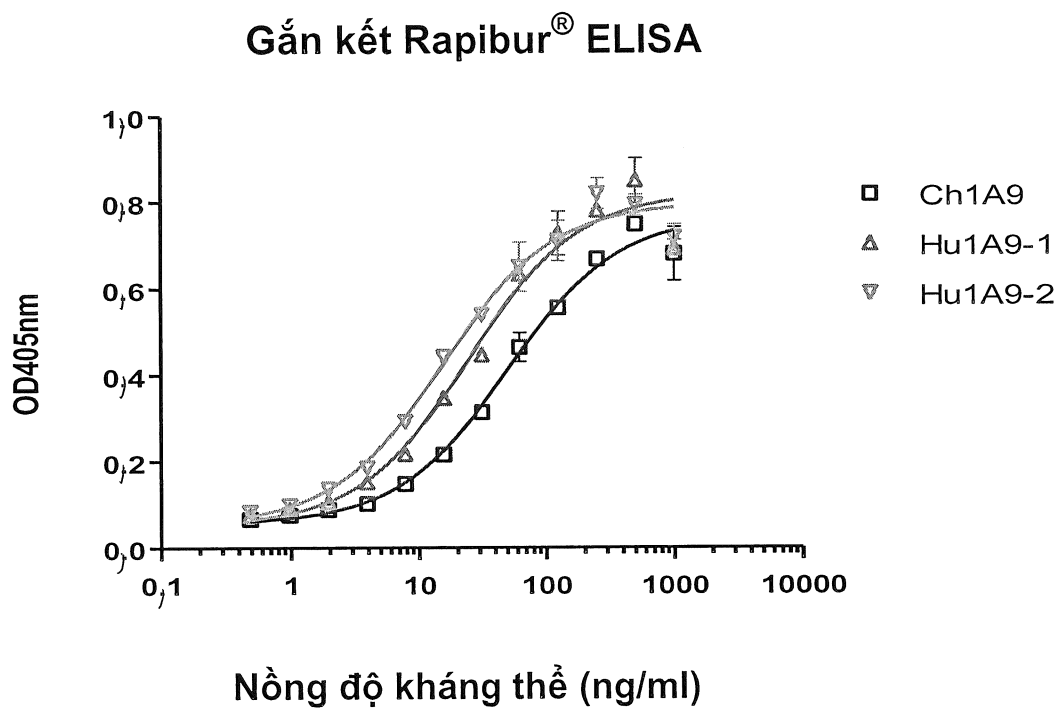


FIG.11

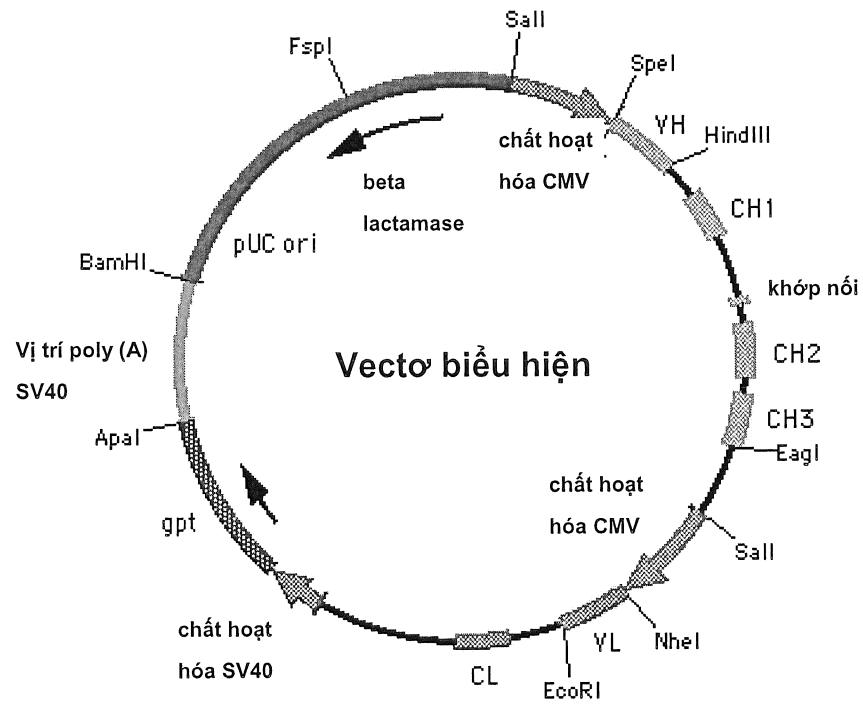


FIG.12

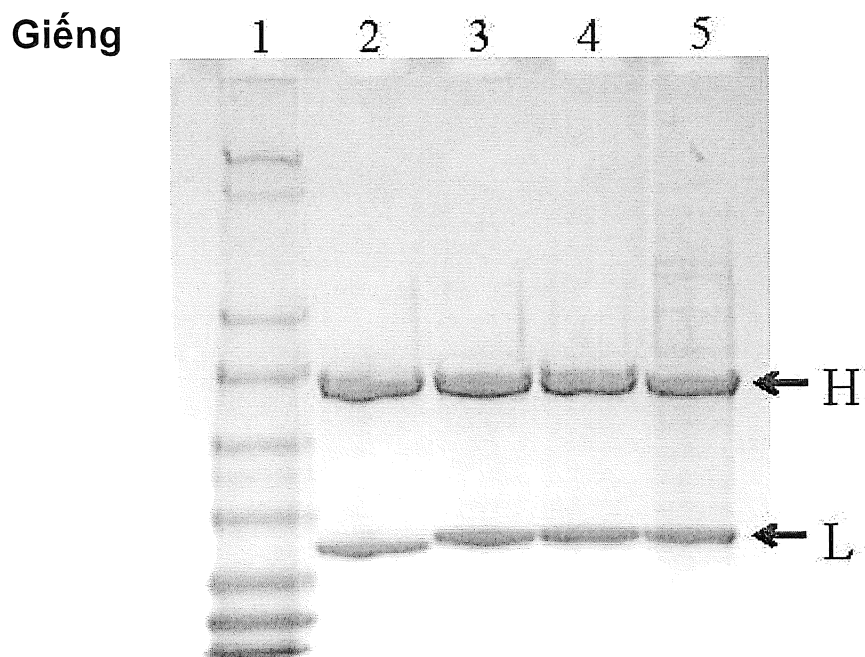


FIG.13

Gắn kết của 7G11A3 1H5 với Rapibur®

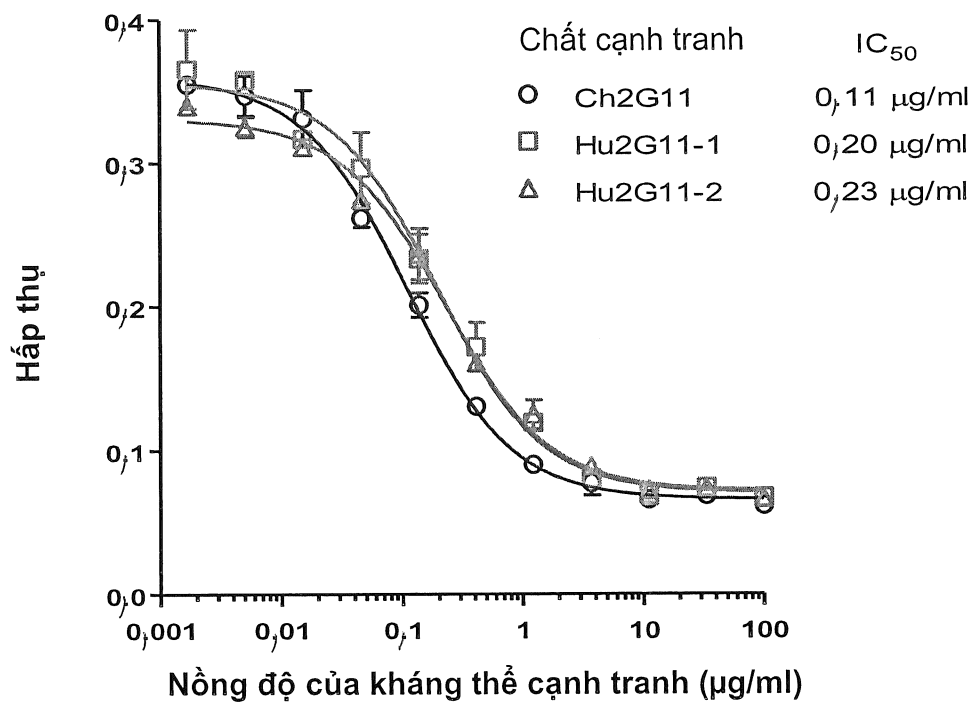


FIG.14A

Phủ bằng 2,5 µg/ml kháng thể

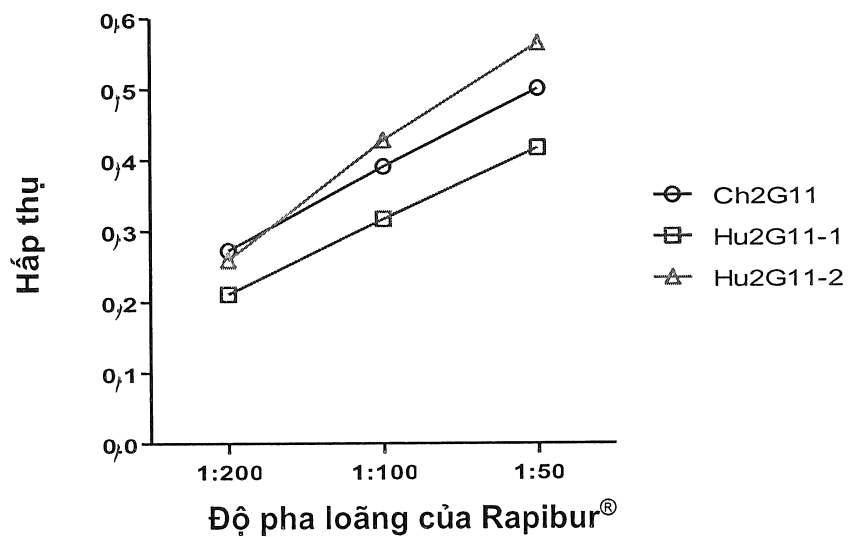


FIG.14B

Phủ bằng 1 µg/ml kháng thể

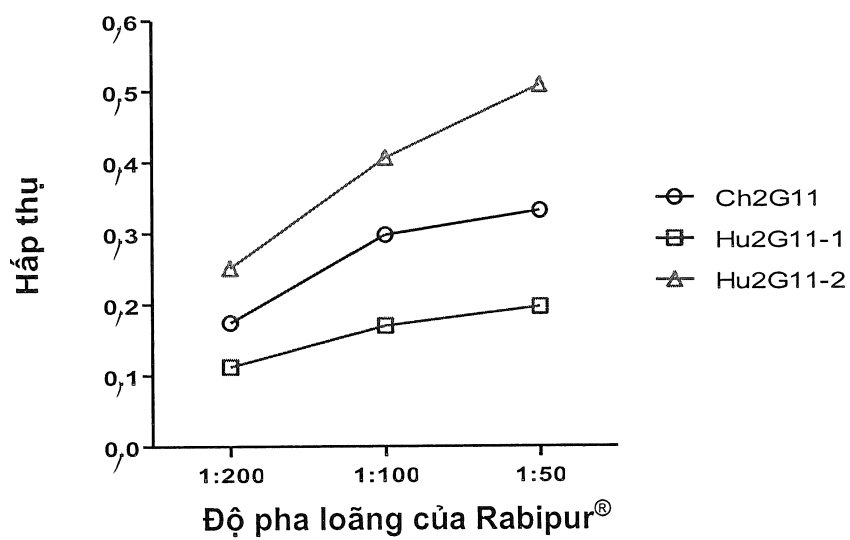


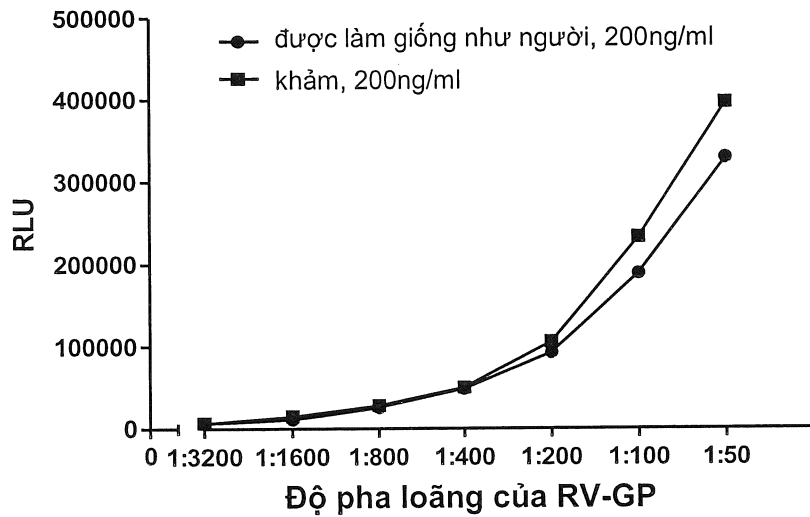
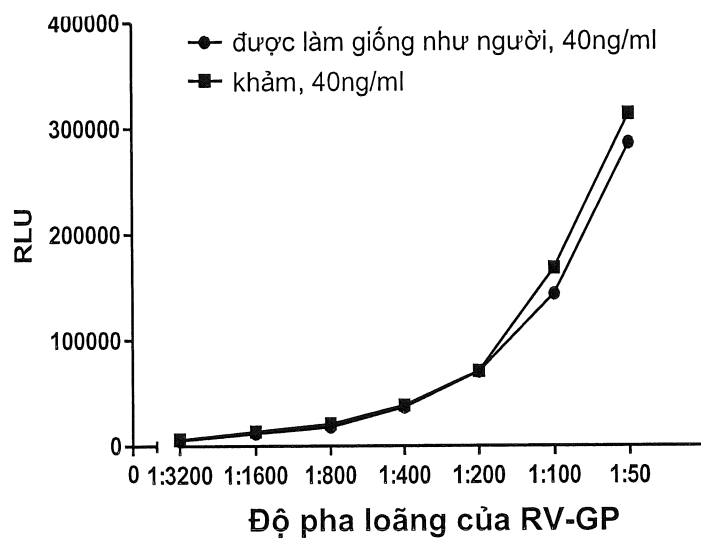
FIG.15A**Hoạt tính bắt giữ của 7G11A32G11****FIG.15B****Hoạt tính bắt giữ của 7G11A32G11**

FIG.15C

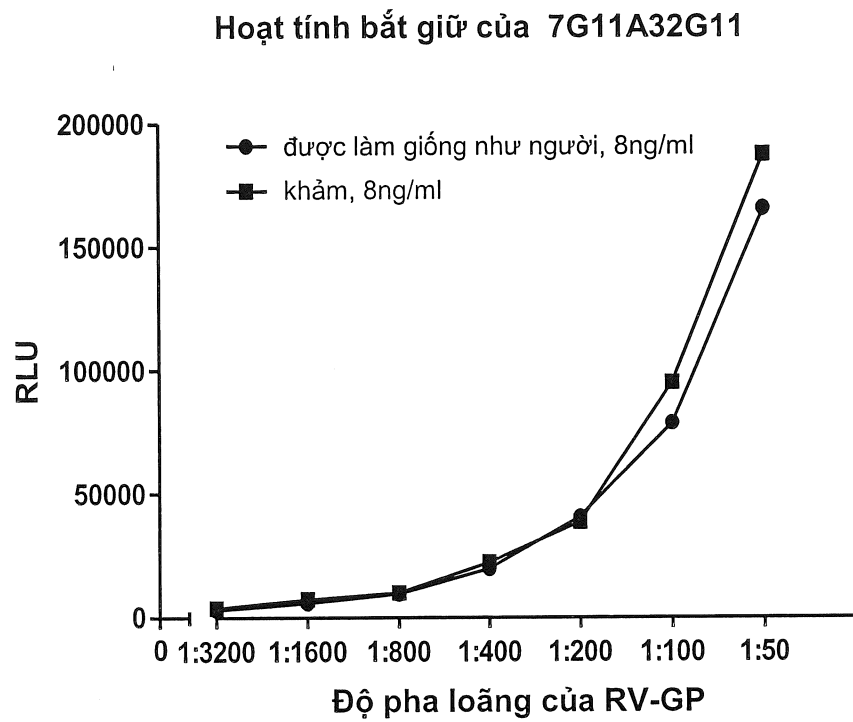


FIG.15D

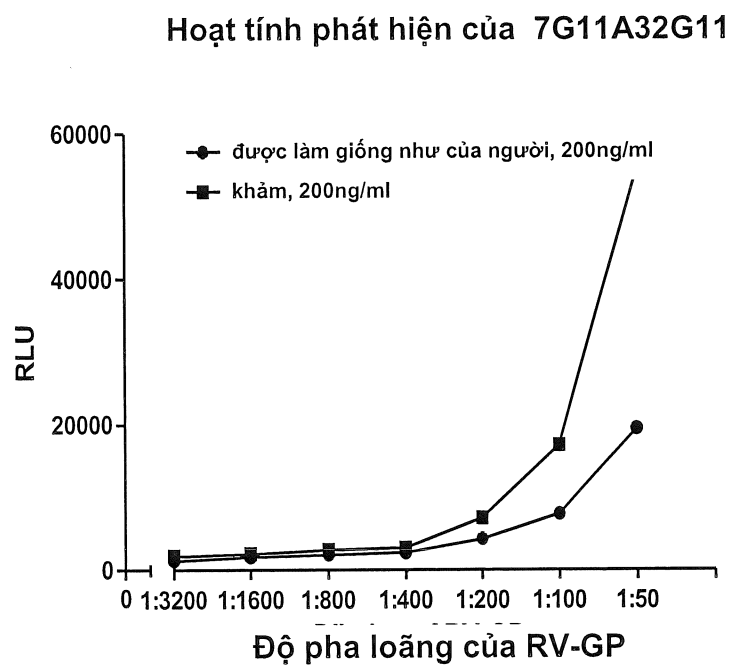
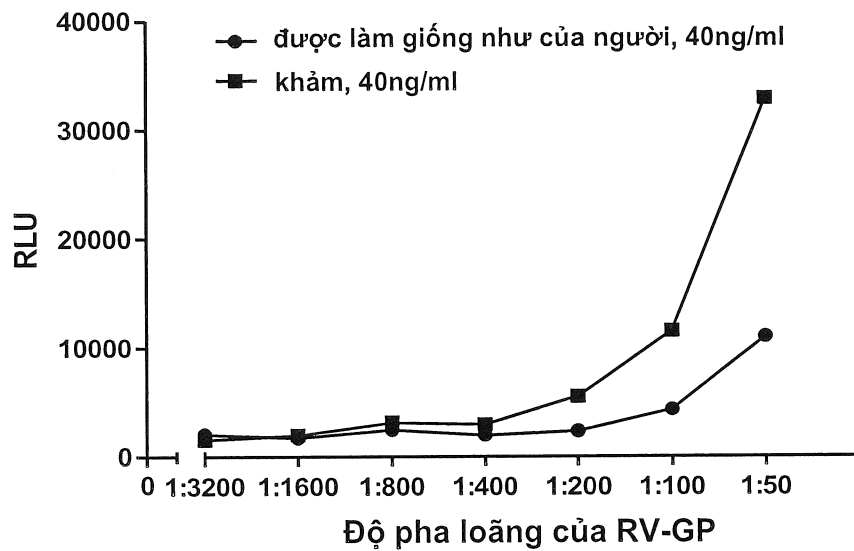


FIG.15E

Hoạt tính phát hiện của 7G11A32G11

**FIG.15F**

Hoạt tính phát hiện của 7G11A32G11

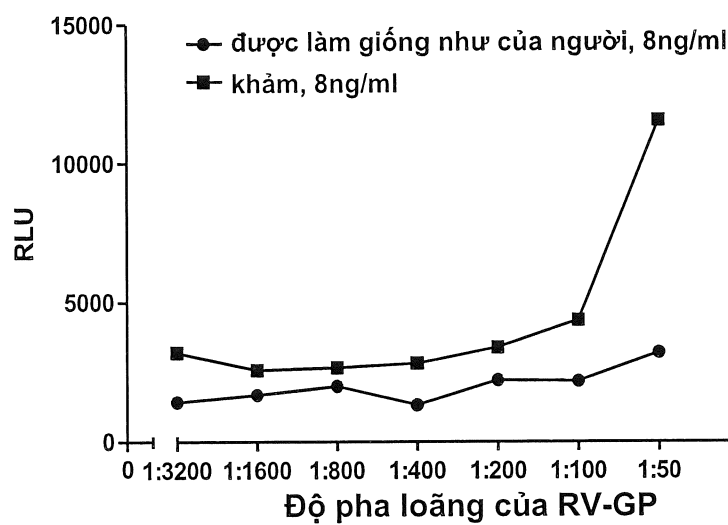
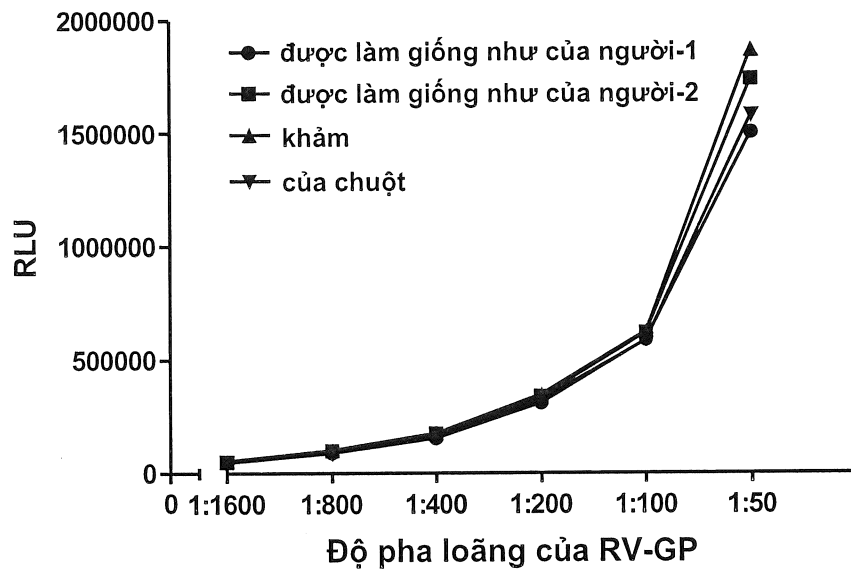


FIG.16A

Hoạt tính bắt giữ của 3D11E31A9, 2000ng/ml

**FIG.16B**

Hoạt tính bắt giữ của 3D11E31A9, 1000ng/ml

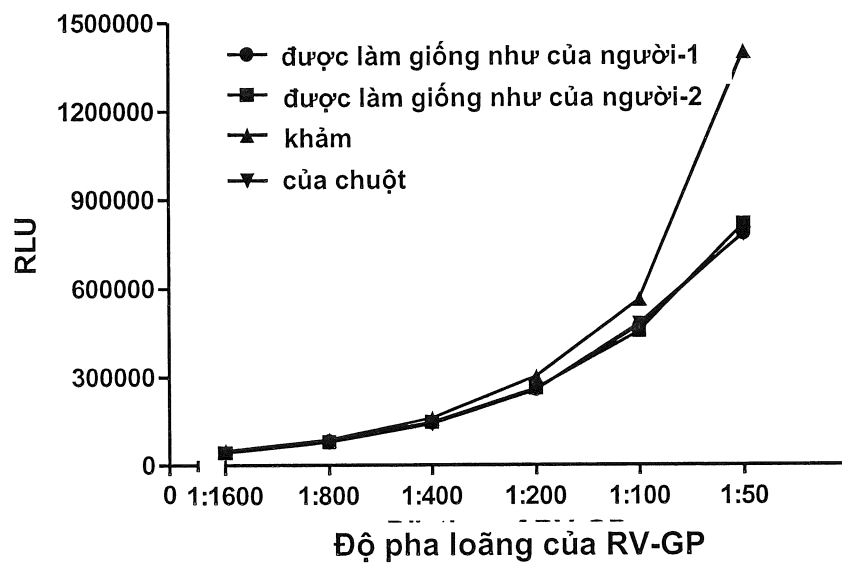


FIG.16C

Hoạt tính bắt giữ của 3D11E31A9, 500ng/ml

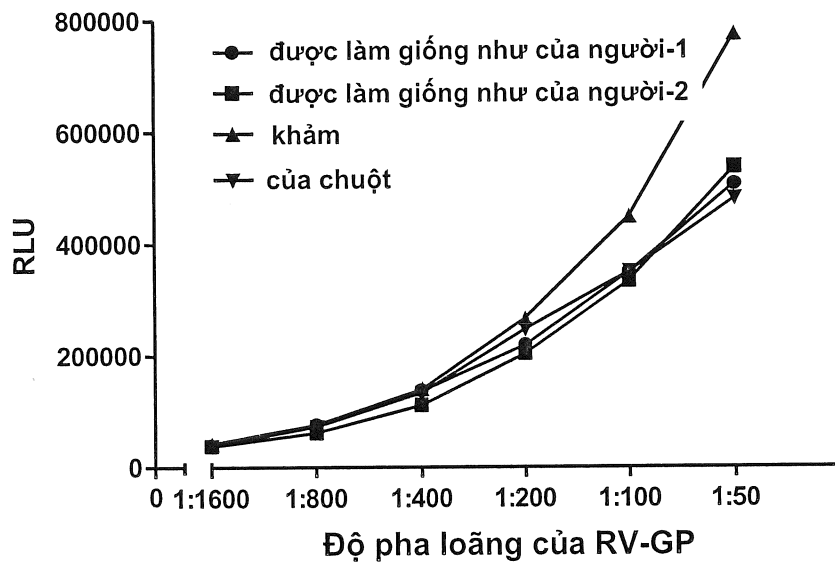


FIG.16D

Hoạt tính bắt giữ của 3D11E31A9, 250ng/ml

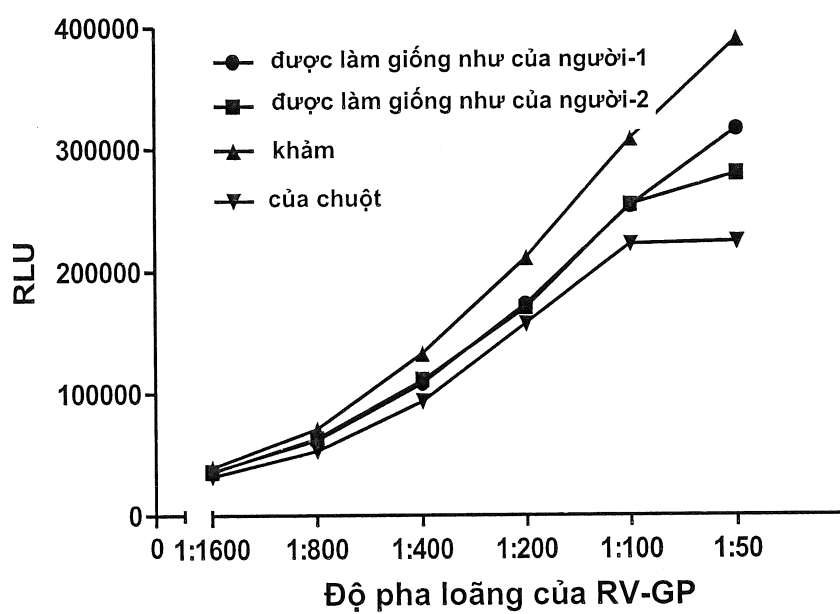


FIG.16E

Hoạt tính bắt giữ của 3D11E31A9, 125ng/ml

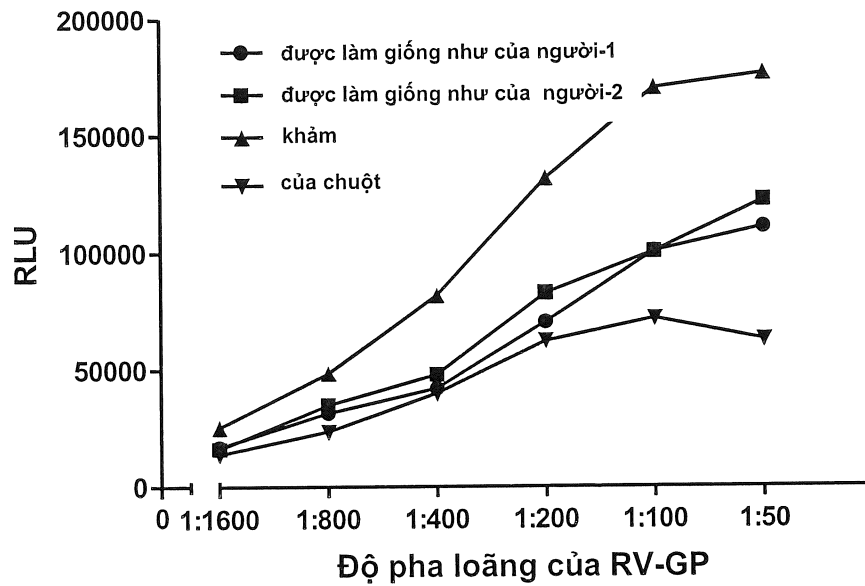


FIG.16F

Hoạt tính phát hiện của 3D11E31A9, 2000ng/ml

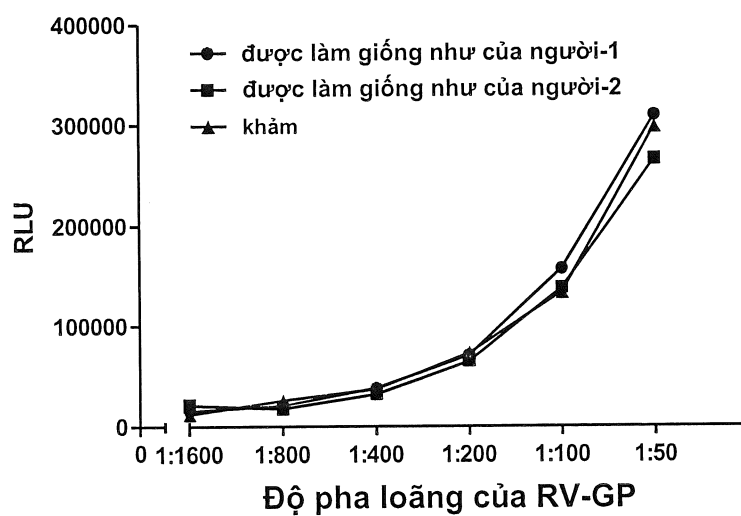


FIG.16G

Hoạt tính phát hiện của 3D11E31A9, 400ng/ml

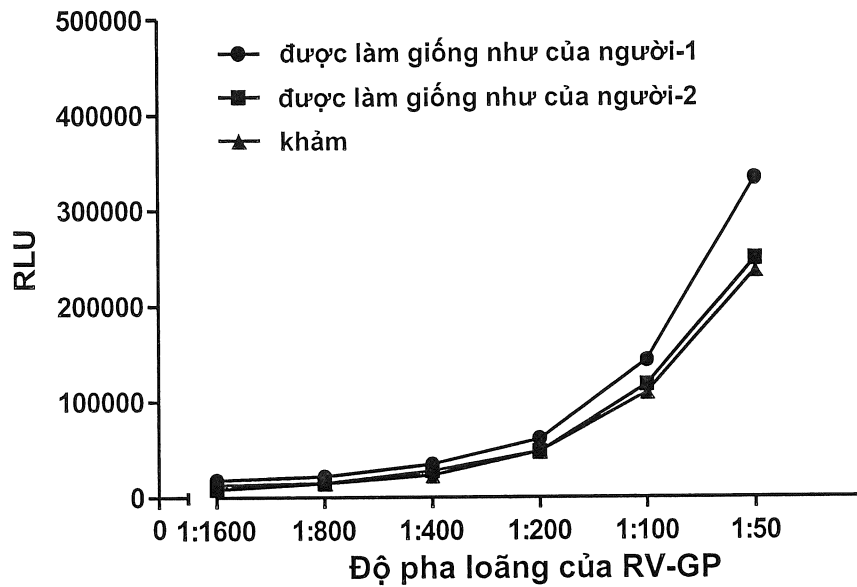


FIG.16H

Hoạt tính phát hiện của 3D11E31A9, 80ng/ml

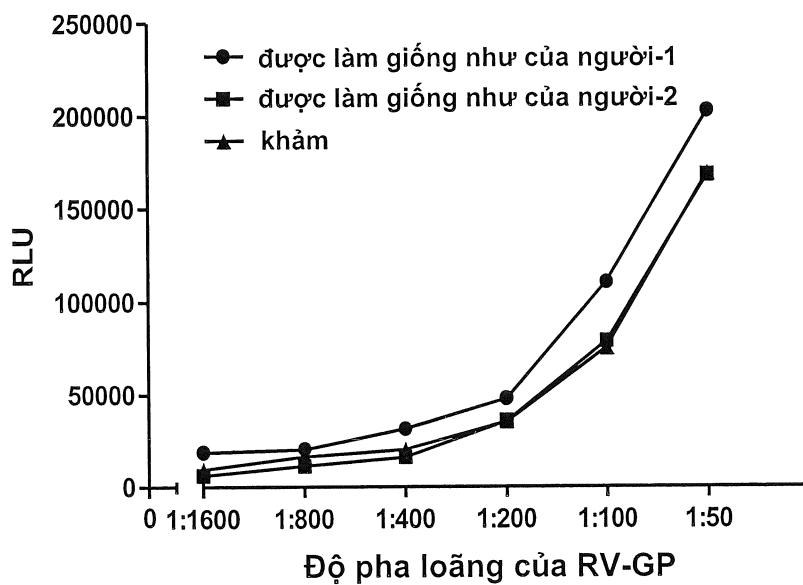


FIG.16I

Hoạt tính phát hiện của 3D11E31A9, 16ng/ml

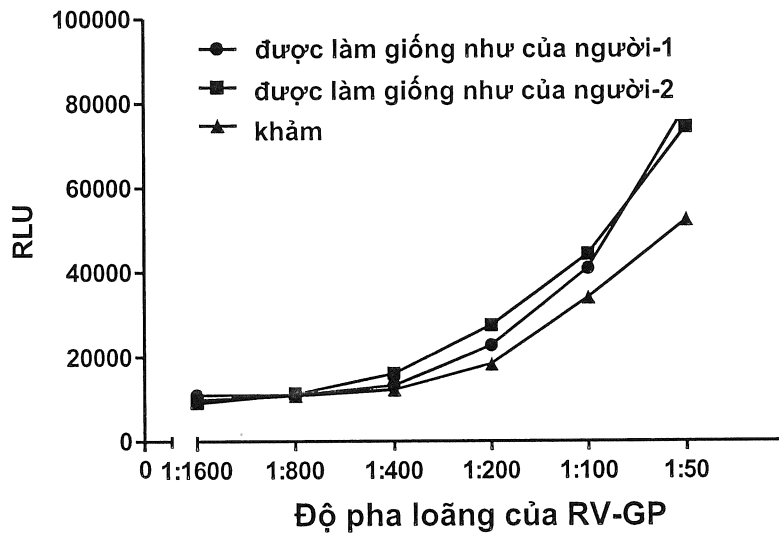


FIG.16J

Hoạt tính phát hiện của 3D11E31A9, 3,2ng/ml

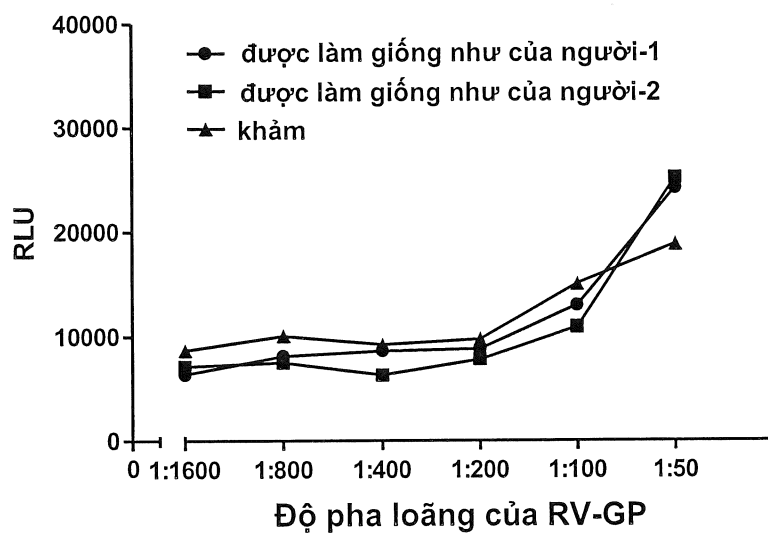


FIG.17A

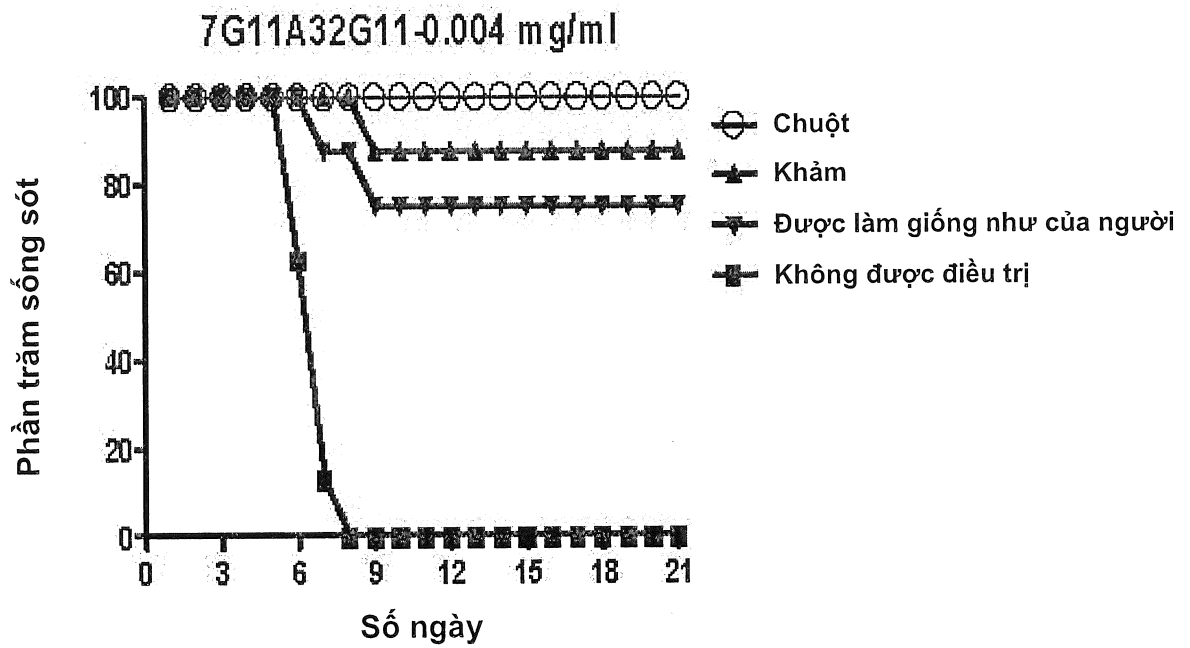


FIG.17B

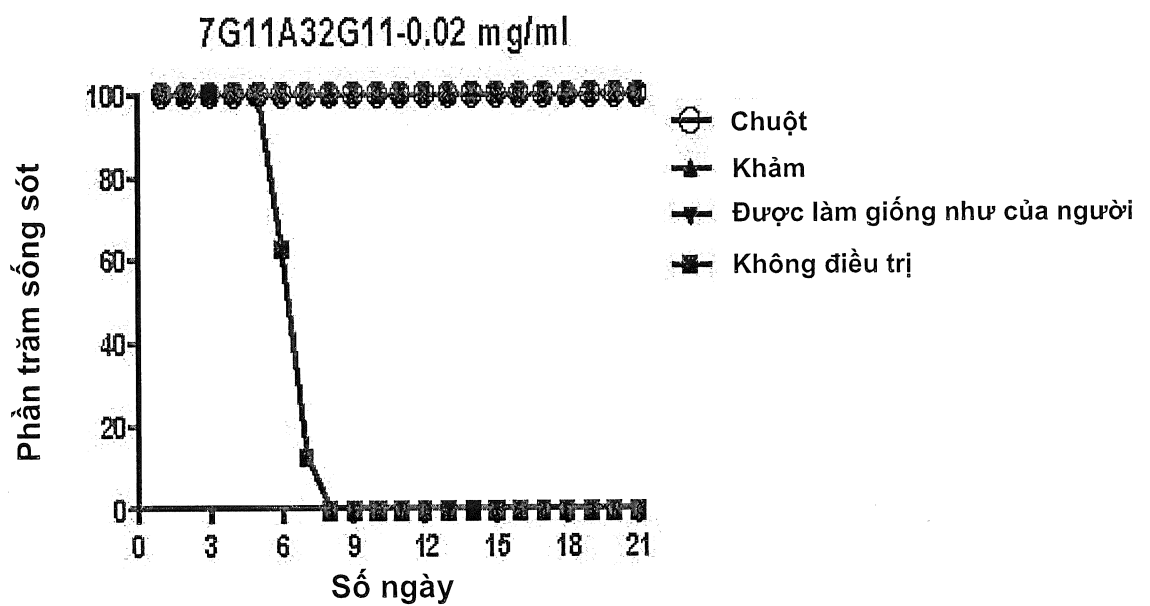


FIG.17C

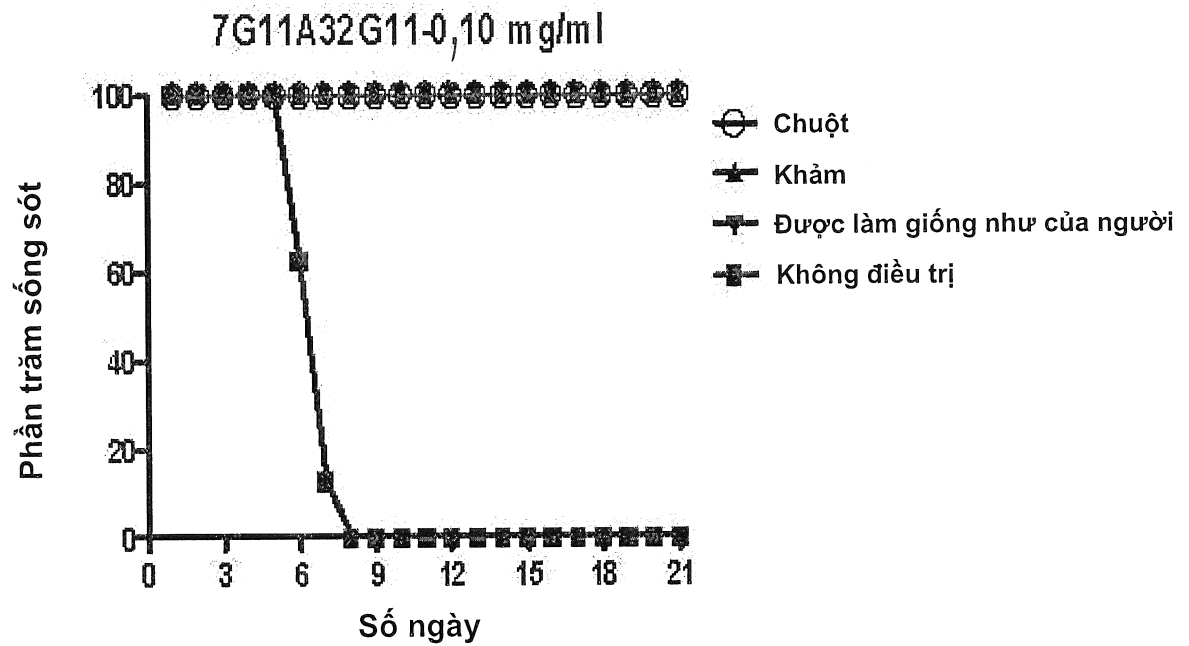


FIG.17D

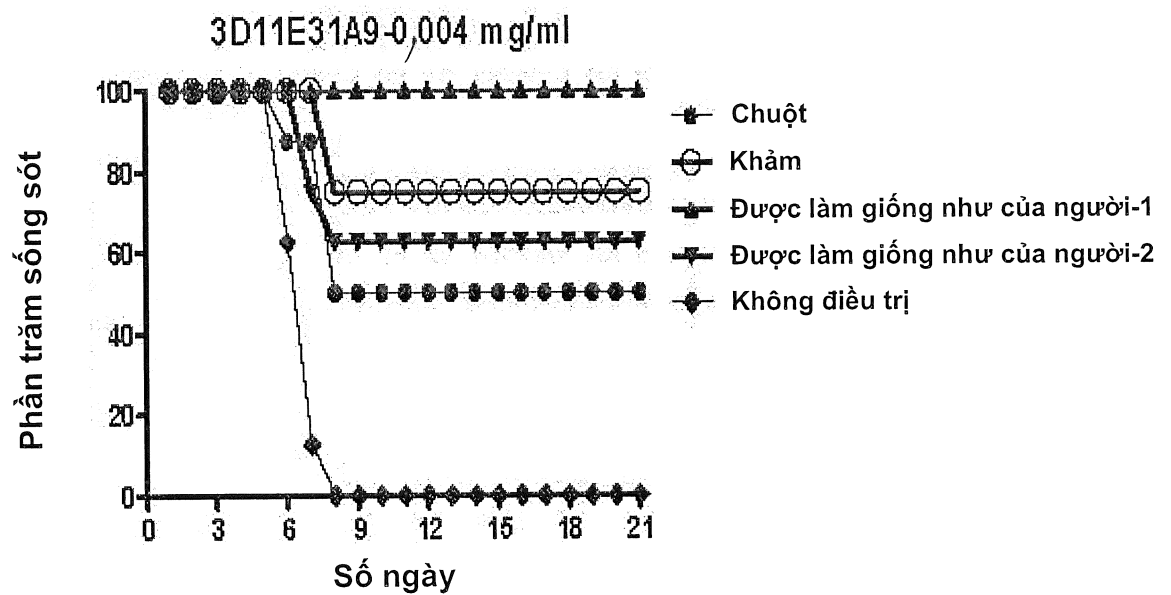


FIG.17E

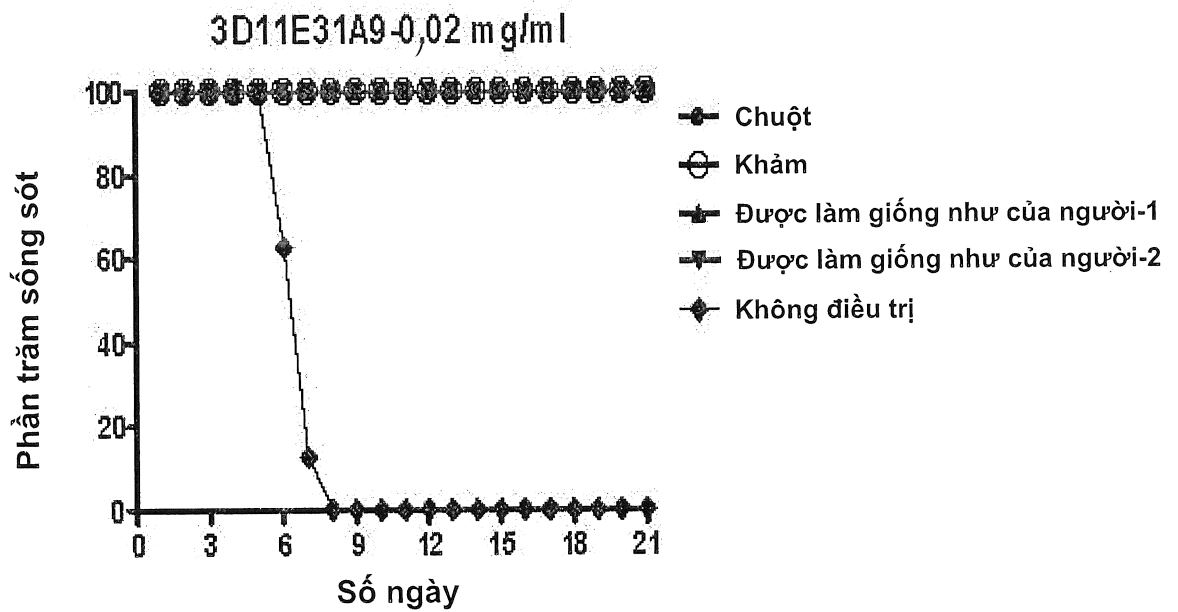


FIG.17F

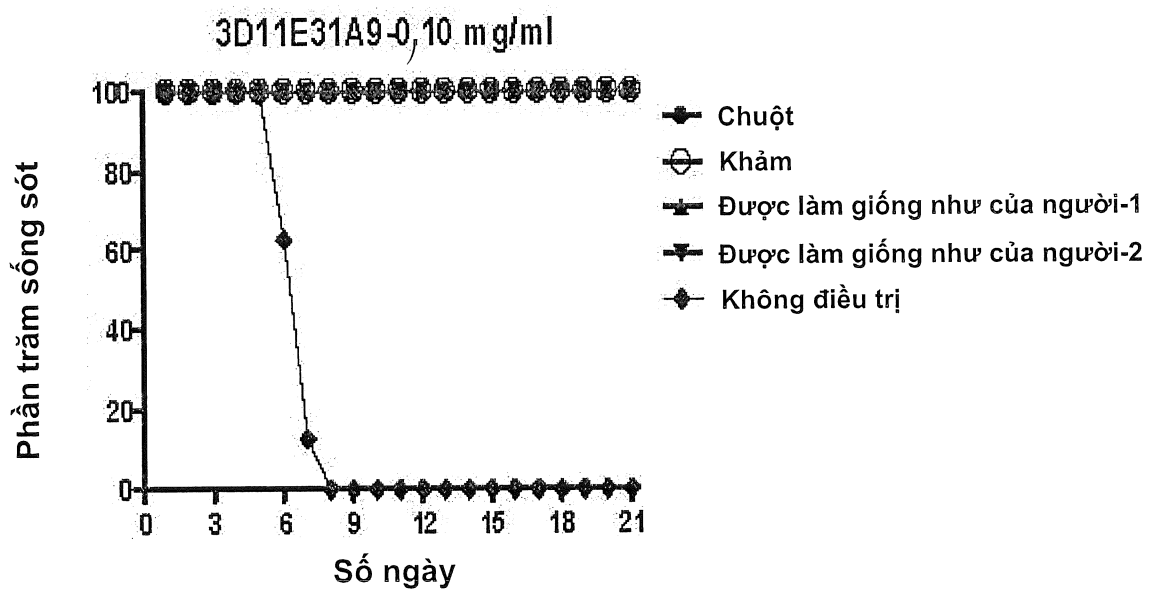


FIG.18A

Bảo vệ sau phơi nhiễm của 7G11A32G11 của chuột, thể khảm và được làm giống như của người trong chuột đồng Syria

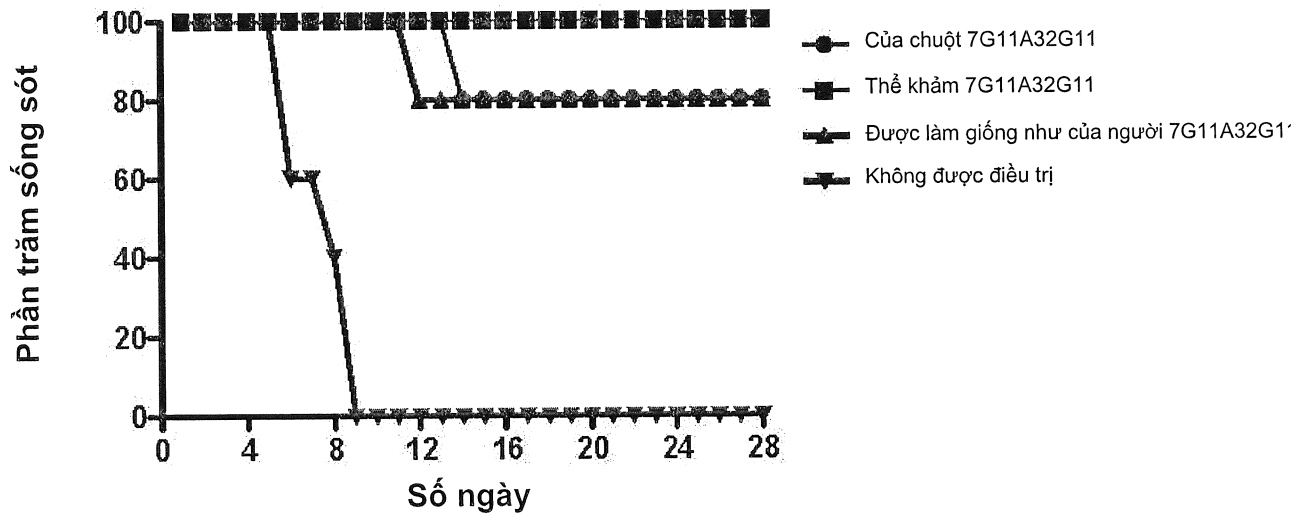


FIG.18B

Bảo vệ sau phơi nhiễm của 3D11E31A9 của chuột, thể khảm và được làm giống như của người trong chuột đồng Syria

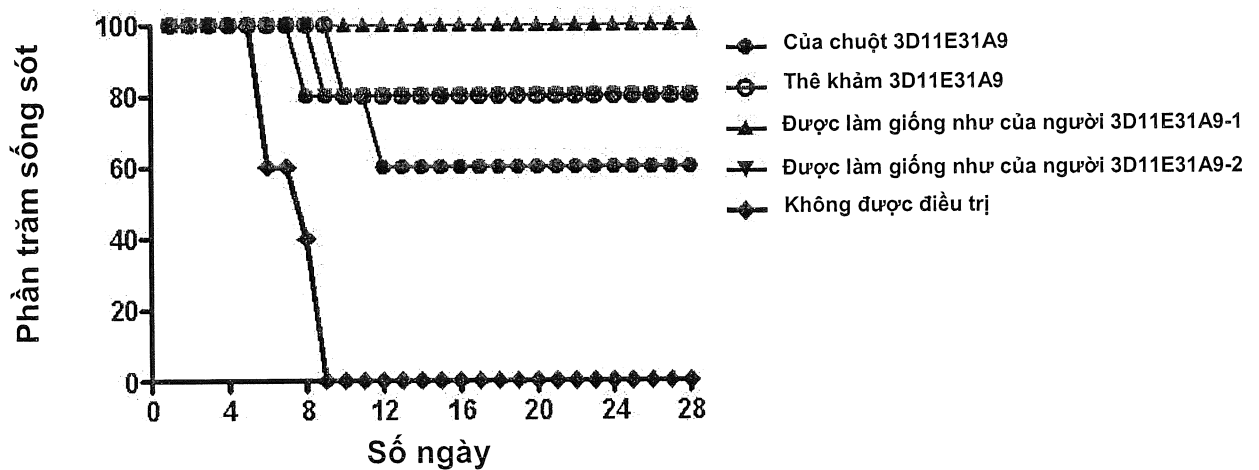


FIG.19

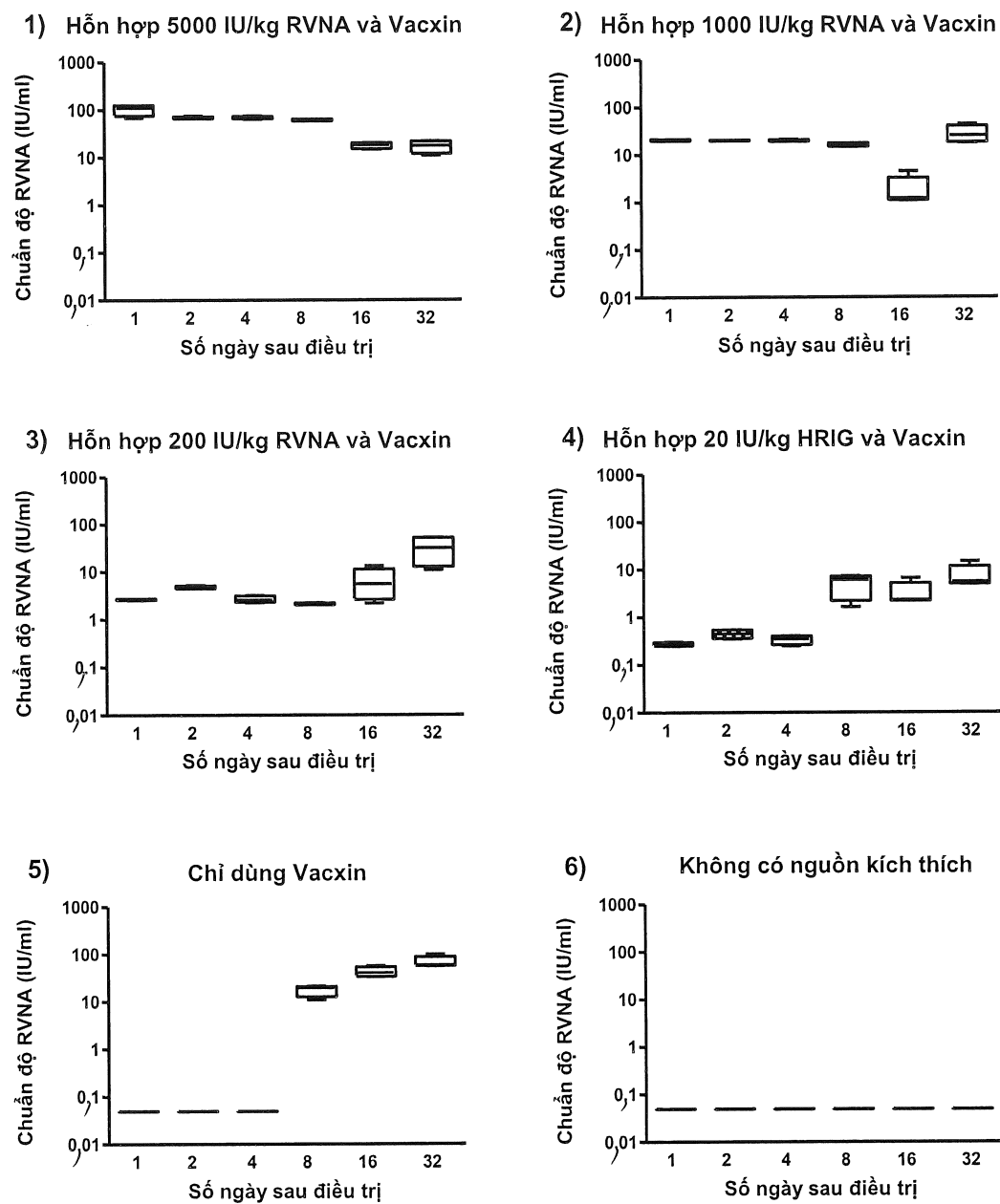
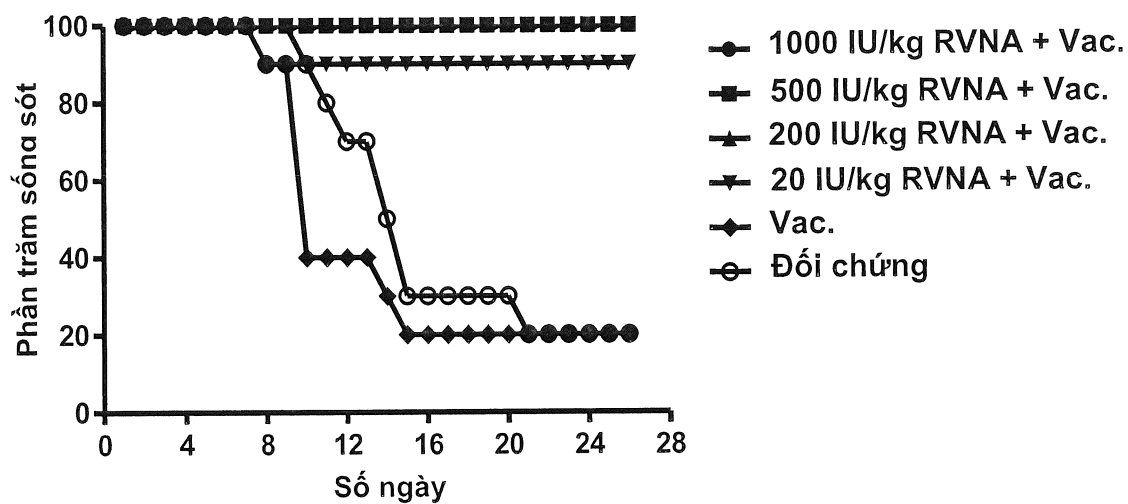


FIG.20

So sánh sau phơi nhiễm của hỗn hợp RVNA và HRIG, với Vacxin trong chuột đồng Syria



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Mountgate innoTech (HK) Limited

<120> KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP, DƯỢC PHẨM VÀ KIT ĐỂ PHÒNG NGỪA VÀ ĐIỀU TRỊ BỆNH ĐẠI CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 090871-0113

<160> 67

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Mọi tổng hợp

<400> 1

gccagtggat agaccgatgg

20

<210> 2

<211> 16

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Mọi tổng hợp

<400> 2

acagtcactg agctgc

16

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Mọi tổng hợp

<400> 3

gatggataca gttggtgcag c

21

<210> 4
 <211> 420
 <212> ADN
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 4
 atgggaggga tctggatctt tctcttctc ctgtcaggaa ctgcaggtgc ccactctgag 60
 atccagctgc agcagactgg acctgagctg gtgaagcctg gggcttcagt gaagatatcc 120
 tgcaaggctt ctggttattc attcactgac tacatcatgc tctgggtgaa gcagagccat 180
 ggaaagagcc ttgagtggat tggagatatt tctcttact atggtagtac tagctacaat 240
 ctgaagtca agggcaaggc cacattgact gtagacaaat cttccagcac agcctacatg 300
 cagctcaaca gtctgacatc tgaggactct gcagctctatt actgtgcaag gcagggcgagg 360
 gatggttaact acgtctctt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctctca 420

<210> 5
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 5

Met Gly Gly Ile Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

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

Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80

Leu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Gly Asp Gly Asn Tyr Val Leu Phe Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 6
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 6
 atggagtcac agactcaggt cttgtatac atgttgctgt gggtgtctgg tgttgatgga 60
 gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120
 gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actactgttg cctggatca acagaaacca 180
 ggacaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtcctgat 240
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcaa tgtgcagtct 300
 gaagacttgg cagaatattt ctgtcagcaa tataacagct atccattcac gtccggctcg 360
 gggacaaaagt tggaaataaa a 381

<210> 7
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 7

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
 1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser
 20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
 35 40 45

Val Gly Thr Thr Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 50 55 60

Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn
 100 105 110

Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 8

<211> 33

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Mời tổng hợp

<400> 8

gcaactagta ccaccatggg agggatctgg atc

33

<210> 9

<211> 49

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Môi tổng hợp

<400> 9

gggaagcttg tttaaggac tcacctgagg agactgtgag agtgggtgcc 49

<210> 10

<211> 454

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Gen khảm

<400> 10

actagtacca ccatgggagg gatctggatc ttctcttcc tctgtcagg aactgcaggt 60

gcccactctg agatccagct gcagcagact ggacctgagc tgggaagcc tggggcttca 120

gtgaagatat cctgcaaggc ttctggttat tcattcactg actacatcat gctctgggtg 180

aagcagagcc atggaaagag ccttgagtgg attggagata ttatcctta ctatggtagt 240

actagctaca atctgaagtt caagggcaag gccacattga ctgtagacaa atcttccagc 300

acagcctaca tgcagctcaa cagtctgaca tctgaggact ctgcagtcta ttactgtgca 360

aggcagggcg gggatggtaa ctacgtctc tttgactact ggggccaagg caccactctc 420

acagtctcct caggtgagtc cttaaaca gctt 454

<210> 11

<211> 140

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Protein khảm

<400> 11

Met Gly Gly Ile Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

1

5

10

15

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

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

Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80

Leu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Gly Asp Gly Asn Tyr Val Leu Phe Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 12

<211> 33

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Mỗi tổng hợp

<400> 12

gctgctagca ccaccatgga gtcacagact cag

33

<210> 13

<211> 50

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Môi tổng hợp

<400> 13

ggggaattcg caaaagtcta cttacgtttt attccaact ttgtccccga 50

<210> 14

<211> 416

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Gen khảm

<400> 14

gctagcacca ccatggagtc acagactcag gtctttgtat acatgttgct gtggttgct 60

ggtgttgatg gagacattgt gatgaccag tctcaaaaat tcatgtccac atcagtagga 120

gacagggtca gcgtcacctg caaggccagt cagaatgtgg gtactactgt tgcctggat 180

caacagaaac caggacaatc tcctaaagca ctgatttact cggcacccta ccggtacagt 240

ggagtccttg atcgcttcac aggcagtgga tctgggacag atttactct caccatcagc 300

aatgtgcagt ctgaagactt ggcagaatat ttctgtcagc aatataacag ctatccattc 360

acgttcggct cggggacaaa gttggaata aaacgtaagt agactttgc gaattc 416

<210> 15

<211> 127

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Protein khảm

<400> 15

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser

1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser
20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
35 40 45

Val Gly Thr Thr Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn
100 105 110

Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 16

<211> 455

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Gen được làm giống như của người

<400> 16

actagtacca ccatggactg gacctggagg atcctctttt tgggtggcagc agccacaggt 60

gccactccc aggtccagct tgtgcagtct ggggctgaag tgaaaaagcc tggggcctca 120

gtgaagggtt cctgcaaggc ttctggatac tcattcactg actatatcat gctttgggtg 180

cgccaggccc ctggacaaag gcttgagtgg attggagata tctatcctta ctatggcagt 240

acaagctata atctgaagtt caagggaag gccaccctca ccgtcgacac atccgcgagc 300

acagcctaca tggagctcag cagcctgaga tctgaagaca ccgctgtgta ttactgtgcc 360

aggcagggcg gcgatggaaa ctacgtctc tttgactact ggggccaggg aaccctggtc 420

accgtctcct caggtgagtc tgctgtacta agctt 455

<210> 17

<211> 140

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Protein được làm giống như của người

<400> 17

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Ile Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
65 70 75 80

Leu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Gly Asp Gly Asn Tyr Val Leu Phe Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 18
 <211> 416
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Gen được làm giống như của người

<400> 18
 gctagcacca ccatggagtc acagactcag gtctttgtgt acatgttgct gtggttgct 60
 ggtgttgatg gagacattca gatgaccag tctccatcct ccctgtccgc atcagtcgga 120
 gacagggtca ccatcacctg caaggccagt cagaatgtgg gtactactgt tgcctggat 180
 caacagaaac caggaaaagc ccctaaagtc ctgatttact ccgcataccta tcggtacagt 240
 ggagtcctt cacgettcag tggcagtga tctgggacag atttactct caccatcagc 300
 agtctgcagc ctgaagactt tgcaacttat tactgtcagc aatataacag ctatccattc 360
 acgttcggcc aggggacaaa gtgggaaatc aaacgtaagt actttttcc gaattc 416

<210> 19
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Protein được làm giống như của người

<400> 19

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
 1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
 35 40 45

Val Gly Thr Thr Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60

Lys Val Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn
 100 105 110

Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 20

<211> 416

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Gen được làm giống như của người

<400> 20

gctagcacca ccatggagtc acagactcag gtctttgtgt acatgttgct gtggtgtct 60

ggtgttgatg gagacattca gatgaccag tctccatcct ccctgtccgc atcagtcgga 120

gacagggtca ccatcacctg caaggccagt cagaatgtgg gtactactgt tgcctggtat 180

caacagaaac caggaaaagc ccctaaagtc ctgatttact ccgcataccta tcggtacagt 240

ggagtcctt cacgcttcag tggcagtga tctgggacag atttactct caccatcagc 300

agtctgcagc ctgaagactt tgcaacttat tactgtcagc aatataacag ctatccattc 360

acgttcggcc aggggacaaa gttggaaatc aaacgtaagt actttttcc gaattc 416

<210> 21
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Protein được làm giống như của người

<400> 21

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
 1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
 35 40 45

Val Gly Thr Thr Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60

Lys Val Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn
 100 105 110

Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 22
 <211> 1413
 <212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Plasmid tái tổ hợp

<400> 22

atgggaggga tctggatctt tctctctc ctgtcaggaa ctgcagggtc ccactctgag 60
atccagctgc agcagactgg acctgagctg gtgaagcctg gggcttcagt gaagatatcc 120
tgcaaggctt ctggttattc attcactgac tacatcatgc tctgggtgaa gcagagccat 180
ggaaagagcc ttgagtggat tggagatatt tacccttact atggtagtag tagctacaat 240
ctgaagtca agggcaaggc cacattgact gtagacaaat ctccagcac agcctacatg 300
cagctcaaca gtctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtgcaag gcagggcgagg 360
gatgtaact acgtctctt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctctca 420
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 480
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtaag gactactcc ccgaaccggg gacgggtgcg 540
tggaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacacctcc cggtgtcct acagtctca 600
ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660
tacatctgca acgtgaatca caagccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 720
aatcttctg acaaaactca cacatgccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 780
ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc cggaccct 840
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 960
agcacgtacc gtgtggtcag cgtctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 1080
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag 1140
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1260

ctggactccg acggetcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1380

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 1413

<210> 23

<211> 470

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Protein tái tổ hợp

<400> 23

Met Gly Gly Ile Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

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

Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
65 70 75 80

Leu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Gly Asp Gly Asn Tyr Val Leu Phe Asp

115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

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

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 24
 <211> 705
 <212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Plasmid tái tổ hợp

<400> 24

```

atggagtcac agactcaggt cttgtatac atgtgtctgt ggtgtctggt tgttgatgga    60
gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc    120
gtcacctgca aggccagtc gaattgtgggt actactgttg cctggtatca acagaaacca    180
ggacaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat    240
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcaa tgtgcagtct    300
gaagacttgg cagaatattt ctgtcagcaa tataacagct atccattcac gtccggctcg    360
gggacaaaagt tggaaataaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca    420
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat    480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag    540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg    600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc    660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag                    705

```

<210> 25

<211> 234

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Protein tái tổ hợp

<400> 25

```

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
1      5      10      15

```

```

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser
20      25      30

```

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
 35 40 45

Val Gly Thr Thr Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 50 55 60

Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn
 100 105 110

Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 26
<211> 1413
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Plasmid tái tổ hợp

<400> 26
atggactgga cctggaggat cctcttttg gtggcagcag ccacaggtgc cactcccag 60
gtccagcttg tgcagtctgg ggctgaagtg aaaaagcctg ggcctcagt gaaggtttcc 120
tgcaaggctt ctggatactc attcactgac tatatcatgc ttgggtgcg ccaggcccct 180
ggacaaaggc ttgagtggat tggagatata tacccttact atggcagtag aagctataat 240
ctgaagtcca agggcaaggc caccctcacc gtcgacacat ccgcgagcac agcctacatg 300
gagctcagca gcctgagatc tgaagacacc gctgtgtatt actgtgccag gcagggcggc 360
gatggaaact acgtcctctt tgactactgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca 420
gcctccacca agggcccatc ggtcttccc ctggcaccct cctcaagag cacctctggg 480
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgctg 540
tggaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacacctcc cggtgtcct acagtcctca 600
ggactctact cctcagcag cgtgggtgacc gtgcctcca gcagcttggg caccagacc 660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 720
aaatcttggt acaaaactca cacatgccc ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 780
ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcattgatct ccggaccct 840
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 960

agcacgtacc gtgtggcag cgtctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1020
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080
 aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1140
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1260
 ctggactccg acggctctt ctctcttac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320
 cagcagggga acgtcttc atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag 1380
 cagaagagcc tctcctgtc tccgggtaaa tga 1413

<210> 27

<211> 470

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Protein tái tổ hợp

<400> 27

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Ile Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80

Leu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Gly Gly Asp Gly Asn Tyr Val Leu Phe Asp
 115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

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

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 28

<211> 705

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Plasmid tái tổ hợp

<400> 28

```
atggagtcac agactcaggt cttgtgtac atgttctgt ggtgtctgg tttgatgga      60
gacattcaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtccgat cagtcggaga cagggtcacc    120
atcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actactgttg cctggtatca acagaaacca    180
ggaaaagccc ctaaagcact gatttactcc gcacacctat ggtacagtgg agtcccttca    240
cgcttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcagcct    300
gaagactttg caacttatta ctgtcagcaa tataacagct atccattcac gttcggccag    360
gggacaaagt tggaatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca    420
tctgatgagc agtgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat    480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag    540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg    600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc    660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag                      705
```

<210> 29

<211> 234

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Protein tái tổ hợp

<400> 29

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
 35 40 45

Val Gly Thr Thr Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60

Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn
 100 105 110

Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 30
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Plasmit tái tổ hợp

<400> 30
 atggagtcac agactcaggt ctttgtgtac atgttgctgt ggtgtctggt tgttgatgga 60
 gacattcaga tgaccacgtc tccatcctcc ctgtccgcat cagtcggaga cagggtcacc 120
 atcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actactgttg cctggtatca acagaaacca 180
 ggaaaagccc ctaaagtcc ttttactcc gcacacctat ggtacagtgg agtcccttca 240
 cgcttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcacttca ccatcagcag tctgcagcct 300
 gaagactttg caacttatta ctgtcagcaa tataacagct atccattcac gttcggccag 360
 gggacaaagt tggaaatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat ctccccgcca 420
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag

705

<210> 31

<211> 234

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Protein tái tổ hợp

<400> 31

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
 35 40 45

Val Gly Thr Thr Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60

Lys Val Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn
 100 105 110

Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

130 135 140
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 32

<211> 417

<212> ADN

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 32

atgaacttg tgctcagcct gatttcctt gccctcatt taagagggtg cccgtgtgaa 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gaggtccct gatactctcc 120

tgtgcagcct caggattcac ttccagtggc ttgccaatgt cttgggttcg ccagactccg 180

gagaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt agtagtggtg gtacttatac ctactctcca 240

gacagtgtga tgggtcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300

caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag acgattacgt 360

cggaattact actctatgga ctactgggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctca 417

<210> 33
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 33

Met Asn Phe Val Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Pro Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Ile Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Gly Phe Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Ser Pro
 65 70 75 80

Asp Ser Val Met Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Leu Arg Arg Asn Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 34
 <211> 396
 <212> ADN

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 34

```

atgaagctgc ctgttctgct agtgggtgctg ctattgttca cgagtcacgc ctcaagcagt    60
gatgttggtc tgacccaagc tccactctct ctgcctgtca atattggaga tcaagcctct    120
atctcttgca agtctactaa gagtcttctg aatagtgatg gattcactta ttggactgg    180
tacctgcaga agccaggcca gtcctcacag ctctaatat atttggttc taatcgattt    240
tctggagttc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa cagatttcac actcaagatc    300
agcagagtgg aggctgagga ttggggaatt tatttttgct tccagagtaa ctatcttcca    360
ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa                                396

```

<210> 35

<211> 132

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 35

```

Met Lys Leu Pro Val Leu Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Thr Ser Pro
1         5         10        15

```

```

Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Ala Pro Leu Ser Leu Pro
20        25        30

```

```

Val Asn Ile Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser
35        40        45

```

```

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

```

```

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe
65        70        75        80

```

```

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85        90        95

```

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

Cys Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys
 130

<210> 36
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Môi tổng hợp

<400> 36
 gcaactagta ccacatgaa ctttgtgctc agc 33

<210> 37
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Môi tổng hợp

<400> 37
 gggaagcttg agaggccatt cttacctgag gagacgggtga ctgaggt 47

<210> 38
 <211> 448
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Gen khám

<400> 38

actagtagca ccatgaactt tggctcagc ctgatttcc ttgccctcat ttaagaggt 60
gtcccggtg aagtcagct ggtggagtct gggggaggct tagtgaagcc tggagggtcc 120
ctgatactct cctgtgcagc ctcaggattc actttcagt gctttgcat gtcttgggtt 180
cgccagactc cggagaagag gctggagtgg gtcgcaacca ttagtagtgg tggacttat 240
acctactctc cagacagtgt gatgggtcga ttaccatct ccagagacaa tgccaagaac 300
accctgtacc tgcaaatgag cagtctgagg tctgaggaca cggccatgta ttactgtgca 360
agacgattac gtcggaatta ctactctatg gactactggg gtcaaggaac ctcaatcacc 420
gtctctcag gtgagtcctt aaaagctt 448

<210> 39

<211> 139

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Protein khảm

<400> 39

Met Asn Phe Val Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Pro Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Ile Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Gly Phe Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Ser Pro
65 70 75 80

Asp Ser Val Met Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Leu Arg Arg Asn Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 40
 <211> 431
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Gen khảm

<400> 40
 gctagcacca ccatgaagct gcctgttctg ctagtggtgc tgctattgtt cacgagtcca 60
 gcctcaagca gtgatgttgt tctgacccaa gctccactct ctctgcctgt caatattgga 120
 gatcaagcct ctatctcttg caagtctact aagagtcttc tgaatagtga tggattcact 180
 tatttgact ggtacctgca gaagccaggc cagtctccac agctcctaata atatttggtt 240
 tctaatcgat ttctggagt tccagacagg ttcagtggca gtgggtcagg aacagatttc 300
 aactcaaga tcagcagagt ggaggctgag gatttgggaa ttatttttg cttccagagt 360
 aactatcttc cattcacgtt cggctcgggg acaaagtgg aaataaaacg taagtagact 420
 ttgcgaatt c 431

<210> 41
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Protein khảm

<400> 41

Met Lys Leu Pro Val Leu Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Thr Ser Pro
 1 5 10 15

Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Ala Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

Val Asn Ile Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser
 35 40 45

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

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

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

Cys Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys
 130

<210> 42

<211> 453

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Gen được làm giống như của người

<400> 42

actagtagca ccatggaatt ggggctgagc tgggtttcc ttgtgctat tctggaaggc 60
gtccagtgtg aagtgcagct cgtggagtct gggggaggcc tcgtccagcc tgggggctcc 120
ctgacacctc cctgtgcagc cctggattc accttagtg gctttgcat gagctgggtc 180
cgccaggtc caggaaggg gctcgagtgg gttgccacca ttagtagtgg cggaacttat 240
acctactctc cagactctgt gatgggccga ttcacctct ccagagacaa cgccaagaac 300
tcactgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga gccgaggaca cagctgtgta ttactgtgcc 360
agacgactgc gtcggaatta ctactctat gactactggg gccaaaggac aatggtcacc 420
gtctctcag gtaagatggg ctttctaag ctt 453

<210> 43

<211> 139

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Protein được làm giống như của người

<400> 43

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

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Ile Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Gly Phe Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Ser Pro

65 70 75 80

Asp Ser Val Met Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Leu Arg Arg Asn Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 44

 $\langle 211 \rangle$ 432

<212> ADN

<213> Nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Gen được làm giống như của người

<400> 44

gctagcacca ccatgaggct ccctgtcag ctctggggc tgctgatgct ctgggtctct 60

ggatccagtg gggatattgt gatgactcag tetccactct cctgcccgt cacccttgga 120

gagcctgcct ccattctctg caagtctact aagagcctcc tgaatagtga tggattcact 180

tatttggatt ggtacctgca gaagccaggg cagtctccac agctcctgat ctatttggtt 240

tctaatcggg tttccggggg tccagacaga ttacgtggca gtggatcagg cacagatttt 300

acactgaaaa tcagcagagt ggaggctgag gatgttggcg ttattactg cttccaaagt 360

aactatcttc ctttcacttt cggcggcgga accaaagtcg agatcaaacg taagtgcact 420

ttcctagaat tc 432

<210> 45

 $\langle 211 \rangle$ 132

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Protein được làm giống như của người

<400> 45

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser
 35 40 45

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

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125

Val Glu Ile Lys
 130

<210> 46

<211> 1410

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Plasmid tái tổ hợp

<400> 46

```

atgaactttg tgctcagcct gattttcctt gccctcattt taagaggtgt cccgtgtgaa    60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gagggtccct gatactctcc    120
tgtgcagcct caggattcac tttagtggc ttgcatgt cttgggttcg ccagactccg    180
gagaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt agtagtggtg gtacttatac ctactctcca    240
gacagtgtga tgggtcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg    300
caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag acgattacct    360
cggaattact actctatgga ctactgggt caaggaacct cagtcaccgt ctctcagcc    420
tccaccaagg gccatcggt ctccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc    480
acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg    540
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctccccg ctgtcctaca gtctcagga    600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac    660
atctgcaacg tgaatcaca gccccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagccaaa    720
tcttgtaga aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg    780
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctccg gacctgag    840
gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac    900
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc    960
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag    1020
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa    1080
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc cccatccccg ggatgagctg    1140
accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggt tctatcccag cgacatgcc    1200
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccacgcc tccgtgctg    1260

```

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380

aagagcctct cctgtctcc gggtaaatga 1410

<210> 47

<211> 469

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Protein tái tổ hợp

<400> 47

Met Asn Phe Val Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Pro Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Ile Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Gly Phe Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Ser Pro
65 70 75 80

Asp Ser Val Met Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Leu Arg Arg Asn Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr

115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
195 200 205

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

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 48
 <211> 720
 <212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Plasmid tái tổ hợp

<400> 48

```

atgaagctgc ctgttctgct agtgggtctg ctattgttca cgagtcacgc ctcaagcagt    60
gatgttgttc tgaccaagc tccactctct ctgcctgtca atattggaga tcaagcctct    120
atctcttga agtctactaa gactcttctg aatagtgatg gattcactta ttggactgg    180
tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctaatat atttggttc taatcgatt    240
tctggagttc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa cagattcac actcaagatc    300
agcagagtgg aggctgagga ttgggaatt tattttgct tccagagtaa ctatctcca    360
ttcacgttcg gtcggggac aaagtggaa ataaaacgaa ctgtggtgc accatctgc    420
ttcatcttc cgccatctga tgagcagtg aaatctggaa cctgaataac ttctatcca    480
gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgcccctca atcgggtaac tcccaggaga    540
gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgtga    600
gcaaagcaga ctacgagaaa cacaagtct acgctgcgt caccatcag ggcctgagct    660
cgccccgcac aaagagcttc aacaggggag agtgtagga atgcctctgt tgtgtgctg    720

```

<210> 49

<211> 239

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Protein tái tổ hợp

<400> 49

```

Met Lys Leu Pro Val Leu Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Thr Ser Pro
1         5         10        15

```

```

Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Leu Thr Gln Ala Pro Leu Ser Leu Pro
20        25        30

```

Val Asn Ile Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser
 35 40 45

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

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

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

Cys Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln

210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 50

<211> 1410

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Plasmid tái tổ hợp

<400> 50

```

atggaattgg ggctgagctg ggttttcctt gttgctattc tggaaggcgt ccagtgtgaa    60

gtgcagctcg tggagtctgg gggaggcctc gtccagcctg ggggctccct gagactctcc    120

tgtgcagcct ctggattcac ctttagtggc ttgccatga gctgggtccg ccaggctcca    180

gggaaggggc tcgagtgggt tgccaccatt agtagtggcg gaacttatac ctactctcca    240

gactctgtga tgggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc actgtatctg    300

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacaca gctgtgtatt actgtgccag acgactgcgt    360

cggaattact actctatgga ctactggggc caagggacaa tggtcaccgt ctctcagcc    420

tccaccaagg gcccatcggg ctccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc    480

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg    540

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctccccgg ctgtcctaca gtctcagga    600

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac    660

atctgcaacg tgaatcaca gccccagcaac accaagggtgg acaagaaagt tgagcccaa    720

tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg    780

tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctccg gacctctgag    840

gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactgttac    900

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc    960

```

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacgctc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020
 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1080
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1140
 accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1200
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tccgtgctg 1260
 gactccgacg gctccttctt cctctacage aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380
 aagagcctct cctgtctcc gggtaaata 1410

<210> 51

<211> 469

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Protein tái tổ hợp

<400> 51

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

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Gly Phe Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Ser Pro
 65 70 75 80

Asp Ser Val Met Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Leu Arg Arg Asn Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

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

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

450 455 460

Asn His Tyr Thr Gln
465

<210> 52

<211> 1410

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Plasmid tái tổ hợp

<400> 52

```

atggaattgg ggctgagctg ggttttcctt gttgctattc tggaaggcgt ccagtgtgaa    60
gtgcagctcg tggagtctgg gggaggcctc gtccagcctg ggggctccct gatcctctcc    120
tgtgcagcct ctggattcac ctttagtgge ttgccatga gctgggtccg ccaggctcca    180
gggaaggggc tcgagtgggt tgccaccatt agtagtggcg gaactatac ctactctcca    240
gactctgtga tgggcccatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc actgtatctg    300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacaca gctgtgtatt actgtgccag acgactgcgt    360
cggaattact actctatgga ctactggggc caagggacaa tggtcaccgt ctctcagcc    420
tccaccaagg gccatcggt ctccccctg gcaccctct ccaagagcac ctctgggggc    480
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg    540
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac acctccccg ctgtcctaca gtctcagga    600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac    660
atctgcaacg tgaatcaca gccccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa    720
tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactct ggggggaccg    780
tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctccg gacctctgag    840
gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactgtac    900
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc    960

```

acgtaccgtg tggcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020
 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tggagaaaac catctccaaa 1080
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg gcatgagctg 1140
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1200
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380
 aagagcctct cctgtctcc gggtaaata 1410

<210> 53

<211> 469

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Protein tái tổ hợp

<400> 53

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

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Ile Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Gly Phe Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Ser Pro
 65 70 75 80

Asp Ser Val Met Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Leu Arg Arg Asn Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

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

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 54
<211> 720
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Plasmid tái tổ hợp

<400> 54
atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctgatgctct gggctctctgg atccagtggg 60
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gcctgcctcc 120
atctcctgca agtctactaa gagcctcctg aatagtgatg gattcactta tttggattgg 180
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttggttc taatcggtt 240
tccgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaac 300
agcagagtgg aggctgagga tgttggcggtt tattactgct tccaaagtaa ctatcttct 360
ttcactttcg gcggcggaac caaagtcgag atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 660
gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720

<210> 55
<211> 239
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> Protein tái tổ hợp

<400> 55

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser
35 40 45

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

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 56
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Peptit CDR

<400> 56

Asp Tyr Ile Met Leu
 1 5

<210> 57
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Peptit CDR

<400> 57

Asp Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Leu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 58
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Peptit CDR

<400> 58

Gln Gly Gly Asp Gly Asn Tyr Val Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 59
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Peptit CDR

<400> 59

Gly Phe Ala Met Ser
 1 5

<210> 60
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Peptit CDR

<400> 60

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Ser Pro Asp Ser Val Met
 1 5 10 15

Gly

<210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Peptit CDR

<400> 61

Arg Leu Arg Arg Asn Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Peptit CDR

<400> 62

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Thr Val Ala
 1 5 10

<210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Peptit CDR

<400> 63

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
 1 5

<210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Peptit CDR

<400> 64

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 65

<211> 16

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Peptit CDR

<400> 65

Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Peptit CDR

<400> 66

Leu Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Peptit CDR

<400> 67

Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Phe Thr
1 5