



(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)



1-0035040

(51)<sup>7</sup> C07K 16/10

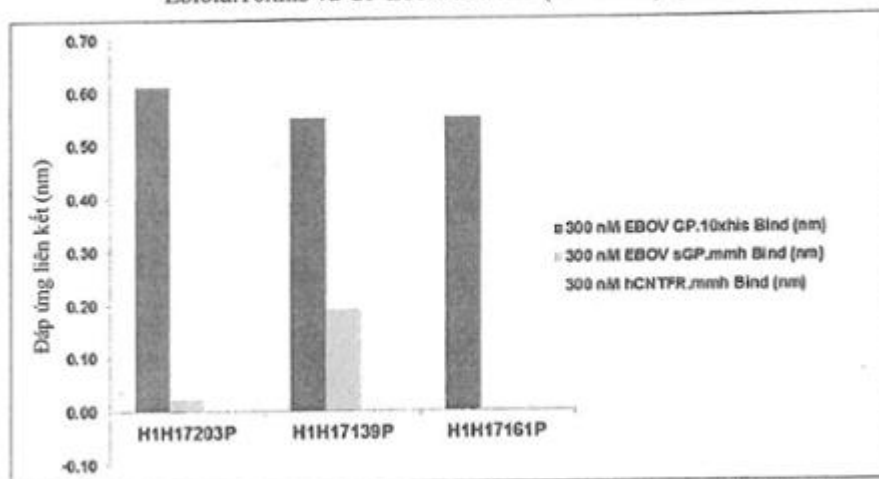
(13) B

- (21) 1-2017-02686 (22) 25/01/2016  
(86) PCT/US2016/014720 25/01/2016 (87) WO/2016/123019 04/08/2016  
(30) 62/107,581 26/01/2015 US; 62/161,356 14/05/2015 US; 62/245,703 23/10/2015 US  
(45) 27/03/2023 420 (43) 25/12/2017 357A  
(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)  
777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591-6707, United States of America  
(72) Christos KYRATSOUS (GR); William OLSON (US); Peter MASON (US); Neil STAHL (US).  
(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) KHÁNG THỂ TÁI TỔ HỢP LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI VIRUT EBOLA VÀ ĐƯỢC PHẪM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với glycoprotein virus Ebola, được phôi chứa kháng thể này và phương pháp sử dụng. Các kháng thể theo sáng chế rất có ích trong việc ức chế hoặc trung hòa hoạt động của virus Ebola, do đó mang lại phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa lây nhiễm virus Ebola ở người. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng một hoặc nhiều kháng thể liên kết với virus Ebola để ngăn chặn sự liên kết và/hoặc xâm nhập của virus vào trong tế bào chủ. Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng trong điều trị hoặc dự phòng và có thể được sử dụng một mình hoặc dưới dạng kết hợp với một hoặc nhiều chất kháng virus hoặc vaccin.

Sự tương tác của H1H17203, H1H17139P và H1H17161P với GP Ebola.10xhis và GP Ebola hòa tan (sGP.mmh) tại 25°C



Các tín hiệu liên kết Octet HTX cho mỗi kháng thể trong số các kháng thể GP Ebola với 300nM GP Ebola.10xhis (màu đen), GP Ebola hòa tan.mmh (xám đậm) và hCNTFR.mmh protein đối chứng âm, không liên quan (xám nhạt).

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết với glycoprotein virus Ebola, được phẩm chứa các kháng thể này và phương pháp sử dụng chúng.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Virus Ebola (EBOV) và các loài filovirus liên quan là nguyên nhân gây ra sốt xuất huyết virus nghiêm trọng cho người và linh trưởng không phải con người, với tỷ lệ tử vong lên đến khoảng 90% ở người trong những đợt bùng phát dịch. (Murin, C.D., et al, (2014), Proc Natl Acad Sci USA, 111(48):17182-17187). Cơ chế miễn dịch làm trung gian bảo vệ đang được nghiên cứu, tuy nhiên cho đến nay, vẫn chưa có phương pháp điều trị nào được phê chuẩn để sử dụng cho con người.

Glycoprotein (GP) virus Ebola là protein duy nhất có mặt trên bề mặt của virus và trên các tế bào bị nhiễm. Nó được cho là có nhiệm vụ liên kết và dung hợp virus với các tế bào chủ. GP tồn tại ở một số dạng. Các GP được mã hóa trong hai khung đọc mở. mARN GP chưa biến đổi tạo ra GP hòa tan (sGP), bài tiết không cấu trúc mà được tổng hợp trong thời gian đầu của quá trình lây nhiễm (Volchkova, et al.(1995), Virology 214:421-430; Volchkova, VA et al., (1998), Virology 250:408-414; Sanchez, et al. (1996), Proc Natl Acad Sci USA, 93:3602- 3607; Sanchez, et al. (1999) J.Infect. Dis. 179(suppl.1,S164)). sGP tạo thành các nhị phân (Volchkova, et al. (1995), Virology 214:421-430; Falzarano, D. et al., Chembiochem (2006), 7:1605-1611) và phát hiện là có hàm lượng cao trong máu của bệnh nhân và các động vật bị nhiễm thử nghiệm (Sanchez, et al. (1996), Proc Natl Acad Sci USA, 93:3602-3607; Dolnik, O. et al., (2004), EMBO J 23:2175-2184).

Sau khi lây nhiễm, mARN đã chỉnh sửa được tạo ra, có được khả năng mã hóa từ khung đọc mở thứ hai. mARN đã chỉnh sửa này mã hóa cho dạng GP có chứa miền xuyên màng (TM) cho phép dạng GP này gắn với màng sinh chất của tế bào, và dung hợp vào trong hạt virus nơi mà nó đóng vai trò như protein dung hợp/protein liên kết-thụ thể tế bào chủ. Trong quá trình sinh tổng hợp dạng GP này, protein được xử lý phân giải protein thành hai sản phẩm được liên kết với nhau bằng cầu nối disulfua. Sản phẩm đầu amino được gọi là GP1 (140 kDa) và sản phẩm cắt đầu cacboxy được gọi là GP2

(26 kDa) (Sanchez, et al. (1998), J. Virol. 72:6442-6447).

GP virus Ebola (GP EBOV) có thể trở thành đích của các kháng thể bảo vệ, tuy nhiên vai trò của các kháng thể trong tính kháng bệnh lại đang gây tranh cãi. Hàm lượng huyết thanh không đáng kể của kháng thể trung hòa trong bệnh nhân đang hồi phục cùng với các kết quả không thống nhất trong việc bảo vệ thu được từ thử nghiệm chuyển huyết thanh miễn dịch cho động vật đã dẫn đến suy đoán về vai trò của kháng thể trung hòa trong việc chữa khỏi bệnh (Peters, CJ and LeDuc, JW, (1999), J. Infect. Dis. 179 Suppl 1; Mikhailov, VV, (1994), Vopr. Virusol. 39:82; Xu, L. *et al.*, (1998), Nature Med. 4: 37). Tuy nhiên, trong đợt bùng phát virus Ebola gần đây, một vài bệnh nhân, những người đã nhiễm bệnh và được điều trị với dung dịch hỗn hợp các kháng thể đơn dòng (ZMapp) đặc hiệu đối với GP virus đã khỏi bệnh. Ngoài ra, ở những bệnh nhân khác, những người được điều trị với huyết thanh của những bệnh nhân đã khỏi bệnh ở trên và từ những bệnh nhân sống sót sau khi lây nhiễm, cũng đem lại những kết quả khả quan.

Một vài kháng thể liên kết với GP virus Ebola đã được mô tả (xem, ví dụ, patent Mỹ số 6630144, 6875433, 7335356 và 8513391. Tương tự, cũng xem patent châu Âu số EP1539238, EP2350270 và EP8513391).

Trong khi mà các thành tựu về công nghệ đã làm cải thiện khả năng sản xuất các chế phẩm vacxin (các) kháng nguyên virus Ebola, vẫn cần phải tạo ra các nguồn bảo vệ bổ sung hướng đến các chủng của virus Ebola nổi lên. Một vài liệu pháp ứng viên chống lại virus Ebola hiện đang được đánh giá, bao gồm sau phơi nhiễm vacxin (Feldman, H, et al. (2007), PLoS Pathog 3(1):e2), chất ức chế phân tử nhỏ (Cote, M. et al. (2011), Nature, 477(7364) :344-348; Johansen, LM, et al. (2013), Sci Transl Med 5(190): 190ra179; Warren, TK, et al., (2014), Nature, 508(7496) :402-405), liệu pháp trên cơ sở siRNA (Geisbert, TW, et al., (2006), J. Infect Dis. 193(12): 1650-1657; Geisbert, TW et al, (2010), Lancet 375(9729): 1896- 1905), và kháng thể đơn dòng (Saphire, EO, (2013), Immunotherapy 5(11): 1221 -1233; Wong, G. et al. (2014), Trends Microbiol. 22(8):456-463; Qiu, X et al, (2014), Hum. Vaccin. Immunother. 10(4):964-967). Việc cung cấp thụ động kháng thể cho linh trưởng không phải người được chứng minh là có hiệu quả (Dye, JM., et al, (2012), Proc Natl Acad Sci USA 109(13):5034-5039). Gần đây hơn, một dung dịch hỗn hợp của ba kháng thể (ZMapp) hiện đang được sản xuất trong cây thuốc lá và đang nghiên cứu cho con người sử dụng (Qiu, X. et al, (2014),

Nature 514(7520):47-53).

Trong khi các ý tưởng về chế phẩm vaccin có chứa kháng nguyên quan tâm (ví dụ, GP) để tạo ra kháng thể trung hòa ở bệnh nhân thường được cho là phương pháp tiếp cận tốt, nó có thể bất lợi khi sử dụng cho bệnh nhân những người đã phơi nhiễm virus rồi, do có thể mất một vài tuần để cơ thể để đáp ứng với chế phẩm vaccin. Vào thời điểm này, bệnh nhân có thể đã bị chết vì lây nhiễm virus, phụ thuộc vào mức độ chăm sóc và liệu pháp tạm thời hiện có. Ở những bệnh nhân này, hoặc ở bệnh nhân bất kỳ những người không có khả năng tạo ra đáp ứng kháng thể hiệu quả, sẽ có lợi hơn khi cung cấp chế phẩm đã chứa sẵn các kháng thể bảo vệ có thể hướng đích tới các quyết định kháng nguyên phổ biến với chủng EBOV cụ thể, hoặc với các chủng khác nhau.

Theo đó, vẫn cần phải tìm ra các kháng thể mới trong lĩnh vực kỹ thuật, là kháng thể có thể được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị lây nhiễm virus Ebola.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế đề xuất kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với glycoprotein (GP) virus Ebola (EBOV). Các kháng thể theo sáng chế rất có ích trong việc ức chế hoặc trung hòa hoạt tính của virus Ebola. Theo một vài phương án, các kháng thể rất có ích trong việc cản trở sự liên kết của virus Ebola với các tế bào chủ và/hoặc ngăn ngừa sự xâm nhập của virus Ebola vào tế bào chủ. Theo một vài phương án, các kháng thể thực hiện chức năng bằng cách ức chế virus truyền từ tế bào này sang tế bào khác, hoặc bằng cách giết chết các tế bào lây nhiễm virus Ebola, làm giảm sự nhân lên của các virus gây bệnh. Theo một vài phương án, các kháng thể rất có ích trong việc ngăn ngừa, điều trị hoặc làm thuyên giảm ít nhất một triệu chứng lây nhiễm virus Ebola ở đối tượng. Theo một vài phương án, các kháng thể có thể được cung cấp để dự phòng hoặc trị liệu cho đối tượng có, hoặc có nguy cơ mắc phải, lây nhiễm virus Ebola. Theo các phương án nhất định, chế phẩm có chứa ít nhất một kháng thể theo sáng chế có thể được cung cấp cho đối tượng những người mà vaccin hoàn toàn không có tác dụng hoặc đối với những người mà vaccin có hiệu quả thấp, ví dụ, ở những bệnh nhân cao tuổi, những bệnh nhân nhỏ tuổi, những bệnh nhân bị dị ứng với một hoặc nhiều thành phần của vaccin, hoặc những bệnh nhân có sức đề kháng kém những người không đáp ứng với chất kháng nguyên trong vaccin. Theo một vài phương án nhất định, chế phẩm chứa ít nhất một kháng thể theo sáng chế có thể được cung cấp cho nhân viên y tế, những



bệnh nhân được đưa vào bệnh viện hoặc y tá nội trú hoặc những bệnh nhân khác có nguy cơ cao trong suốt đợt bùng phát virus Ebola. Theo một vài phương án, chế phẩm chứa ít nhất một kháng thể theo sáng chế có thể được cung cấp như là dòng điều trị đầu tiên cho bệnh nhân những người đã bị phơi nhiễm với virus Ebola rồi.

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đầy đủ chiều dài (ví dụ, kháng thể IgG1 hoặc kháng thể IgG4) hoặc có thể chỉ chứa phần liên kết kháng nguyên (ví dụ, mảnh Fab, F(ab')<sub>2</sub> hoặc scFv), và có thể được biến đổi để tạo ra hiệu quả về mặt chức năng, ví dụ, để tăng độ bền trong tế bào chủ hoặc để loại bỏ các chức năng phản ứng lại kích thích dư thừa (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164: 1925-1933). Theo các phương án nhất định, kháng thể có thể là đặc hiệu kép.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng tái tổ hợp được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với GP virus Ebola.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể tái tổ hợp được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với virus Ebola (EBOV) và/hoặc GP virus Ebola (EBOV-GP), trong đó kháng thể có một hoặc nhiều đặc điểm sau đây:

(a) chứa ba vùng xác định bổ trợ (CDR) chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) nằm trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 18, 66, 146, 2, 34, 50, 82, 98, 114, 130, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, và 306; và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) nằm trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 26, 74, 154, 10, 42, 58, 90, 106, 122, 138, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, và 298;

(b) là kháng thể đơn dòng người hoàn chỉnh;

(c) liên kết với EBOV, hoặc các hạt tương tự virus (VLP) biểu hiện EBOV-GP có hằng số phân ly ( $K_D$ ) nhỏ hơn  $10^{-7}M$ , như được xác định bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt;

(d) cho thấy tăng ít nhất ba lần trong chu kỳ bán rã ( $t_{1/2}$ ) tại pH 5 hoặc pH 6 so với pH 7,4;

(e) cho thấy có phản ứng trung hòa virus Ebola Zaire với giá trị  $IC_{50}$  nằm trong khoảng từ  $10^{-11}M$  đến khoảng  $10^{-9}M$ ;

(f) cho thấy liên kết với các tế bào biểu hiện EBOV-GP kích hoạt phản ứng gây

độc tế bào phụ thuộc kháng thể;

(g) phản ứng chéo với một hoặc nhiều chủng EBOV được chọn từ nhóm bao gồm Zaire.2014, Zaire.1995, Sudan, Bundibugyo và Cote d'Ivoire;

(h) liên kết với GP hòa tan (sGP);

(i) cạnh tranh chéo với kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu bao gồm trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR và LCVR nêu trong bảng 1.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể tái tổ hợp được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EBOV và/hoặc glycoprotein của virus Ebola (EBOV-GP), trong đó kháng thể có hai hoặc nhiều đặc điểm sau đây:

(a) là kháng thể đơn dòng người hoàn chỉnh;

(b) liên kết với EBOV, hoặc các hạt tương tự virus (VLP) biểu hiện GP EBOV có hằng số phân ly ( $K_D$ ) nhỏ hơn  $10^{-7}M$ , như được xác định bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt;

(c) cho thấy tăng ít nhất ba lần trong chu kỳ bán rã ( $t_{1/2}$ ) tại pH 5 hoặc pH 6 so với pH 7,4;

(d) cho thấy có phản ứng trung hòa virus Ebola Zaire với giá trị  $IC_{50}$  nằm trong khoảng từ  $10^{-11} M$  đến khoảng  $10^{-9} M$ ;

(e) cho thấy liên kết với các tế bào biểu hiện EBOV-GP kích hoạt phản ứng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể;

(f) phản ứng chéo với một hoặc nhiều chủng EBOV-GP được chọn từ nhóm bao gồm Zaire.2014, Zaire.1995, Sudan, Bundibugyo và Cote d'Ivoire;

(g) liên kết với GP hòa tan (sGP);

(h) cạnh tranh chéo với kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu bao gồm trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR và LCVR nêu trong bảng 1.

Các kháng thể kháng GP virus Ebola minh họa theo sáng chế được liệt kê trong các bảng 1 và 2 trong bản mô tả. Bảng 1 trình bày mã nhận biết trình tự axit amin của các vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), các vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), các vùng

xác định bổ trợ chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3), và các vùng xác định bổ trợ chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) của các kháng thể kháng GP virus Ebola minh họa. Bảng 2 trình bày mã nhận biết trình tự axit nucleic của các HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của các kháng thể kháng GP virus Ebola minh họa.

Sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm HCVR chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR đã liệt kê trong bảng 1, hoặc trình tự gần giống với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm LCVR chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR đã liệt kê trong bảng 1, hoặc trình tự gần giống với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm cặp trình tự axit amin của HCVR và LCVR (HCVR/LCVR) chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR đã liệt kê trong bảng 1, bắt cặp với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR đã liệt kê trong bảng 1. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của bao gồm cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR nằm trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng GP virus Ebola minh họa được liệt kê trong bảng 1.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 18/26, 66/74, 146/154, 2/10, 34/42, 50/58, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 và 306/282.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm:

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

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

310;

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

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

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

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

Theo các phương án nhất định, cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 18/26 (H1H17139P), 66/74 (H1H17161P) và 146/154 (H1H17203P).

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm CDR1 chuỗi nặng (HCDR1) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR1 được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần giống với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm CDR2 chuỗi nặng (HCDR2) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR2 được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần giống với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm CDR3 chuỗi nặng (HCDR3) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR3 được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần giống với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm CDR1 chuỗi nhẹ (LCDR1) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR1 được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần giống

với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm CDR1 chuỗi nặng (LCDR2) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR2 được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần giống với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm CDR1 chuỗi nặng (LCDR3) chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR3 được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần giống với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm cặp trình tự axit amin của HCVR3 và LCDR3(HCDR3/LCDR3) chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR3 được liệt kê trong bảng 1 bắt cặp với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR3 được liệt kê trong bảng 1. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 nằm trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng GP virus Ebola minh họa được liệt kê trong bảng 1. Theo một phương án nhất định, cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 24/32 (ví dụ, H1H17139P), 72/80 (ví dụ, H1H17161P), và 152/160 (ví dụ, H1H17203P).

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm tập hợp gồm sáu CDR (cụ thể là, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) nằm trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng GP virus Ebola minh họa được liệt kê trong bảng 1. Theo các phương án nhất định, tập hợp trình tự axit amin HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 20-22-24-28-30-32 (ví dụ, H1H17139P), 68-70-72-76-78-80 (ví dụ, H1H17161P); và 148-150-152-156-158-160 (ví dụ, H1H17203P).

Theo các phương án liên quan khác, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm tập hợp gồm sáu CDR (cụ thể là HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) nằm trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR như được xác định bằng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng GP virus Ebola minh họa được liệt kê trong bảng 1. Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có chứa tập hợp trình tự axit amin HCDR1-HCDR2-HCDR3-

LCDR1-LCDR2-LCDR3 nằm trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 18/26 (ví dụ, H1H17139P), 66/74 (ví dụ, H1H17161P); và 146/154 (ví dụ, H1H17203P). Phương pháp và các kỹ thuật để xác định CDR trong trình tự axit amin HCVR và LCVR đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật và được sử dụng để xác định CDR nằm trong các trình tự axit amin HCVR và LCVR cụ thể được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ về quy ước có thể được sử dụng để xác định ranh giới của các CDR bao gồm, ví dụ, định nghĩa Kabat, định nghĩa Chothia, định nghĩa AbM. Nói chung, định nghĩa Kabat dựa trên sự biến đổi về trình tự, định nghĩa Chothia dựa trên vị trí của vùng cấu trúc móc, và định nghĩa AbM là sự điều chỉnh giữa phương pháp của Kabat và Chothia. Xem, ví dụ, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); và Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Cơ sở dữ liệu công khai cũng giúp xác định trình tự CDR trong kháng thể.

Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể kháng virus Ebola có kiểu glycosyl hóa được biến đổi. Theo một số phương án, việc biến đổi để loại bỏ vị trí glycosyl hóa không mong muốn có thể rất hữu dụng, hoặc kháng thể thiếu gốc fucose có mặt trên chuỗi oligosacarit, ví dụ, để làm tăng chức năng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (xem, Shield et al. (2002) JBC 277:26733). Trong các ứng dụng khác, việc biến đổi galactosyl hóa có thể được thực hiện để biến đổi hoạt tính gây độc phụ thuộc vào bổ thể (CDC).

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó cạnh tranh để liên kết đặc hiệu với virus Ebola với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa CDR của HCVR và CDR của LCDR, trong đó mỗi HCVR và LCVR có trình tự axit amin chọn từ các trình tự HCVR và LCVR liệt kê trong bảng 1.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó cạnh tranh chéo để liên kết đặc hiệu với virus Ebola với kháng thể tham chiếu hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa CDR của HCVR và CDR của LCDR, trong đó mỗi HCVR và LCVR có trình tự axit amin chọn từ các trình tự HCVR và LCVR liệt kê trong bảng 1.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể được phân lập và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó cản trở virus Ebola liên kết với, và/hoặc xâm nhập vào tế bào chủ.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể đặc hiệu kép gồm kháng thể thứ nhất liên kết đặc hiệu với quyết định kháng nguyên thứ nhất trên virus Ebola và kháng thể thứ hai liên kết đặc hiệu với quyết định kháng nguyên thứ hai trên virus Ebola, trong đó các quyết định kháng nguyên thứ nhất và thứ hai tách biệt và không chồng lên nhau. Theo các phương án nhất định, kháng thể đặc hiệu kép có thể có nhánh thứ nhất liên kết với quyết định kháng nguyên trong glycoprotein virus và nhánh thứ hai liên kết với quyết định kháng nguyên trong kháng nguyên virus khác.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa cho kháng thể kháng virus Ebola hoặc mảnh của nó. Ví dụ, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCVR được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR được liệt kê trong bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCVR được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR1 được liệt kê trong bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCVR1 được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR2 được liệt kê trong bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCVR2 được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự bất kỳ trong số

các trình tự axit amin HCVR3 được liệt kê trong bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCVR3 được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR1 được liệt kê trong bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCVR1 được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR2 được liệt kê trong bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCVR2 được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR3 được liệt kê trong bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCVR3 được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa cho HCVR, trong đó HCVR chứa tập hợp gồm ba vùng CDR (cụ thể là, HCDR1-HCDR2-HCDR3), trong đó tập hợp trình tự axit amin HCDR1-HCDR2-HCDR3 được xác định bởi kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng GP virus Ebola minh họa được liệt kê trong bảng 1.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa cho HCVR, trong đó LCVR chứa tập hợp gồm ba vùng CDR (cụ thể là, LCDR1-LCDR2-LCDR3), trong đó tập hợp trình tự axit amin LCDR1-LCDR2-LCDR3 được xác định bởi kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng GP virus Ebola minh họa được liệt kê trong bảng 1.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa cho cả HCVR và LCVR, trong đó HCVR bao gồm trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong bảng 1, và trong đó LCVR bao gồm trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR được liệt kê trong bảng 1. Theo các phương án nhất định, phân



từ axit nucleic gồm trình tự polynucleotit chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCVR được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%, và trình tự polynucleotit chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCVR được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống với nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%. Theo phương án nhất định theo khía cạnh này của sáng chế, phân tử axit nucleic mã hóa cho HCVR và LCVR, trong đó cả hai HCVR và LCVR đều có nguồn gốc từ cùng một kháng thể kháng GP virus Ebola được liệt kê trong bảng 1.

Sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin chuỗi nặng được liệt kê trong bảng 1. Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin chuỗi nhẹ được liệt kê trong bảng 1.

Theo một phương án liên quan, sáng chế đề xuất các vector biểu hiện tái tổ hợp có khả năng biểu hiện polypeptit có chứa vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể kháng GP virus Ebola. Ví dụ, sáng chế bao gồm vector biểu hiện tái tổ hợp có chứa phân tử axit nucleic bất kỳ trong số các phân tử axit nucleic đã nêu ở trên, nghĩa là phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự HCVR, LCVR, và/hoặc CDR bất kỳ như được liệt kê trong bảng 1. Tương tự, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là các tế bào chủ mà các vector này được đưa vào, cũng như phương pháp sản xuất kháng thể hoặc các mảnh của nó bằng cách nuôi cấy các tế bào chủ trong các điều kiện cho phép sản xuất kháng thể hoặc mảnh kháng thể, và thu hồi các kháng thể và các mảnh kháng thể đã sản xuất.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất được phẩm có chứa một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với GP virus Ebola và chất mang được dung hoặc chất pha loãng. Một hoặc nhiều kháng thể được phân lập chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự HCVR và LCVR liệt kê trong bảng 1. Theo một phương án, cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 18/26, 66/74, 146/154, 2/10, 34/42, 50/58, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 và 306/282. Theo một phương án, cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID

NO: 18/26, 66/74 và 146/154.

Theo một khía cạnh liên quan, sáng chế mô tả đặc điểm của chế phẩm, là tổ hợp của ít nhất hai kháng thể theo sáng chế và chất mang được dụng hoặc chất pha loãng.

Theo một khía cạnh liên quan, sáng chế mô tả đặc điểm của tổ hợp/dung dịch hỗn hợp của ít nhất ba kháng thể theo sáng chế và chất mang được dụng hoặc chất pha loãng.

Theo một phương án, được phẩm bao gồm: (a) kháng thể kháng virus Ebola thứ nhất, chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR như đã mô tả trong bảng 1, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó; (b) kháng thể kháng virus Ebola thứ hai chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR như đã mô tả trong bảng 1, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và (c) kháng thể kháng virus Ebola thứ ba chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR như đã mô tả trong bảng 1, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể thứ nhất liên kết với, hoặc tương tác với, quyết định kháng nguyên thứ nhất trên GP virus Ebola và kháng thể thứ hai và/hoặc thứ ba liên kết với; hoặc tương tác với quyết định kháng nguyên khác trên GP virus Ebola; và (d) chất mang được dụng hoặc chất pha loãng.

Theo một khía cạnh liên quan khác, sáng chế mô tả đặc điểm của chế phẩm, là tổ hợp của kháng thể kháng GP virus Ebola và chất trị liệu thứ hai.

Theo một phương án, chất trị liệu thứ hai là chất bất kỳ được kết hợp một cách hiệu quả với kháng thể kháng GP virus Ebola. Ví dụ về các chất được kết hợp một cách hiệu quả với kháng thể kháng GP virus Ebola bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất liên kết với và/hoặc ức chế hoạt tính virus Ebola (bao gồm các kháng thể khác hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, v.v.) và/hoặc các chất, không liên kết trực tiếp với virus Ebola tuy nhiên lại ức chế hoạt tính virus bao gồm hoạt tính lây nhiễm trong tế bào chủ.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất được phẩm bao gồm: (a) kháng thể kháng virus Ebola thứ nhất, chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR như đã mô tả trong bảng 1, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó; (b) kháng thể kháng virus Ebola thứ hai chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR như đã mô tả trong bảng 1, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể thứ nhất liên kết với quyết định kháng nguyên thứ nhất trên GP virus Ebola và kháng thể thứ hai liên kết với quyết định kháng nguyên thứ hai trên GP virus Ebola, trong đó quyết định kháng nguyên thứ nhất và thứ

hai tách biệt và không chồng lên nhau; và (c) chất mang được dụng của nó hoặc chất pha loãng.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất được phẩm bao gồm: (a) kháng thể kháng virus Ebola thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó; (b) kháng thể kháng virus Ebola thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể thứ nhất không cạnh tranh chéo để liên kết với virus Ebola với kháng thể thứ hai; và (c) chất mang được dụng của nó hoặc chất pha loãng.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất được phẩm bao gồm: (a) kháng thể kháng virus Ebola thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó; (b) kháng thể kháng virus Ebola thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, tương tác với kháng nguyên virus Ebola khác, trong đó kháng thể thứ nhất liên kết với quyết định kháng nguyên trên GP virus Ebola và kháng thể thứ hai liên kết với quyết định kháng nguyên trên kháng nguyên virus Ebola khác; và (c) chất mang được dụng của nó hoặc chất pha loãng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất được phẩm bao gồm: (a) kháng thể kháng virus Ebola thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó; (b) kháng thể kháng virus Ebola thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó và (c) kháng thể kháng virus Ebola thứ ba hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể thứ nhất liên kết với quyết định kháng nguyên thứ nhất trên GP virus Ebola và kháng thể thứ hai và/hoặc thứ ba liên kết với quyết định kháng nguyên khác trên GP virus Ebola trong đó các quyết định kháng nguyên thứ nhất, thứ hai và thứ ba tách biệt và không chồng lên nhau; và (d) chất mang được dụng của nó hoặc chất pha loãng.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất được phẩm bao gồm: (a) kháng thể kháng virus Ebola thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó; (b) kháng thể kháng virus Ebola thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó; và (c) kháng thể kháng virus Ebola thứ ba hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể thứ nhất có thể cạnh tranh chéo hoặc không cạnh tranh chéo với kháng thể thứ hai, và/hoặc thứ ba để liên kết với virus Ebola; và (d) chất mang được dụng của nó hoặc chất pha loãng.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất được phẩm bao gồm: (a) kháng thể kháng virus Ebola thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó; (b) kháng thể kháng virus Ebola thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, tương tác với một

kháng nguyên virus Ebola khác, trong đó kháng thể thứ nhất liên kết với quyết định kháng nguyên trên virus Ebola và kháng thể thứ hai và/hoặc thứ ba liên kết với quyết định kháng nguyên trên kháng nguyên virus Ebola khác; và (c) chất mang được dùng của nó hoặc chất pha loãng.

Theo một phương án, được phẩm có chứa kháng thể kháng virus Ebola thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với, hoặc tương tác với một quyết định kháng nguyên trên một chủng virus Ebola và kháng thể kháng virus Ebola thứ hai và/hoặc thứ ba hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với, hoặc tương tác với quyết định kháng nguyên thứ hai và/hoặc thứ ba trên cùng một chủng hoặc trên các chủng virus Ebola khác. Các chủng virus Ebola tương tác với kháng thể theo sáng chế có thể chọn từ nhóm bao gồm các chủng Zaire.2014, Zaire.1995, Sudan, Bundibugyo, và Cote d'Ivoire, hoặc các biến thể của chúng.

Theo một khía cạnh liên quan, sáng chế đề xuất được phẩm bao gồm kháng thể đơn dòng thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với GP virus Ebola, trong đó kháng thể đơn dòng được phân lập thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa trình tự axit amin HCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 20; trình tự axit amin HCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 22; trình tự axit amin HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 24; trình tự axit amin LCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 28; trình tự axit amin LCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 30 và trình tự axit amin LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 32, và chất mang được dùng hoặc chất pha loãng. Được phẩm còn chứa thêm kháng thể đơn dòng được phân lập thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với GP virus Ebola, trong đó kháng thể đơn dòng được phân lập thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa trình tự axit amin HCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 68; trình tự axit amin HCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 70; trình tự axit amin HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 72; trình tự axit amin LCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 76; trình tự axit amin LCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 78 và trình tự axit amin LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 80. Được phẩm còn chứa thêm kháng thể đơn dòng được phân lập thứ ba hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với GP virus Ebola, trong đó kháng thể đơn dòng được phân lập thứ ba hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa trình tự axit amin HCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 148; trình tự axit amin HCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 150; trình tự axit amin HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 152; trình tự axit amin LCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 156; trình tự axit amin LCDR2 nêu trong SEQ

ID NO: 158 và trình tự axit amin LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 160.

Theo một phương án nhất định, mỗi kháng thể có thể được bào chế dưới dạng chế phẩm riêng rẽ và nếu nó được xác định rằng cần nhiều hơn một kháng thể để thu được hiệu quả điều trị tối đa, mỗi tròng số các chế phẩm kháng thể có thể được cung cấp đồng thời (cung cấp cùng lúc hoặc liên tục), nếu cần. Ngoài ra, dung dịch hỗn hợp kháng thể có thể được bào chế cùng lúc.

Theo các phương án nhất định, khi hai hoặc nhiều kháng thể được kết hợp với nhau trong cùng một dược phẩm, chúng có thể liên kết hoặc không liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên hoặc các quyết định kháng nguyên chồng lên nhau trên protein virus Ebola. Các liệu pháp kết hợp và đồng chế phẩm bổ sung bao gồm kháng thể kháng virus Ebola theo sáng chế được mô tả ở một nơi nào đó trong bản mô tả.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất phương pháp trị liệu để điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến virus Ebola (chẳng hạn như lây nhiễm virus ở đối tượng), hoặc ít nhất một triệu chứng liên quan đến lây nhiễm virus, hoặc tần suất hoặc mức độ nghiêm trọng của ít nhất một triệu chứng liên quan đến lây nhiễm virus Ebola, sử dụng kháng thể kháng GP virus Ebola hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế, hoặc dung dịch hỗn hợp của ít nhất hai hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế, trong đó phương pháp trị liệu bao gồm cung cấp một lượng có hiệu quả trị liệu của ít nhất hai hoặc nhiều kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế cho đối tượng cần điều trị. Theo một phương án, phương pháp bao gồm cung cấp một tổ hợp (dung dịch hỗn hợp) của ít nhất ba kháng thể theo sáng chế. Theo một phương án, dung dịch hỗn hợp kháng thể bao gồm ba kháng thể kháng virus Ebola có cặp trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18/26, 66/74 và 146/154. Rối loạn được điều trị là bệnh hoặc tình trạng bệnh bất kỳ, cái được cải thiện, làm thuyên giảm, bị ức chế hoặc được ngăn ngừa bằng cách ức chế hoạt động của virus Ebola. Theo các phương án nhất định, sáng chế cũng đề xuất phương pháp để ngăn ngừa, điều trị hoặc làm thuyên giảm ít nhất một triệu chứng của lây nhiễm virus Ebola, phương pháp bao gồm cung cấp một lượng có hiệu quả trị liệu của ít nhất một hoặc nhiều kháng thể kháng GP virus Ebola hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế cho đối tượng cần điều trị.

Theo một khía cạnh liên quan, sáng chế đề xuất phương pháp trung hòa virus Ebola lây nhiễm, phương pháp bao gồm phơi nhiễm tế bào đã nhiễm virus Ebola với chế phẩm

có chứa một hoặc nhiều kháng thể kháng EBOV hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó việc phơi nhiễm giúp tăng cường bảo vệ tế bào khỏi lây nhiễm virus, hoặc khỏi sự chết tế bào. Theo các phương án nhất định, việc phơi nhiễm có thể *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một phương án, phương pháp bao gồm cung cấp một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế. Theo một phương án, phương pháp bao gồm cung cấp tổ hợp (dung dịch hỗn hợp) của ít nhất ba kháng thể theo sáng chế. Theo một phương án, dung dịch hỗn hợp kháng thể bao gồm ba kháng thể kháng EBOV có cặp trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 18/26, 66/74 và 146/154.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm thuyên giảm hoặc giảm nhẹ mức độ nghiêm trọng, thời gian, hoặc tần suất xuất hiện, của ít nhất một triệu chứng lây nhiễm virus Ebola ở đối tượng bằng cách cung cấp một hoặc nhiều kháng thể kháng virus Ebola theo sáng chế, trong đó ít nhất một triệu chứng được chọn từ nhóm gồm sốt, đau đầu, mệt mỏi, chán ăn, đau cơ, tiêu chảy, nôn mửa, đau bụng, mất nước hoặc chảy máu không thể giải thích.

Theo một phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm số lượng virus ở đối tượng, phương pháp bao gồm cung cấp cho đối tượng một lượng hiệu quả của một hoặc nhiều kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế mà liên kết với GP virus Ebola và cản trở virus Ebola liên kết và/hoặc xâm nhập vào trong tế bào chủ.

Theo một khía cạnh liên quan, sáng chế đề xuất phương pháp tăng sự sống sót, hoặc khả năng sống sót của đối tượng mang lây nhiễm với EBOV, hoặc của đối tượng phơi nhiễm với EBOV, hoặc có nguy cơ phơi nhiễm, hoặc mắc phải EBOV, phương pháp bao gồm cung cấp ít nhất một kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa ít nhất một kháng thể theo sáng chế cho đối tượng cần điều trị.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tăng sự sống sót hoặc khả năng sống sót của đối tượng mang lây nhiễm với EBOV, hoặc của đối tượng phơi nhiễm với EBOV, hoặc có nguy cơ phơi nhiễm, hoặc mắc phải EBOV, phương pháp bao gồm cung cấp dung dịch hỗn hợp kháng thể có chứa một hỗn hợp gồm ít nhất hai kháng thể kháng EBOV theo sáng chế. Theo một phương án, phương pháp bao gồm cung cấp một dung dịch hỗn hợp kháng thể có chứa một hỗn hợp gồm ít nhất ba kháng thể kháng EBOV theo sáng chế. Theo một phương án, phương pháp bao gồm cung cấp một dung

dịch hỗn hợp kháng thể có chứa một hỗn hợp gồm ít nhất ba kháng thể kháng EBOV theo sáng chế, trong đó ít nhất ba kháng thể chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 18/26, 66/74 và 146/154.

Theo một phương án, đối tượng cần điều trị là đối tượng có nguy cơ phơi nhiễm với, hoặc mắc phải lây nhiễm virus Ebola, trong đó đối tượng được chọn từ nhóm bao gồm người có sức đề kháng kém, nhân viên chăm sóc sức khỏe, người bị nghi ngờ đã từng tiếp xúc với những người mang virus Ebola, người tiếp xúc trực tiếp hoặc gần gũi thân thể với người bị bệnh, nhân viên bệnh viện, nhà nghiên cứu dược phẩm, nhân viên bảo trì chịu trách nhiệm làm sạch thiết bị bệnh viện hoặc viện nghiên cứu nơi bệnh nhân Ebola đang được điều trị, những người đã đến hoặc có dự định ghé thăm vùng hoặc quốc gia được biết là có hoặc bị nghi ngờ có đợt bùng phát virus Ebola hoặc những người đi du lịch thường xuyên.

Theo một phương án, đối tượng cần điều trị có thể được cung cấp ít nhất một kháng thể kháng EBOV theo sáng chế hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm có chứa ít nhất một kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế kết hợp với chất trị liệu thứ hai. Chất trị liệu thứ hai có thể chọn từ nhóm bao gồm thuốc kháng virus, thuốc kháng viêm (chẳng hạn như corticosteroid, và thuốc kháng viêm không chứa steroid), kháng thể liên kết với EBOV khác, vắc xin dùng cho EBOV, TKM Ebola (các siARN hướng đích tới RNA polymerase virus) brincidofovir (CMX-001), favipiravir (T-705), BCX-4430, AVI-7537 (oligome morpholino phosphorodiamidat vô nghĩa hướng đích gen VP24 của virus Ebola) và interferon.

Theo một phương án, dược phẩm có thể được dùng dưới da, theo đường tĩnh mạch, trong da, trong cơ, theo đường mũi hoặc theo đường miệng.

Theo một phương án liên quan, sự bảo vệ tăng cường có thể quan sát được ở động vật có vú phơi nhiễm với, hoặc lây nhiễm với EBOV khi động vật có vú được điều trị với dược phẩm có chứa dung dịch hỗn hợp kháng thể, chứa ít nhất ba kháng thể theo sáng chế.

Theo một phương án, sự bảo vệ tăng cường quan sát được có thể được đo bằng mức giảm độ nghiêm trọng hoặc tần suất xuất hiện của ít nhất một triệu chứng liên quan đến lây nhiễm EBOV, bằng cách làm giảm số lượng virus, hoặc bằng cách tăng khả năng sống sót ở động vật có vú bị lây nhiễm với EBOV. Ít nhất một triệu chứng được chọn

từ nhóm bao gồm sốt, đau đầu, mệt mỏi, chán ăn, đau cơ, tiêu chảy, nôn mửa, đau bụng, mất nước hoặc chảy máu không thể giải thích.

Sự bảo vệ tăng cường có thể quan sát được khi kháng thể được sử dụng một mình hoặc khi nó được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân trị liệu bổ sung hoặc phương thức điều trị chống EBOV.

Một hoặc nhiều tác nhân trị liệu bổ sung có thể chọn từ nhóm bao gồm thuốc kháng virus, thuốc kháng viêm (chẳng hạn như corticosteroid và thuốc kháng viêm không chứa steroid), kháng thể liên kết với EBOV khác, vacxin dùng cho EBOV, TKM Ebola (các SiARN hướng đích tới RNA polymeraza virus) brincidofovir (CMX-001), favipiravir (T-705), BCX-4430, AVI-7537 (oligome morpholino phosphorodiamidat vô nghĩa hướng đích gen VP24 của virus Ebola) và interferon.

Theo một phương án, một hoặc nhiều tác nhân điều trị bổ sung chứa một hoặc nhiều kháng thể kháng EBOV.

Theo một phương án, một hoặc nhiều kháng thể kháng EBOV chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR và LCVR nêu trong bảng 1.

Theo một phương án liên quan, một hoặc nhiều kháng thể kháng EBOV chứa cặp trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298 và 306/282.

Theo một phương án liên quan khác nữa, một hoặc nhiều kháng thể kháng EBOV chứa cặp trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 18/26, 66/74 và 146/154.

Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được cung cấp để ngăn ngừa hoặc điều trị cho đối tượng có lây nhiễm, hoặc có nguy cơ lây nhiễm, hoặc được sắp đặt trước để nghiên cứu lây nhiễm virus Ebola. Các đối tượng có nguy cơ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, người có sức đề kháng yếu, ví dụ, người có sức đề kháng yếu do bệnh tự miễn, hoặc những người



nhận liệu pháp ức chế miễn dịch (chẳng hạn, sau khi cấy ghép cơ quan), hoặc người mắc hội chứng suy giảm miễn dịch người (HIV) hoặc hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS), các dạng nhất định của thiếu máu cái mà làm tan máu hoặc phá hủy các tế bào bạch cầu, những người nhận phóng xạ hoặc hóa trị, hoặc những người mang bệnh viêm. Các đối tượng khác có nguy cơ mắc phải virus Ebola bao gồm những nhân viên chăm sóc sức khỏe, hoặc những người tiếp xúc trực tiếp hoặc gần gũi cơ thể với người bị bệnh, hoặc bị phơi nhiễm với dịch thể hoặc mô của người nhiễm bệnh, cũng có nguy cơ cao trong việc phát triển lây nhiễm virus Ebola. Ngoài ra, đối tượng có nguy cơ bị mắc lây nhiễm virus Ebola do ở gần vùng bùng phát bệnh, ví dụ, đối tượng cư trú tại thành phố đông dân hoặc ở gần đối tượng đã được xác nhận hoặc nghi ngờ bị nhiễm virus Ebola, hoặc công việc lựa chọn, ví dụ, nhân viên bảo trì chịu trách nhiệm làm sạch thiết bị bệnh viện hoặc viện nghiên cứu nơi bệnh nhân Ebola được điều trị, nhân viên bệnh viện, nhà nghiên cứu dược phẩm, những người đã đi đến hoặc có kế hoạch đi đến những vùng hoặc quốc gia được biết đến là có hoặc bị nghi ngờ có dịch bùng phát của virus Ebola, hoặc những người thường xuyên đi du lịch.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế được cung cấp dưới dạng kết hợp với chất điều trị thứ hai cho đối tượng cần điều trị. Chất điều trị thứ hai này có thể chọn từ nhóm bao gồm thuốc kháng viêm (chẳng hạn corticosteroid, và thuốc kháng viêm thuốc không chứa steroid), và thuốc chống lây nhiễm, thuốc kháng virus, kháng thể gắn với virus Ebola khác, vắc xin dùng cho virus Ebola, kháng thể liên kết với EBOV khác, TKM Ebola (các siARN hướng đích tới RNA polymerase virus) brincidofovir (CMX-001), favipiravir (T-705), BCX-4430, AVI-7537 (oligome morpholino phosphorodiamidat vô nghĩa hướng đích gen VP24 của virus Ebola) và interferon, bổ sung chế độ ăn uống chẳng hạn chất chống oxy hóa và thuốc hoặc liệu pháp bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật dùng để làm thuyên giảm ít nhất một triệu chứng của lây nhiễm virus Ebola, hoặc làm giảm số lượng virus ở bệnh nhân. Theo một số phương án, chất trị liệu thứ hai có thể là chất mà giúp chống lại hoặc làm giảm bất kỳ (các) tác dụng phụ nào liên quan đến kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, nếu (các) tác dụng phụ này xảy ra. Kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế được tiêm dưới da, trong tĩnh mạch, trong da, trong màng bụng, dùng theo đường miệng, theo đường mũi, tiêm bắp hoặc trong sọ. Theo một phương án, kháng thể có thể được dùng theo đường tĩnh mạch nồng độ lớn

nhất của kháng thể trong huyết thanh của bệnh nhân. Kháng thể hoặc mảnh của nó có thể được dùng với liều lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mg/kg thể trọng đến khoảng 100 mg/kg thể trọng bệnh nhân. Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế có thể được dùng một hoặc nhiều liều có chứa từ 50mg đến 600mg.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể kháng virus Ebola hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó dùng để điều trị cho đối tượng có, hoặc bị nghi ngờ có, hoặc đã bị phơi nhiễm với EBOV, hoặc sử dụng để sản xuất thuốc dùng để điều trị bệnh hoặc rối loạn mà có thể có lợi từ việc cản trở liên kết và/hoặc hoạt động của virus Ebola.

Các phương án khác sẽ trở nên rõ ràng hơn khi xem phần mô tả chi tiết sau đây.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: H1H17161P trung hòa hiệu quả EBOV sống.

Fig. 2: Thể hiện sự tương tác của ba kháng thể kháng EBOV với GP Ebola hoặc GP hòa tan.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi mô tả phương pháp, cần phải hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở phương pháp và điều kiện thí nghiệm cụ thể được mô tả, do phương pháp và điều kiện này có thể thay đổi. Cần phải hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ với mục đích mô tả cho các phương án cụ thể, và không làm giới hạn sáng chế ở các phương án này, vì phạm vi của sáng chế sẽ chỉ bị giới hạn bởi yêu cầu bảo hộ kèm theo dưới đây.

Trừ khi được chỉ ra theo cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này có cùng một nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Mặc dù bất kỳ phương pháp và nguyên liệu tương tự hoặc tương đương với phương pháp và nguyên liệu được mô tả trong bản mô tả này đều có thể được sử dụng trên thực tế hoặc phương pháp thử nghiệm theo sáng chế, tuy nhiên phương pháp và nguyên liệu được ưu tiên sẽ được mô tả dưới đây.

### Định nghĩa

“Virus Ebola” hoặc “EBOV” là một chi thuộc họ *Filoviridae*, được biết đến là nguyên nhân gây sốt xuất huyết xảy ra nhanh và nghiêm trọng. Có nhiều loài và nhiều

chủng virus Ebola khác nhau dựa trên trình tự nucleotit và nơi bùng phát dịch, ví dụ, Zaire, Tai Forest (trước đây được gọi là Cote d'Ivoire hoặc bờ biển Ngà), Sudan, Reston, và Bundibugyo. Các dạng gây chết phổ biến nhất của virus là các chủng Zaire và Sudan. Chủng Reston là chủng được biết đến là chỉ lây nhiễm ở linh trưởng không phải con người. Thuật ngữ “virus Ebola” cũng bao gồm các biến thể của virus Ebola phân lập từ các chủng virus Ebola khác nhau.

Trình tự axit amin của glycoprotein virus Ebola đầy đủ chiều dài, trong bản mô tả, còn được viết là “EBOV-GP” hoặc “GP virus Ebola” được minh họa bằng các trình tự axit amin được tìm thấy trong ngân hàng gen có số đăng ký AHX24649.1 (Cũng xem SEQ ID NO: 314) và AHX24649.2 (Cũng xem SEQ ID NO: 315). Thuật ngữ này cũng bao gồm GP virus Ebola hoặc mảnh của nó bắt cặp với, ví dụ đuôi histidin (ví dụ, xem số đăng ký AHX24649.1 với đuôi decahistidin (SEQ ID NO: 318)), Fc của người và chuột, hoặc trình tự tín hiệu. Trình tự axit amin của “GP hòa tan” hoặc “sGP” được trình bày trong số đăng ký AHX24650 và trong SEQ ID NO 316 (với trình tự tín hiệu) và cũng được trình bày trong SEQ ID NO: 317 (không có trình tự tín hiệu nhưng có đuôi myc-myc-hexahistidin). Trình tự axit amin của “GP1” bắt đầu tại đầu amino của GP đầy đủ chiều dài tại gốc 1 và kết thúc tại gốc 501 trong SEQ ID NO: 315. Trình tự axit amin của “GP2” chạy dài từ gốc 502 đến 676 của GP đầy đủ chiều dài trong SEQ ID NO: 315.

Thuật ngữ “lây nhiễm virus Ebola”, hoặc “lây nhiễm EBOV”, như được sử dụng trong bản mô tả dùng để chỉ sốt xuất huyết nghiêm trọng do phơi nhiễm với virus, hoặc với động vật đã bị nhiễm, hoặc với người đã bị nhiễm, hoặc tiếp xúc với dịch thể hoặc mô của động vật hoặc người đã bị nhiễm virus Ebola. Thuật ngữ “các triệu chứng đi kèm với lây nhiễm virus Ebola” bao gồm sốt, đau đầu, mệt mỏi, chán ăn, đau cơ, tiêu chảy, nôn mửa, đau bụng, mất nước hoặc chảy máu không thể giải thích.

Thuật ngữ “kháng thể”, như được sử dụng trong bản mô tả, dùng để chỉ phân tử globulin miễn dịch chứa bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua (nghĩa là, “phân tử kháng thể hoàn chỉnh”), cũng như phân tử protein gồm nhiều monome của nó (ví dụ, IgM) hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (“HCVR” hoặc “V<sub>H</sub>”) và vùng hằng định chuỗi nặng (có ba miền C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> và C<sub>H3</sub>). Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (“LCVR” hoặc “V<sub>L</sub>”) và vùng hằng định chuỗi

nhẹ( $C_L$ ). Vùng  $V_H$  và  $V_L$  có thể còn được chia nhỏ thành vùng siêu biến, được gọi là vùng xác định bổ trợ (CDR), đặt giữa vùng mà bảo thủ hơn, được gọi là vùng khung (FR). Mỗi  $V_H$  và  $V_L$  bao gồm ba CDR và bốn FR, từ đầu amino đến đầu cacboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo các phương án nhất định của sáng chế, FR của kháng thể (hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) có thể được biến đổi một cách tự nhiên hoặc nhân tạo. Trình tự liên ứng axit amin có thể được xác định dựa trên phân tích kép của hai hoặc nhiều CDR.

Việc thay thế một hoặc nhiều gốc CDR hoặc loại bỏ một hoặc nhiều CDR cũng có thể xảy ra. Các kháng thể được mô tả trong tài liệu khoa học trong đó một hoặc hai CDR có thể bị bỏ đi để liên kết. Padlan *et al.* (1995 FASEB J. 9:133-139) đã phân tích các vùng tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên của chúng, dựa trên các cấu trúc tinh thể đã công bố, và kết luận rằng chỉ có khoảng 1/5 đến 1/3 các gốc CDR thực sự liên kết với kháng nguyên. Padlan cũng tìm ra nhiều kháng thể trong đó một hoặc hai CDR không có axit amin tiếp xúc với kháng nguyên (Xem, Vajdos *et al.* 2002 J Mol Biol 320:415-428).

Các gốc CDR không tiếp xúc kháng nguyên có thể được xác định dựa trên các nghiên cứu trước đây (ví dụ, các gốc H60-H65 trong CDRH2 thường không cần đến), từ các vùng CDR Kabat nằm ngoài các CDR Chothia, bằng mô hình phân tử, và/hoặc thực nghiệm. Nếu CDR hoặc các gốc của nó bị loại bỏ, nó thường được thế bằng axit amin chiếm giữ vị trí tương ứng trong trình tự kháng thể người khác hoặc liên ứng của các trình tự này. Các vị trí để thay thế trong các CDR và các axit amin để thay thế cũng được lựa chọn theo thực nghiệm. Thay thế thực nghiệm có thể là thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ.

Các kháng thể đơn dòng kháng virus Ebola hoàn chỉnh ở người được bộc lộ trong bản mô tả có thể chứa một hoặc nhiều đột biến thay thế, thêm và/hoặc mất axit amin trong vùng khung và/hoặc vùng CDR trong vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ so với trình tự dòng mầm tương ứng. Các đột biến này được xác định một cách dễ dàng bằng cách so sánh trình tự axit amin được trình bày trong bản mô tả với các trình tự dòng mầm có sẵn từ, ví dụ, cơ sở dữ liệu trình tự kháng thể công khai. Sáng chế cũng bao gồm kháng thể, và mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà bắt nguồn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được trình bày trong bản mô tả, trong đó một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều vùng khung và/hoặc vùng CDR bị đột biến thành

(các) gốc tương ứng trong trình tự dòng mầm từ cái mà kháng thể bắt nguồn, hoặc thành các gốc tương ứng trong trình tự dòng mầm người khác, hoặc thành sự thay thế axit amin bảo thủ trong các gốc dòng mầm tương ứng (thay đổi trình tự này được gọi chung trong bản mô tả là “đột biến dòng mầm”). Những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, bắt đầu từ vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ trong bản mô tả, có thể dễ dàng tạo ra lượng lớn các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm riêng rẽ hoặc tổ hợp các đột biến. Theo các phương án nhất định, tất cả các gốc vùng khung và/hoặc vùng CDR trong vùng  $V_H$  và/hoặc  $V_L$  bị đột biến quay trở lại thành các gốc có mặt trong trình tự dòng mầm ban đầu từ mà kháng thể bắt nguồn từ đó. Theo các phương án khác, chỉ các gốc nhất định mới bị đột biến quay trở lại trình tự dòng mầm ban đầu, ví dụ, chỉ các gốc bị đột biến tìm thấy trong 8 axit amin đầu tiên trên FR1 và trong 8 axit amin cuối cùng trên FR4, hoặc chỉ các gốc đã đột biến tìm thấy trên CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều gốc vùng khung và/hoặc CDR bị đột biến thành các gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác (nghĩa là trình tự dòng mầm khác so với trình tự dòng mầm mà ban đầu kháng thể bắt nguồn từ đó). Hơn nữa, kháng thể theo sáng chế có thể chứa tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều đột biến dòng mầm tại vùng khung và/hoặc CDR, ví dụ, trong đó các gốc riêng rẽ nhất định bị đột biến thành gốc tương ứng trên trình tự dòng mầm cụ thể trong khi các gốc nhất định khác cái mà khác với trình tự dòng mầm ban đầu được giữ lại hoặc bị đột biến thành các gốc tương ứng trên trình tự dòng mầm khác. Sau khi thu được, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm có thể dễ dàng kiểm tra một hoặc nhiều đặc tính mong muốn, chẳng hạn, tăng độ đặc hiệu liên kết, tăng ái lực liên kết, tăng hoặc cải thiện đặc tính sinh học đối kháng hoặc chủ vận (trong trường hợp có thể), giảm tính sinh miễn dịch, v.v.. Kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên thu được theo cách này nằm trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể đơn dòng người kháng virus Ebola hoàn chỉnh chứa biến thể của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được bộc lộ trong bản mô tả này có một hoặc nhiều đột biến thay thế bảo thủ. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng virus Ebola có trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR với, ví dụ, 10 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, v.v. đột biến thay thế axit amin bảo thủ so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit

amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “kháng thể người”, như được sử dụng trong bản mô tả, được dự tính để bao gồm các kháng thể có vùng biến đổi và vùng hằng định có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người. mAb người theo sáng chế bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi trình tự globulin miễn dịch người (ví dụ, các đột biến tạo ra bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc bằng đột biến *in vivo* sinh dưỡng), ví dụ trong CDR và cụ thể là CDR3. Tuy nhiên, thuật ngữ “kháng thể người” như được sử dụng trong bản mô tả, không bao gồm mAb trong đó trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của các loài động vật có vú khác (ví dụ, chuột), được ghép trong trình tự FR người. Thuật ngữ bao gồm kháng thể được sản xuất tái tổ hợp trong động vật có vú không phải con người, hoặc trong các tế bào của động vật có vú không phải con người. Thuật ngữ không bao gồm các kháng thể được phân lập từ hoặc được sản xuất ở đối tượng con người.

Thuật ngữ “tái tổ hợp”, như được sử dụng trong bản mô tả, dùng để chỉ kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế tạo ra, biểu hiện, phân lập hoặc thu được bằng các kỹ thuật hoặc phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật chẳng hạn như kỹ thuật ADN tái tổ hợp bao gồm, ví dụ, ghép nối ADN và biểu hiện gen chuyển. Thuật ngữ dùng để chỉ kháng thể biểu hiện trong động vật có vú không phải con người (bao gồm động vật có vú không phải con người chuyển gen, ví dụ, chuột chuyển gen), hoặc hệ thống biểu hiện tế bào (ví dụ, các tế bào CHO) hoặc được phân lập từ thư viện kháng thể người tổ hợp tái tổ hợp.

Thuật ngữ “liên kết đặc hiệu”, hoặc “liên kết đặc hiệu với”, hoặc thuật ngữ tương tự, có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó tạo thành phức hợp với kháng nguyên mà tương đối ổn định dưới điều kiện sinh lý. Liên kết đặc hiệu được đặc trưng bởi hằng số phân ly cân bằng ít nhất là khoảng  $1 \times 10^{-7}$  M hoặc thấp hơn (ví dụ,  $K_D$  nhỏ hơn nghĩa là liên kết bền chặt hơn). Phương pháp xác định việc hai phân tử liên kết đặc hiệu với nhau là phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm, ví dụ, thẩm tách cân bằng, cộng hưởng plasmon bề mặt, và phương pháp tương tự. Như được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™, liên kết đặc hiệu với virus Ebola. Ngoài ra, kháng thể đa đặc hiệu liên kết với một vùng trên virus Ebola và một hoặc nhiều kháng nguyên khác hoặc kháng thể đặc hiệu kép mà liên kết với hai vùng khác của virus Ebola được

xem là kháng thể “liên kết đặc hiệu”, như được sử dụng trong bản mô tả này.

Thuật ngữ kháng thể “ái lực cao” dùng để chỉ mAb có ái lực liên kết với virus Ebola, được biểu hiện là  $K_D$ , ít nhất là  $10^{-7}M$ ; tốt hơn nếu là  $10^{-8}M$ ; tốt hơn nữa nếu là  $10^{-9}M$ ; thậm chí tốt hơn nữa là  $10^{-10}M$ ; ưu tiên hơn nếu là  $10^{-11}M$ ; và tốt nhất là  $10^{-12}M$ ; như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™ hoặc ELISA ái lực-dung dịch.

Thuật ngữ “tốc độ phân ly chậm”, “Koff” hoặc “kd” có nghĩa là kháng thể phân ly từ virus Ebola, hoặc hạt tương tự virus biểu hiện GP virus Ebola, có hằng số tốc độ là  $1 \times 10^{-3} s^{-1}$  hoặc thấp hơn, tốt hơn nếu là  $1 \times 10^{-4} s^{-1}$  hoặc thấp hơn, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™.

Thuật ngữ “phần liên kết kháng nguyên” của kháng thể, “mảnh liên kết kháng nguyên” của kháng thể, và thuật ngữ tương tự, như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein bất kỳ có trong tự nhiên, thu được bằng enzym, tổng hợp, hoặc được biến đổi gen mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo thành phức hợp. Thuật ngữ “mảnh liên kết kháng nguyên” hoặc “mảnh kháng thể”, như được sử dụng trong bản mô tả, dùng để chỉ một hoặc nhiều mảnh kháng thể giúp duy trì khả năng liên kết với virus Ebola.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được liên hợp với một cấu tử chẳng hạn như là phối tử hoặc phân trị liệu (“Liên hợp miễn dịch”), chẳng hạn thuốc kháng virus, kháng thể kháng virus Ebola thứ hai, hoặc bất kỳ phân trị liệu nào khác hữu dụng trong việc điều trị lây nhiễm gây ra bởi virus Ebola.

“Kháng thể được phân lập” như được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định để dùng để chỉ kháng thể mà gần như không chứa kháng thể (Ab) khác có tính đặc hiệu kháng nguyên khác nhau (ví dụ, kháng thể được phân lập liên kết đặc hiệu với virus Ebola, hoặc mảnh của nó, gần như không chứa các Ab liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên khác ngoài virus Ebola).

“Kháng thể phong bế” hoặc “kháng thể trung hòa”, như được sử dụng trong bản mô tả này (hoặc “kháng thể mà trung hòa hoạt tính của virus Ebola” hoặc “kháng thể đối kháng”), dùng để chỉ kháng thể mà việc liên kết với virus Ebola của nó dẫn đến ức chế ít nhất một hoạt tính sinh học của virus Ebola. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể

giúp ngăn ngừa hoặc cản trở virus Ebola liên kết với, hoặc xâm nhập vào trong tế bào chủ. Ngoài ra, “kháng thể trung hòa” là kháng thể có khả năng trung hòa, nghĩa là, ngăn chặn, ức chế, làm giảm, cản trở hoặc gây trở ngại đến, khả năng của các tác nhân gây bệnh trong việc bắt đầu và/hoặc duy trì lây nhiễm trong tế bào chủ. Thuật ngữ “kháng thể trung hòa” và “kháng thể cái mà trung hòa” hoặc “các kháng thể cái mà trung hòa” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này. Có thể sử dụng các kháng thể này, một mình hoặc kết hợp, dưới dạng chất điều trị hoặc dự phòng với chất kháng virus khác khi có công thức thích hợp, hoặc kết hợp với vacxin hoạt hóa, hoặc làm công cụ chẩn đoán.

“Gây độc trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể” hoặc “ADCC” là cơ chế bảo vệ miễn dịch trung gian tế bào trong đó tế bào phản ứng lại kích thích của hệ miễn dịch dung giải tích cực tế bào đích, mà các kháng nguyên bề mặt màng của nó được liên kết bởi các kháng thể đặc hiệu, chẳng hạn bằng các kháng thể đã mô tả trong bản mô tả. Như vậy, nó là cơ chế thông qua đó, ví dụ, kháng thể đặc hiệu virus có thể hoạt động để hạn chế sự lan rộng của lây nhiễm. ADCC cổ điển được trung gian bởi các tế bào giết tự nhiên (tế bào NK), đại thực bào, bạch cầu trung tính và trong trường hợp nhất định, bạch cầu ưa eosin.

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

Thuật ngữ “K<sub>D</sub>”, như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ hằng số phân ly cân bằng trong tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể.

Thuật ngữ “quyết định kháng nguyên” dùng để chỉ yếu tố quyết định kháng nguyên tương tác với vị trí liên kết kháng nguyên đặc hiệu trong vùng biến đổi của phân tử kháng thể đã biết là paratop. Một kháng nguyên có thể có nhiều hơn một quyết định kháng nguyên. Do đó, các kháng thể khác nhau có thể liên kết với các vùng khác nhau trên kháng nguyên và có thể tạo ra tác dụng sinh học khác nhau. Thuật ngữ “quyết định kháng nguyên” cũng dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà tế bào B và/hoặc T đáp ứng. Nó cũng dùng để chỉ vùng trên kháng nguyên được liên kết bởi kháng thể. Các



quyết định kháng nguyên được chia thành quyết định kháng nguyên cấu trúc và chức năng. Các quyết định kháng nguyên chức năng thường là tập hợp con của các quyết định kháng nguyên cấu trúc và các gốc của nó trực tiếp tác động đến ái lực của tương tác. Quyết định kháng nguyên có thể có cấu trúc bậc một hoặc bậc ba. Quyết định kháng nguyên có cấu trúc bậc ba, có chứa các axit amin phi tuyến tính. Theo các phương án nhất định, quyết định kháng nguyên bao gồm các yếu tố quyết định, là các nhóm phân tử bề mặt hoạt hóa về mặt hóa học chẳng hạn axit amin, các chuỗi bên đường, nhóm phosphoryl hoặc nhóm sulfonyl, và theo các phương án nhất định, có các đặc trưng cấu trúc không gian ba chiều, và/hoặc đặc tính tích điện nhất định.

Thuật ngữ “cạnh tranh chéo”, như được sử dụng trong bản mô tả, có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với kháng nguyên và ức chế hoặc cản trở sự liên kết của kháng thể khác hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Thuật ngữ cũng bao gồm sự cạnh tranh giữa hai kháng thể theo cả hai hướng, nghĩa là, kháng thể thứ nhất liên kết và cản trở sự liên kết của kháng thể thứ hai và ngược lại. Theo các phương án nhất định, kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai có thể liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên. Ngoài ra, kháng thể thứ nhất và thứ hai có thể liên kết với các quyết định kháng nguyên khác nhau nhưng chồng lên nhau sao cho việc liên kết của kháng thể thứ nhất ức chế hoặc cản trở sự liên kết của kháng thể thứ hai, ví dụ, thông qua chướng ngại không gian. Cạnh tranh chéo giữa các kháng thể có thể đo được bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, bằng thử nghiệm giao thoa lớp sinh học không gắn nhãn, thời gian thực. Để xác định việc kháng thể thử nghiệm cạnh tranh chéo với kháng thể kháng GP virus Ebola tham chiếu theo sáng chế, cho kháng thể tham chiếu liên kết với GP virus Ebola hoặc peptit dưới các điều kiện bão hòa. Sau đó, xác định khả năng liên kết của kháng thể thử nghiệm với GP virus Ebola. Nếu kháng thể thử nghiệm có khả năng liên kết với GP virus Ebola sau khi liên kết bão hòa với kháng thể kháng GP virus Ebola tham chiếu, có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm liên kết với quyết định kháng nguyên khác so với kháng thể kháng GP virus Ebola tham chiếu. Mặt khác, nếu kháng thể thử nghiệm không có khả năng liên kết với GP virus Ebola sau khi liên kết bão hòa với kháng thể kháng GP virus Ebola tham chiếu, thì kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với cùng quyết định kháng nguyên so với quyết định kháng nguyên mà kháng thể kháng GP virus Ebola tham chiếu theo sáng chế liên kết.

Thuật ngữ "gần như tương đồng" hoặc "về cơ bản tương đồng" khi đề cập đến axit

nucleic hoặc mảnh của nó, chỉ ra rằng, khi được sắp thẳng hàng một cách tối ưu cùng với việc mất hoặc chèn nucleotit thích hợp với axit nucleic khác (hoặc sợi bổ sung của nó), thì độ tương đồng trình tự nucleotit ít nhất khoảng 90%, và tốt hơn nữa nếu ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% của các bazơ nucleotit, như được xác định bằng bất kỳ thuật toán nào giải đã biết về độ tương đồng trình tự, như FASTA, BLAST hoặc GAP, như được mô tả dưới đây. Phân tử axit nucleic gần như tương đồng với phân tử axit nucleic tham chiếu có thể, trong một số trường hợp, mã hóa cho polypeptit có cùng tự trình tự amino axit hoặc tương tự với polypeptit được mã hóa bằng phân tử axit nucleic tham chiếu này.

Đối với polypeptit, thuật ngữ "gần giống" hoặc "gần như tương tự" có nghĩa là hai trình tự peptit, khi được sắp thẳng hàng một cách tối ưu, chẳng hạn như bằng chương trình GAP hoặc BESTFIT bằng cách sử dụng khối lượng khoảng trống mặc định, có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa nếu độ tương đồng trình tự ít nhất 95%, 98% hoặc 99%. Tốt hơn là, phần gốc mà không tương đồng khác nhau bởi sự thay thế axit amin bảo thủ. "Thay thế axit amin bảo thủ" là thay thế trong đó gốc axit amin được thay bằng gốc axit amin khác có chuỗi bên (nhóm R) với đặc tính hóa học tương tự (ví dụ, điện tích hoặc kỵ nước). Nói chung, thay thế axit amin bảo thủ về cơ bản sẽ không thay đổi đặc tính của protein. Đối với trường hợp trong đó hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau bởi thay thế bảo thủ, phần trăm độ tương đồng trình tự hoặc mức độ tương tự có thể được điều chỉnh để điều chỉnh bản chất bảo thủ của đột biến thay thế. Phương pháp thực hiện việc điều chỉnh này là phương pháp đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331). Ví dụ về nhóm axit amin có chuỗi bên với đặc tính hóa học tương tự bao gồm (1) chuỗi bên béo: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; (2) chuỗi bên hydroxyl béo: serin và threonin; (3) chuỗi bên chứa amit: asparagin và glutamin; (4) chuỗi bên thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; (5) chuỗi bên có tính bazơ: lysin, arginin, và histidin; (6) chuỗi bên có tính axit: aspartat và glutamat, và (7) chuỗi bên chứa lưu huỳnh: xystein và methionin. Nhóm thay thế axit amin bảo thủ được ưu tiên là: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat, và asparagin-glutamin. Ngoài ra, thay thế bảo thủ là sự thay đổi bất kỳ có giá trị dương trong ma trận logarit PAM250 của hàm hợp lý được bộc lộ trong Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45. Việc thay thế "tương đối bảo thủ" là sự thay đổi bất kỳ có giá trị

không âm trong ma trận logarit PAM250 của hàm hợp lý.

Tương đồng về trình tự đối với polypeptit thường được xác định bằng cách sử dụng phần mềm phân tích trình tự. Phần mềm phân tích protein đối chiếu các trình tự tương tự bằng cách sử dụng giá trị về mức tương tự dùng cho việc thay thế, loại bỏ và sự biến đổi khác, bao gồm việc thay thế axit amin bảo thủ. Đối với trường hợp, phần mềm GCG bao gồm chương trình như Gap và Bestfit mà có thể được sử dụng với thông số mặc định để xác định tính tương đồng về trình tự hoặc độ tương đồng trình tự giữa polypeptit có mối liên quan mật thiết, như các polypeptit tương đồng từ loài sinh vật khác nhau hoặc giữa protein kiểu đại và thể đột biến của nó. Xem, ví dụ, GCG phiên bản 6.1. Trình tự polypeptit còn có thể được so sánh bằng cách sử dụng FASTA với thông số mặc định hoặc yêu cầu, chương trình trong GCG phiên bản 6.1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) tạo ra thông tin về sự bất cặp và phần trăm độ tương đồng trình tự của vùng của sự trùng lặp tốt nhất giữa các trình tự tra cứu và truy vấn (Pearson (2000) *supra*). Kỹ thuật giải được ưu tiên khác khi so sánh trình tự theo sáng chế với cơ sở dữ liệu chứa lượng lớn các trình tự từ các sinh vật khác nhau là chương trình máy tính BLAST, đặc biệt là BLASTP hoặc TBLASTN, bằng cách sử dụng thông số mặc định. Xem, ví dụ, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 và Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

Thuật ngữ “lượng có hiệu quả trị liệu” nghĩa là lượng mà tạo ra hiệu quả mong muốn khi nó được sử dụng. Lượng chính xác sẽ phụ thuộc vào mục đích điều trị, và sẽ được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết (xem, ví dụ, Lloyd (1999) *The Art, Science và Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “đối tượng” dùng để chỉ động vật, ưu tiên hơn là động vật có vú, ưu tiên hơn nữa là con người, cần được làm thuyên giảm, ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn chẳng hạn như lây nhiễm virus. Đối tượng có thể mắc lây nhiễm virus Ebola hoặc bị cho mắc bệnh để tiến hành nghiên cứu lây nhiễm virus Ebola. Các đối tượng “bị cho mắc bệnh để tiến hành nghiên cứu lây nhiễm virus Ebola”, hoặc các đối tượng “những người có nguy cơ cao mắc phải lây nhiễm virus Ebola”, là các đối tượng có hệ miễn dịch bị tổn thương vì bệnh tự miễn, hoặc những người nhận liệu pháp ức chế miễn dịch (ví dụ, sau khi cấy ghép cơ quan), hoặc người mắc hội chứng suy giảm miễn dịch người (HIV) hoặc hội chứng suy giảm miễn dịch

mắc phải (acquired immune deficiency syndrome- AIDS), các dạng nhất định của thiếu máu cái mà làm tan máu hoặc phá hủy các tế bào bạch cầu, những người nhận phóng xạ hoặc hóa trị, hoặc những người mang bệnh viêm. Ngoài ra, các đối tượng còn quá nhỏ hoặc lớn tuổi đều có nguy cơ cao. Bất kỳ người nào tiếp xúc trực tiếp hoặc gần gũi cơ thể với động vật bị nhiễm, hoặc người bị nhiễm bệnh, hoặc bị phơi nhiễm với dịch thể hoặc mô từ động vật hoặc người nhiễm bệnh, cũng có nguy cơ phát triển lây nhiễm virus Ebola cao. Ngoài ra, đối tượng có nguy cơ mắc lây nhiễm virus Ebola do ở gần vùng bùng phát bệnh, ví dụ, đối tượng cư trú tại thành phố đông dân hoặc ở gần đối tượng đã được xác nhận hoặc nghi ngờ bị nhiễm virus Ebola, hoặc do tính chất công việc, ví dụ nhân viên bệnh viện, nhà nghiên cứu dược phẩm, những người đã đi đến hoặc có kế hoạch đi đến những vùng hoặc quốc gia được biết đến là có hoặc nghi ngờ có dịch bùng phát của virus Ebola, hoặc những người thường xuyên đi du lịch.

Thuật ngữ “điều trị”, “đang điều trị” hoặc “việc điều trị”, dùng để chỉ việc làm giảm hoặc làm cải thiện mức độ nghiêm trọng của ít nhất một triệu chứng hoặc dấu hiệu của lây nhiễm virus Ebola nhờ việc cung cấp chất trị liệu chẳng hạn như kháng thể theo sáng chế cho đối tượng cần điều trị. Thuật ngữ này bao gồm việc ức chế sự tiến triển của bệnh, hoặc lây nhiễm trở nên tồi tệ hơn. Thuật ngữ cũng bao gồm tiên lượng bệnh tích cực tức là, đối tượng có thể không còn lây nhiễm hoặc có thể giảm hoặc không còn hàm lượng virus sau khi việc cung cấp chất trị liệu chẳng hạn như kháng thể theo sáng chế. Chất trị liệu được cung cấp theo liều trị liệu cho đối tượng.

Thuật ngữ “ngăn ngừa”, “đang ngăn ngừa” hoặc “sự ngăn ngừa” đề cập đến việc ức chế sự xuất hiện của lây nhiễm virus Ebola hoặc bất kỳ triệu chứng hoặc dấu hiệu nào của lây nhiễm virus Ebola sau khi việc cung cấp kháng thể theo sáng chế. Thuật ngữ bao gồm việc ngăn chặn sự lan rộng của lây nhiễm ở đối tượng phơi nhiễm với virus hoặc có nguy cơ mắc phải lây nhiễm virus Ebola.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “thuốc kháng virus” dùng để chỉ liệu pháp hoặc chất chống lây nhiễm, hoặc nó là phân tử hóa học, hoặc liệu pháp sinh học, được dùng để điều trị, ngăn ngừa hoặc làm thuyên giảm lây nhiễm virus ở đối tượng. Ví dụ, theo sáng chế, thuốc kháng virus có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể liên kết với virus Ebola (theo một phương án kháng thể liên kết với virus Ebola có thể khác với các kháng thể được mô tả trong bản mô tả), vacxin dùng cho virus Ebola, TKM Ebola (các si ARN hướng đích tới RNA polymeraza virus) brincidofovir (CMX-001),

favipiravir (T-705), BCX-4430, AVI-7537 (oligome morpholino phosphorodiamidat vô nghĩa hướng đích gen VP24 của virus Ebola) và interferon. Theo sáng chế, lây nhiễm được điều trị được gây ra bởi virus Ebola.

#### Mô tả chung

Bệnh virus Ebola là bệnh nghiêm trọng, thường gây tử vong gây ra bởi các hạt virus dạng sợi là thành viên của họ *Filoviridae*. Một số loài thuộc chi Ebola virus được biết đến là có khả năng gây bệnh ở người. Chúng bao gồm Zaire, Sudan, Tai Forest (trước đây là Bờ biển Ngà) và Bundibugyo. Nguồn phát sinh tự nhiên của virus chưa được biết đến và đến nay chưa có liệu pháp trị liệu hoặc vaccin nào được chấp nhận sử dụng.

Hệ gen của virus bao gồm một chuỗi đơn của ARN hướng âm có chiều dài xấp xỉ 19kb. Các hạt virus Ebola có bảy protein: một glycoprotein (GP) bề mặt, một nucleoprotein (NP), bốn protein cấu trúc của hạt virus (VP40, VP30, VP24, và VP30), và một polymeraza ARN phụ thuộc ARN (L). (Feldman, et al. (1992) *Virus Res.* 24, 1-19).

Chỉ có duy nhất một protein có mặt trên bề mặt của virus là glycoprotein. Do ARN cải biến, sự phiên mã của gen GP tạo ra sự tổng hợp của một số gen GP đặc hiệu mARN mã hóa cho các GP virus bao gồm GP hòa tan không cấu trúc (sGP) và GP hạt virus bề mặt (Volchkova, VA *et al.*, (1998), *Virology* 250:408-414). Cả hai GP đều được tổng hợp như là một phân tử tiền thân được phân tách protein bằng furin proteaza tế bào trong suốt quá trình nội bào (Volchkov, VE, *et al.*, ((1998), *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5762-5767). Các sGP tạo ra dạng dime, trong khi mảnh đầu cacboxy được phân tách là monome. Các đột biến bề mặt virus được tạo ra như là một trime của GP<sub>1,2</sub> tạo thành từ hai tiểu đơn vị GP1 và GP2 liên kết bởi cầu nối disulfua (Volchkova, VA *et al.*, (1998), *Virology* 250:408-414; Falzarano, D. *et al.*, (2006), *Chembiochem* 7:1605-1611). GP1 được biết đến là trung gian liên kết virus với tế bào chủ và GP2 được tham gia vào dung hợp màng tế bào (Sanchez, A. *et al.*, (1996), *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3602-3607; Alazard-Dany, N., *et al.* (2006), *J. Gen. Virol.* 87:1247-1257).

Trong khi nhiễm EBOV, một lượng đáng kể các glycoprotein hòa tan (sGP) được giải phóng ra khỏi tế bào bị nhiễm virus. Dạng GP này thể hiện khả năng liên kết và cô lập các kháng thể trung hòa virus trực tiếp kháng lại GP hạt virus hoặc GP bề mặt

(Dolnik, O. et al., (2004), EMBO J 23:2175-2184). Ngoài việc cản trở kháng thể, vai trò của GP hòa tan liên quan tới sự nhân lên và/hoặc khả năng gây bệnh của virus không được xác định rõ ràng. Những nghiên cứu gần đây hơn bởi Escudero-Perez, et al., đã cho thấy rằng các sGP có thể liên kết và hoạt hóa các tế bào đuôi gai và đại thực bào không bị nhiễm và kích hoạt sự bài tiết của các cytokin kháng viêm và cytokin gây viêm. Ngoài ra, họ chứng minh được rằng sGP tác động đến chức năng tế bào nội mô và có thể ảnh hưởng đến tính thấm qua của mạch máu (Escudero-Perez, et al., (2014), PLOS Pathogens, Vol. 10, Issue 11:1-17). Điều này có thể giải thích cho phản ứng vật chủ viêm rối loạn sau khi lây nhiễm và có thể góp phần vào khả năng gây bệnh của virus.

Liệu pháp miễn dịch thụ động dùng để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh lây nhiễm đã được sử dụng trong hơn một thế kỷ qua, thường là ở dạng huyết thanh người đang khỏi bệnh có chứa lượng lớn các kháng thể trung hòa (Good *et al.*, (1991); Cancer 68: 1415-1421). Ngày nay, các kháng thể đơn dòng tinh sạch hiện đang được nghiên cứu lâm sàng và cận lâm sàng để sử dụng như là thuốc kháng sinh (Marasco et al 2007; Nature Biotechnology 25: 1421-1434). Một vài kháng thể trong số các kháng thể đã mô tả liên kết với glycoprotein virus Ebola (Xem ví dụ Audet *et. al.* (2014), Scientific Reports 4:6881; Chen, *et.al.* (2014), ACS Chem Biol. Oct. 17; 9(10):2263-73; Koellhoffer JF, *et.al.*, (2012), Chembiochem Nov. 26; 13(17):2549-57; Qiu, X., *et. al.*, Nature (2014) Oct 2;514(7520):47-53).

Các tác giả sáng chế đã bộc lộ trong bản mô tả các kháng thể người hoàn chỉnh và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với GP virus Ebola và điều chỉnh tương tác của virus Ebola với các tế bào này. Các kháng thể kháng GP virus Ebola có thể liên kết với virus Ebola với ái lực cao. Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế là kháng thể phong bế trong đó các kháng thể có thể liên kết với GP virus Ebola và cản trở virus liên kết và/hoặc xâm nhập vào trong các tế bào chủ. Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế có thể cản trở sự liên kết của virus Ebola với các tế bào và điều này có thể ức chế hoặc trung hòa lây nhiễm virus trong tế bào chủ. Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế có thể làm trung gian cho phản ứng gây độc trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) và do đó, có thể giúp đỡ trong việc phá hủy tế bào có chứa virus. Theo các phương án nhất định, các kháng thể có thể hoạt động theo cả hai kiểu, ví dụ, chúng có thể trung hòa lây nhiễm virus và có thể làm trung gian cho ADCC. Theo một số phương án, các kháng thể có thể

rất có ích trong việc điều trị cho đối tượng đang bị nhiễm virus Ebola. Các kháng thể khi được cung cấp cho đối tượng cần điều trị có thể làm giảm lây nhiễm gây ra bởi virus chẳng hạn như virus Ebola ở đối tượng. Chúng được sử dụng để làm giảm số lượng virus ở đối tượng. Chúng có thể được sử dụng một mình hoặc được sử dụng như một liệu pháp bổ trợ bên cạnh các liệu pháp và phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật để điều trị lây nhiễm virus. Theo các phương án nhất định, các kháng thể này có thể liên kết với quyết định kháng nguyên tại đầu amino của GP virus Ebola. Theo các phương án nhất định, các kháng thể này có thể liên kết với quyết định kháng nguyên tại đầu cacboxy của GP virus Ebola. Ngoài ra, các kháng thể đã xác định có thể được sử dụng theo cách dự phòng (trước khi lây nhiễm) để bảo vệ động vật không bị lây nhiễm, hoặc có thể sử dụng để điều trị (sau khi đã bị lây nhiễm) để làm thuyên giảm tình trạng lây nhiễm trước đó, hoặc làm thuyên giảm ít nhất một triệu chứng liên quan đến lây nhiễm.

Trình tự axit amin đầy đủ chiều dài của GP virus Ebola minh họa được trình bày trong ngân hàng gen với số đăng ký AHX24649.1 và AHX24649.2 và cũng được trình bày lần lượt trong SEQ ID NO: 314 và 315. GP1 kéo dài từ gốc axit amin 1-501 của GP đầy đủ chiều dài và GP2 kéo dài từ gốc axit amin 502 đến 676 của GP đầy đủ chiều dài (trình bày trong SEQ ID NO 314 hoặc SEQ ID NO: 315). GP EBOV đầy đủ chiều dài, cũng được trình bày trong số đăng ký AHX24649.1, được bắt cặp với đuôi decahistidin, chẳng hạn như đã trình bày trong SEQ ID NO: 318. GP hòa tan (sGP) được trình bày trong ngân hàng gen với số đăng ký AHX24650.1 và cũng được trình bày trong SEQ ID NO: 316 (cùng với trình tự tín hiệu đính kèm) và cũng được trình bày trong SEQ ID NO: 317 (cùng với trình tự tín hiệu, nhưng không có đuôi myc-myc-his).

Theo các phương án nhất định, thu được các kháng thể theo sáng chế từ chuột tạo miễn dịch với kháng nguyên sơ cấp, chẳng hạn GP virus Ebola đầy đủ chiều dài, hoặc với dạng tái tổ hợp từ GP virus Ebola hoặc mảnh của nó sau đó tạo miễn dịch với kháng nguyên thứ cấp, hoặc với mảnh hoạt hóa miễn dịch của GP virus Ebola. Theo các phương án nhất định, các kháng thể thu được từ chuột tạo miễn dịch với ADN mã hóa cho GP virus Ebola đầy đủ chiều dài (Zaire.2014, xem ngân hàng xen KJ660346.2; tương tự xem trong SEQ ID NO: 313).

Kháng nguyên có thể là mảnh kháng nguyên và/hoặc mảnh hoạt hóa về mặt sinh học của GP virus Ebola hoặc ADN mã hóa cho mảnh hoạt hóa của nó. Mảnh này có thể được bắt nguồn từ vùng bất kỳ trong GP virus, bao gồm mảnh đầu amino (ví dụ, GP1),

hoặc mảnh đầu cacboxy (ví dụ, Gp2). Các peptit có thể bị biến đổi bao gồm thêm hoặc thay thế các gốc nhất định dùng để gắn nhãn hoặc dùng cho mục đích liên hợp với các phân tử mang, chẳng hạn KLH. Ví dụ, gốc xystein có thể được thêm vào tại đầu C hoặc đầu N của peptit, hoặc trình tự nối có thể được thêm vào để tạo ra peptit để liên hợp với, ví dụ, KLH dùng cho phản ứng tạo miễn dịch.

Các kháng thể kháng virus Ebola nhất định theo sáng chế có khả năng liên kết và trung hòa hoạt động của virus Ebola, như được xác định bằng thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo*. Kháng thể theo sáng chế có khả năng liên kết và trung hòa hoạt động của virus Ebola và do đó sự liên kết và/hoặc xâm nhập của virus vào trong tế bào chủ sau khi lây nhiễm virus có thể được đo bằng cách sử dụng bất kỳ phương pháp tiêu chuẩn nào đã biết với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm các thử nghiệm liên kết hoặc thử nghiệm hoạt hóa, chẳng hạn như được mô tả trong bản mô tả.

Các ví dụ không giới hạn về thử nghiệm *in vitro* dùng để đo hoạt tính liên kết được minh họa trong ví dụ 3, trong bản mô tả. Trong ví dụ 3, ái lực liên kết và hằng số phân ly liên kết của các kháng thể kháng GP virus Ebola đối với virus Ebola đã xác định bằng Biacore. Trong ví dụ 4 và 7, các thử nghiệm trung hòa được dùng để xác định tính lây nhiễm của các chủng virus Ebola khác nhau.

Các kháng thể đặc hiệu với GP virus Ebola có thể không chứa các cấu tử hoặc các nhãn bổ sung, hoặc chúng có thể chứa một cấu tử hoặc một nhãn đầu C hoặc đầu N. Theo một phương án, nhãn hoặc cấu tử có thể là biotin. Trong thử nghiệm liên kết, vị trí của nhãn (nếu có) có thể xác định theo hướng của peptit có liên quan đến bề mặt mà peptit gắn vào. Ví dụ, nếu bề mặt được phủ avidin, peptit có chứa biotin đầu N sẽ được định hướng sao cho phần đầu C của peptit sẽ ở xa bề mặt. Theo một phương án, nhãn có thể là nuclit phóng xạ, thuốc nhuộm huỳnh quang hoặc nhãn có thể phát hiện MRI. Theo các phương án nhất định, các kháng thể gắn nhãn này có thể được sử dụng trong thử nghiệm chẩn đoán bao gồm thử nghiệm tạo ảnh.

Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể

Trừ khi được định nghĩa cụ thể khác, thuật ngữ “kháng thể”, như được sử dụng trong bản mô tả, sẽ được hiểu là bao gồm các phân tử kháng thể có chứa hai chuỗi nặng globulin miễn dịch và hai chuỗi nhẹ globulin miễn dịch (nghĩa là, “các phân tử kháng



thể đầy đủ chiều dài”) cũng như các mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể, "mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể và các thuật ngữ tương tự, như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ polypeptit hoặc glycoprotein có trong tự nhiên, thu được bằng enzym, tổng hợp, hoặc được biến đổi gen mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo thành phức hợp. Thuật ngữ “mảnh liên kết kháng nguyên” của kháng thể hoặc “mảnh kháng thể”, như được sử dụng trong bản mô tả, dùng để chỉ một hoặc nhiều mảnh kháng thể có khả năng liên kết đặc hiệu với virus Ebola. Mảnh kháng thể có thể bao gồm mảnh Fab, mảnh  $F(ab')_2$ , mảnh  $F_v$ , mảnh dAb, mảnh chứa CDR, hoặc CDR được phân lập. Theo các phương án nhất định, thuật ngữ “mảnh liên kết kháng nguyên” dùng để chỉ mảnh polypeptit của phân tử liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu. Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể bắt nguồn, ví dụ, từ phân tử kháng thể hoàn chỉnh sử dụng kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp bất kỳ như thủy phân protein hoặc kỹ thuật biến đổi gen tái tổ hợp bao gồm kỹ thuật thao tác trên gen và biểu hiện ADN mã hóa cho miền hằng định (tùy ý) và miền biến đổi của kháng thể. ADN này đã được biết đến và/hoặc dễ dàng thu được từ, ví dụ, nguồn thương mại, thư viện ADN (bao gồm, ví dụ, thư viện thể thực khuẩn-kháng thể), hoặc có thể được tổng hợp. ADN có thể được giải trình tự và được thao tác xử lý hóa học hoặc bằng cách sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử, ví dụ, để sắp xếp một hoặc nhiều vùng hằng định và/hoặc vùng biến đổi theo cấu hình thích hợp, hoặc để đưa vào mã bộ ba, tạo ra gốc xystein, biến đổi, thêm hoặc mất axit amin, v.v..

Ví dụ về mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: (i) mảnh Fab; (ii) mảnh  $F(ab')_2$ ; (iii) mảnh  $F_d$ ; (iv) mảnh  $F_v$ ; (v) phân tử  $F_v$  (scFv) chuỗi đơn; (vi) mảnh dAb; và (vii) đơn vị nhận diện tối thiểu bao gồm các gốc axit amin tương đồng với vùng siêu biến của kháng thể (ví dụ, vùng xác định bổ trợ (CDR) được phân lập như peptit CDR3), hoặc peptit FR3-CDR3-FR4 ràng buộc. Phân tử được biến đổi khác, như kháng thể đặc hiệu vùng, kháng thể đơn vùng, kháng thể loại bỏ vùng, kháng dạng khảm, kháng thể ghép CDR, các dạng tổ hợp khác như diabody, triabody, tetrabody, minibody, nanobody (ví dụ: nanobody đơn trị, nanobody lưỡng trị, v.v.), thuốc miễn dịch mô đụn nhỏ (SMIPs), và vùng IgNAR biến đổi từ cá mập, cũng nằm trong phạm vi nghĩa của thuật ngữ "mảnh liên kết kháng nguyên" như được sử dụng trong bản mô tả này.

Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể sẽ thường chứa ít nhất một miền biến

đổi. Miền biến đổi có thể có kích thước bất kỳ hoặc là hỗn hợp axit amin và sẽ thường chứa ít nhất một CDR, cái mà liền kề hoặc trong khung với một hoặc nhiều trình tự khung. Trong mảnh liên kết kháng nguyên có miền  $V_H$  liên hợp với miền  $V_L$ , các miền  $V_H$  và  $V_L$  có thể nằm cân xứng với nhau trong cấu hình thích hợp bất kỳ. Ví dụ, vùng biến đổi có thể là dime và chứa các dime  $V_H-V_H$ ,  $V_H-V_L$  hoặc  $V_L-V_L$ . Ngoài ra, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa miền  $V_H$  hoặc  $V_L$  monome.

Theo một số phương án, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất một miền biến đổi được liên kết cộng hóa trị với ít nhất một miền hằng định. Ví dụ về cấu hình của miền hằng định và miền biến đổi mà có thể có trong mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: (i)  $V_H-CH1$ ; (ii)  $V_H-CH2$ ; (iii)  $V_H-CH3$ ; (iv)  $V_H-CH1-CH2$ ; (v)  $V_H-CH1-CH2-CH3$ ; (vi)  $V_H-CH2-CH3$ ; (vii)  $V_H-CL$ ; (viii)  $V_L-CH1$ ; (ix)  $V_L-CH2$ ; (x)  $V_L-CH3$ ; (xi)  $V_L-CH1-CH2$ ; (xii)  $V_L-CH1-CH2-CH3$ ; (xiii)  $V_L-CH2-CH3$ ; và (xiv)  $V_L-CL$ . Trong cấu hình bất kỳ của miền hằng định và miền biến đổi, bao gồm bất kỳ cấu hình mẫu được liệt kê trên đây, miền hằng định và miền biến đổi có thể được liên kết trực tiếp với nhau hoặc có thể được liên kết bằng toàn bộ hoặc một phần vùng liên kết hoặc vùng bản lề. Vùng bản lề có thể bao gồm ít nhất 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều hơn) axit amin mà tạo ra liên kết linh hoạt hoặc bán linh hoạt giữa miền hằng định và/hoặc biến đổi liền kề trong một phân tử polypeptit. Ngoài ra, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể chứa dime cùng loại hoặc dime khác loại (hoặc multimer khác) có cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình của miền hằng định và miền biến đổi được liệt kê trên đây liên kết không cộng hóa trị với nhau và/hoặc với một hoặc nhiều miền  $V_H$  hoặc  $V_L$  monome (ví dụ, bằng (các) liên kết disulfua).

Đối với phân tử kháng thể hoàn chỉnh, mảnh liên kết kháng nguyên có thể là đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Mảnh liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu của kháng thể sẽ thường chứa ít nhất hai miền biến đổi khác nhau, trong đó mỗi miền biến đổi có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên riêng biệt hoặc với quyết định kháng nguyên khác trên cùng một kháng nguyên. Dạng kháng thể đa đặc hiệu bất kỳ, bao gồm dạng kháng thể đặc hiệu kép được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể được biến đổi để sử dụng cho mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bằng cách sử dụng kỹ thuật thông thường có sẵn trong lĩnh vực này.

## Tạo ra kháng thể người

Phương pháp tạo ra kháng thể người trong chuột chuyển gen là phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Bất kỳ phương pháp đã biết nào cũng có thể sử dụng được trong ngữ cảnh của sáng chế để tạo ra kháng thể người liên kết đặc hiệu với GP virus Ebola. Kháng nguyên có chứa một yếu tố bất kỳ trong số các yếu tố sau đây có thể sử dụng để tạo ra kháng thể liên kết với virus Ebola. Theo các phương án nhất định, có thể thu được kháng thể theo sáng chế từ chuột tạo miễn dịch với GP virus Ebola tự nhiên, đầy đủ chiều dài (Xem, ví dụ, số đăng ký AHX24649.1 (SEQ ID NO: 314) và AHX24649.2 (SEQ ID NO: 315 trong ngân hàng gen) hoặc với ADN mã hóa cho glycoprotein hoặc mảnh của nó. Ngoài ra, GP virus Ebola hoặc mảnh của nó có thể được tạo ra sử dụng các kỹ thuật hóa sinh chuẩn và bị biến đổi và được sử dụng làm kháng nguyên. Theo một phương án, kháng nguyên là GP virus Ebola được tạo ra bằng tái tổ hợp hoặc mảnh của nó. Theo các phương án nhất định theo sáng chế, kháng nguyên có thể là GP virus Ebola có sẵn trên thị trường. Theo các phương án nhất định, có thể cung cấp thêm một hoặc nhiều thuốc tiêm bổ sung. Theo các phương án nhất định, các thuốc tiêm bổ sung bao gồm một hoặc nhiều sGP virus Ebola bán sẵn trên thị trường. Theo các phương án nhất định, kháng nguyên có thể là GP virus Ebola tái tổ hợp biểu hiện trong *E.coli* hoặc trong bất kỳ tế bào động vật có vú hoặc nhân thực nào chẳng hạn như tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc (CHO).

Bằng cách sử dụng kỹ thuật VELOCIMMUNE® (xem, ví dụ, US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) hoặc bất kỳ phương pháp nào đã biết để tạo ra kháng thể đơn dòng, kháng dạng khả ái lực cao với GP virus Ebola ban đầu được phân lập có vùng biến đổi người và vùng hằng định chuột. Kỹ thuật VELOCIMMUNE® bao gồm việc tạo ra chuột chuyển gen có bộ gen chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng người có thể được liên kết chức năng với các locus vùng hằng định chuột nội sinh sao cho chuột này tạo ra kháng thể chứa vùng biến đổi người và vùng hằng định chuột đáp ứng với kích thích kháng nguyên. ADN mã hóa cho vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được phân lập và có thể được liên kết chức năng với ADN mã hóa cho vùng hằng định của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng người. Sau đó, ADN được biểu hiện trong tế bào có thể biểu hiện kháng thể người hoàn chỉnh.

Nói chung, chuột VELOCIMMUNE® được thử thách với kháng nguyên quan

tâm, và tế bào lympho (như tế bào B) được thu hồi từ chuột nhắt mà biểu hiện kháng thể. Tế bào lympho có thể được dung hợp với dòng tế bào u tủy để tạo ra dòng tế bào lai bất tử, và dòng tế bào lai này được sàng lọc và được chọn để nhận biết dòng tế bào lai mà tạo ra kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên quan tâm. ADN mã hóa cho vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được phân lập và được liên kết với vùng hằng định đẳng hướng mong muốn của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Protein kháng thể này có thể được tạo ra trong tế bào, như tế bào CHO. Ngoài ra, ADN mã hóa cho kháng dạng khảm đặc hiệu kháng nguyên hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể được phân lập trực tiếp từ tế bào lympho đặc hiệu kháng nguyên.

Đầu tiên, các kháng dạng khảm ái lực cao được phân lập có vùng biến đổi người và vùng hằng định chuột. Như trong phần ví dụ thử nghiệm bên dưới, các kháng thể được định rõ đặc điểm và chọn lọc những đặc tính mong muốn, bao gồm ái lực, tính chọn lọc, quyết định kháng nguyên, v.v.. Các vùng hằng định chuột được thay thế bằng vùng hằng định người mong muốn để tạo ra kháng thể người hoàn chỉnh theo sáng chế, ví dụ IgG1 hoặc IgG4 kiểu đại hoặc đã bị biến đổi. Trong khi vùng hằng định chọn lọc có thể thay đổi theo mục đích sử dụng cụ thể, liên kết kháng nguyên ái lực cao và độ đặc trưng chọn lọc đích trong vùng biến đổi.

#### Tương đương sinh học

Kháng thể kháng GP virus Ebola và mảnh kháng thể theo sáng chế bao gồm protein có trình tự axit amin mà thay đổi so với trình tự của kháng thể được mô tả, nhưng vẫn giữ lại khả năng để liên kết với virus Ebola. Biến thể kháng thể này và mảnh kháng thể chứa một hoặc nhiều đột biến thêm, mất hoặc thay thế axit amin so với trình tự ban đầu, nhưng có hoạt tính sinh học gần như tương đương với hoạt tính sinh học của kháng thể được mô tả. Tương tự, trình tự mã hóa ADN của kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự chứa một hoặc nhiều đột biến thêm, mất, hoặc thay thế nucleotit so với trình tự được bộc lộ, nhưng mã hóa kháng thể hoặc mảnh kháng thể mà gần như tương đương sinh học với kháng thể mảnh hoặc kháng thể theo sáng chế.

Hai protein liên kết kháng nguyên, hoặc kháng thể, được xem là tương đương sinh học nếu, ví dụ, chúng là tương đương về mặt được dụng hoặc thay thế lẫn nhau về mặt được dụng mà tốc độ và mức độ hấp thụ không khác nhau đáng kể khi được sử dụng ở cùng một liều lượng mol dưới điều kiện thí nghiệm tương tự, một liều hoặc nhiều liều.

Một số kháng thể sẽ là được xem là tương đương hoặc thay thế lẫn nhau về mặt được dụng nếu chúng tương đương về mức độ hấp thụ nhưng khác nhau về tốc độ hấp thụ và còn có thể được xem là tương đương sinh học vì sự khác nhau về tốc độ hấp thụ này là có chủ đích và được tạo ra trong quá trình gắn nhãn, không nhất thiết phải duy trì được nồng độ thuốc hữu hiệu trong cơ thể đối với, ví dụ, việc sử dụng mãn tính, và được xem là khác nhau không đáng kể về mặt được dụng đối với sản phẩm thuốc cụ thể được nghiên cứu.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu không khác biệt đáng kể về mặt lâm sàng đối với độ an toàn, độ tinh khiết và hiệu lực của chúng.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu bệnh nhân có thể thay đổi một hoặc nhiều lần giữa sản phẩm tham chiếu và sản phẩm sinh học mà không làm tăng về nguy cơ của tác dụng bất lợi, bao gồm sự thay đổi đáng kể về mặt lâm sàng trong tính sinh miễn dịch, hoặc làm giảm hiệu quả khi so với liệu pháp trị liệu liên tục mà không thực hiện sự thay đổi trên đây.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu chúng đều tác động bằng cơ chế chung hoặc cơ chế tác động đối với điều kiện hoặc điều kiện sử dụng, đến mức độ mà cơ chế tác động này đã biết.

Tương đương sinh học có thể được chứng minh bằng phương pháp *in vivo* và/hoặc *in vitro*. Phương pháp đo tương đương sinh học bao gồm, ví dụ, (a) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc động vật có vú khác, trong đó nồng độ của kháng thể hoặc chất chuyển hóa của nó được đo trong máu, huyết tương, huyết thanh, hoặc dịch sinh học khác dưới dạng hàm theo thời gian; (b) thử nghiệm *in vitro* mà tương ứng với và được cho là phù hợp với dữ liệu độ sinh khả dụng ở người *in vivo*; (c) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc khác động vật có vú trong đó tác dụng dược lý cấp tính thích hợp của kháng thể (hoặc đích của nó) được xác định dưới dạng hàm theo thời gian; và (d) trong thử nghiệm lâm sàng dễ kiểm soát mà xác định độ an toàn, hiệu lực, hoặc độ sinh khả dụng hoặc tương đương sinh học của kháng thể.

Biến thể tương đương sinh học của kháng thể theo sáng chế có thể được tạo cấu trúc bằng cách, ví dụ, thực hiện các các đột biến thay thế của gốc hoặc trình tự khác nhau hoặc loại bỏ gốc hoặc trình tự bên trong hoặc đầu cuối không cần thiết đối với hoạt

tính sinh học. Ví dụ, gốc xystein không cần thiết đối với hoạt tính sinh học có thể được loại bỏ hoặc được thay bằng axit amin khác để ngăn ngừa sự tạo thành của cầu nối disulfua trong phân tử không thích hợp hoặc không cần thiết do quá trình phục hồi đặc tính. Trong các phương án khác, kháng thể tương đương sinh học có thể bao gồm biến thể của kháng thể chứa sự thay đổi về axit amin, mà biến đổi đặc tính glycosyl hóa của kháng thể, ví dụ, đột biến mà khử hoặc loại bỏ sự quá trình glycosyl hóa.

Kháng thể kháng virus Ebola các chứa biến thể Fc

Theo một số phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng virus Ebola được đề xuất có miền Fc chứa một hoặc nhiều đột biến giúp làm tăng hoặc làm giảm liên kết của kháng thể với thụ thể FcRn, ví dụ, ở pH axit so với pH trung tính. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng GP virus Ebola chứa đột biến trong vùng CH2 hoặc CH3 của miền Fc, trong đó (các) đột biến này làm tăng ái lực của miền Fc với FcRn trong môi trường axit (ví dụ, trong hạt cơ quan nội bào nơi pH nằm trong khoảng từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,0). Đột biến này có thể làm tăng chu kỳ bán rã trong huyết thanh của kháng thể khi được cung cấp cho động vật. Ví dụ không giới hạn về việc biến đổi Fc bao gồm, ví dụ, biến đổi ở vị trí 250 (ví dụ, E hoặc Q); 250 và 428 (ví dụ, L hoặc F); 252 (ví dụ, L/Y/F/W hoặc T), 254 (ví dụ, S hoặc T), và 256 (ví dụ, S/R/Q/E/D hoặc T); hoặc sự biến đổi ở vị trí 428 và/hoặc 433 (ví dụ, H/L/R/S/P/Q hoặc K) và/hoặc 434 (ví dụ, A, W, H, F hoặc Y [N434A, N434W, N434H, N434F hoặc N434Y]); hoặc biến đổi ở vị trí 250 và/hoặc 428; hoặc biến đổi ở vị trí 307 hoặc 308 (ví dụ, 308F, V308F), và 434. Theo một khía cạnh, biến đổi bao gồm biến đổi 428L (ví dụ, M428L) và 434S (ví dụ, N434S); biến đổi 428L, 259I (ví dụ, V259I), và 308F (ví dụ, V308F); biến đổi 433K (ví dụ, H433K) và 434 (ví dụ, 434Y); biến đổi 252, 254, và 256 (ví dụ, 252Y, 254T, và 256E); biến đổi 250Q và 428L (ví dụ, T250Q và M428L); và biến đổi 307 và/hoặc 308 (ví dụ, 308F hoặc 308P). Theo các phương án khác nữa, biến đổi bao gồm biến đổi 265A (ví dụ, D265A) và/hoặc 297A (ví dụ, N297A).

Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng virus Ebola chứa miền Fc chứa một hoặc nhiều cặp hoặc nhóm đột biến được chọn từ nhóm bao gồm: 250Q và 248L (ví dụ, T250Q và M248L); 252Y, 254T và 256E (ví dụ, M252Y, S254T và T256E); 428L và 434S (ví dụ, M428L và N434S); 257I và 311I (ví dụ, P257I và Q311I); 257I và 434H (ví dụ, P257I và N434H); 376V và 434H (ví dụ, D376V và N434H); 307A, 380A và

434A (ví dụ, T307A, E380A và N434A); và 433K và 434F (ví dụ, H433K và N434F). Tất cả các tổ hợp có thể có của đột biến miền Fc ở nêu ở trên đây, và đột biến khác trong miền biến đổi kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này, đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng virus Ebola chứa vùng hằng định chuỗi nặng ( $C_H$ ) dạng khảm, trong đó vùng  $C_H$  dạng khảm chứa mảnh bắt nguồn từ vùng  $C_H$  của nhiều hơn một isotyp globulin miễn dịch. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng  $C_H$  dạng khảm chứa một phần hoặc tất cả các vùng  $C_{H2}$  bắt nguồn từ phân tử IgG1 người, IgG2 người hoặc IgG4 người, kết hợp với một phần hoặc tất cả các vùng  $C_{H3}$  bắt nguồn từ phân tử IgG1 người, IgG2 người hoặc IgG4 người. Theo một số phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế chứa vùng  $C_H$  dạng khảm có vùng bản lề dạng khảm. Ví dụ, vùng bản lề dạng khảm có thể chứa trình tự axit amin của "vùng bản lề trên" (các gốc axit amin từ vị trí 216 đến 227 theo phương pháp đánh số EU) bắt nguồn từ vùng bản lề IgG1 người, IgG2 người hoặc IgG4 người, kết hợp với trình tự của "vùng bản lề dưới" (các gốc axit amin từ vị trí 228 đến 236 theo phương pháp đánh số EU) bắt nguồn từ vùng bản lề IgG1 người, IgG2 người hoặc IgG4 người. Theo một số phương án, vùng bản lề dạng khảm chứa các gốc axit amin bắt nguồn từ vùng bản lề trên IgG1 người hoặc IgG4 người và các gốc axit amin bắt nguồn từ vùng bản lề dưới IgG2 người. Kháng thể chứa vùng  $C_H$  dạng khảm như được mô tả trong bản mô tả này có thể, theo một số phương án, có chức năng phản ứng lại kích thích Fc bị biến đổi mà không ảnh hưởng bất lợi đến đặc tính dược học và trị liệu của kháng thể. (Xem, ví dụ, công bố đơn Mỹ số US 61/759,578, nộp ngày 1 tháng 1 năm 2013).

#### Đặc tính sinh học của kháng thể

Nhìn chung, kháng thể theo sáng chế thực hiện chức năng bằng cách liên kết với GP virus Ebola. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của các kháng thể mà liên kết với GP virus Ebola (ví dụ, ở 25°C hoặc 37°C) với giá trị  $K_D$  nhỏ hơn  $10^{-7}M$ , như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với GP virus Ebola với giá trị  $K_D$  nhỏ hơn khoảng 10 nM, nhỏ hơn khoảng 5 nM, nhỏ hơn khoảng 1 nM, nhỏ hơn khoảng 500 pM, nhỏ hơn khoảng 250 pM, nhỏ hơn khoảng 100 pM, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm như được mô tả trong

bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết virus Ebola với chu kỳ bán rã ( $t_{1/2}$ ) lớn hơn khoảng 3 phút như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C, hoặc lớn hơn khoảng 1 phút như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 37°C ví dụ, và ít nhất tăng gấp ba lần chu kỳ bán rã ( $t_{1/2}$ ) tại pH 5 hoặc pH 6; bằng cách sử dụng thử nghiệm như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm tương tự. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết virus Ebola có giá trị  $t_{1/2}$  lớn hơn hoặc bằng khoảng 10 phút, lớn hơn khoảng 30 phút, lớn hơn khoảng 60 phút, lớn hơn khoảng 100 phút, lớn hơn khoảng 200 phút, lớn hơn khoảng 300 phút, lớn hơn khoảng 400 phút, lớn hơn khoảng 500 phút, lớn hơn khoảng 600 phút, lớn hơn khoảng 700 phút, lớn hơn khoảng 800 phút, lớn hơn khoảng 900 phút, lớn hơn khoảng 1000 phút như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại 25°C, hoặc 37°C, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm như được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, thử nghiệm bắt giữ kháng nguyên hoặc bắt giữ mAb), hoặc thử nghiệm tương tự.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó trung hòa lây nhiễm của virus Ebola trong tế bào chủ. Theo một vài phương án, kháng thể thể hiện phản ứng trung hòa tiềm năng kháng lại VLP Zaire.2014 với giá trị  $IC_{50}$  nằm trong khoảng từ  $10^{-11}$  M đến khoảng  $10^{-9}$  M. Các kháng thể theo sáng chế cũng phản ứng chéo với VLP virus Ebola có chứa các GP lấy từ các chủng EBOV khác nhau, bao gồm Zaire.1995, Zaire.2014, Ebola Sudan, Bundibugyo và Cote d'Ivoire (Bờ biển Ngà). Các kháng thể theo sáng chế cũng làm trung gian cho phản ứng ADCC như được trình bày trong ví dụ 5. Ngoài ra, các kháng thể theo sáng chế cũng cạnh tranh chéo với các kháng thể khác là kháng thể liên kết với GP EBOV, như được trình bày trong ví dụ 6.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể tái tổ hợp được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với GP virus Ebola, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có một hoặc nhiều đặc tính sau đây: (a) là kháng thể đơn dòng người hoàn chỉnh; (b) liên kết với EBOV, hoặc hạt tương tự virus (VLP) biểu hiện glycoprotein virus Ebola với hằng số phân ly ( $K_D$ ) nhỏ hơn  $10^{-7}$  M, như được xác định bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; (c) cho thấy tăng ít nhất ba lần trong chu kỳ bán rã ( $t_{1/2}$ ) tại pH 5 hoặc pH 6 so với pH 7,4; (d) cho thấy khả năng trung hòa virus Ebola Zaire với giá trị  $IC_{50}$  nằm trong khoảng từ  $10^{-11}$  M đến khoảng  $10^{-9}$  M.



<sup>9</sup> M; (e) cho thấy phản ứng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể của các tế bào lây nhiễm virus Ebola; (f) phản ứng cạnh tranh với một hoặc nhiều chủng VLP virus Ebola được chọn từ nhóm bao gồm Zaire.2014, Zaire.1995, Sudan, Bundibugyo và Cote d'Ivoire; (g) cạnh tranh chéo với kháng thể tham chiếu, trong đó kháng thể tham chiếu có chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR và LCVR trong bảng 1.

Kháng thể theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều của đặc tính sinh học trên đây, hoặc tổ hợp bất kỳ của các đặc tính này. Các đặc tính sinh học của kháng thể theo sáng chế không chỉ giới hạn ở các đặc tính được mô tả trên đây. Đặc tính sinh học khác của kháng thể theo sáng chế là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này thông qua phần mô tả này bao gồm các ví dụ thực hiện sáng chế trong bản mô tả.

| mAb       | Các đặc tính của mAb                    | IC <sub>50</sub> (M) của phản ứng trung hòa virus giả | Phản ứng trung hòa virus sống | ADCC  | Liên kết với sGP |
|-----------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------|-------|------------------|
| H1H17161P | Chất trung hòa, ADCC-, sGP-             | 8,3E-11                                               | Có                            | Không | Không            |
| H1H17139P | Không phải chất trung hòa, ADCC +, sGP+ | Không                                                 | Không                         | Có    | Có               |
| H1H17203P | Chất trung hòa, ADCC +, sGP-            | 2E-10                                                 | Không                         | Có    | Không            |

Lập bản đồ quyết định kháng nguyên và các kỹ thuật liên quan

Sáng chế bao gồm các kháng thể kháng virus Ebola tương tác với một hoặc nhiều axit amin tìm thấy trong GP virus Ebola. Quyết định kháng nguyên mà kháng thể theo sáng chế liên kết với nó có thể bao gồm trình tự chuỗi liên tiếp (chuỗi contig) đơn của 3 hoặc nhiều (ví dụ, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều hơn) axit amin nằm trong phân tử GP virus Ebola (ví dụ, quyết định kháng nguyên bậc 1 trong một vùng. Ngoài ra, quyết định kháng nguyên có thể bao gồm các axit amin không liên tiếp (hoặc trình tự axit amin) nằm trong GP virus Ebola (ví dụ, quyết định kháng nguyên cấu hình không gian).

Các kỹ thuật đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể

được sử dụng để xác định việc kháng thể "tương tác với một hoặc nhiều axit amin" trong polypeptit hoặc protein. Ví dụ về các kỹ thuật bao gồm, ví dụ, thử nghiệm phong bế chéo thông thường như thử nghiệm được mô tả trong tài liệu Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY). Phương pháp khác bao gồm phân tích đột biến quét alanin, kỹ thuật phân tích peptit blot (Reineke, 2004, Methods Mol Biol 248:443-63), nghiên cứu tinh thể học phân tích sự phân cắt peptit. Ngoài ra, phương pháp như cắt quyết định kháng nguyên, tách chiết quyết định kháng nguyên và biến đổi hóa học của kháng nguyên có thể được sử dụng (Tomer, 2000, Protein Science 9:487-496). Phương pháp khác mà có thể được sử dụng để nhận biết axit amin trong polypeptit mà kháng thể tương tác với nó là phương pháp trao đổi hydro/đoteri được phát hiện bằng khối phổ. Nói chung, phương pháp trao đổi hydro/đoteri bao gồm protein quan tâm được đánh dấu bằng đoteri, sau đó cho kháng thể liên kết với protein được đánh dấu bằng đoteri. Tiếp theo, phức hợp protein/kháng thể được chuyển vào nước và các proton có thể trao đổi trong các axit amin cái mà được bảo vệ bởi phức hợp kháng thể trải qua quá trình chuyển ngược lại từ đoteri thành hydro với vận tốc chậm hơn so với các proton có thể trao đổi trong các axit amin không phải là một phần của bề mặt phân chia. Kết quả là, các axit amin cái mà tạo thành một phần của bề mặt phân chia protein/kháng thể có thể giữ lại đoteri và do đó có khối lượng cao hơn so với các axit amin không có trong bề mặt phân chia. Sau quá trình phân ly của kháng thể, protein đích được xử lý bằng quá trình phân cắt proteaza và phân tích bằng khối phổ, do đó hiển thị gốc được đánh dấu bằng đoteri mà tương ứng với axit amin cụ thể mà tương tác với kháng thể. Xem, ví dụ, Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267(2):252-259; Engen và Smith (2001) Anal. Chem. 73:256A-265A.

Thuật ngữ "quyết định kháng nguyên" dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà các tế bào B và/hoặc T đáp ứng. Các quyết định kháng nguyên tế bào B được tạo thành từ cả axit amin liên tiếp hoặc axit amin không liên tiếp được chồng lên nhau bằng nếp gấp bậc ba của một protein. Các quyết định kháng nguyên được tạo thành từ các axit amin liên tiếp thường được tiếp tục dùng để phơi nhiễm với các dung môi biến tính, trong đó quyết định kháng nguyên được tạo thành bằng nếp gấp bậc ba bị mất đi khi xử lý với dung môi biến tính. Một quyết định kháng nguyên thường có ít nhất 3, thường sẽ có nhiều hơn, ít nhất 5 hoặc 8-10 axit amin trong một cấu hình không gian duy nhất.

Modification-Assisted Profiling (MAP), còn được biết đến như là định hình kháng

thể dựa trên cấu trúc kháng nguyên (Antigen Structure-based Antibody Profiling - ASAP) là một phương pháp nhằm phân loại lượng lớn các kháng thể đơn dòng (mAb) trực tiếp kháng cùng một kháng nguyên theo sự tương đồng của các dữ liệu liên kết của mỗi kháng thể với bề mặt kháng nguyên bị biến đổi hóa học hay enzym. (Xem US 2004/0101920). Mỗi loại có thể phản ánh một quyết định kháng nguyên duy nhất hoặc hoàn toàn tách biệt từ hoặc chồng một phần lên quyết định kháng nguyên đại diện bởi một loại khác. Kỹ thuật này cho phép lọc một cách nhanh chóng các kháng thể giống nhau về mặt di truyền học, sao cho đặc tính có thể tập trung vào các kháng thể riêng biệt. Khi áp dụng vào sàng lọc tế bào lai, MAP có thể dễ dàng phát hiện tỷ lệ các dòng tế bào lai sản xuất kháng thể mAb có các đặc tính mong muốn. MAP được sử dụng để phân loại các kháng thể theo sáng chế thành các nhóm kháng thể liên kết với các quyết định kháng nguyên khác nhau.

Theo các phương án nhất định, kháng thể virus Ebola hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với quyết định kháng nguyên tại một hoặc nhiều vùng bất kỳ minh họa trong GP virus Ebola, hoặc ở dạng tự nhiên, hoặc được sản xuất tái tổ hợp, hoặc liên kết với mảnh của nó.

Sáng chế bao gồm kháng thể kháng GP virus Ebola liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên, hoặc với một phần của quyết định kháng nguyên. Tương tự, sáng chế cũng bao gồm kháng thể kháng GP virus Ebola cạnh tranh để liên kết với GP virus Ebola hoặc mảnh của nó với các kháng thể cụ thể lấy làm ví dụ được mô tả trong bản mô tả. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng GP virus Ebola cạnh tranh với một hoặc nhiều kháng thể thu được từ những kháng thể được mô tả trong bảng 1 và 2 để liên kết với virus Ebola.

Người có hiểu biết trung bình có thể dễ dàng xác định được việc kháng thể và kháng thể kháng GP virus Ebola tham chiếu cùng liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên, hay cạnh tranh với nhau để liên kết với GP virus Ebola bằng cách sử dụng phương pháp thường dùng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, để xác định việc kháng thể cần kiểm tra và kháng thể kháng GP virus Ebola tham chiếu theo sáng chế có liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên hay không, cho kháng thể tham chiếu liên kết với GP virus Ebola hoặc peptit dưới các điều kiện bão hòa. Tiếp theo, đánh giá khả năng liên kết của kháng thể cần kiểm tra với GP virus Ebola. Nếu kháng thể cần kiểm tra có khả năng liên kết với GP virus Ebola sau khi liên kết bão hòa với kháng thể kháng

GP virus Ebola tham chiếu, có thể kết luận rằng kháng thể cần kiểm tra liên kết với quyết định kháng nguyên khác với kháng thể kháng GP virus Ebola. Mặt khác, nếu kháng thể cần kiểm tra không thể liên kết với GP virus Ebola sau khi đã liên kết bão với kháng thể kháng GP virus Ebola tham chiếu, do đó kháng thể cần kiểm tra liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên là quyết định kháng nguyên đã liên kết với kháng thể kháng GP virus Ebola theo sáng chế.

Để xác định liệu một kháng thể có cạnh tranh để liên kết với kháng thể kháng GP virus Ebola tham chiếu, các hệ phương pháp liên kết đã mô tả ở trên được tiến hành theo hai hướng: theo hướng thứ nhất, cho kháng thể tham chiếu liên kết với GP virus Ebola dưới các điều kiện bão hòa, sau đó đánh giá khả năng gắn kết của kháng thể cần kiểm tra với GP virus Ebola. Theo hướng thứ hai, cho kháng thể cần kiểm tra liên kết với GP virus Ebola dưới các điều kiện bão hòa, sau đó đánh giá khả năng liên kết của kháng thể tham chiếu với GP virus Ebola. Nếu theo cả hai hướng, chỉ có kháng thể thứ nhất (bão hòa) có khả năng gắn với GP virus Ebola thì có thể kết luận rằng, kháng thể cần kiểm tra và kháng thể tham chiếu cạnh tranh nhau để liên kết với GP virus Ebola. Theo như đánh giá của những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, một kháng thể mà cạnh tranh với kháng thể tham chiếu để liên kết có thể không nhất thiết phải liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên với kháng thể tham chiếu, nhưng có thể cản trở sự liên kết của kháng thể tham chiếu bằng cách gắn vào quyết định kháng nguyên liên kề hoặc gối lên nhau.

Hai kháng thể liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên hoặc với quyết định kháng nguyên chồng lên nhau nếu mỗi kháng thể ức chế (cản trở) sự liên kết của kháng thể còn lại với kháng nguyên. Ví dụ, vượt quá 1, 5, 10, 20 hoặc 100 lần của một kháng thể ức chế việc liên kết của kháng thể còn lại bằng ít nhất 50% nhưng tốt hơn là 75%, 90% hoặc thậm chí 99% như được xác định trong thử nghiệm liên kết cạnh tranh (xem, ví dụ, Junghans et al., cancer Res. 1990:50:1495-1502). Ngoài ra, hai kháng thể được cho là liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên nếu về cơ bản tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên làm giảm hoặc ngăn chặn việc liên kết của kháng thể, làm giảm hoặc ngăn chặn việc liên kết của kháng thể còn lại. Hai kháng thể có các quyết định kháng nguyên chồng lên nhau nếu chỉ nhóm nhỏ của đột biến axit amin mà làm giảm hoặc ngăn chặn việc liên kết của một kháng thể, làm giảm hoặc ngăn chặn việc liên kết của kháng thể còn lại.

Có thể thực hiện các thử nghiệm thông thường khác (ví dụ, gây đột biến peptit và phân tích liên kết) để xác định việc không quan sát thấy liên kết của kháng thể cần kiểm tra trên thực tế là do việc liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên với kháng thể tham chiếu hoặc nếu sự cản trở về mặt không gian (hoặc hiện tượng khác) gây ra việc không quan sát thấy liên kết. Các thử nghiệm loại này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật ELISA, RIA, cộng hưởng plasmon bề mặt, đếm tế bào theo dòng chảy hoặc thử nghiệm liên kết kháng thể định tính và định lượng bất kỳ khác có sẵn trong lĩnh vực này.

#### Liên hợp miễn dịch

Sáng chế bao gồm kháng thể đơn dòng kháng GP virus Ebola ở người liên hợp với gốc trị liệu (“liên hợp miễn dịch”), chẳng hạn như thuốc kháng virus để điều trị lây nhiễm virus Ebola. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “liên hợp miễn dịch” dùng để chỉ kháng thể, được liên kết về mặt hóa học hoặc sinh học với chất phóng xạ, xytokin, interferon, phân tử báo cáo hoặc phân tử đích, enzym, peptit hoặc protein, hoặc chất trị liệu. Kháng thể có thể liên kết với chất phóng xạ, xytokin, interferon, phân tử báo cáo hoặc phân tử đích, enzyme, peptit hoặc protein, hoặc chất trị liệu tại vị trí bất kỳ dọc theo phân tử sao cho nó có liên kết với đích của nó. Các ví dụ về liên hợp miễn dịch bao gồm liên hợp thuốc kháng thể và protein dung hợp độc tố-kháng thể. Theo một phương án, chất trị liệu có thể là kháng thể thứ hai khác liên kết với virus Ebola, hoặc GP virus Ebola. Theo một phương án nhất định, kháng thể có thể được liên hợp với chất đặc hiệu với tế bào bị nhiễm virus. Có thể thu được loại chất trị liệu cái mà có thể liên hợp với kháng thể kháng GP virus Ebola và sẽ tính đến điều kiện để được điều trị và các hiệu quả trị liệu mong muốn. Ví dụ về chất thích hợp để tạo ra liên hợp miễn dịch đã biết trong lĩnh vực này, xem, ví dụ, WO 05/103081,

#### Kháng thể đa đặc hiệu

Kháng thể theo sáng chế có thể đơn đặc hiệu, đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu. Kháng thể đa đặc hiệu có thể đặc hiệu đối với các quyết định kháng nguyên khác nhau của một polypeptit đích hoặc có thể chứa miền liên kết kháng nguyên đặc hiệu đối với nhiều hơn một polypeptit đích. Xem, ví dụ, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244.

Bất kỳ phân tử liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu nào theo sáng chế, hoặc các biến thể của nó, đều có thể được tạo thành bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn (ví dụ, kỹ thuật ADN tái tổ hợp và biểu hiện protein) đã được biết đến bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Theo một vài phương án, kháng thể đặc hiệu virus Ebola được tạo ra ở dạng đặc hiệu kép (“đặc hiệu kép”) trong đó vùng biến đổi liên kết với các miền riêng biệt của virus Ebola được liên kết với nhau để tạo ra tính đặc hiệu miền kép trong một phân tử liên kết. Đặc hiệu kép thích hợp có thể tăng cường hiệu quả ức chế protein virus Ebola bằng cách tăng cả tính đặc hiệu và ái lực liên kết. Các vùng biến đổi có tính đặc hiệu với các vùng riêng biệt (ví dụ, các mảnh tại đầu N), hoặc có thể liên kết với các đoạn khác nhau trong cùng một vùng, được ghép trên một khung cấu trúc cho phép mỗi đoạn liên kết cùng một lúc với các quyết định kháng nguyên riêng biệt, hoặc với các đoạn khác nhau trong cùng một vùng. Theo một ví dụ về đặc hiệu kép, vùng biến đổi chuỗi nặng ( $V_H$ ) từ một chất liên kết đặc hiệu với một vùng được tái tổ hợp với vùng biến đổi chuỗi nhẹ ( $V_L$ ) từ một loạt các chất liên kết đặc hiệu với vùng thứ hai để nhận dạng các phần  $V_L$  không liên tiếp cái mà có thể bắt cặp với  $V_H$  ban đầu mà không ảnh hưởng đến độ đặc hiệu ban đầu với  $V_H$ . Theo cách này, một đoạn  $V_L$  đơn lẻ (ví dụ,  $V_{H1}$ ) có thể kết hợp với hai vùng  $V_H$  khác nhau (ví dụ  $V_{H1}$  và  $V_{H2}$ ) để tạo ra dạng đặc hiệu kép có chứa hai “cánh” liên kết ( $V_{H1} - V_{L1}$  và  $V_{H2} - V_{L1}$ ). Việc sử dụng đoạn  $V_L$  làm giảm tính phức tạp của hệ thống và do đó làm đơn giản hóa và tăng hiệu quả trong quá trình tách dòng, biểu hiện và tinh sạch được sử dụng để tạo ra đặc hiệu kép. (Xem, ví dụ, USSN13/022759 và US2010/0331527).

Ngoài ra, kháng thể mà liên kết với nhiều hơn một miền và đích thứ hai, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể thứ hai khác kháng virus Ebola, có thể được tạo ra ở dạng đặc hiệu kép sử dụng kỹ thuật được mô tả ở đây, hoặc các kỹ thuật khác đã biết bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Vùng biến đổi kháng thể liên kết với các vùng riêng biệt có thể được liên kết cùng với các vùng biến đổi là vùng liên kết với các vị trí thích hợp trên, ví dụ, virus Ebola, để tạo ra tính đặc hiệu kháng nguyên kép trong một phân tử liên kết. Đặc hiệu kép thích hợp với tính chất này phục vụ cho chức năng kép. Các vùng biến đổi đặc hiệu với vùng ngoại bào được kết hợp với vùng biến đổi đặc hiệu với bên ngoài của vùng ngoại bào và được ghép trên một khung cấu trúc cho phép mỗi vùng biến đổi liên kết với các kháng nguyên riêng

biệt.

Dạng kháng thể đặc hiệu kép để làm ví dụ mà có thể được sử dụng theo ngữ cảnh của sáng chế bao gồm sử dụng miền  $C_H3$  globulin miễn dịch (Ig) thứ nhất và miền  $C_H3$  Ig thứ hai, trong đó miền  $C_H3$  Ig thứ nhất và thứ hai khác nhau ở ít nhất một axit amin, và trong đó ít nhất một khác biệt axit amin làm giảm liên kết của kháng thể đặc hiệu kép với Protein A so với kháng thể đặc hiệu kép không có sự khác biệt axit amin này. Theo một phương án, miền  $C_H3$  Ig thứ nhất liên kết với Protein A và miền  $C_H3$  Ig thứ hai chứa đột biến làm giảm hoặc làm mất liên kết với Protein A chẳng hạn như biến đổi H95R (bằng phương pháp đánh số IMGT exon; H435R bằng phương pháp đánh số EU).  $C_H3$  thứ hai có thể còn chứa biến đổi Y96F (bằng IMGT; Y436F bằng EU). Các biến đổi khác nữa được tìm thấy trong  $C_H3$  thứ hai bao gồm: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, và V82I (bằng IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, và V422I bằng EU) trong trường hợp của kháng thể IgG1; N44S, K52N, và V82I (IMGT; N384S, K392N, và V422I bằng EU) trong trường hợp của kháng thể IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, và V82I (bằng IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, và V422I bằng EU) trong trường hợp của kháng thể IgG4. Các biến thể trên dạng kháng thể đặc hiệu kép được mô tả trên đây đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Dạng đặc hiệu kép lấy làm ví dụ khác có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, dạng đặc hiệu kép diabody hoặc trên cơ sở scFv, dung hợp IgG-scFv, miền biến đổi kép (DVD)-Ig, Quadroma, bấm vào lỗ, chuỗi nhẹ thông thường (ví dụ, chuỗi nhẹ thông thường bấm vào lỗ, v.v.), CrossMab, CrossFab, (XEMD)body, vùng khóa kéo leuxin, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG tác động kép, và dạng đặc hiệu kép Mab<sup>2</sup> (xem, ví dụ, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, và các tài liệu được trích dẫn trong bản mô tả này, với phần mô tả liên quan đến các dạng trên đây). Kháng thể đặc hiệu kép có thể còn được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng liên hợp peptit/axit nucleic, ví dụ, trong đó axit amin không có trong tự nhiên với khả năng phản ứng hóa học trực giao được sử dụng để tạo ra thể liên hợp kháng thể-oligonucleotit đặc hiệu vị trí cái mà sau đó tự lắp ráp vào trong phức hợp đa phân với thành phần, hóa trị và hình thái học xác định. (Xem, ví dụ, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Dược phẩm trị liệu và cung cấp

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể kháng GP virus Ebola hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Dược phẩm theo sáng chế được cung cấp cùng với chất mang thích hợp, tá dược, và các chất khác mà được kết hợp vào trong dược phẩm để làm tăng sự vận chuyển, sự phân phối, độ dung nạp, và yếu tố tương tự. Các dược phẩm thích hợp có thể được bào chế ở dạng đã biết bởi các nhà hóa dược: xem, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Các dược phẩm này bao gồm, ví dụ, dạng bột, bột nhão, thuốc mỡ, dạng thạch, sáp, dầu, lipid, chất dẫn thuốc chứa lipid (cation hoặc anionic) (như LIPOFECTIN™), thể liên hợp ADN, bột nhão hấp thu dạng khan, nhũ tương dầu trong nước và nước trong dầu, nhũ tương polyetylen glycol (polyetylen glycol với khối lượng phân tử khác nhau), gel bán rắn, và hỗn hợp bán rắn chứa chế phẩm polyetylen glycol. Ngoài ra, xem, Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311,

Liều lượng của kháng thể được sử dụng có thể thay đổi phụ thuộc vào độ tuổi và thể trọng của đối tượng được cung cấp, bệnh đích, tình trạng bệnh lý, đường dùng, và yếu tố tương tự. Khi một kháng thể theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh hoặc rối loạn ở người lớn, hoặc để ngăn ngừa bệnh, thuận lợi nếu cung cấp kháng thể theo sáng chế thường ở liều đơn khoảng 0,1 đến khoảng 60 mg/kg thể trọng, tốt hơn nữa nếu khoảng 5 đến khoảng 60, khoảng 10 đến khoảng 50, hoặc khoảng 20 đến khoảng 50 mg/kg thể trọng. Phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý, tần suất sử dụng và thời gian điều trị có thể được điều chỉnh. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được cung cấp dưới dạng liều thứ nhất với liều lượng nằm trong khoảng từ 0,1 mg đến khoảng 800 mg, khoảng 1 đến khoảng 500 mg, khoảng 5 đến khoảng 300 mg, hoặc khoảng 10 đến khoảng 200 mg, đến khoảng 100 mg, hoặc đến khoảng 50 mg. Theo các phương án nhất định, sau liều thứ nhất có thể cung cấp liều thứ hai hoặc nhiều liều kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên tiếp theo với lượng gần bằng hoặc ít hơn liều thứ nhất, trong đó, các liều tiếp theo được cung cấp riêng biệt sau ít nhất 1 đến 3 ngày; ít nhất 1 tuần, ít nhất 2 tuần; ít nhất 3 tuần; ít nhất 4 tuần; ít nhất 5 tuần; ít nhất 6 tuần; ít nhất 7 tuần; ít nhất 8 tuần; ít nhất 9 tuần; ít nhất 10 tuần; ít nhất 12 tuần; hoặc ít nhất 14 tuần.

Các hệ thống phân phối đã biết và có thể được sử dụng để dùng dược phẩm theo sáng chế, ví dụ, bao trong liposom, vi hạt, vi nang, tế bào tái tổ hợp có thể biểu hiện virus đột biến, nhập bào qua trung gian thụ thể (xem, ví dụ, Wu et al., 1987, J. Biol.



Chem. 262:4429-4432). Phương pháp đưa vào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trong da, trong cơ, trong bụng, trong tĩnh mạch, dưới da, trong mũi, trên màng cứng, và đường miệng. Dược phẩm có thể được sử dụng theo đường thông dụng bất kỳ, ví dụ, bằng cách truyền hoặc tiêm nhanh một liều, bằng cách hấp thụ qua lớp biểu bì hoặc niêm mạc da (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và ruột, v.v.) và có thể được sử dụng cùng với hoạt chất sinh học khác. Việc sử dụng có thể là toàn thân hoặc cục bộ. Dược phẩm có thể được phân phối trong một túi, cụ thể là liposom (Xem, ví dụ, Langer (1990) Science 249:1527-1533).

Việc sử dụng các hạt có kích thước nano để vận chuyển kháng thể theo sáng chế cũng được liệu trước trong bản mô tả này. Các hạt có kích thước nano liên hợp kháng thể được sử dụng trong cả hai ứng dụng về trị liệu và chẩn đoán. Các hạt có kích thước nano liên hợp kháng thể và phương pháp tạo ra và sử dụng được mô tả chi tiết bởi Arruebo, M., et al. 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" in J. Nanomat. Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi:10.1155/2009/439389). Các hạt có kích thước nano dùng để vận chuyển thuốc cũng được mô tả trong, ví dụ, US 8257740, hoặc US 8246995.

Trong một số trường hợp, dược phẩm có thể được vận chuyển trong hệ thống giải phóng có kiểm soát. Theo một khía cạnh, bơm có thể được sử dụng. Theo phương án khác, vật liệu polyme có thể được sử dụng. Theo các phương án khác nữa, hệ thống giải phóng có kiểm soát có thể được đặt ở vị trí xung quanh đích của dược phẩm, do đó chỉ cần sử dụng một phần của liều toàn thân.

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

tương, v.v., mà có thể được sử dụng kết hợp với chất làm hòa tan như benzyl benzoat, rượu benzylic, v.v. Do đó, tốt hơn nếu được phẩm tiêm được điều chế được làm đầy trong ống thuốc tiêm thích hợp.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được phân phối dưới da hoặc trong tĩnh mạch bằng kim tiêm và ống tiêm tiêu chuẩn. Ngoài ra, đối với phân phối dưới da, thiết bị phân phối dạng bút có thể sử dụng để phân phối dược phẩm theo sáng chế. Thiết bị phân phối dạng bút này có thể tái sử dụng hoặc dùng một lần rồi bỏ. Thiết bị phân phối dạng bút tái sử dụng thường sử dụng hộp chứa chứa dược phẩm có thể thay được. Khi tất cả các thành phần dược phẩm trong hộp chứa được sử dụng hết và hộp chứa rỗng, hộp chứa rỗng có thể được loại bỏ một cách dễ dàng và được thay bằng hộp chứa mới chứa dược phẩm. Sau đó, thiết bị phân phối dạng bút có thể được tái sử dụng. Trong thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần, không có hộp chứa có thể thay được. Cụ thể hơn, thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần thường được nạp đầy trước bằng dược phẩm trong ngăn chứa của thiết bị. Khi ngăn chứa hết dược phẩm, toàn bộ thiết bị sẽ bị vứt bỏ.

Các bút tái sử dụng lại và thiết bị phân phối tự tiêm có thể được sử dụng để phân phối dược phẩm theo sáng chế dưới da. Ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), bút DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland), bút HUMALOG MIX 75/25™, bút HUMALOG™, bút HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), bút BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, và OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), chỉ nêu tên một số. Ví dụ về thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần có thể được sử dụng để phân phối dược phẩm theo sáng chế dưới da bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bút SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), và thiết bị tự tiêm KWIKPEN™ (Eli Lilly), SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.), và bút HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), chỉ nêu tên một số.

Thuận lợi nếu, dược phẩm để sử dụng theo đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa được mô tả trên đây được điều chế ở dạng liều liều đơn vị phù hợp với liều chứa thành phần hoạt tính. Dạng liều ở dạng liều đơn vị này bao gồm, ví dụ, viên nén, viên

tròn, viên nang, thuốc tiêm (ống thuốc tiêm), thuốc đạn, v.v.. Lượng kháng thể thường nằm trong khoảng từ 5 đến khoảng 500 mg mỗi dạng liều ở dạng liều đơn vị; đặc biệt là ở dạng tiêm, tốt hơn nếu lượng kháng thể trên nằm khoảng từ 5 đến khoảng 100 mg và trong khoảng 10 đến khoảng 250 mg đối với các dạng liều khác.

#### Sử dụng kháng thể trong trị liệu

Các kháng thể theo sáng chế được sử dụng để điều trị, và/hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc rối loạn hoặc tình trạng bệnh liên quan đến lây nhiễm virus Ebola và/hoặc làm thuyên giảm ít nhất một triệu chứng liên quan đến các bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh này.

Theo một phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế rất có ích trong điều trị cho đối tượng mắc phải nhiễm trùng hô hấp cấp tính và nghiêm trọng gây ra bởi virus Ebola. Theo một vài phương án, kháng thể theo sáng chế được sử dụng để làm giảm hàm lượng virus hoặc làm giảm số lượng của virus trong tế bào chủ. Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được cung cấp tại liều lượng trị liệu cho bệnh nhân mắc lây nhiễm virus Ebola.

Một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế có thể được cung cấp để làm dịu đi hoặc ngăn ngừa hoặc giảm mức độ nghiêm trọng của một hoặc nhiều triệu chứng của tình trạng bệnh hoặc rối loạn. Kháng thể có thể sử dụng để cải thiện hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng của ít nhất một triệu chứng của lây nhiễm virus Ebola bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở sốt, đau đầu, mệt mỏi, chán ăn, đau cơ, tiêu chảy, nôn mửa, đau bụng, mất nước hoặc chảy máu không thể giải thích.

Cũng được dự tính trong bản mô tả để sử dụng một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế trong phòng ngừa cho những đối tượng có nguy cơ phát triển lây nhiễm virus Ebola chẳng hạn, những người có sức đề kháng kém, nhân viên chăm sóc sức khỏe, người bị nghi ngờ đã từng bị phơi nhiễm với những người mang virus Ebola, người tiếp xúc trực tiếp hoặc gần gũi thân thể với người bị bệnh, nhân viên bệnh viện, nhà nghiên cứu được phẩm, nhân viên bảo trì chịu trách nhiệm làm sạch thiết bị bệnh viện hoặc viện nghiên cứu nơi bệnh nhân Ebola đang được điều trị, các người đã đến hoặc có dự định ghé thăm vùng hoặc quốc gia được biết là có hoặc bị nghi ngờ có đợt bùng phát virus Ebola hoặc những người đi du lịch thường xuyên.

Theo một phương án nữa của sáng chế, kháng thể được sử dụng để điều chế được

phẩm dùng để điều trị cho bệnh nhân mắc phải lây nhiễm virus Ebola. Theo một phương án khác theo sáng chế, các kháng thể được sử dụng làm liệu pháp bổ trợ cùng với chất trị liệu hoặc liệu pháp bất kỳ khác đã biết bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật hữu dụng để điều trị hoặc làm thuyên giảm lây nhiễm virus Ebola.

#### Liệu pháp kết hợp

Liệu pháp kết hợp có thể bao gồm kháng thể kháng GP virus Ebola theo sáng chế và bất kỳ chất trị liệu bổ sung khác có thể kết hợp một cách có lợi với kháng thể theo sáng chế, hoặc với mảnh có hoạt tính sinh học của kháng thể theo sáng chế. Các kháng thể theo sáng chế có thể được kết hợp hiệp đồng điều trị với một hoặc nhiều chất hoặc thuốc được sử dụng để điều trị lây nhiễm virus Ebola.

Ví dụ, các chất dùng để điều trị lây nhiễm virus bao gồm, ví dụ, thuốc kháng virus, thuốc kháng viêm (chẳng hạn như corticosteroid và thuốc kháng viêm không chứa steroid), kháng thể liên kết với EBOV khác, vắc xin dùng cho EBOV, TKM Ebola (các SiARN hướng đích tới RNA polymeraza virus) brincidofovir (CMX-001), favipiravir (T-705), BCX-4430, AVI-7537 (oligome morpholino phosphorodiamidat vô nghĩa hướng đích gen VP24 của virus Ebola) và interferon.

Theo một vài phương án, kháng thể theo sáng chế có thể kết hợp với chất trị liệu thứ hai để làm giảm số lượng của virus trong cơ thể bệnh nhân bị nhiễm virus Ebola, hoặc làm thuyên giảm một hoặc nhiều triệu chứng lây nhiễm.

Theo các phương án nhất định, chất trị liệu thứ hai là kháng thể khác, hoặc dung dịch hỗn hợp kháng thể đặc hiệu với GP virus Ebola, trong đó kháng thể khác hoặc các kháng thể trong dung dịch hỗn hợp kháng thể có thể liên kết hoặc không liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên, hoặc với các quyết định kháng nguyên chồng lên nhau, như kháng thể theo sáng chế. Theo các phương án nhất định, chất trị liệu thứ hai là kháng thể liên kết với protein virus Ebola khác. Kháng thể thứ hai có thể đặc hiệu với một hoặc nhiều protein virus Ebola khác nhau từ các chủng virus khác nhau. Cũng được dự tính trong bản mô tả này để sử dụng tổ hợp (“dung dịch”) các kháng thể theo sáng chế có hoạt tính trung hòa hoặc ức chế chống lại virus Ebola. Theo các phương án, các kháng thể không cạnh tranh có thể được kết hợp và được cung cấp cho đối tượng cần điều trị, để làm giảm khả năng virus Ebola trốn thoát được do đột biến. Theo một số

phương án, kháng thể bao gồm tổ hợp liên kết với các quyết định kháng nguyên riêng biệt không chồng lên nhau trên GP. Các kháng thể chứa tổ hợp này có thể cản trở virut liên kết với và/hoặc xâm nhập vào tế bào chủ. Các kháng thể có thể tương tác với GP từ một chủng EBOV được chọn từ Zaire, Sudan, Bundibugyo, hoặc Cote d'Ivoire và khi sử dụng một mình, hoặc ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu bất kỳ nêu trên, có thể trung hòa một hoặc nhiều chủng virut Ebola nêu trên.

Cũng được dự tính trong bản mô tả này để sử dụng tổ hợp của các kháng thể kháng GP virut Ebola theo sáng chế, trong đó tổ hợp gồm một hoặc nhiều kháng nguyên không cạnh tranh chéo. Theo các phương án nhất định, tổ hợp gồm dung dịch có chứa hỗn hợp của ít nhất ba kháng thể theo sáng chế. Các kháng thể trong dung dịch hỗn hợp có thể khác nhau về khả năng trung hòa virut hoặc virut lây nhiễm, hoặc về khả năng làm trung gian cho phản ứng gây độc trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), hoặc về khả năng liên kết với Glycoprotein hòa tan (sGP) trên EBOV.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “trong sự kết hợp với” có nghĩa là (các) thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung được cung cấp trước, cùng một lúc, hoặc sau khi cung cấp ít nhất một kháng thể kháng GP virut Ebola, hoặc một dung dịch hỗn hợp chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế. Thuật ngữ “trong sự kết hợp với” cũng bao gồm việc cung cấp liên tục hoặc cùng một lúc kháng thể kháng virut Ebola và một chất trị liệu thứ hai.

(Các) thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung có thể được cung cấp cho đối tượng trước khi cung cấp kháng thể kháng GP virut Ebola theo sáng chế. Ví dụ, thành phần thứ nhất được coi như là được cung cấp “trước” thành phần thứ hai nếu thành phần thứ nhất được cung cấp trước 1 tuần, trước 72 giờ, trước 60 giờ, trước 48 giờ, 36 giờ, trước 24 giờ, trước 12 giờ, trước 6 giờ, trước 5 giờ, trước 4 giờ, trước 3 giờ, trước 2 giờ, trước 1 giờ, trước 30 phút, trước 5 phút, trước 10 phút, trước 5 phút, hoặc trước ít hơn 1 phút trước khi cung cấp thành phần thứ hai. Theo một phương án khác, (các) thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung có thể được cung cấp cho đối tượng sau khi cung cấp kháng thể kháng virut Ebola theo sáng chế. Ví dụ, thành phần thứ nhất được cho là cung cấp “sau” thành phần thứ hai nếu thành phần thứ nhất được cung cấp sau 1 phút, sau 5 phút, sau 10 phút, sau 15 phút, sau 30 phút, sau 1 giờ, sau 2 giờ, sau 3 giờ, sau 4 giờ, sau 5 giờ, sau 6 giờ, sau 12 giờ, sau 24 giờ, sau 48 giờ, sau 60 giờ, sau 72 giờ, sau khi cung cấp thành phần thứ hai. Theo một phương án khác nữa, (các) thành phần hoạt hóa trị liệu bổ

sung có thể được cung cấp cho đối tượng cùng lúc cung cấp kháng thể kháng virus Ebola theo sáng chế. Cung cấp “cùng lúc”, đối với mục đích theo sáng chế bao gồm, ví dụ, cung cấp kháng thể kháng GP virus Ebola và thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung cho đối tượng cần điều trị ở dạng liều đơn, hoặc dạng liều riêng biệt được cung cấp cho đối tượng trong 30 phút hoặc ít hơn của nhau. Nếu được cung cấp ở các dạng liều riêng biệt, mỗi dạng liều có thể được cung cấp theo cùng một đường dùng (ví dụ, cả kháng thể kháng GP virus Ebola và thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung được cung cấp trong tĩnh mạch, v.v.), ngoài ra, mỗi dạng liều có thể được cung cấp theo các đường dùng khác nhau (ví dụ, kháng thể kháng virus Ebola có thể được cung cấp trong tĩnh mạch, và thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung được cung cấp theo đường miệng). Trong trường hợp bất kỳ, việc cung cấp các thành phần dưới dạng liều, dưới dạng liều riêng biệt theo cùng một đường dùng, hoặc cung cấp dạng liều riêng biệt theo các đường dùng khác nhau đều được xem là “cung cấp cùng lúc”, đối với mục đích của sáng chế. Đối với mục đích của sáng chế, cung cấp kháng thể kháng GP virus Ebola “trước”, “cùng lúc” hoặc “sau” (các thuật ngữ có thể thay thế cho nhau) việc cung cấp thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung được xem là cung cấp kháng thể kháng GP virus Ebola “kết hợp với” một thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung.

Sáng chế bao gồm được phẩm trong đó kháng thể kháng GP virus Ebola theo sáng chế được bào chế cùng lúc với một hoặc nhiều thành phần hoạt hóa trị liệu bổ sung như được mô tả trong bản mô tả.

#### Phác đồ cung cấp

Theo các phương án nhất định, liều đơn của kháng thể kháng GP virus Ebola theo sáng chế (hoặc được phẩm chứa tổ hợp của kháng thể kháng GP virus Ebola và hoạt chất trị liệu bổ sung bất kỳ được đề cập trong bản mô tả này) có thể được cung cấp cho đối tượng cần điều trị. Theo các phương án nhất định của sáng chế, nhiều liều kháng thể kháng GP virus Ebola (hoặc được phẩm có chứa tổ hợp của kháng thể kháng GP virus Ebola và hoạt chất trị liệu bổ sung bất kỳ được đề cập trong bản mô tả) có thể được cung cấp cho đối tượng trong suốt một khoảng thời gian xác định. Phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm bước sử dụng liên tiếp cho đối tượng các liều của kháng thể kháng GP virus Ebola theo sáng chế. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “cung cấp liên tiếp” có nghĩa là mỗi liều kháng thể kháng GP virus Ebola được cung cấp cho đối tượng ở các thời điểm khác nhau, ví dụ, vào các ngày khác nhau được tách riêng

bằng khoảng thời gian xác định (ví dụ, giờ, ngày, tuần hoặc tháng). Sáng chế gồm phương pháp bao gồm bước cung cấp liên tiếp cho bệnh nhân một liều ban đầu của kháng thể kháng GP virus Ebola, sau đó là một hoặc nhiều liều thứ hai của kháng thể kháng GP virus Ebola, và tùy ý sau đó là một hoặc nhiều liều thứ ba của kháng thể kháng GP virus Ebola.

Thuật ngữ "liều ban đầu", "liều thứ hai" và "liều thứ ba" dùng để chỉ trình tự về thời gian cung cấp kháng thể kháng GP virus Ebola theo sáng chế. Do đó, "liều ban đầu" là liều mà được cung cấp ở thời điểm bắt đầu chế độ điều trị (còn gọi là "liều cơ sở"); "liều thứ hai" là liều mà được cung cấp sau liều thứ nhất; và "liều thứ ba" là liều mà được cung cấp sau liều thứ hai. Liều ban đầu, thứ hai, và thứ ba có thể đều là các liều chứa cùng một lượng kháng thể kháng GP virus Ebola, nhưng thường có thể khác nhau về tần suất sử dụng. Tuy nhiên, theo một số phương án, lượng kháng thể kháng GP virus Ebola có trong liều thứ nhất, thứ hai và/hoặc thứ ba thay đổi khác nhau (ví dụ, được điều chỉnh nhiều hoặc ít sao cho thích hợp) trong quá trình điều trị. Theo một số phương án, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, hoặc 5) liều được sử dụng ở thời điểm bắt đầu chế độ điều trị làm "liều nạp" sau đó là liều tiếp theo mà được sử dụng trên cơ sở tuần suất sử dụng ít hơn (ví dụ, "liều duy trì").

Trong một số phương án cụ thể theo sáng chế, mỗi liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba được sử dụng từ 1 đến 48 giờ (ví dụ, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, hoặc nhiều hơn) tuần sau liều ngay trước đó. Thuật ngữ "liều ngay trước đó" như được sử dụng trong bản mô tả này, nghĩa là, trong trình tự của việc cung cấp nhiều liều, liều chứa kháng thể kháng GP virus Ebola, mà được sử dụng cho bệnh nhân trước khi sử dụng của liều tiếp theo trong trình tự mà không có liều xen giữa.

Phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế có thể bao gồm bước sử dụng cho bệnh nhân lượng bất kỳ của liều thứ hai và/hoặc thứ ba của kháng thể kháng GP virus Ebola. Ví dụ, theo một số phương án, chỉ duy nhất liều thứ hai được sử dụng cho bệnh nhân. Trong khác phương án, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn) liều thứ hai được sử dụng cho bệnh nhân. Tương tự, theo một số phương án, chỉ duy nhất liều thứ ba được sử dụng cho bệnh nhân. Trong khác phương án, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn) liều thứ ba được sử dụng cho bệnh nhân.

Theo một số phương án theo sáng chế, tần xuất sử dụng trong đó liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba được sử dụng cho bệnh nhân có thể thay đổi theo chế độ điều trị. Tần xuất cung cấp có thể được điều chỉnh trong quá trình điều trị bởi bác sỹ phụ thuộc vào nhu cầu của mỗi bệnh nhân sau khi được kiểm tra lâm sàng.

#### Sử dụng kháng thể trong chẩn đoán

Kháng thể kháng GP virus Ebola theo sáng chế có thể còn được sử dụng để phát hiện và/hoặc xác định lượng virus Ebola trong mẫu, ví dụ, nhằm mục đích chẩn đoán. Một vài phương án sử dụng một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế trong thử nghiệm để phát hiện bệnh hoặc rối loạn chẳng hạn như lây nhiễm virus. Các thử nghiệm chẩn đoán lấy làm ví dụ đối với virus Ebola bao gồm, ví dụ, cho kháng thể kháng GP virus Ebola tiếp xúc với mẫu, thu được từ bệnh nhân, trong đó kháng thể kháng GP virus Ebola được gắn nhãn với một nhãn có thể phát hiện hoặc một phân tử báo cáo hoặc được sử dụng như một phối tử bắt giữ để phân lập có chọn lọc virus Ebola từ các mẫu bệnh nhân. Ngoài ra, các kháng thể kháng GP virus Ebola không gắn nhãn có thể được sử dụng trong chẩn đoán kết hợp với kháng thể thứ hai được đánh dấu có thể phát hiện được. Chất đánh dấu hoặc phân tử báo cáo có thể phát hiện có thể là đồng vị phóng xạ, như  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , hoặc  $^{125}\text{I}$ ; phân tử huỳnh quang hoặc quang hóa như florescein isothiocyanat, hoặc rhodamin; hoặc enzym như alkaline phosphatase,  $\beta$ -galactosidase, horseradish peroxidase, hoặc luciferase. Ví dụ về thử nghiệm đặc hiệu mà có thể được sử dụng để phát hiện hoặc xác định virus Ebola trong mẫu bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), và phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS).

Mẫu có thể được sử dụng trong thử nghiệm chuẩn đoán virus Ebola theo sáng chế bao gồm mẫu mô hoặc dịch lỏng bất kỳ thu được từ bệnh nhân, chứa lượng có thể phát hiện được của virus Ebola, hoặc mảnh của nó, dưới điều kiện bệnh lý hoặc điều kiện bình thường. Thông thường, lượng virus Ebola trong mẫu cụ thể thu được từ người khỏe mạnh (ví dụ, bệnh nhân không bị tác động bởi bệnh liên quan đến virus Ebola) sẽ được xác định trước để bước đầu thiết lập mức độ cơ sở, hoặc tiêu chuẩn, của virus Ebola. Sau đó, mức độ cơ sở của virus Ebola có thể được so sánh với mức độ virus Ebola được xác định trong mẫu thu được từ các cá thể bị nghi ngờ là mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh lý có liên quan đến virus Ebola, hoặc triệu chứng liên quan đến bệnh hoặc tình trạng bệnh lý này.

Các kháng thể đặc hiệu virus Ebola có thể không chứa các phân tử hoặc các nhãn



bổ sung, hoặc chúng có thể chứa phần tử hoặc nhãn đầu C hoặc đầu N. Theo một phương án, nhãn hoặc phần tử là biotin. Trong thử nghiệm liên kết, vị trí của nhãn (nếu có) có thể xác định hướng của peptit liên quan đến bề mặt mà trên đó peptit liên kết với. Ví dụ, nếu bề mặt được phủ avidin, peptit chứa biotin đầu N sẽ được định hướng sao cho phần đầu C của peptit sẽ xa bề mặt.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Các ví dụ sau đây được đưa ra để cung cấp cho những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật một mô tả và chỉ dẫn hoàn thiện về cách tiến hành và sử dụng phương pháp và chế phẩm trong sáng chế, và không dự định làm giới hạn phạm vi của cái mà các tác giả sáng chế quan tâm như là sáng chế của họ. Mặc dù, các tác giả sáng chế đã có gắng để tạo ra sự chính xác đối với số liệu được sử dụng (ví dụ, lượng, nhiệt độ, v.v.), nhưng các sai số và độ lệch thử nghiệm là không thể tránh được. Do đó trừ khi được chỉ ra theo cách khác, phần là phần theo khối lượng, khối lượng phân tử là khối lượng phân tử trung bình, nhiệt độ là theo độ °C, nhiệt độ phòng là khoảng 25°C và áp suất là ở hoặc gần với áp suất khí quyển.

#### **Ví dụ 1: Tạo ra kháng thể người liên kết với virus Ebola**

Các kháng thể người liên kết với virus Ebola được tạo ra ở chuột chứa ADN mã hóa cho các vùng biến đổi chuỗi nhẹ kappa và vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch người. Theo một phương án, các kháng thể người liên kết với virus Ebola được tạo ra ở chuột VELOCIMMUNE®. Theo một phương án, chuột VelocImmune® (VI) được tạo miễn dịch với ADN mã hóa cho GP virus Ebola đầy đủ chiều dài [Zaire ebolavirus 2014 (Ngân hàng gen: KJ660346.2)]. Các kháng thể được tạo ra sau khi tăng cường phác đồ điều trị bao gồm hai quá trình tạo miễn dịch tách biệt trong hai tuần. Quan sát các đáp ứng miễn dịch kháng thể bằng thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu GP virus Ebola. Ví dụ, huyết thanh được phân tích hàm lượng kháng thể liên kết đặc hiệu với GP EBOV đầy đủ chiều dài đã tinh sạch, các tiểu đơn vị protein GP (GP1 và GP2), và các hạt tương tự virus (VLP) biểu hiện GP EBOV. Các dòng sản xuất kháng thể được phân lập sử dụng kỹ thuật phân loại tế bào B (B-cell Sorting Technology - BST) và phương pháp tế bào lai. Ví dụ, khi thu được đáp ứng miễn dịch mong muốn, thu lấy các tế bào đơn nhân lách và dung hợp với tế bào u tủy chuột để duy trì khả năng sống sót của chúng và tạo ra các dòng tế bào lai. Các dòng tế bào lai được sàng lọc và lựa chọn để nhận biết dòng tế bào sản xuất kháng thể đặc hiệu GP virus Ebola. Sử dụng các kỹ thuật, và các kháng nguyên khác nhau đã mô tả ở trên, thu được một số kháng thể dạng khảm (nghĩa là, các kháng

thể có vùng biến đổi người và vùng hằng định chuột); các kháng thể lấy làm ví dụ được tạo ra theo phương pháp này được ký hiệu là H1M17354N, H2aM17356N, H1M17357N, H2aM17358N, H2aM17359N và H2aM17360N.

Các kháng thể kháng virus Ebola cũng được phân lập trực tiếp từ tế bào B chuột dương tính kháng nguyên mà không dung hợp với các tế bào đơn nhân lách, như đã mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 7582298. Sử dụng phương pháp này, thu được một số kháng thể kháng GP virus Ebola đầy đủ chiều dài (nghĩa là, kháng thể có vùng biến đổi người và vùng hằng định người); các kháng thể lấy làm ví dụ được tạo ra theo phương pháp này được ký hiệu là H1H17134P, H1H17139P, H1H17142P, H1H17151P, H1H17161P, H1H17162P, H1H17193P, H1H17196P, H1H17199P, H1H17203P, H1H17214P, H1H17219P, H1H17223P và H1H17228P.

Các đặc tính sinh học của các kháng thể lấy làm ví dụ tạo ra theo phương pháp trong ví dụ này sẽ được mô tả chi tiết trong các ví dụ bên dưới.

Ví dụ 2: Trình tự axit amin và axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng

Bảng 1 mô tả mã nhận dạng trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng và CDR của kháng thể kháng virus Ebola được chọn theo sáng chế. Mã nhận dạng trình tự axit nucleic tương ứng được nêu trong Bảng 2.

Bảng 1: Mã nhận dạng trình tự axit amin

| Ký hiệu kháng thể | SEQ ID NO: |        |        |        |      |        |        |        |
|-------------------|------------|--------|--------|--------|------|--------|--------|--------|
|                   | HCVR       | HCDR 1 | HCDR 2 | HCDR 3 | LCVR | LCDR 1 | LCDR 2 | LCDR 3 |
| H1H17134P         | 2          | 4      | 6      | 8      | 10   | 12     | 14     | 16     |
| H1H17139P         | 18         | 20     | 22     | 24     | 26   | 28     | 30     | 32     |
| H1H17142P         | 34         | 36     | 38     | 40     | 42   | 44     | 46     | 48     |
| H1H17151P         | 50         | 52     | 54     | 56     | 58   | 60     | 62     | 64     |
| H1H17161P         | 66         | 68     | 70     | 72     | 74   | 76     | 78     | 80     |
| H1H17162P         | 82         | 84     | 86     | 88     | 90   | 92     | 94     | 96     |
| H1H17193P         | 98         | 100    | 102    | 104    | 106  | 108    | 110    | 112    |
| H1H17196P         | 114        | 116    | 118    | 120    | 122  | 124    | 126    | 128    |
| H1H17199P         | 130        | 132    | 134    | 136    | 138  | 140    | 142    | 144    |
| H1H17203P         | 146        | 148    | 150    | 152    | 154  | 156    | 158    | 160    |

|                   | SEQ ID NO: |        |        |        |      |        |        |        |
|-------------------|------------|--------|--------|--------|------|--------|--------|--------|
| Ký hiệu kháng thể | HCVR       | HCDR 1 | HCDR 2 | HCDR 3 | LCVR | LCDR 1 | LCDR 2 | LCDR 3 |
| H1H17214P         | 162        | 164    | 166    | 168    | 170  | 172    | 174    | 176    |
| H1H17219P         | 178        | 180    | 182    | 184    | 186  | 188    | 190    | 192    |
| H1H17223P         | 194        | 196    | 198    | 200    | 202  | 204    | 206    | 208    |
| H1H17228P         | 210        | 212    | 214    | 216    | 218  | 220    | 222    | 224    |
| H1H17354N         | 226        | 228    | 230    | 232    | 234  | 236    | 238    | 240    |
| H1H17356N         | 242        | 244    | 246    | 248    | 250  | 252    | 254    | 256    |
| H1H17357N         | 258        | 260    | 262    | 264    | 266  | 268    | 270    | 272    |
| H1H17358N2        | 274        | 276    | 278    | 280    | 282  | 284    | 286    | 288    |
| H1H17359N         | 290        | 292    | 294    | 296    | 298  | 300    | 302    | 304    |
| H1H17360N         | 306        | 308    | 310    | 312    | 282  | 284    | 286    | 288    |
| H1M17354N         | 226        | 228    | 230    | 232    | 234  | 236    | 238    | 240    |
| H2aM17356N        | 242        | 244    | 246    | 248    | 250  | 252    | 254    | 256    |
| H1M17357N         | 258        | 260    | 262    | 264    | 266  | 268    | 270    | 272    |
| H2aM17358N        | 274        | 276    | 278    | 280    | 282  | 284    | 286    | 288    |
| H2aM17359N        | 290        | 292    | 294    | 296    | 298  | 300    | 302    | 304    |
| H2aM17360N        | 306        | 308    | 310    | 312    | 282  | 284    | 286    | 288    |

Bảng 2: Mã nhận dạng trình tự axit nucleic

|                   | SEQ ID NO: |        |        |        |      |        |        |        |
|-------------------|------------|--------|--------|--------|------|--------|--------|--------|
| Ký hiệu kháng thể | HCVR       | HCDR 1 | HCDR 2 | HCDR 3 | LCVR | LCDR 1 | LCDR 2 | LCDR 3 |
| H1H17134P         | 1          | 3      | 5      | 7      | 9    | 11     | 13     | 15     |
| H1H17139P         | 17         | 19     | 21     | 23     | 25   | 27     | 29     | 31     |
| H1H17142P         | 33         | 35     | 37     | 39     | 41   | 43     | 45     | 47     |
| H1H17151P         | 49         | 51     | 53     | 55     | 57   | 59     | 61     | 63     |
| H1H17161P         | 65         | 67     | 69     | 71     | 73   | 75     | 77     | 79     |
| H1H17162P         | 81         | 83     | 85     | 87     | 89   | 91     | 93     | 95     |
| H1H17193P         | 97         | 99     | 101    | 103    | 105  | 107    | 109    | 111    |
| H1H17196P         | 113        | 115    | 117    | 119    | 121  | 123    | 125    | 127    |
| H1H17199P         | 129        | 131    | 133    | 135    | 137  | 139    | 141    | 143    |
| H1H17203P         | 145        | 147    | 149    | 151    | 153  | 155    | 157    | 159    |

|                   | SEQ ID NO: |        |        |        |      |        |        |        |
|-------------------|------------|--------|--------|--------|------|--------|--------|--------|
| Ký hiệu kháng thể | HCVR       | HCDR 1 | HCDR 2 | HCDR 3 | LCVR | LCDR 1 | LCDR 2 | LCDR 3 |
| H1H17214P         | 161        | 163    | 165    | 167    | 169  | 171    | 173    | 175    |
| H1H17219P         | 177        | 179    | 181    | 183    | 185  | 187    | 189    | 191    |
| H1H17223P         | 193        | 195    | 197    | 199    | 201  | 203    | 205    | 207    |
| H1H17228P         | 209        | 211    | 213    | 215    | 217  | 219    | 221    | 223    |
| H1H17354N         | 225        | 227    | 229    | 231    | 233  | 235    | 237    | 239    |
| H1H17356N         | 241        | 243    | 245    | 247    | 249  | 251    | 253    | 255    |
| H1H17357N         | 257        | 259    | 261    | 263    | 265  | 267    | 269    | 271    |
| H1H17358N2        | 273        | 275    | 277    | 279    | 281  | 283    | 285    | 287    |
| H1H17359N         | 289        | 291    | 293    | 295    | 297  | 299    | 301    | 303    |
| H1H17360N         | 305        | 307    | 309    | 311    | 281  | 283    | 285    | 287    |
| H1M17354N         | 225        | 227    | 229    | 231    | 233  | 235    | 237    | 239    |
| H2aM17356N        | 241        | 243    | 245    | 247    | 249  | 251    | 253    | 255    |
| H1M17357N         | 257        | 259    | 261    | 263    | 265  | 267    | 269    | 271    |
| H2aM17358N        | 273        | 275    | 277    | 279    | 281  | 283    | 285    | 287    |
| H2aM17359N        | 289        | 291    | 293    | 295    | 297  | 299    | 301    | 303    |
| H2aM17360N        | 305        | 307    | 309    | 311    | 281  | 283    | 285    | 287    |

Kháng thể thường được đề cập đến trong bản mô tả này theo danh pháp sau: tiền tố Fc (ví dụ "H1H", "H2M" v.v.), sau đó là số nhận dạng (ví dụ "17139," "17161, v.v., như được thể hiện trong bảng 1 hoặc bảng 2), sau đó là hậu tố "P," "P2," "N", N2, hoặc "B". Các tiền tố H1H và H2M trong ký hiệu kháng thể được sử dụng trong bản mô tả này chỉ ra kiểu tương đương của miền Fc cụ thể của kháng thể. Do đó, theo danh pháp này, kháng thể có thể được đề cập đến trong bản mô tả này như, ví dụ, "H1H17359N," "H2aM17359N", v.v.. Ví dụ, kháng thể "H1M" có Fc IgG1 chuột, kháng thể "H1M" có Fc IgG1 chuột, và "H2M" kháng thể có Fc IgG2 chuột (kiểu tương đương a hoặc b) (tất cả các vùng biến đổi hoàn toàn của người như được thể hiện bằng "H" thứ nhất trong ký hiệu của kháng thể). Như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, kháng thể có kiểu tương đương của miền Fc cụ thể có thể được biến đổi thành kháng thể có kiểu tương đương Fc khác (ví dụ, kháng thể có Fc IgG1 chuột có thể được biến đổi thành kháng thể với IgG4 người, v.v.), nhưng trong trường hợp bất kỳ, vùng biến đổi (bao gồm các CDR) - mà được thể hiện bằng số nhận dạng trong các Bảng 1 hoặc 2 -

sẽ giữ nguyên không đổi, và đặc tính liên kết với kháng nguyên được kỳ vọng là giống nhau hoặc gần như tương tự bất kể bản chất của miền Fc.

Ví dụ 3: Kháng thể liên kết với GP virus Ebola như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt.

#### A. hằng số tốc độ phân ly phụ thuộc pH tại nhiệt độ 37°C

Hằng số tốc độ phân ly liên kết ( $k_d$ ) và chu kỳ bán rã ( $t_{1/2}$ ) của GP virus Ebola liên kết với kháng thể đơn dòng kháng GP virus Ebola tinh sạch tại nhiệt độ 37°C được xác định sử dụng thử nghiệm cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt, thời gian thực trên thiết bị Biacore T200. Bề mặt cảm biến sinh học CM4 Biacore được tạo dẫn xuất bằng cách bắt cặp amin với kháng thể đơn dòng chuột kháng Fc người (GE, # BR-1008-39) hoặc kháng thể đơn dòng dê kháng Fc chuột (GE, # BR-1008-38) để bắt giữ các mAb kháng virus Ebola đã tinh sạch. Tất cả các thử nghiệm liên kết Biacore trong ví dụ 3A được tiến hành trong dung dịch đệm có chứa  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,01M, NaCl 0,15M, chất hoạt động bề mặt P20 0,05% thể tích/thể tích (đệm chạy PBS-P) tại các pH 7,4, 6,0 và 5,0. Tiến hành tại giá trị pH thấp để đánh giá việc các kháng thể duy trì liên kết tại pH thấp. pH này tương tự các điều kiện mà virus sẽ gặp phải trong suốt quá trình dung hợp màng, sau khi axit hóa thể nội bào. Các nồng độ khác của GP virus Ebola ở người có đuôi polyhistidin ở đầu C (GP Ebola.his; Sino Biologicals, Catalog # 40442-V08B1) được tạo ra trong dung dịch đệm chạy PBS-P (nằm trong khoảng từ 90 nM đến 11,1 nM, pha loãng ba lần) được phun lên bề mặt bắt giữ kháng thể đơn dòng kháng virus Ebola với tốc độ dòng chảy là 25  $\mu\text{L}$ /phút. Sự liên kết của GP virus Ebola với kháng thể đơn dòng bị bắt giữ được quan sát trong 5 phút và sự phân ly của GP virus Ebola trong dung dịch đệm chạy PBS-P được quan sát trong 6 phút. Tất cả các thử nghiệm hằng số tốc độ phân ly được thực hiện tại 37°C. Hằng số tốc độ phân ly động học ( $k_d$ ) được xác định bằng cách điều chỉnh các sensorgram thời gian thực thành kiểu liên kết 1:1 sử dụng phần mềm điều chỉnh đường cong Scrubber 2.0c. Chu kỳ bán rã ( $t_{1/2}$ ) được tính từ hằng số tốc độ động học theo phương trình sau:

$$t_{1/2} \text{ (phút)} = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

Thông số tốc độ phân ly của GP virus Ebola liên kết với kháng thể đơn dòng kháng GP virus Ebola đã tinh sạch tại nhiệt độ 37°C được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3: Sự phụ thuộc của chu kỳ bán rã vào pH tại 37°C

| mAb bị bắt giữ           | Tỷ lệ t $\frac{1}{2}$ |             |
|--------------------------|-----------------------|-------------|
|                          | pH7,4/pH6,0           | pH7,4/pH5,0 |
| H1H1238N(-)<br>đối chứng | NB                    | NB          |
| H1H17162P                | 0,3                   | 0,3         |
| H1H17177P                | 0,2                   | 0,2         |
| H1H17193P                | 1,1                   | 0,8         |
| H1H17196P                | 1,0                   | 1,0         |
| H1H17150P                | 0,2                   | 0,2         |
| H1H17151P                | 0,03                  | 0,01        |
| H1H17160P                | 0,2                   | 0,4         |
| H1H17161P                | 0,2                   | 0,2         |
| H1H17214P                | 1,0                   | 1,0         |
| H1H17219P                | 1,0                   | 1,0         |
| H1H17223P                | 0,4                   | 0,4         |
| H1H17228P                | 0,6                   | 0,5         |
| H1H17142P                | 0,5                   | 0,5         |
| H1H17141P                | 0,3                   | 0,3         |
| H1H17139P                | 0,2                   | 0,2         |
| H1H17134P                | 0,6                   | 0,6         |
| H1H17211P                | 6,7                   | 3,0         |
| H1H17210P                | 0,2                   | 0,2         |
| H1H17203P                | 0,2                   | 0,1         |
| H1H17199P                | 0,4                   | 0,1         |
| H1M17348N                | 0,3                   | 0,4         |
| H1M17349N                | 2,7                   | 6,9         |
| H1M17350N                | 0,1                   | 1,1         |
| H1M17351N                | NB                    | NB          |
| H1M17352N                | 1,1                   | 1,1         |
| H1M17353N                | 1,6                   | 0,3         |
| H1M17354N                | 1,3                   | 1,3         |
| H1M17357N                | 0,8                   | 0,5         |

| mAb bị bắt giữ | Tỷ lệ t <sub>1/2</sub> |             |
|----------------|------------------------|-------------|
|                | pH7,4/pH6,0            | pH7,4/pH5,0 |
| H2aM17355N     | 0,5                    | 0,6         |
| H2aM17356N     | 0,9                    | 0,9         |
| H2aM17358N     | 0,7                    | 0,4         |
| H2aM17359N     | 0,8                    | 0,7         |
| H2aM17360N     | 0,2                    | 0,5         |
| H2aM17361N     | 0,2                    | 0,5         |

NB: không phát hiện được liên kết dưới các điều kiện thử nghiệm.

#### B. Động học liên kết và ái lực liên kết tại nhiệt độ 25°C và 37°C

Hằng số phân ly cân bằng (giá trị  $K_D$ ) của GP virus Ebola liên kết với mAb kháng GP virus Ebola tinh sạch được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt, thời gian thực trên thiết bị Biacore 4000. Bề mặt cảm biến sinh học CM4 Biacore được tạo dẫn xuất bằng cách bắt cặp amin với kháng thể đơn dòng chuột kháng Fc người (GE, # BR-1008-39) hoặc kháng thể đơn dòng dê kháng Fc chuột (GE, # BR-1008-38) để bắt giữ các mAb kháng virus Ebola đã tinh sạch. Tất cả các thử nghiệm liên kết Biacore trong ví dụ 3B được tiến hành trong đệm có chứa 0,01M HEPES pH 7,4, NaCl 0,15M, 3mM EDTA, chất hoạt động bề mặt P20 0,05% thể tích/thể tích (đệm chạy HBS-ET). Các nồng độ khác của GP virus Ebola có đuôi polyhistidin ở đầu C (Sino Biologicals, Catalog # 40442-V08B1) được chuẩn bị trong dung dịch đệm chạy HBS-ET (nằm trong khoảng từ 90 nM đến 3,3 nM, pha loãng ba lần) được phun lên bề mặt bắt giữ kháng thể đơn dòng kháng virus Ebola với tốc độ dòng chảy là 30  $\mu$ L/phút. Sự liên kết của GP virus Ebola với kháng thể đơn dòng bị bắt giữ được quan sát trong 5 phút và sự phân ly của GP virus Ebola trong đệm chạy HBS-ET được quan sát trong 10 phút. Tất cả các thử nghiệm động học liên kết đều được thực hiện tại 25°C và 37°C. Hằng số tốc độ liên kết ( $k_a$ ) và phân ly động học ( $k_d$ ) động học được xác định bằng cách điều chỉnh các sensorgram thời gian thực thành kiểu liên kết 1:1 sử dụng phần mềm điều chỉnh đường cong Scrubber 2.0c. Hằng số cân bằng phân ly liên kết ( $K_D$ ) và chu kỳ bán rã (t<sub>1/2</sub>) được tính từ hằng số tốc độ động học theo phương trình sau:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ và } t_{1/2} (\text{phút}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

Thông số động học liên kết đối với GP virus Ebola liên kết với mAb kháng GP virus Ebola tinh sạch ở 25°C và 37°C được trình bày trong Bảng 4A và 4B.

Bảng 4A : Động học liên kết tại 25°C

| mAb       | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | KD (M)   | $t_{1/2}$ (phút) |
|-----------|--------------|-------------|----------|------------------|
| H1H17162P | 2,18E+04     | $\leq 1E-5$ | 4,60E-10 | $\geq 1155$      |
| H1H17177P | 3,18E+03     | 1,12E-05    | 3,53E-09 | 1030,3           |
| H1H17193P | 4,58E+03     | 1,08E-04    | 2,36E-08 | 106,6            |
| H1H17196P | 2,56E+04     | $\leq 1E-5$ | 3,91E-10 | $\geq 1155$      |
| H1H17150P | 2,16E+04     | 5,42E-05    | 2,51E-09 | 213,1            |
| H1H17151P | 1,26E+04     | 9,44E-05    | 7,49E-09 | 122,3            |
| H1H17160P | 6,85E+04     | 3,76E-03    | 5,48E-08 | 3,1              |
| H1H17161P | 5,29E+04     | $\leq 1E-5$ | 1,89E-10 | $\geq 1155$      |
| H1H17214P | 3,76E+04     | $\leq 1E-5$ | 2,66E-10 | $\geq 1155$      |
| H1H17219P | 3,11E+04     | 2,90E-05    | 9,34E-10 | 398,3            |
| H1H17223P | 3,00E+04     | 6,08E-05    | 2,03E-09 | 190,0            |
| H1H17228P | 4,49E+04     | 1,69E-03    | 3,76E-08 | 6,9              |
| H1H17142P | 2,00E+04     | 2,81E-05    | 1,41E-09 | 410,7            |
| H1H17141P | 1,98E+04     | 9,69E-05    | 4,90E-09 | 119,2            |
| H1H17139P | 2,29E+04     | 1,63E-04    | 7,13E-09 | 70,8             |
| H1H17134P | 7,65E+04     | 9,41E-04    | 1,23E-08 | 12,3             |
| H1H17211P | 3,33E+04     | 2,14E-04    | 6,43E-09 | 54,0             |
| H1H17210P | 1,09E+02     | 2,06E-04    | 1,89E-06 | 56,0             |
| H1H17203P | 2,78E+04     | 1,68E-04    | 6,04E-09 | 68,7             |
| H1H17199P | 1,25E+04     | 2,36E-04    | 1,89E-08 | 49,0             |
| H1M17348N | IC           | IC          | IC       | IC               |
| H1M17349N | 7,03E+04     | 8,69E-04    | 1,24E-08 | 13,3             |
| H1M17350N | IC           | IC          | IC       | IC               |
| H1M17351N | NB           | NB          | NB       | NB               |
| H1M17352N | IC           | IC          | IC       | IC               |
| H1M17353N | IC           | IC          | IC       | IC               |
| H1M17354N | 4,94E+04     | 3,16E-03    | 6,39E-08 | 3,7              |



| mAb        | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | KD (M)   | $t_{1/2}$ (phút) |
|------------|--------------|-------------|----------|------------------|
| H1M17357N  | IC           | IC          | IC       | IC               |
| H2aM17355N | 1,44E+04     | $\leq 1E-5$ | 6,96E-10 | $\geq 1155$      |
| H2aM17356N | 2,18E+04     | 9,57E-05    | 4,40E-09 | 120,7            |
| H2aM17358N | 3,22E+02     | 2,01E-04    | 6,23E-07 | 57,5             |
| H2aM17359N | 3,82E+03     | 1,95E-04    | 5,09E-08 | 59,4             |
| H2aM17360N | 2,30E+04     | 1,06E-05    | 4,63E-10 | 1086,5           |
| H2aM17361N | 1,22E+02     | 1,25E-04    | 1,02E-06 | 92,5             |

NB: không quan sát được liên kết dưới các điều kiện thử nghiệm

IC- không kết luận sensorgram liên kết đối với việc điều chỉnh

Bảng 4B: Động học liên kết tại 37°C

| mAb       | $k_a$ (1/Ms) | $k_d$ (1/s) | KD (M)   | $t_{1/2}$ (phút) |
|-----------|--------------|-------------|----------|------------------|
| H1H17162P | 3,47E+04     | $\leq 1E-5$ | 2,88E-10 | $\geq 1155$      |
| H1H17177P | 1,68E+04     | 1,62E-04    | 9,62E-09 | 71,3             |
| H1H17193P | 1,58E+04     | 5,03E-04    | 3,18E-08 | 22,9             |
| H1H17196P | 3,16E+04     | $\leq 1E-5$ | 3,17E-10 | $\geq 1155$      |
| H1H17150P | 3,18E+04     | 3,94E-05    | 1,24E-09 | 292,8            |
| H1H17151P | 2,26E+04     | 3,83E-04    | 1,70E-08 | 30,2             |
| H1H17160P | 5,72E+04     | 5,63E-03    | 9,85E-08 | 2,1              |
| H1H17161P | 4,39E+04     | $\leq 1E-5$ | 2,28E-10 | $\geq 1155$      |
| H1H17214P | 3,67E+04     | 1,54E-04    | 4,20E-09 | 74,9             |
| H1H17219P | 4,41E+04     | $\leq 1E-5$ | 2,27E-10 | $\geq 1155$      |
| H1H17223P | 3,51E+04     | 2,42E-04    | 6,89E-09 | 47,7             |
| H1H17228P | 7,32E+04     | 3,83E-03    | 5,23E-08 | 3                |
| H1H17142P | 2,60E+04     | 1,74E-04    | 6,68E-09 | 66,6             |
| H1H17141P | 2,65E+04     | 2,92E-04    | 1,10E-08 | 39,6             |

| mAb        | ka (1/Ms) | kd (1/s) | KD (M)   | t1/2 (phút) |
|------------|-----------|----------|----------|-------------|
| H1H17139P  | 2,48E+04  | 5,12E-04 | 2,06E-08 | 22,5        |
| H1H17134P  | 6,99E+04  | 4,69E-04 | 6,70E-09 | 24,6        |
| H1H17211P  | 1,90E+04  | 7,31E-04 | 3,84E-08 | 15,8        |
| H1H17210P  | 6,19E+02  | 6,12E-04 | 9,89E-07 | 18,9        |
| H1H17203P  | 3,85E+04  | 1,19E-03 | 3,09E-08 | 9,7         |
| H1H17199P  | 3,04E+04  | 1,28E-03 | 4,22E-08 | 9           |
| H1M17348N  | IC        | IC       | IC       | IC          |
| H1M17349N  | 1,77E+04  | 1,93E-03 | 1,09E-07 | 6           |
| H1M17350N  | 4,84E+02  | 1,00E-03 | 2,07E-06 | 11,5        |
| H1M17351N  | NB        | NB       | NB       | NB          |
| H1M17352N  | 4,09E+04  | 1,55E-03 | 3,80E-08 | 7,4         |
| H1M17353N  | 2,33E+02  | 5,38E-04 | 2,31E-06 | 21,5        |
| H1M17354N  | 5,08E+04  | 5,73E-03 | 1,13E-07 | 2           |
| H1M17357N  | 2,35E+04  | 1,84E-03 | 7,81E-08 | 6,3         |
| H2aM17355N | 1,99E+04  | 2,06E-04 | 1,03E-08 | 56,2        |
| H2aM17356N | 7,26E+03  | 2,50E-04 | 3,44E-08 | 46,2        |
| H2aM17358N | 1,07E+04  | 5,67E-04 | 5,28E-08 | 20,4        |
| H2aM17359N | 1,54E+04  | 3,52E-04 | 2,29E-08 | 32,8        |
| H2aM17360N | 2,43E+04  | 3,37E-04 | 1,39E-08 | 34,3        |
| H2aM17361N | 1,83E+04  | 4,15E-04 | 2,27E-08 | 27,8        |

NB: không phát hiện được liên kết dưới các điều kiện thử nghiệm,

IC- không kết luận sensorgram liên kết đối với việc điều chỉnh

#### Kết quả

Như được trình bày trong các bảng 4A và 4B bên trên, các kháng thể liên kết với

GP virus Ebola có giá trị  $K_D$  nằm trong khoảng từ 934pM đến 1890nM tại 25°C và từ 227pM đến 2310nM tại 37°C. Tại pH 7,4, các kháng thể có chu kỳ bán rã ( $t_{1/2}$ ) nằm trong khoảng từ 3 phút đến hơn 1155 phút tại 25°C và nằm trong khoảng từ 2 phút đến hơn 1155 phút tại 37°C. Không quan sát thấy mất đi liên kết nào tại pH thấp. Một vài kháng thể có giá trị chu kỳ bán rã ( $t_{1/2}$ ) tăng lên tại pH thấp so với pH 7,4. Các kháng thể có giá trị chu kỳ bán rã ( $t_{1/2}$ ) tăng lên ba lần hoặc lớn hơn tại pH 5 và/hoặc 6 bao gồm H1H17162P, H1H17177P, H1H17150P, H1H17151P, H1H17160P, H1H17161P, H1H17141P, H1H17139P, H1H17210P, H1H17203P, H1H17199P, H1M17348N, H1M17350N, H2aM17360N và H2aM17361N.

Ví dụ 4: Tạo ra hạt tương tự virus Ebola và thử nghiệm trung hòa

Các hạt giả virus Ebola (còn được gọi là các hạt tương tự virus hoặc VLP) được tạo ra bằng tách biến nạp đồng thời các tế bào 293T với hỗn hợp các cấu trúc plasmit biểu hiện GP virus Ebola, HIV gag-pol và vectơ tiền virus HIV mã hóa cho luciferaza phát sáng trong tế bào. Dịch nổi có chứa các hạt giả virus Ebola được thu lại tại 48 giờ sau biến nạp, làm sạch bằng ly tâm, phân đoạn và làm đông tại -80°C, hạt giả virus đối chứng được tạo ra bằng cách thay thế plasmit biểu hiện GP virus Ebola bằng plasmit mã hóa cho glycoprotein virus Vesicular Stomatitis (VSVg),

Thử nghiệm trung hòa trên hạt giả virus Ebola

Các hạt giả được tạo ra như đã mô tả ở trên được kiểm tra bằng thử nghiệm trung hòa. Cụ thể là, dịch pha loãng của các kháng thể được ủ với hạt giả virus Ebola trong 1 giờ tại nhiệt độ trong phòng. Các tế bào Huh7 được tách ra sử dụng EDTA 0,02M, được rửa và ủ với hỗn hợp kháng thể/hạt giả trong 72 giờ. Hiệu quả lây nhiễm được định lượng bằng cách phát hiện luciferaza với thử nghiệm BrightGlo® luciferaza (Promega, San Luis Obispo, CA, USA) và đọc trên đầu đọc đĩa Victor® X3(Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) đối với sản phẩm nhẹ.

Bảng 5: Trung hòa VLP Zaire 2014

| Kí hiệu kháng thể | Kí hiệu kháng thể lai tương ứng | Chất trung hòa của Zaire 2014 VLP | IC50 (M) |
|-------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------|
| H1H17134P         |                                 | -                                 | -        |
| H1H17139P         |                                 | -                                 | -        |

|            |            |   |          |
|------------|------------|---|----------|
| H1H17142P  |            | + | 1,59E-09 |
| H1H17151P  |            | + | 1,51E-09 |
| H1H17161P  |            | + | 2,55E-10 |
| H1H17162P  |            | + | 2,86E-10 |
| H1H17193P  |            | - | -        |
| H1H17196P  |            | + | 1,68E-09 |
| H1H17199P  |            | - | -        |
| H1H17203P  |            | + | 8,68E-10 |
| H1H17214P  |            | + | 8,99E-10 |
| H1H17219P  |            | + | 6,95E-10 |
| H1H17223P  |            | + | 1,58E-09 |
| H1H17228P  |            | + | 3,26E-09 |
| H1M17354N  | H1M17354N  | - | -        |
| H2aM17356N | H2aM17356N | + | 4,77E-09 |
| H1M17357N  | H1M17357N  | - | -        |
| H2aM17358N | H2aM17358N | + | 4,68E-09 |
| H2aM17359N | H2aM17359N | + | 3,36E-09 |
| H2aM17360N | H2aM17360N | + | 3,75E-09 |

Các dữ liệu trình bày trong bảng 5 cho thấy rằng có 14 trên 20 kháng thể kháng virus Ebola theo sáng chế, sử dụng thiết kế thử nghiệm đã mô tả trong bản mô tả, trung hòa hiệu quả lây nhiễm với giá trị  $IC_{50}$  nằm trong khoảng từ  $10^{-11}$  M đến khoảng  $10^{-9}$  M.

Ví dụ 5: Gây độc trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) bằng kháng thể kháng virus Ebola

Gây độc trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) được thử nghiệm bằng khả năng của kháng thể với tín hiệu thông qua hệ thống báo cáo dựa trên CD16 (Promega ADCC reporter bioassay core kit, San Luis Obispo, CA, USA). Các tế bào 293 biểu hiện GP virus Ebola được nhân lên. Một ngày sau, các kháng thể pha loãng được tạo ra trong các dòng tế bào fuc (Xem Patent Mỹ số, 8409838) và các tế bào kích thích lại phản ứng (tỉ lệ tế bào kích thích lại phản ứng trên tế bào đích là 1,5:1) được thêm vào và ủ qua đêm. Hoạt động của phân tử báo cáo được đo bằng thử nghiệm BioGlo® luciferaza (Promega, San Luis Obispo, CA, USA) và đọc trên đầu đọc đĩa Victor® X3 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) đối với sản phẩm nhẹ.

Bảng 6: Các kết quả ADCC

| Sinh thử nghiệm chất báo cáo ADCC |              |                |
|-----------------------------------|--------------|----------------|
| Ký hiệu kháng thể                 | Ký hiệu dòng | Hoạt động ADCC |
| H1H17134P                         |              | +              |
| H1H17139P                         |              | +              |
| H1H17142P                         |              | +              |
| H1H17151P                         |              | +              |
| H1H17161P                         |              | -              |
| H1H17162P                         |              | -              |
| H1H17193P                         |              | +              |
| H1H17196P                         |              | +              |
| H1H17199P                         |              | +              |
| H1H17203P                         |              | +              |
| H1H17214P                         |              | +              |
| H1H17219P                         |              | -              |
| H1H17223P                         |              | +              |
| H1H17228P                         |              | +              |
| H1M17354N                         | HCAF05C08-22 | +              |
| H2aM17356N                        | HCAF08C07-09 | +              |
| H1M17357N                         | HCAF09D11-13 | +              |
| H2aM17358N                        | HCAF12C05-14 | +              |
| H2aM17359N                        | HCAF12C06-26 | +              |
| H2aM17360N                        | HCAF12G09-07 | +              |

Khả năng của kháng thể trong việc trung hòa ADCC được tính toán trên cơ sở hoạt tính so với đối chứng (âm) kiểu tương đương. Bất kỳ giá trị nào lớn hơn 5 lần đối chứng âm ở trên đều được xem là dương tính. Dữ liệu trong bảng 6 nêu trên chỉ ra rằng có 17 trên 20 kháng thể kháng GP virus Ebola làm trung gian cho phản ứng ADCC

#### Ví dụ 6: Cạnh tranh chéo Octet

Sự cạnh tranh liên kết giữa các kháng thể đơn dòng kháng GP virus Ebola mà trước đây đã được xác định là liên kết với GP virus Ebola được xác định bằng cách sử

dụng thử nghiệm giao thoa lớp sinh học không nhãn, thời gian thực trên bộ cảm biến sinh học Octet HTX (ForteBio Corp., A Division of Pall Life Sciences). Sự liên kết của các đối chứng thích hợp với GP hòa tan (sGP), GP1, hoặc GP2, được đo bằng thử nghiệm tương tự và đáp ứng của nó được trừ đi chất phản ứng GP virus Ebola quan tâm với mỗi mAb được thử nghiệm. Toàn bộ thử nghiệm được tiến hành ở 25°C trong dung dịch đệm có chứa 0,01M HEPES pH7,4, 0,15M NaCl, 3mM EDTA, chất hoạt động bề mặt P20 0,05% thể tích/thể tích, 1,0mg/mL BSA (dung dịch đệm Octet HBS-ET) cùng với việc lắc đĩa ở vận tốc 1000 vòng/phút. Để đánh giá việc hai kháng thể có khả năng cạnh tranh với nhau để liên kết với các quyết định kháng nguyên tương ứng của chúng trên GP virus Ebola được biểu hiện với đuôi polyhistidin ở đầu C (Ebola virus GP.h, Sino Biologicals Inc., cũng xem trong Ngân hàng gen AHX24649.1 và SEQ ID NO: 314), xấp xỉ ~1,0 nm GP virus Ebola được bắt giữ lần thứ nhất trên cảm biến sinh học Octet được phủ kháng thể kháng penta-His (ForteBio Inc, # 18-5079) bằng cách ngâm cảm biến sinh học trong các giếng có chứa 20µg/mL dung dịch GP virus Ebola trong 3 phút. Các cảm biến sinh học bắt giữ kháng nguyên sau đó được bão hòa với kháng thể đơn dòng kháng GP virus Ebola thứ nhất (sau đây còn được gọi là mAb-1) bằng cách nhúng vào trong các giếng có chứa 50µg/mL dung dịch mAb-1 trong 5 phút. Sau đó ngâm các cảm biến sinh học vào trong các giếng có chứa 50µg/mL dung dịch kháng thể đơn dòng kháng GP virus Ebola thứ hai (sau đây còn được gọi là mAb-2) trong 3 phút. Rửa tất cả các cảm biến sinh học bằng dung dịch đệm Octet HBS-ET giữa mỗi bước trong thử nghiệm. Đáp ứng thử nghiệm thời gian thực được theo dõi trong suốt thời gian tiến hành thử nghiệm và đáp ứng liên kết tại cuối mỗi bước đều được ghi lại. Đáp ứng của mAb2 liên kết với GP virus Ebola trước khi tạo phức với mAb-1 được so sánh và hành vi cạnh tranh/không cạnh tranh của các kháng thể kháng GP virus Ebola khác được xác định sử dụng ngưỡng ức chế 50%. Bảng 7 chỉ ra một cách rõ ràng mối quan hệ của các kháng thể cạnh tranh theo cả hai hướng, không phụ thuộc vào thứ tự liên kết.

Như được trình bày trong bảng 7, cột bên trái là các kháng thể mAb-1 bị bắt giữ sử dụng cảm biến sinh học AHC octet và cột bên phải cho thấy các kháng thể (mAb2) cạnh tranh chéo với kháng thể mAb1.

Bảng 7: Sự cạnh tranh chéo của kháng thể kháng GP virus Ebola để liên kết với GP virus Ebola

|                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kháng thể mAb-1 bị bắt giữ sử dụng cảm biến sinh học Octet | Kháng thể mAb-2 cạnh tranh với mAb-1                                                                                                                                                                                                                              |
| H1H17160P                                                  | H1H17160P, H1M17354N, H1M17357N, H1H17228P, H1H17203P                                                                                                                                                                                                             |
| H1M17354N                                                  | H1H17160P, H1M17354N, H1M17357N, H1H17228P, H1H17203P                                                                                                                                                                                                             |
| H1M17357N                                                  | H1H17160P, H1M17354N, H1M17357N, H1H17228P, H1H17203P                                                                                                                                                                                                             |
| H1H17228P                                                  | H1H17160P, H1M17354N, H1M17357N, H1H17228P, H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N                                                                                                                                                                |
| H1H17203P                                                  | H1H17160P, H1M17354N, H1M17357N, H1H17228P, H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N                                                                                                       |
| H1H17151P                                                  | H1H17228P, H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17353N, H1H17223P, H1H17196P, H1H17193P                                             |
| H1H17142P                                                  | H1H17228P, H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1M17353N, H1H17223P, H1H17196P, H1H17193P                                                        |
| H1H17177P                                                  | H1H17228P, H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N, H1H17141P, H1H17223P, H1H17196P, H1H17139P, H1H17193P, H1M17350N |
| H2aM17359N                                                 | H1H17228P, H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N, H1H17141P, H1H17223P, H1H17139P, H1H17193P, H1M17350N            |
| H1H17214P                                                  | H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N, H1H17141P, H1H17223P, H1H17139P, H1H17193P, H1M17350N                       |

|                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kháng thể mAb-1 bị bắt giữ sử dụng cảm biến sinh học Octet | Kháng thể mAb-2 cạnh tranh với mAb-1                                                                                                                                                                                                           |
|                                                            | H1M17353N<br>H1H17141P, H1H17223P, H1H17139P<br>H1H17193P, H1M17350N                                                                                                                                                                           |
| H1H17199P                                                  | H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P,<br>H2aM17359N, H1H17214P<br>H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N,<br>H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P,<br>H1M17348N, H1M17353N, H1H17141P, H1H17139P, H1H17193P,<br>H1M17350N |
| H2aM17358N                                                 | H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P,<br>H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N,<br>H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N<br>H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N,<br>H1M17353N<br>H1H17139P, H1H17193P, H1M17350N             |
| H2aM17360N                                                 | H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N<br>H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N,<br>H1M17352N<br>H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P,<br>H1M17348N<br>H1M17353N, H1H17139P, H1H17193P, H1M17350N              |
| H1M17352N                                                  | H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P,<br>H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N,<br>H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N,<br>H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N,<br>H1H17139P, H1H17193P, H1M17350N              |
| H2aM17356N                                                 | H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P<br>H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N,<br>H2aM17356N<br>H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N<br>H1M17353N, H1H17139P, H1H17193P, H1M17350N                            |
| H2aM17361N                                                 | H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N,<br>H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N,<br>H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N,<br>H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N, H1H17139P, H1H17193P,<br>H1M17350N                         |
| H2aM17355N                                                 | H1H17203P, H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N                                                                                                                                                                                         |



|                                                            |                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kháng thể mAb-1 bị bắt giữ sử dụng cảm biến sinh học Octet | Kháng thể mAb-2 cạnh tranh với mAb-1                                                                                                                                                                                                 |
|                                                            | H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N<br>H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N<br>H1M17353N, H1H17193P, H1M17350N                                                                               |
| H1H17211P                                                  | H1H17151P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P<br>H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N<br>H1H17193P, H1M17350N                                             |
| H1M17348N                                                  | H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N<br>H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N, H1H17193P<br>H1M17350N                                                        |
| H1M17353N                                                  | H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P<br>H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N<br>H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N, H1H17141P, H1H17223P, H1H17196P, H1H17139P, H1H17193P |
| H1H17141P                                                  | H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H1M17353N<br>H1H17141P, H1H17223P, H1H17196P, H1H17139P                                                                                                                                 |
| H1H17223P                                                  | H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1M17353N<br>H1H17141P, H1H17223P, H1H17196P, H1H17139P                                                                                                                      |
| H1H17196P                                                  | H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H1M17353N, H1H17141P, H1H17223P, H1H17196P, H1H17139P                                                                                                                                               |
| H1H17139P                                                  | H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N<br>H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H1M17353N<br>H1H17141P, H1H17223P, H1H17196P, H1H17139P                                                                    |
| H1H17193P                                                  | H1H17151P, H1H17142P, H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P                                                                                                                                                                    |

|                                                            |                                                                                                                                                                  |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kháng thể mAb-1 bị bắt giữ sử dụng cảm biến sinh học Octet | Kháng thể mAb-2 cạnh tranh với mAb-1                                                                                                                             |
|                                                            | H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N<br>H2aM17355N, H1H17211P, H1M17348N, H1M17353N, H1H17193P, H1M17350N                                   |
| H1M17350N                                                  | H1H17177P, H2aM17359N, H1H17214P, H1H17199P, H2aM17358N, H2aM17360N, H1M17352N, H2aM17356N, H2aM17361N, H2aM17355N<br>H1H17211P, H1M17348N, H1H17193P, H1M17350N |
| H1H17219P                                                  | H1H17219P, H1H17150P, H1H17161P                                                                                                                                  |
| H1H17150P                                                  | H1H17219P, H1H17150P, H1H17161P                                                                                                                                  |
| H1H17161P                                                  | H1H17219P, H1H17150P, H1H17161P                                                                                                                                  |
| H1M17349N                                                  | H1M17349N                                                                                                                                                        |
| H1H17134P                                                  | H1H17134P                                                                                                                                                        |
| H1H17162P                                                  | H1H17162P                                                                                                                                                        |
| H1H17210P                                                  | H1H17210P                                                                                                                                                        |

Ví dụ 7: Sự liên kết tuần tự của H1H17203P, H1H17139P và H1H17161P với glycoprotein virus Ebola

Lấy kết quả thu được từ các thử nghiệm cạnh tranh chéo, thử nghiệm liên kết tuần tự được tiến hành để xác định việc ba ứng cử viên kháng thể riêng rẽ có khả năng liên kết cùng một lúc với glycoprotein (GP) virus Ebola hòa tan, từ đó, xác nhận rằng các vị trí liên kết trên GP virus Ebola là độc lập với mỗi kháng thể đơn dòng. Nếu thế, kết quả này có thể ủng hộ cho việc sử dụng các kháng thể này trong dung dịch hỗn hợp kháng thể.

Theo đó, thử nghiệm liên kết tuần tự, đối với ba kháng thể đơn dòng kháng GP virus Ebola liên kết với GP virus Ebola, H1H17203P, H1H17139P và H1H17161P được thử nghiệm về việc liên kết một cách độc lập và không cạnh tranh chéo để liên kết với GP virus Ebola. Tiến hành thử nghiệm sử dụng thử nghiệm giao thoa lớp sinh học không nhãn, thời gian thực (BLI) trên các cảm biến sinh học Octet RED (ForteBio Corp, A Division of Pall Life Sciences). Toàn bộ thử nghiệm được tiến hành tại nhiệt độ 25°C trong đệm có chứa 0,01M HEPES pH7,4, 0,15M NaCl, 3mM EDTA, 0,05% thể tích/thể tích chất hoạt động bề mặt P20, 1,0mg/mL BSA (đệm Octet HBS-ET) cùng với việc lắc

các đĩa với vận tốc 1000 vòng/phút. Để đánh giá việc ba kháng thể có khả năng liên kết cùng một lúc với GP virus Ebola kháng nguyên bắt giữ được biểu hiện với đuôi polyhistidin ở đầu C (Ebola virus GP.h, Sino Biologicals Inc., cũng xem Ngân hàng gen AHX24649.1 và SEQ ID NO: 314), xấp xỉ ~ 0,6nm GP virus Ebola được bắt giữ lần thứ nhất trên cảm biến sinh học Octet được phủ kháng thể kháng penta-His (Fortebio Inc, # 18-5079) bằng cách ngâm cảm biến sinh học trong các giếng có chứa 20µg/mL dung dịch GP virus Ebola.h trong 3 phút. Các cảm biến sinh học bắt giữ kháng nguyên sau đó được bão hòa với kháng thể đơn dòng kháng GP virus Ebola thứ nhất (sau đây còn được gọi là H1H17161P) bằng cách nhúng vào trong các giếng có chứa 50µg/mL dung dịch REGN H1H17161P trong 5 phút, Sau đó ngâm các cảm biến sinh học vào trong các giếng có chứa 50µg/mL dung dịch kháng thể đơn dòng kháng GP virus Ebola thứ hai (sau đây còn được gọi là H1H17139P) trong 5 phút. Cuối cùng, 50ug/mL kháng thể thứ ba (sau đây còn được gọi là H1H17161P) được phun vào trong 5 phút để đạt được trạng thái bão hòa. Đáp ứng thử nghiệm thời gian thực được quan sát trong suốt thời gian diễn ra thử nghiệm và đáp ứng liên kết sau mỗi bước đều được ghi lại.

#### Kết quả

Ba ứng cử viên kháng thể đơn dòng thử nghiệm có khả năng liên kết cùng một lúc với GP virus Ebola, chỉ ra rằng mỗi kháng thể không cản trở kháng thể thử nghiệm còn lại liên kết với GP virus Ebola tại vị trí liên kết, đưa ra giả thuyết rằng mỗi kháng thể liên kết hoặc tương tác với các quyết định kháng nguyên khác nhau. Điều này củng cố cho vai trò của việc sử dụng cả ba kháng thể này trong dung dịch hỗn hợp kháng thể trị liệu.

Ví dụ 8: Sự liên kết của kháng thể kháng Ebola với các chủng hạt tương tự virus (VLP) Ebola khác nhau

Một nghiên cứu được tiến hành để xác định việc kháng thể kháng GP virus Ebola có phản ứng với các hạt tương tự virus (VLP) có chứa các GP lấy từ các chủng virus Ebola khác. Nghiên cứu này bao gồm các VLP có chứa các GP lấy từ Bundibugyo NC\_014373, Cote d'Ivoire FJ217162, Sudan NC\_006432, Zaire. 1995, Zaire.2014 AY354458, và đối chứng âm, glycoprotein VSV (VSVg). Tiến hành nghiên cứu sử dụng "MesoScale Discovery" (MSD), một kỹ thuật cho phép liên kết/cố định các VLP chủng Ebola (biểu hiện glycoprotein Ebola/các protein bề mặt virus) với bề mặt cacbon sau đó tiến hành thử nghiệm liên kết kiểu ELISA. Mục đích là để nhận biết các dữ liệu liên kết của mAb với các chủng Ebola khác nhau.

Thử nghiệm được tiến hành trong các đĩa polypropylen 96 giếng bằng cách đầu tiên chuẩn bị dung dịch pha loãng 1:10 của dịch nổi thu được từ các VLP/giếng khác nhau (như được ghi chú trong bảng dưới đây) và cho dung dịch pha loãng vào PBS (50 µl/giếng) và ủ tại nhiệt độ 4°C qua đêm.

Loại bỏ chất lỏng trong các giếng sau khi phong bế với 150 µl/giếng trong PBS + 2% BSA và ủ trong một giờ tại nhiệt độ phòng. Sau đó loại bỏ hàm lượng trong mỗi giếng và rửa các giếng bằng PBS sử dụng máy rửa đĩa AquaMax2000 được thiết kế cho thử nghiệm MSD. 50µl kháng thể sơ cấp được pha loãng trong PBS + 1% BSA và ủ tại nhiệt độ phòng cùng với việc lắc tại tốc độ trung bình (5). Loại bỏ hàm lượng trong các giếng và rửa đĩa bằng PBS. Bổ sung 50µl chất phát hiện sulfo-TAG (Fc người hoặc chuột) tại nồng độ 1 µg/ml trong PBS + 0,5% BSA vào mỗi giếng và ủ tại nhiệt độ phòng trong 1 giờ cùng với việc lắc tại tốc độ trung bình (5). Sau đó loại bỏ hàm lượng trong mỗi giếng và rửa đĩa bằng PBS + 0,5% BSA. Bổ sung vào mỗi giếng 150 µl đệm đọc 1X không chứa chất hoạt động bề mặt và đọc các giếng trên SECTORImager6000 từ mã vạch.

Các kết quả thu được được trình bày trong bảng 8 bên dưới, chỉ ra rằng tất cả các kháng thể kháng GP virus Ebola thử nghiệm liên kết với các VLP có chứa các GP của Zaire 2014 và Zaire 1995. Một vài kháng thể trong số các kháng thể thử nghiệm liên kết với VLP có chứa các GP từ các chủng virus Ebola khác, bên cạnh việc liên kết với hai chủng Zaire ghi trong bảng 8. Cụ thể là, bên cạnh việc liên kết với các VLP có chứa các GP từ các chủng Zaire 2014 và Zaire 1995, các kháng thể kháng virus Ebola được kí hiệu là H1H17161P và H1H17162P liên kết với các VLP có chứa các GP từ các chủng Sudan và Bundibugyo, trong khi các kháng thể kháng virus Ebola kí hiệu là H2aM17356N và H1H17142P liên kết với các chủng Bundibugyo và Cote d'Ivoire.

Bảng 8: Khả năng phản ứng chéo của các kháng thể kháng virus Ebola với các GP lấy từ các chủng virus Ebola khác nhau

| AbPID     | Kháng thể kháng virus Ebola liên kết với các VLP chứa các GP từ các chủng virus Ebola khác nhau |            |               |            |            |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|---------------|------------|------------|
|           | Sudan                                                                                           | Bundibugyo | Cote d'Ivoire | Zaire 2014 | Zaire 1995 |
| H1H17161P | +                                                                                               | +          | –             | +          | +          |
| H1H17139P | –                                                                                               | –          | –             | +          | +          |
| H1H17203P | –                                                                                               | –          | –             | +          | +          |

|            | Kháng thể kháng virus Ebola liên kết với các VLP chứa các GP từ các chủng virus Ebola khác nhau |            |               |            |            |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|---------------|------------|------------|
| AbPID      | Sudan                                                                                           | Bundibugyo | Cote d'Ivoire | Zaire 2014 | Zaire 1995 |
| H1H17219P  | –                                                                                               | –          | –             | +          | +          |
| H1H17162P  | +                                                                                               | +          | –             | +          | +          |
| H1H17199P  | –                                                                                               | –          | –             | +          | +          |
| H1H17193P  | –                                                                                               | –          | –             | +          | +          |
| H1M17354N  | –                                                                                               | –          | –             | +          | +          |
| H1M17357N  | –                                                                                               | –          | –             | +          | +          |
| H1H17134P  | –                                                                                               | –          | –             | +          | +          |
| H1H17360N  | –                                                                                               | –          | –             | +          | +          |
| H1H17358N2 | –                                                                                               | –          | –             | +          | +          |
| H2aM17356N | –                                                                                               | +          | +             | +          | +          |
| H1H17223P  | –                                                                                               | –          | –             | +          | +          |
| H1H17196P  | –                                                                                               | –          | –             | +          | +          |
| H1H17151P  | –                                                                                               | –          | –             | +          | +          |
| H1H17142P  | –                                                                                               | +          | +             | +          | +          |
| H1H17214P  | –                                                                                               | –          | –             | +          | +          |
| H1H17228P  | –                                                                                               | –          | –             | +          | +          |
| H2aM17359N | –                                                                                               | –          | –             | +          | +          |

Ví dụ 9: Phản ứng trung hòa *in vitro* của virus Ebola (EBOV) sống/lây nhiễm

Các kháng thể kí hiệu là H1H17203P, H1H17139P và H1H17161P được phân tích khả năng trung hòa EBOV lây nhiễm trong các tế bào Vero của chúng. Các tế bào Vero được đưa lên các đĩa 384 giếng trong DMEM-10% FBS và cho phép sinh trưởng đến xấp xỉ 75% dòng tế bào tại 37°C. H1H17203P, H1H17139P và H1H17161P được pha loãng theo chỉ định. Các chủng EBOV (Mayinga, Kikwit, Makona, và Mayinga chuột lang nhà-đáp ứng) được làm tan giá và pha loãng gần đến MOI nằm trong khoảng 0,01-0,1. Kháng thể kháng virus Ebola có sẵn trên thị trường có kí hiệu là KZ52 được sử dụng làm đối chứng dương. (Xem Maruyama, T, *et al*, *J Virol* 73, 6024–6030 (1999)). Các kháng thể được ủ với virus trong 1 giờ tại 37°C. Sau đó, hỗn hợp kháng thể/virus được đưa vào các tế bào trước khi đưa vào đĩa và các đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau khoảng thời gian ủ, các đĩa được đưa ra khỏi tủ ấm và bị bất hoạt bằng cách ngâm trong

formalin được đệm trung hòa 10%, đặt vào trong túi bịt kín và bảo quản ở 4°C qua đêm trong BSL-4. Các đĩa được rửa ba lần trong 1X-PBS và các tế bào được thấm tại nhiệt độ phòng (RT) với 25µl Triton X-100 0,1% trong 1X-PBS trong 15-20 phút. Loại bỏ Triton-X và phong bế bằng BSA 3,5% trong 1X-PBS trong 1 giờ tại nhiệt độ phòng. Các đĩa được xử lý qua đêm tại 4°C với kháng thể sơ cấp kháng GP virut Ebola 4F3 (Xem IBT BIOSERVICES dùng cho kháng thể đơn dòng 4F3 chuột kháng GP virut Ebola, số 0201-020) pha loãng theo tỷ lệ 1:1500 trong 1X-PBS. Các đĩa được rửa trong 1X-PBS trong 10-15 phút và lặp lại hai lần. Các tế bào được ủ trong 1 giờ với kháng thể thứ cấp kháng chuột liên hợp Alexa-fluor-488. Loại bỏ kháng thể thứ cấp và các đĩa được rửa trong 1X-PBS trong 10-15 phút và lặp lại hai lần. Các đĩa được ủ với 25µl/giếng Hoechst (1:50,000 trong 1X-PBS) trong 30 phút tại nhiệt độ phòng. Các đĩa được chụp ảnh bằng kính hiển vi huỳnh quang sử dụng các kênh huỳnh quang xanh lá và xanh da trời.

#### Kết quả

Các kết quả thu được được trình bày trong Fig. 1, cho thấy rằng kháng thể H1H17161P đã trung hòa virut sống và có nhiều tiềm năng hơn với với kháng thể đối chứng dương KZ52, tuy nhiên các kháng thể được kí hiệu là H1H17203P và H1H17139P lại không hoạt động như các chất trung hòa.

Ví dụ 10: Liên kết của kháng thể kháng Ebola với Gp hòa tan (sGP)

Gen thứ tư trong hệ gen EBOV mã hóa cho hai protein, glycoprotein bài tiết dime, không cấu trúc, được gọi là sGP và glycoprotein (GP) vỏ, gắn với hạt virut, trime. Hai GP này chiếm 295 axit amin thứ nhất, tuy nhiên có các đầu C duy nhất. Để xác định việc Regeneron đưa mAb gắn với các GP, protein sGP.mmh tái tổ hợp được sản xuất nội bộ (SEQ ID NO: 317). Các cảm biến sinh học Octet HTX trên cơ sở giao thoa được sử dụng để xác định việc các kháng thể đơn dòng H1H17203P, H1H17139P, H1H17161P có thể liên kết với protein sGP.mmh Ebola. Thử nghiệm tham gia bắt giữ H1H17203P, H1H17139P, H1H17161P trên các đầu cảm biến kháng hFc, sau khi ngâm trong 300 nM dung dịch GP Ebola.10xhis (SEQ ID NO: 318), sGP. mmh (SEQ ID NO: 317), hoặc hCNTFR (thụ thể nhân tố tế bào thần kinh có mao.mmh, là protein đối chứng âm). Mỗi mAb được bắt giữ tại nồng độ nằm trong khoảng 0,94 – 1,36 nm.

Như được trình bày trong Fig. 2, tất cả các mAb đều cho thấy khả năng liên kết đặc hiệu với GP Ebola. 10xhis và không liên kết với protein đối chứng âm; trong khi chỉ

có H1H17139 cho thấy được khả năng liên kết đặc hiệu với Ebola sGP.mmh. Phát hiện này đưa ra giả thuyết rằng quyết định kháng nguyên liên kết của H1H17139 có thể được nằm ở vị trí tương tự trong vùng có chứa 295 axit amin đầu tiên của cả hai sGP và GP; trong đó các mAb còn lại chỉ có khả năng nhận biết đầu C của GP Ebola.

Ví dụ 11: Liên kết của kháng thể kháng GP EBOV bổ sung với GP Ebola.h, GP hòa tan của Ebola.mmh và hCNTFR.mmh

Một nghiên cứu tiếp theo được tiến hành để xác định đặc trưng liên kết của kháng thể kháng GP virus Ebola bổ sung theo sáng chế; cụ thể là, nghiên cứu được tiến hành để xác định khả năng của các kháng thể bổ sung này trong việc liên kết với GP hòa tan và GP. Nghiên cứu này được tiến hành sử dụng thử nghiệm giao thoa lớp sinh học không có nhãn, thời gian thực (BLI) trên cảm biến sinh học Octet HTX (ForteBio Corp., A Division of Pall Life Sciences). Toàn bộ thử nghiệm được tiến hành ở 25°C trong dung dịch đệm có chứa 0,01M HEPES pH7,4, NaCl 0,15M, 3mM EDTA, chất hoạt động bề mặt P20 0,05% thể tích/thể tích, 1,0mg/mL BSA (đệm Octet HBS-ET) cùng với việc lắc đĩa ở vận tốc 1000rpm. Để khẳng định việc hai kháng thể có khả năng liên kết với GP hòa tan của Ebola hoặc chất phản ứng GP Ebola khác, gần 1,0nm mAb kháng GP virus Ebola được bắt giữ trên kháng thể kháng Fc người (ForteBio Inc, # 18-5064) phủ các cảm biến sinh học Octet bằng cách ngâm cảm biến sinh học trong các giếng có chứa 20µg/mL dung dịch mAb trong 3 phút. Các cảm biến sinh học bắt giữ mAb được kiểm tra khả năng liên kết với các chất phản ứng protein chọn lọc bằng cách ngâm trong các giếng có chứa 300nM dung dịch protein GP Ebola hoặc các đối chứng không liên quan trong 5 phút. Tất cả các cảm biến sinh học được rửa bằng dung dịch đệm Octet HBS-ET giữa mỗi bước trong thử nghiệm. Đáp ứng liên kết thời gian thực được quan sát trong suốt thời gian tiến hành thử nghiệm và đáp ứng liên kết tại cuối mỗi bước được ghi lại.

Kết quả:

Như được trình bày trong bảng 9, bất kỳ giá trị nào dưới 0,10 nm được xác định là kháng thể không liên kết, dựa trên các kết quả đến nay, tất cả các kháng thể ngoại trừ một kháng thể (H1H17360N) được thử nghiệm cho thấy khả năng liên kết với GP EBOV đủ chiều dài, và mười ba trong số 20 kháng thể thử nghiệm cho thấy khả năng liên kết với GP hòa tan (sGP).

Bảng 9: Sự liên kết các kháng thể kháng GP Ebola với GP Ebola.h, GP Ebola hòa tan.mmh và hCNTFR.mmh

| Kí hiệu kháng thể | Khả năng liên kết với GP hòa tan | 300 nM sGP (F2) Ebola liên kết (nm) | 300 nM GP,h Ebola liên kết (nm) | 300 nM hCNTFR.mmh (đối chứng âm) liên kết (nm) |
|-------------------|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------|
| H1H17161P         | Không                            | 0,00                                | 0,55                            | -0,01                                          |
| H1H17139P         | Có                               | 0,19                                | 0,55                            | 0,01                                           |
| H1H17203P         | Không                            | 0,02                                | 0,61                            | 0,01                                           |
| H1H17219P         | Không                            | 0,01                                | 0,68                            | 0,01                                           |
| H1H17162P         | Không                            | 0,03                                | 0,49                            | 0,02                                           |
| H1H17199P         | Có                               | 0,33                                | 0,38                            | 0,00                                           |
| H1H17193P         | Có                               | 0,26                                | 0,33                            | 0,02                                           |
| H1M17354N         | Có                               | 0,18                                | 0,71                            | 0,02                                           |
| H1M17357N         | Không                            | 0,10                                | 0,56                            | 0,01                                           |
| H1H17134P         | Không                            | 0,01                                | 0,70                            | -0,01                                          |
| H1H17360N         | Không                            | 0,09                                | 0,09                            | 0,03                                           |
| H1H17358N2        | Có                               | 0,30                                | 0,35                            | 0,01                                           |
| H1H17356N         | Có                               | 0,22                                | 0,23                            | 0,02                                           |
| H1H17223P         | Có                               | 0,31                                | 0,61                            | 0,02                                           |
| H1H17196P         | Có                               | 0,25                                | 0,62                            | 0,01                                           |
| H1H17151P         | Có                               | 0,33                                | 0,43                            | -0,02                                          |
| H1H17142P         | Có                               | 0,28                                | 0,34                            | 0,01                                           |
| H1H17214P         | Có                               | 0,38                                | 0,52                            | 0,01                                           |
| H1H17228P         | Có                               | 0,35                                | 0,58                            | 0,00                                           |
| H1H17359N         | Có                               | 0,39                                | 0,51                            | 0,00                                           |



## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể tái tổ hợp được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với virus Ebola (EBOV) và/hoặc glycoprotein virus Ebola (EBOV-GP), trong đó kháng thể này:
 

chứa ba vùng xác định bổ trợ (CDR) chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) nằm trong cặp bất kỳ trong số các cặp trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 18/26, 66/74, và 146/154.
2. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể này còn có một hoặc nhiều đặc tính sau đây:
  - (a) là kháng thể đơn dòng người hoàn chỉnh;
  - (b) liên kết với EBOV, hoặc các hạt tương tự virus (VLP) biểu hiện EBOV-GP có hằng số phân ly ( $K_D$ ) nhỏ hơn  $10^{-7}M$ , như được xác định bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt; và
  - (c) cho thấy tăng ít nhất ba lần trong chu kỳ bán rã ( $t_{1/2}$ ) tại pH 5 hoặc pH 6 so với pH 7,4.
3. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, bao gồm HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 18, 66, và 146.
4. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, bao gồm LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 26, 74, và 154.
5. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, bao gồm cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 18/26, 66/74, và 146/154.
6. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, bao gồm trình tự axit amin HCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 20; trình tự axit amin HCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 22; trình tự axit amin HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 24; trình tự axit amin LCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 28, trình tự axit amin LCDR2 nêu trong

SEQ ID NO: 30; trình tự axit amin LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 32.

7. Kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, bao gồm trình tự axit amin HCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 68; trình tự axit amin HCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 70; trình tự axit amin HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 72; trình tự axit amin LCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 76, trình tự axit amin LCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 78; trình tự axit amin LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 80.

8. Kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, bao gồm trình tự axit amin HCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 148; trình tự axit amin HCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 150; trình tự axit amin HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 152; trình tự axit amin LCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 156, trình tự axit amin LCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 158; trình tự axit amin LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 160.

9. Kháng thể được phân lập theo điểm 1, trong đó kháng thể này ức chế virus Ebola xâm nhập tế bào chủ.

10. Được phẩm bao gồm một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EBOV theo điểm 1, và chất mang được dung hoặc chất pha loãng.

11. Được phẩm theo điểm 10, trong đó kháng thể này chứa sáu CDR nằm trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 18/26.

12. Được phẩm theo điểm 11, còn bao gồm thêm một hoặc nhiều kháng thể, trong đó kháng thể chứa sáu CDR nằm trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 66/74 và 146/154.

13. Được phẩm bao gồm (a) kháng thể kháng EBOV thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1; (b) kháng thể kháng EBOV thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó; và (c) kháng thể kháng EBOV thứ ba hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể thứ nhất liên kết, hoặc tương tác với, quyết định kháng nguyên thứ nhất trên EBOV và kháng thể thứ hai và/hoặc thứ ba liên kết, hoặc tương tác với quyết định kháng nguyên khác trên EBOV, và (d) chất mang được dung hoặc chất pha loãng.

14. Được phẩm theo điểm 13, trong đó kháng thể kháng EBOV thứ hai và thứ ba có chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự

HCVR và LCVR được liệt kê trong bảng sau:

| Ký hiệu kháng thể | SEQ ID NO: |        |        |        |      |        |        |        |
|-------------------|------------|--------|--------|--------|------|--------|--------|--------|
|                   | HCVR       | HCDR 1 | HCDR 2 | HCDR 3 | LCVR | LCDR 1 | LCDR 2 | LCDR 3 |
| H1H17134P         | 2          | 4      | 6      | 8      | 10   | 12     | 14     | 16     |
| H1H17139P         | 18         | 20     | 22     | 24     | 26   | 28     | 30     | 32     |
| H1H17142P         | 34         | 36     | 38     | 40     | 42   | 44     | 46     | 48     |
| H1H17151P         | 50         | 52     | 54     | 56     | 58   | 60     | 62     | 64     |
| H1H17161P         | 66         | 68     | 70     | 72     | 74   | 76     | 78     | 80     |
| H1H17162P         | 82         | 84     | 86     | 88     | 90   | 92     | 94     | 96     |
| H1H17193P         | 98         | 100    | 102    | 104    | 106  | 108    | 110    | 112    |
| H1H17196P         | 114        | 116    | 118    | 120    | 122  | 124    | 126    | 128    |
| H1H17199P         | 130        | 132    | 134    | 136    | 138  | 140    | 142    | 144    |
| H1H17203P         | 146        | 148    | 150    | 152    | 154  | 156    | 158    | 160    |
| H1H17214P         | 162        | 164    | 166    | 168    | 170  | 172    | 174    | 176    |
| H1H17219P         | 178        | 180    | 182    | 184    | 186  | 188    | 190    | 192    |
| H1H17223P         | 194        | 196    | 198    | 200    | 202  | 204    | 206    | 208    |
| H1H17228P         | 210        | 212    | 214    | 216    | 218  | 220    | 222    | 224    |
| H1H17354N         | 226        | 228    | 230    | 232    | 234  | 236    | 238    | 240    |
| H1H17356N         | 242        | 244    | 246    | 248    | 250  | 252    | 254    | 256    |
| H1H17357N         | 258        | 260    | 262    | 264    | 266  | 268    | 270    | 272    |
| H1H17358N2        | 274        | 276    | 278    | 280    | 282  | 284    | 286    | 288    |
| H1H17359N         | 290        | 292    | 294    | 296    | 298  | 300    | 302    | 304    |
| H1H17360N         | 306        | 308    | 310    | 312    | 282  | 284    | 286    | 288    |
| H1M17354N         | 226        | 228    | 230    | 232    | 234  | 236    | 238    | 240    |
| H2aM17356N        | 242        | 244    | 246    | 248    | 250  | 252    | 254    | 256    |
| H1M17357N         | 258        | 260    | 262    | 264    | 266  | 268    | 270    | 272    |
| H2aM17358N        | 274        | 276    | 278    | 280    | 282  | 284    | 286    | 288    |
| H2aM17359N        | 290        | 292    | 294    | 296    | 298  | 300    | 302    | 304    |
| H2aM17360N        | 306        | 308    | 310    | 312    | 282  | 284    | 286    | 288.   |

15. Được phẩm theo điểm 13, trong đó các quyết định kháng nguyên liên kết, hoặc tương tác với kháng thể kháng EBOV thứ nhất, thứ hai và/hoặc thứ ba hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, tách biệt và không chồng lên nhau.

16. Được phẩm theo điểm 13, trong đó kháng thể kháng EBOV thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết, hoặc tương tác với một quyết định kháng nguyên trên một chủng EBOV và kháng thể kháng EBOV thứ hai và/hoặc thứ ba và mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết, hoặc tương tác với quyết định kháng nguyên thứ hai và/hoặc thứ ba trên cùng một chủng hoặc trên chủng EBOV khác.

17. Được phẩm theo điểm 16, trong đó mỗi kháng thể trong số kháng thể kháng EBOV thứ hai và thứ ba hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng liên kết độc lập với chủng EBOV được chọn từ nhóm bao gồm chủng Zaire.2014, Zaire. 1995, Sudan, Bundibugyo, và Cote d'Ivoire.

18. Được phẩm theo điểm 10, bao gồm kháng thể đơn dòng được phân lập thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EBOV, trong đó kháng thể đơn dòng được phân lập thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm trình tự axit amin HCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 20; trình tự axit amin HCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 22; trình tự axit amin HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 24; trình tự axit amin LCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 28, trình tự axit amin LCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 30; trình tự axit amin LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 32 và chất mang được dung hoặc chất pha loãng.

19. Được phẩm theo điểm 18, còn bao gồm thêm một kháng thể đơn dòng được phân lập thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EBOV, trong đó kháng thể đơn dòng được phân lập thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm trình tự axit amin HCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 68; trình tự axit amin HCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 70; trình tự axit amin HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 72; trình tự axit amin LCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 76, trình tự axit amin LCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 78; trình tự axit amin LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 80.

20. Được phẩm theo điểm 19, còn bao gồm thêm một kháng thể đơn dòng được phân lập thứ ba hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với EBOV, trong đó kháng thể đơn dòng được phân lập thứ ba hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm trình tự axit amin HCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 148; trình tự axit amin HCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 150; trình tự axit amin HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 152; trình tự axit amin LCDR1 nêu trong SEQ ID NO: 156, trình tự axit amin LCDR2 nêu trong SEQ ID NO: 158; trình tự axit amin LCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 160.

21. Phân tử polynucleotit được phân lập chứa trình tự polynucleotit mã hóa cho HCVR, và/hoặc LCVR của kháng thể nêu trong điểm 1.
22. Vector có chứa trình tự polynucleotit theo điểm 21.
23. Tế bào được phân lập biểu hiện vector theo điểm 22.
24. Được phẩm theo điểm 11, trong đó kháng thể chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 18/26.
25. Được phẩm theo điểm 12, trong đó một hoặc nhiều kháng thể khác nữa chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ SEQ ID NO: 66/74 và 146/154.
26. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 66/74 và cho thấy sự trung hòa của virus Ebola Zaire với giá trị  $IC_{50}$  nằm trong khoảng từ  $10^{-11}$  M đến khoảng  $10^{-9}$  M.
27. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 18/26 hoặc 146/154 và cho thấy sự liên kết với các tế bào biểu hiện EBOV-GP kích hoạt phản ứng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể.
28. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 18/26 và phản ứng chéo với chủng EBOV Zaire.2014 và Zaire.1995.
29. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 66/74 và phản ứng chéo với một hoặc nhiều chủng EBOV được chọn từ nhóm bao gồm Zaire.2014, Zaire.1995, Sudan, và Bundibugyo.
30. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 146/154 và phản ứng chéo với chủng EBOV Zaire.2014 và Zaire.1995.
31. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 18/26 và liên kết với Gp hòa tan (sGP).

32. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó dược phẩm bao gồm ba kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR nêu trong SEQ ID NO: 18/26, 66/74, và 146/154, và chất mang được dụng hoặc chất pha loãng.

1/2

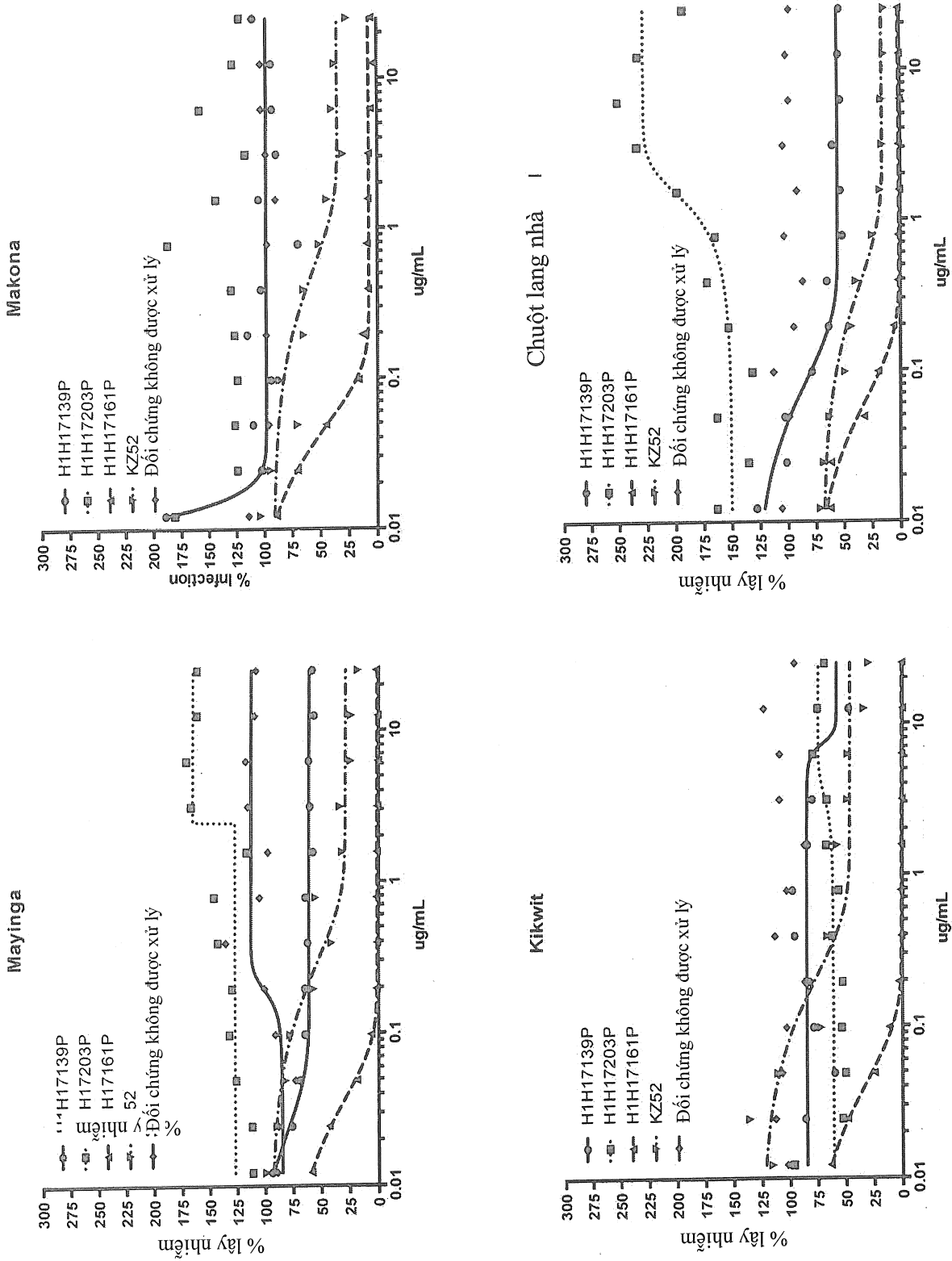
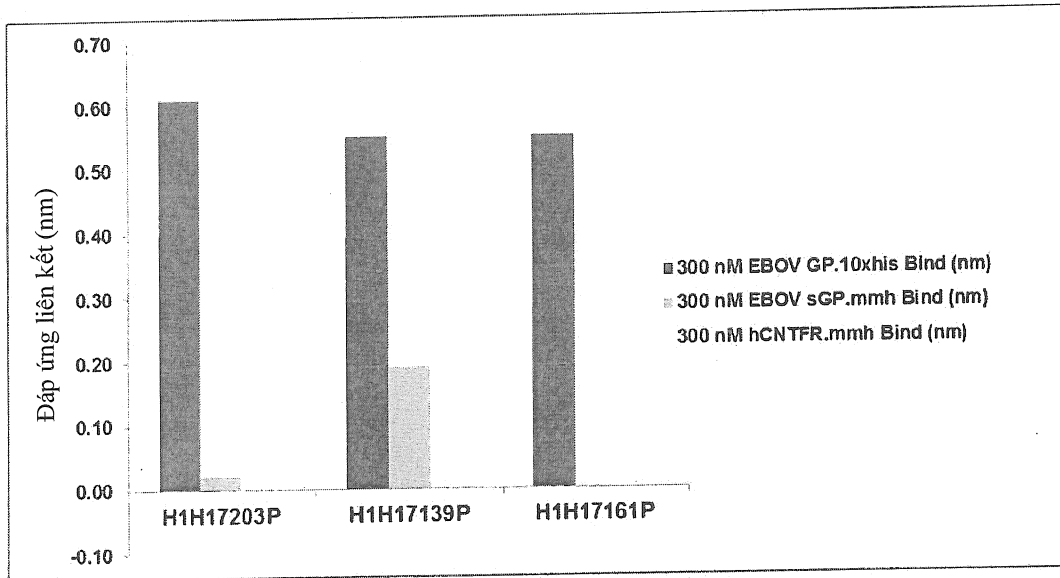


Fig. 1

Fig. 2: Sự tương tác của H1H17203, H1H17139P và H1H17161P với GP Eblola.10xhis và GP Ebola hòa tan (sGP.mmh) tại 25°C



Các tín hiệu liên kết Octet HTX cho mỗi kháng thể trong số các kháng thể GP Ebola với 300nM GP Ebola.10xhis (màu đen), GP Ebola hòa tan.mmh (xám đậm) và hCNTFR.mmh protein đối chứng âm, không liên quan (xám nhạt).



## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Kháng thể tái tổ hợp liên kết đặc hiệu với virus Ebola và được phẩm chứa kháng thể này

<130> 10139W001

<150> 62/107,581

<151> 2015-01-26

<150> 62/161,356

<151> 2015-05-14

<150> 62/245,703

<151> 2015-10-23

<160> 318

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 342

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 1

```

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtagtt actactgggg ctggatccgc 120
cagccccagc ggaaggggct ggagtggatt gggagtatct attatgatgg ggacacctac 180
tacaacccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatccgtag acacgtcca gaaccagttc 240
tccttgaggc tgagctctgt gaccgccgca gacacggcag tgtattactg tgcgagacag 300
tttgactact ggggccaggg aaccctggtc accgtctcct ca 342

```

<210> 2

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 2

```

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1             5             10             15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
          20             25             30
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu

```

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

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 3  
 ggtggctcca tcagcagtag tagttactac

30

<210> 4  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 4  
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 5  
 atctattatg atggggacac c

21

<210> 6  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 6

Ile Tyr Tyr Asp Gly Asp Thr

1

5

<210> 7

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 7

gcgagacagt ttgactac

18

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 8

Ala Arg Gln Phe Asp Tyr

1

5

<210> 9

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 9

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagt agcaacttag cctgggtacca gcagaaacct 120  
 ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180  
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtc 240  
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataaaaact ggccgatcac cttcggccaa 300  
 gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

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

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 11  
 cagagtgtta gtagcaac

18

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 12  
 Gln Ser Val Ser Ser Asn  
 1 5

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 13  
 ggtgcatcc

9

<210> 14

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 14  
 Gly Ala Ser  
 1

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 15  
 cagcagtata aaaactggcc gatcacc

27

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 16  
 Gln Gln Tyr Lys Asn Trp Pro Ile Thr  
 1 5

<210> 17  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 17  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctacgaca tgcactgggt ccgccaagct 120  
 acaggaaaag gtctggagtg ggtctcagct attgggtactg ctgggtgacac atactatcca 180  
 ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaaaaactc cttgtatctt 240  
 caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag aacatgggtc 300  
 ggggagcttt actttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 18  
 <211> 118

<212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

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

<210> 19  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 19  
 ggattcacct tcagtagcta cgac

24

<210> 20  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 20  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp  
 1 5

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

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 21

attggtactg ctggtgacac a

21

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 22

Ile Gly Thr Ala Gly Asp Thr

1

5

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 23

gcaagaacat gggtcgggga gctttacttt gactac

36

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 24

Ala Arg Thr Trp Phe Gly Glu Leu Tyr Phe Asp Tyr

1

5

10

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 339

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 25

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggtgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
atcaactgca agtccagcca gagggtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120

tggtagcagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccggg 180  
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagaatt cactctcacc 240  
 atcaccagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtagt 300  
 ccgctcactt tcggcggagg gaccaaggtg gagatcaaa 339

<210> 26  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 26  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
 20 25 30  
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Thr Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 100 105 110  
 Lys

<210> 27  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 27  
 cagagtgttt tatacagctc caacaataag aactac 36

<210> 28  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 28  
 Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr



|   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | 5 | 10 |
|---|---|----|

<210> 29  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> tổng hợp  
  
 <400> 29  
 tgggcatct

9

<210> 30  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> tổng hợp  
  
 <400> 30  
 Trp Ala Ser  
 1

<210> 31  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> tổng hợp  
  
 <400> 31  
 cagcaatatt atagtagtcc gctcact

27

<210> 32  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> tổng hợp  
  
 <400> 32  
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu Thr  
 1                      5

<210> 33  
 <211> 375  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 33

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcca tgacctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaagt attagtggta gtggtactag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240
ctgcaaatac acagcctgcg agccgaggac acggccctat attactgttc gagagatata 300
tatacctgga acttcctctc actaattggc ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360
gtcaccgtct cctca 375

```

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 34

```

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

```

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 35

```

ggattcacct ttagcagcta tgcc

```

24

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
1 5

<210> 37

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 37

attagtggta gtggtactag caca

24

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 38

Ile Ser Gly Ser Gly Thr Ser Thr  
1 5

<210> 39

<211> 54

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 39

tcgagagata tatatacctg gaacttcctc tcactaattg gcggtatgga cgtc 54

<210> 40

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

&lt;400&gt; 40

Ser Arg Asp Ile Tyr Thr Trp Asn Phe Leu Ser Leu Ile Gly Gly Met  
 1 5 10 15  
 Asp Val

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 41

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga attgatttag gctggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaaccgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaggtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag caaaatagtt acccgtggac gttcggccaa 300  
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 42

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

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

<223> tổng hợp

<400> 43

cagggcatta gaattgat

18

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 44

Gln Gly Ile Arg Ile Asp

1

5

<210> 45

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 45

gctgcatcc

9

<210> 46

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 46

Ala Ala Ser

1

<210> 47

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 47

ctacagcaaa atagttaccc gtggacg

27

<210> 48

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 48  
 Leu Gln Gln Asn Ser Tyr Pro Trp Thr  
 1 5

<210> 49  
 <211> 387  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 49  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc tgaactgggt ccgccaggct 120  
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attagtggta gtgggtggttg gagaaactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gatcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acaacctgag agccgaggac acggccgtat attattgtgc gaaagatcgg 300  
 ggtgcgactt ttggagtggg tatttttgga cccccctatt acggtatgga cgtctggggc 360  
 caagggacca cggtcaccgt ctctca 387

<210> 50  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

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

| 115                             | 120 | 125 |
|---------------------------------|-----|-----|
| Ser                             |     |     |
| <210> 51                        |     |     |
| <211> 24                        |     |     |
| <212> ADN                       |     |     |
| <213> Trình tự nhân tạo         |     |     |
| <220>                           |     |     |
| <223> tổng hợp                  |     |     |
| <400> 51                        |     | 24  |
| ggattcacct ttagcagcta tgcc      |     |     |
| <210> 52                        |     |     |
| <211> 8                         |     |     |
| <212> PRT                       |     |     |
| <213> Trình tự nhân tạo         |     |     |
| <220>                           |     |     |
| <223> tổng hợp                  |     |     |
| <400> 52                        |     |     |
| Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala |     |     |
| 1 5                             |     |     |
| <210> 53                        |     |     |
| <211> 24                        |     |     |
| <212> ADN                       |     |     |
| <213> Trình tự nhân tạo         |     |     |
| <220>                           |     |     |
| <223> tổng hợp                  |     |     |
| <400> 53                        |     | 24  |
| attagtggtta gtggtggttg gaga     |     |     |
| <210> 54                        |     |     |
| <211> 8                         |     |     |
| <212> PRT                       |     |     |
| <213> Trình tự nhân tạo         |     |     |
| <220>                           |     |     |
| <223> tổng hợp                  |     |     |
| <400> 54                        |     |     |
| Ile Ser Gly Ser Gly Gly Trp Arg |     |     |
| 1 5                             |     |     |
| <210> 55                        |     |     |
| <211> 66                        |     |     |

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 55

gcgaaagatc ggggtgcgac ttttggagtg gttatttttg gaccccccta ttacggtatg 60  
gacgtc 66

<210> 56

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 56

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Lys | Asp | Arg | Gly | Ala | Thr | Phe | Gly | Val | Val | Ile | Leu | Gly | Pro | Pro |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| Tyr | Tyr | Gly | Met | Asp | Val |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 57

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 57

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaagaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc acttatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacaggt ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta tcccgtacac ttttgccag 300  
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 58

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Gln | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Arg |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | Ser | Ile | Ser | Thr | Tyr |



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

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

<220>  
<223> tổng hợp

18

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

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 60  
Gln Ser Ile Ser Thr Tyr  
1 5

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

<220>  
<223> tổng hợp

9

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

 $\langle 220 \rangle$

<223> tổng hợp

<400> 62

Ala Ala Ser

1

<210> 63

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 63

caacagagtt acagtatccc gtacact

27

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 64

Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Tyr Thr

1

5

<210> 65

<211> 354

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 65

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctctagc agctatgcca tgaactgggt ccgccaggct 120  
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaaca attagtggta tgggtggtag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagggga 300  
 tatccccatt cttttgatat ctgggggcaa gggacaatgg tcaccgtctc ttca 354

<210> 66

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

&lt;400&gt; 66

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

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 67

ggattcacct ctagcagcta tgcc

24

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 68

Gly Phe Thr Ser Ser Ser Tyr Ala

1 5

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 69

attagtggta tgggtggtag caca

24

<210> 70  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 70  
 Ile Ser Gly Met Gly Gly Ser Thr  
 1 5

<210> 71  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 71  
 gcgaaaaggg gatatcccca ttcttttgat atc

33

<210> 72  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 72  
 Ala Lys Arg Gly Tyr Pro His Ser Phe Asp Ile  
 1 5 10

<210> 73  
 <211> 318  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 73  
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctttttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccctcacctt cggccaaggg 300  
 acacgactgg agattaaa 318

<210> 74  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 74  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Phe  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Leu Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 75  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 75  
 cagagcatta gcagcttt

18

<210> 76  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 76  
 Gln Ser Ile Ser Ser Phe  
 1 5

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

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 77  
gctgcatcc

9

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

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 78  
Ala Ala Ser  
1

<210> 79  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 79  
caacagagtt acagtaccct cacc

24

<210> 80  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 80  
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Leu Thr  
1 5

<210> 81  
<211> 354  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 81  
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctgaatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtagtggtag cacatactac 180  
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaaaaa gacgctgtat 240  
ctacaaatga acagcctgag agtcgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggggg 300  
tacccccatt cttttgatat ctggggccat gggacaatgg tcaccgtctc ttca 354

<210> 82  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 82  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30  
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Lys Gly Gly Tyr Pro His Ser Phe Asp Ile Trp Gly His Gly Thr  
100 105 110  
Met Val Thr Val Ser Ser  
115

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

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 83  
gaattcacct ttagcagcta tgcc

24

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

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 84  
Glu Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1

5

&lt;210&gt; 85

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 85

attagtggta gtagtggtag caca

24

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 86

Ile Ser Gly Ser Ser Gly Ser Thr

1

5

&lt;210&gt; 87

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 87

gcgaaagggg ggtaccccca ttcttttgat atc

33

&lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 88

Ala Lys Gly Gly Tyr Pro His Ser Phe Asp Ile

1

5

10

&lt;210&gt; 89

&lt;211&gt; 318

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo



<220>  
<223> tổng hợp

<400> 89  
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agcttttttaa attggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagtt ccatcacctt cggccaaggg 300  
acacgactgg agattaata 318

<210> 90  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

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

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

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 91  
cagagcatta gcagcttt

18

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

<220>

<223> tổng hợp

<400> 92

Gln Ser Ile Ser Ser Phe

1

5

<210> 93

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 93

gctgcatcc

9

<210> 94

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 94

Ala Ala Ser

1

<210> 95

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 95

caacagagtt acagttccat cacc

24

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 96

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ile Thr

1

5

<210> 97  
 <211> 375  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 97  
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatggca tccactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagt ggctggagtg ggtggcattt atatggtttg atggaagtaa taaatactat 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagacg attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagatgga 300  
 gagatttttg gagtgcttat ttcctctgat gcttttgata tctggggcca agggacaatg 360  
 gtcaccgtct cttca 375

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

<220>  
 <223> tổng hợp

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

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 99  
ggattcacct tcagtagtta tggc

24

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

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 100  
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly  
1 5

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

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 101  
atatggtttg atggaagtaa taaa

24

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

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 102  
Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Lys  
1 5

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

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 103  
gcgagagatg gagagatttt tggagtgcctt atttcctctg atgcttttga tatc

54

<210> 104  
<211> 18  
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 104

Ala Arg Asp Gly Glu Ile Phe Gly Val Leu Ile Ser Ser Asp Ala Phe  
 1 5 10 15  
 Asp Ile

<210> 105

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 105

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtcg gggcattaga aatgatttag gctggtttca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagcgcct gatctatggt gcatccaatt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccgatcac cttcggccaa 300  
 gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 106

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 106

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

<210> 107

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 107  
 cggggcatta gaaatgat

18

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 108  
 Arg Gly Ile Arg Asn Asp  
 1 5

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 109  
 gttgcatcc

9

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 110  
 Val Ala Ser  
 1

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 111  
ctacagcata atagttaccc gatcacc

27

<210> 112  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 112  
Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Ile Thr  
1 5

<210> 113  
<211> 354  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 113  
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt caccttcaga agctacgaca tgcactgggt cgcccaaggt 120  
tcaggaaaag gtctggagtg ggtctcagct attggtactg ctggtgacac atactattta 180  
ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaagaactc cttgtatctt 240  
caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag agcgtgggtc 300  
ggggacgtat tcctggacta ctgggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 114  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 114  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr  
20 25 30  
Asp Met His Trp Val Arg Gln Gly Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ser Ala Ile Gly Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Leu Gly Ser Val Lys  
50 55 60  
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu  
65 70 75 80  
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |  |
| Arg | Ala | Trp | Phe | Gly | Asp | Val | Phe | Leu | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr |  |  |
|     |     |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |  |
| Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|     |     |     |     | 115 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 115  
 ggattcacct tcagaagcta cgac

24

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 116  
 Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Asp  
 1 5

<210> 117  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 117  
 attggtactg ctggtgacac a

21

<210> 118  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 118  
 Ile Gly Thr Ala Gly Asp Thr  
 1 5



<210> 119  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 119  
 gcaagagcgt gggtcgggga cgtattcctg gactac

36

<210> 120  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 120  
 Ala Arg Ala Trp Phe Gly Asp Val Phe Leu Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 121  
 <211> 318  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 121  
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120  
 ggccaggctc ccaggctcct catatatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180  
 aggttcagtg gcagtggggc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240  
 gaagattttg caggctatta ctgtcagcag tataataaca ggctgacttt cggcggaggg 300  
 accaaggtgg agatcaaa 318

<210> 122  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 122  
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn  
 20 25 30

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

```
<210> 123
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>  
<223> tổng hợp

18

```
<210> 124
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 124  
Gln Ser Val Ser Ser Asn  
1 5

```
<210> 125
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>  
<223> tổng hợp

9

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

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 126  
Gly Ala Ser  
1

<210> 127  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 127  
cagcagtata ataacaggct gact

24

<210> 128  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 128  
Gln Gln Tyr Asn Asn Arg Leu Thr  
1 5

<210> 129  
<211> 381  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 129  
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtccagc ctggaggggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gaccactaca tgggtctgggt ccgccaggct 120  
ccagggaagg ggctggagtg gggtggccgt actagaaaca aagctaataag ttatagcaca 180  
gaatatgccg cgtctgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaagaagtca 240  
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgctaga 300  
gggggggaaa cactatgggt cggggagtc aactacggt tggacgtctg gggccaaggg 360  
accacggtca ccgtctcctc a 381

<210> 130  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

&lt;400&gt; 130

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

&lt;210&gt; 131

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 131

ggattcacct tcagtgacca ctac

24

&lt;210&gt; 132

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 132

Gly Phe Thr Phe Ser Asp His Tyr

1 5

&lt;210&gt; 133

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 133

actagaaaca aagctaataag ttatagcaca

30

<210> 134  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 134  
 Thr Arg Asn Lys Ala Asn Ser Tyr Ser Thr  
 1 5 10

<210> 135  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 135  
 gctagagggg gggaaacact atggttcggg gagtccaact acggtatgga cgtc 54

<210> 136  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 136  
 Ala Arg Gly Gly Glu Thr Leu Trp Phe Gly Glu Ser Asn Tyr Gly Met  
 1 5 10 15  
 Asp Val

<210> 137  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 137  
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccagacacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtca gactgttagc agcacctact tagcctggta ccagcagaaa 120  
 cctggccagg ctcccagtct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180  
 gacaggttca gtggcagcgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240  
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta ggtcacctct cacttttcggc 300

ggagggacca aggtggagat caaa

<210> 138

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 138

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

<210> 139

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 139

cagagtgtta gcagcaccta c

21

<210> 140

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 140

|     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ser | Val | Ser | Ser | Thr | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |

<210> 141

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 141

ggtgcatcc

9

<210> 142

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 142

Gly Ala Ser

1

<210> 143

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 143

cagcagtatg gtaggtcacc tctcact

27

<210> 144

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 144

Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Pro Leu Thr

1

5

<210> 145

<211> 348

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 145

```

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggctt caccttcaat aactatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcatgg ggctggagtg ggtggcagtt atatggcacg atggaagtga taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaaattgg 300
aacctctttg actactgggg ccaggaacc ctgggtcactg tctcctca 348

```

<210> 146

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 146

```

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

```

<210> 147

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 147

ggcttcacct tcaataacta tggc

24

<210> 148

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp



<400> 148

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Gly  
1 5

<210> 149

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 149

atatggcacg atggaagtga taaa

24

<210> 150

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 150

Ile Trp His Asp Gly Ser Asp Lys  
1 5

<210> 151

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 151

gcgagaaaatt ggaacctctt tgactac

27

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 152

Ala Arg Asn Trp Asn Leu Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 153

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 153

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagaatcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcatcagc acctatttac attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcagagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agtttcagta cccctccgat aaacttcggc 300
caagggacca agctggagat caaa                                     324

```

<210> 154

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 154

```

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

```

<210> 155

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 155

cagagcatca gcacctat

18

<210> 156

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 156

Gln Ser Ile Ser Thr Tyr  
1 5

<210> 157

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 157

gctgcatcc

9

<210> 158

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 158

Ala Ala Ser  
1

<210> 159

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 159

caacagagtt tcagtacccc tccgataaac

30

<210> 160

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 160

Gln Gln Ser Phe Ser Thr Pro Pro Ile Asn  
 1 5 10

<210> 161  
 <211> 384  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 161  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtccagc ctgggggggct cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctaaatt cacctttgac acctttgcca tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggttggaatg ggtctcattt attagtagtt ctgggtgggtcg cacagactat 180  
 gtagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa caccctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgcg agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagaacgg 300  
 acgatttttg gagtgcttat tctggggcccc gacaactacg gtatggacgt ctgggggcaa 360  
 gggaccacgg tcaccgtctc ctca 384

<210> 162  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 162  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Lys Phe Thr Phe Asp Thr Phe  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Phe Ile Ser Ser Ser Gly Gly Arg Thr Asp Tyr Val Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Glu Arg Thr Ile Phe Gly Val Leu Ile Leu Gly Pro Asp Asn  
 100 105 110  
 Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

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

<220>

<223> tổng hợp

<400> 163

aaattcacct ttgacacctt tgcc

24

<210> 164

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 164

Lys Phe Thr Phe Asp Thr Phe Ala

1

5

<210> 165

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 165

attagtagtt ctggtggtcg caca

24

<210> 166

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 166

Ile Ser Ser Ser Gly Gly Arg Thr

1

5

<210> 167

<211> 63

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 167

gcgaaagaac ggacgatttt tggagtgcct attctgggcc ccgacaacta cggtatggac 60  
gtc 63

<210> 168  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 168  
 Ala Lys Glu Arg Thr Ile Phe Gly Val Leu Ile Leu Gly Pro Asp Asn  
           1                          5                          10                          15  
 Tyr Gly Met Asp Val  
                           20

<210> 169  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 169  
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ttgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc acctatttaa attggtatca gcaaaaacca 120  
 gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcattccagtt tgcaaagtgg ggtctcatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagtg cccctccgat caccttcggc 300  
 caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 170  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 170  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Phe Val Gly  
           1                          5                          10                          15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr  
                           20                          25                          30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                           35                          40                          45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly  
           50                          55                          60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
           65                          70                          75                          80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Pro  
                           85                          90                          95  
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 171  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 171  
 cagagcatta gcacctat

18

<210> 172  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 172  
 Gln Ser Ile Ser Thr Tyr  
 1 5

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 173  
 gctgcatcc

9

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 174  
 Ala Ala Ser  
 1

<210> 175  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 175  
caacagagtt acagtgcccc tccgatcacc

30

<210> 176  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 176  
Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Pro Ile Thr  
1 5 10

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

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 177  
caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60  
acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacattc ctgcttgga ctggatcagg 120  
cagtcccctt cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggat 180  
aatgattatg cagtatctgt gaaaagtcga ataaccatca atccagacac atccaagaac 240  
cacttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300  
agaggaagg tctatgacag gtcttctagg tacttctacg ctatggacgt ctggggccaa 360  
gggaccacgg tcaccgtctc ctca 384

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

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 178  
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn  
20 25 30  
Ile Pro Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu  
35 40 45  
Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala



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

<210> 179  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 179  
 ggggacagtg tctctagcaa cattcctgct

30

<210> 180  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 180  
 Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ile Pro Ala  
 1 5 10

<210> 181  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 181  
 acatactaca ggtccaagtg gtataat

27

<210> 182  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

&lt;400&gt; 182

Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn

1

5

&lt;210&gt; 183

&lt;211&gt; 54

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 183

gcaagaggaa gggctctatga caggtcttct aggtacttct acgctatgga cgtc

54

&lt;210&gt; 184

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 184

Ala Arg Gly Arg Val Tyr Asp Arg Ser Ser Arg Tyr Phe Tyr Ala Met

1

5

10

15

Asp Val

&lt;210&gt; 185

&lt;211&gt; 324

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 185

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta attatccgat caccttcggc 300  
 caagggacac gactggagat taaa 324

&lt;210&gt; 186

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 186

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

&lt;210&gt; 187

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 187

cagagcatta gcagctat

18

&lt;210&gt; 188

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 188

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 1 5

&lt;210&gt; 189

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 189

gctgcatcc

9

&lt;210&gt; 190

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 190  
 Ala Ala Ser  
 1

<210> 191  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 191  
 caacagagtt acagtaatta tccgatcacc

30

<210> 192  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 192  
 Gln Gln Ser Tyr Ser Asn Tyr Pro Ile Thr  
 1 5 10

<210> 193  
 <211> 357  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 193  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggttcagc cggggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcaga acctacgaca tgcactgggt ccgccaagct 120  
 acaggaaaag gtctggagtg ggtctcagct attggtactg ctggtgacac atactatcca 180  
 ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaagaactc cttgtatctt 240  
 caaatgaaca gcctgagagc cgggtgacacg gctgtgtatt actgtgcacg aacgattttt 300  
 ggagtgggttc ttacctttga ctactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 194  
 <211> 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 194

```

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

```

&lt;210&gt; 195

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 195

ggattcacct tcagaaccta cgac

24

&lt;210&gt; 196

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 196

```

Gly Phe Thr Phe Arg Thr Tyr Asp
 1              5

```

&lt;210&gt; 197

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 197

attggtactg ctggtgacac a

21

&lt;210&gt; 198

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 198

Ile Gly Thr Ala Gly Asp Thr

1

5

&lt;210&gt; 199

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 199

gcacgaacga tttttggagt gggtccttacc tttgactac

39

&lt;210&gt; 200

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 200

Ala Arg Thr Ile Phe Gly Val Val Leu Thr Phe Asp Tyr

1

5

10

&lt;210&gt; 201

&lt;211&gt; 324

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 201

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctctttaa attggtatca gcagaaacca 120

```

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcacagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag acttacagta tccctccgac caccttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaa 324

```

<210> 202  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 202  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Ile Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 203  
 cagagcatta gcagctct

18

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

<220>  
 <223> tổng hợp

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

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 205  
 gctgcatcc

9

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 206  
 Ala Ala Ser  
 1

<210> 207  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 207  
 caacagactt acagtatccc tccgaccacc

30

<210> 208  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 208  
 Gln Gln Thr Tyr Ser Ile Pro Pro Thr Thr  
 1 5 10

<210> 209  
 <211> 384  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>



<223> tổng hợp

<400> 209

```
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc aactatgccca tgatctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta gtgggtggcag tatatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagaagga 300
attattagta tggttcgggg acttatcaac tactaccacg gtatggacgt ctggggccaa 360
gggaccacgg tcaccgtctc ctca 384
```

<210> 210

<211> 128

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 210

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

<210> 211

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 211

```
ggattcacct ttagcaacta tgcc
```

24

<210> 212

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 212  
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala  
1 5

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

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 213  
attagtggta gtggtggcag tata

24

<210> 214  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 214  
Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Ile  
1 5

<210> 215  
<211> 63  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 215  
gcgaaagaag gaattattag tatggttcgg ggacttatca actactacca cggtatggac 60  
gtc 63

<210> 216  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 216

Ala Lys Glu Gly Ile Ile Ser Met Val Arg Gly Leu Ile Asn Tyr Tyr  
 1 5 10 15  
 His Gly Met Asp Val  
 20

<210> 217  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 217  
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120  
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180  
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240  
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccttg gacgttcggc 300  
 caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 218  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

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

<210> 219  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 219  
cagagtgtta gcagcagcta c

21

<210> 220  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 220  
Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr  
1 5

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

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 221  
ggtgcatcc

9

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

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 222  
Gly Ala Ser  
1

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

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 223  
cagcagtatg gtagctcacc ttggacg

27

<210> 224  
<211> 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 224

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1

5

&lt;210&gt; 225

&lt;211&gt; 360

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 225

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60  
 tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagtg gttgggaata atcaacccta gtggtggtag cacaagctac 180  
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240  
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagagaca 300  
 ggagaagctg gtgaggtttt taactactgg ggccagggaa cccaggtcac cgtctcctca 360

&lt;210&gt; 226

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 226

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

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 227  
 ggatacacct tcaccagcta ctat

24

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

<220>  
 <223> tổng hợp

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

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 229  
 atcaacccta gtggtggttag caca

24

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

<220>  
 <223> tổng hợp

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

<210> 231  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 231

gcgagagaga caggagaagc tggtagggtt tttaactac

39

<210> 232

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 232

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Arg | Glu | Thr | Gly | Glu | Ala | Gly | Glu | Val | Phe | Asn | Tyr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |

<210> 233

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 233

|            |            |            |            |            |             |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-----|
| gacatccaga | tgacccagtc | tccatcctcc | ctgtctgcat | ctgtaggaga | cagagtcacc  | 60  |
| atcacttgcc | gggcaagtca | gatcattagc | aggtatttaa | attggtatca | gcataaacca  | 120 |
| gggaaagccc | ctaaggtcct | gatctatgct | gcctccactt | tgcaaagtgg | gggtcccatca | 180 |
| aggttcagtg | gcagtggatc | tgggacagat | ttcactctca | ccatcagcag | tctgcaacct  | 240 |
| gaagattttg | caacttacta | ctgtcaacag | agttacagta | cccctccgat | caccttcggc  | 300 |
| caagggacac | gactggagat | taaa       |            |            |             | 324 |

<210> 234

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 234

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro  
85 90 95  
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

```
<210> 235
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>  
<223> tổng hợp

18

```
<210> 236
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 236  
Gln Ile Ile Ser Arg Tyr  
1 5

```
<210> 237
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220> .  
<223> tổng hợp

9

```
<210> 238
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 238  
Ala Ala Ser  
1

<210> 239



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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 239  
 caacagagtt acagtacccc tccgatcacc

30

<210> 240  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 240  
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr  
 1 5 10

<210> 241  
 <211> 381  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 241  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggaggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatgaaa tgaactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcatac attggtagta gtggtcgtgc cacatactac 180  
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaaaaa ctcaactgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagaccttcg 300  
 agcatagcag ctctgttacg gaaccagtac cacttcggta tggacgtctg gggccaaggg 360  
 accacggtca ccgtctcctc a 381

<210> 242  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 242  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 243  
 ggattcacct tcagtagtta tgaa

24

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 244  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Glu  
 1                  5

<210> 245  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 245  
 attgtagta gtggcgtgc caca

24

<210> 246  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 246  
Ile Gly Ser Ser Gly Arg Ala Thr  
1 5

<210> 247  
<211> 60  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 247  
gcgagacctt cgagcatagc agctctgtta cggaaccagt accacttcgg tatggacgtc 60

<210> 248  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 248  
Ala Arg Pro Ser Ser Ile Ala Ala Leu Leu Arg Asn Gln Tyr His Phe  
1 5 10 15  
Gly Met Asp Val  
20

<210> 249  
<211> 324  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 249  
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gagcattacc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaagggtg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300  
caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 250  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 250

```

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

```

&lt;210&gt; 251

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 251

cagagcatta ccagctat

18

&lt;210&gt; 252

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 252

```

Gln Ser Ile Thr Ser Tyr
 1           5

```

&lt;210&gt; 253

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 253

gctgcatcc

<210> 254

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 254

Ala Ala Ser

1

<210> 255

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 255

caacagagtt acagtacccc tccgatcacc

30

<210> 256

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 256

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr

1

5

10

<210> 257

<211> 360

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 257

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggtt 60  
tcttgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120  
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaata atcaacccta gtggtggtag cacaagctac 180  
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240  
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagagata 300  
ggagaagctg gtgaagtttt taactactgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 258  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 258  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Ile Gly Glu Ala Gly Glu Val Phe Asn Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 259  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 259  
 ggatacacct tcaccagcta ctat

24

<210> 260  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 260  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr  
 1 5

<210> 261  
 <211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 261

atcaacccta gtggtggttag caca

24

<210> 262

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 262

Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr

1

5

<210> 263

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 263

gcgagagaga taggagaagc tgggtgaagtt tttaactac

39

<210> 264

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 264

Ala Arg Glu Ile Gly Glu Ala Gly Glu Val Phe Asn Tyr

1

5

10

<210> 265

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 265  
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc aggtatttaa attggtatca gcataaacca 120  
gggaaagccc ctaagggtcct gatctatgct gcatccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300  
caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 266  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 266  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr  
20 25 30  
Leu Asn Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Ala Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro  
85 90 95  
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 267  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 267 18  
cagagcatta gcaggtat

<210> 268  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 268



Gln Ser Ile Ser Arg Tyr  
1 5

<210> 269  
<211> 9  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 269  
gctgcatcc

9

<210> 270  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 270  
Ala Ala Ser  
1

<210> 271  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 271  
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc

30

<210> 272  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 272  
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr  
1 5 10

<210> 273  
<211> 381  
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 273

```
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acttatgaaa tgaactgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatat agtagtagta gtggtagaac catatactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtt 240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagaccttcg 300
agtatagaga ctctgttacg gaatcagtac cactacgggtg tggacgtctg gggccaaggg 360
accacggtca ccgtctcctc a 381
```

<210> 274

<211> 127

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 274

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

<210> 275

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 275

ggattcacct tcagtactta tgaa

<210> 276

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

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 276  
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Glu  
 1 5

<210> 277  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 277  
 agtagtagta gtggtagaac cata

24

<210> 278  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 278  
 Ser Ser Ser Ser Gly Arg Thr Ile  
 1 5

<210> 279  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 279  
 gcgagacctt cgagtataga gactctgtta cggaatcagt accactacgg tgtggacgtc 60

<210> 280  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

&lt;400&gt; 280

Ala Arg Pro Ser Ser Ile Glu Thr Leu Leu Arg Asn Gln Tyr His Tyr  
 1 5 10 15  
 Gly Val Asp Val  
 20

&lt;210&gt; 281

&lt;211&gt; 324

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 281

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300  
 caagggacac gactggagat taaa 324

&lt;210&gt; 282

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 282

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

&lt;210&gt; 283

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 283  
cagagcatta gcagctat

18

<210> 284  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 284  
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
1 5

<210> 285  
<211> 9  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 285  
gctgcatcc

9

<210> 286  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 286  
Ala Ala Ser  
1

<210> 287  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 287  
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc

30

<210> 288  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 288  
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr  
 1 5 10

<210> 289  
 <211> 384  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 289  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggcacagc ctggaggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agtcatgaaa tgaactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtcgta gtggtagaat cataaactac 180  
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagagaga 300  
 ggctcgtatt acgatatttt gactggttcc caggactacg gtatggacgt ctggggccaa 360  
 gggaccacgg tcaccgtctc ctca 384

<210> 290  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 290  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His  
 20 25 30  
 Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Tyr Ile Ser Arg Ser Gly Arg Ile Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Glu Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Ser Gln Asp  
 100 105 110

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

<210> 291  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 291  
 ggattcacct tcagtagtca tgaa

24

<210> 292  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 292  
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser His Glu  
 1 5

<210> 293  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 293  
 attagtcgta gtggtagaat cata

24

<210> 294  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 294  
 Ile Ser Arg Ser Gly Arg Ile Ile  
 1 5

<210> 295  
 <211> 63  
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 295

gcgagagaga gaggctcgta ttacgatatt ttgactgggtt cccaggacta cggtatggac 60  
gtc 63

<210> 296

<211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 296

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Arg | Glu | Arg | Gly | Ser | Tyr | Tyr | Asp | Ile | Leu | Thr | Gly | Ser | Gln | Asp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| Tyr | Gly | Met | Asp | Val |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 297

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 297

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
atcacttgcc gggcaagtca gaccattagc acctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180  
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300  
caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 298

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

<400> 298

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Gln | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | Thr | Ile | Ser | Thr | Tyr |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |



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

<210> 299  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 299  
 cagaccatta gcacctat

18

<210> 300  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 300  
 Gln Thr Ile Ser Thr Tyr  
   1                  5

<210> 301  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 301  
 gctgcatcc

9

<210> 302  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 302  
Ala Ala Ser  
1

<210> 303  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 303  
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc

30

<210> 304  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 304  
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr  
1 5 10

<210> 305  
<211> 381  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

<400> 305  
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggaggggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatgaaa tgaactgggt ccgccagggt 120  
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtggtagtagt caaatactac 180  
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240  
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgttt attactgtgc gagaccttcg 300  
agtataccag ctctgttacg gaaccagtag cactacggta tggacgtctg gggccaaggg 360  
accacggtca ccgtctctc a 381

<210> 306  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> tổng hợp

&lt;400&gt; 306

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

&lt;210&gt; 307

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 307

ggattcacct tcagtagtta tgaa

24

&lt;210&gt; 308

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 308

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Glu  
 1 5

&lt;210&gt; 309

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; tổng hợp

&lt;400&gt; 309

attagtagta gtggtagtac caaa

24

<210> 310  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 310  
 Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Lys  
 1 5

<210> 311  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 311  
 gcgagacctt cgagtatacc agctctgtta cggaaccagt accactacgg tatggacgtc 60

<210> 312  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> tổng hợp

<400> 312  
 Ala Arg Pro Ser Ser Ile Pro Ala Leu Leu Arg Asn Gln Tyr His Tyr  
 1 5 10 15  
 Gly Met Asp Val  
 20

<210> 313  
 <211> 2051  
 <212> ADN  
 <213> Virut Ebola

<400> 313  
 gaattcgcca ccatgggCGT gaccggcatc ctgcagctgc cccgggacag attcaagcgg 60  
 accagcttct tcctgtgggt catcatcctg ttccagcggg ccttcagcat cccctggggc 120  
 gtgatccaca acagcaccct gcaggtgtcc gacgtggaca agctcgtgtg ccgggacaag 180  
 ctgagcagca ccaaccagct gagaagcgtg ggcctgaacc tggaaggcaa tggcgtggcc 240  
 accgatgtgc ctagcgccac caagagatgg ggcttcagat ccggcgtgcc cccaagggtc 300  
 gtgaattatg aggcggcgga gtgggcccag aactgctaca acctggaaat caagaagccc 360  
 gacggcagcg agtgccctgcc tgctgcccct gatggcatca gaggttccc ccggtgcaga 420  
 tacgtgcaca aggtgtccgg cacaggcccc tgcgctggcg atttcgcctt tcacaaagag 480

```

ggcgcctttt tcctgtacga ccggtctggcc tccaccgtga tctacagagg caccaccttt 540
gccgagggcg tgggtggcctt tctgatcctg cctcaggcca agaaggactt cttcagcagc 600
caccctctgc gcgagcctgt gaatgccaca gaggatccca gcagcggcta ctacagcacc 660
accatcagat accaggccac cggcttcggc accaacgaga cagagtacct gttcagagtg 720
gacaacctga cctacgtgca gctggaaagc cggttcaccc cccagtttct gctgcagctg 780
aacgagacaa tctacgccag cggcaagcgg agcaacacca cgggcaagct gatctggaaa 840
gtgaaccccg agatcgatac cacaatcgga gagtgggcct tctgggagac aaagaagaac 900
ctgaccggga agatcagaag cgaggaactg agcttcaccg ccgtgtccaa cggccccaag 960
aacatcagcg gacagagccc cgccagaacc agcagcgacc ccgagacaaa caccaccaat 1020
gaggaccaca agatcatggc cagcgagaac agcagcgcca tgggtgcaggt gcacagccag 1080
ggaagaaagg ccgctgtgtc ccacctgacc accctggcca caatctccac cagccctcag 1140
agcctgacca caaagcctgg ccccgacaac tccaccacaca acacccccgt gtacaagctg 1200
gacatcagcg aggccacaca agtggggccag caccacagaa gggccgacaa cgatagcacc 1260
gccagcgata cccctccagc cacaactgct gccggacctc tgaaggccga gaataccaac 1320
accagcaaga gcgccgacag cctggatctg gccaccacca caagcccca gaactactct 1380
gagacagccg gcaacaacaa caccaccac caggataccg gcgaggaaag cgccagctct 1440
ggcaagctgg gactgatcac caacacaatc gccggcgtgg ccggcctgat taccgggggg 1500
agaagaacca gacgggaagt gatcgtgaac gccagccca agtgcaacct caacctgcac 1560
tactggacca cccaggatga gggcgctgct atcggactgg cctggatccc ttactttggc 1620
cctgccgccg agggcatcta caccgagggg ctgatgcaca accaggacgg cctgatctgc 1680
ggactgaggc agctggccaa cgaaaccaca caggctctgc agctgttctt gagagccacc 1740
accgagctga ggaccttctc catcctgaac agaaaggcta tcgacttctt gctgcagcgc 1800
tggggcggca cctgtcacat tctgggccct gactgctgca tcgagcccca cgactggacc 1860
aagaatatca ccgacaagat cgaccagatc atccacgact ttgtggacaa gaccctgccc 1920
gaccagggcg acaatgacaa ctggtggaca ggctggcggc agtggattcc tgccggcatt 1980
ggagtgaccg gcgtgatcat tgccgtgatc gccctgttct gcatctgcaa gttcgtgttc 2040
tgagcggccg c

```

<210> 314

<211> 676

<212> PRT

<213> Virut Ebola

<400> 314

```

Met Gly Val Thr Gly Ile Leu Gln Leu Pro Arg Asp Arg Phe Lys Arg
1          5          10          15
Thr Ser Phe Phe Leu Trp Val Ile Ile Leu Phe Gln Arg Thr Phe Ser
20          25          30
Ile Pro Leu Gly Val Ile His Asn Ser Thr Leu Gln Val Ser Asp Val
35          40          45
Asp Lys Leu Val Cys Arg Asp Lys Leu Ser Ser Thr Asn Gln Leu Arg
50          55          60
Ser Val Gly Leu Asn Leu Glu Gly Asn Gly Val Ala Thr Asp Val Pro
65          70          75          80
Ser Ala Thr Lys Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly Val Pro Pro Lys Val
85          90          95
Val Asn Tyr Glu Ala Gly Glu Trp Ala Glu Asn Cys Tyr Asn Leu Glu
100         105         110
Ile Lys Lys Pro Asp Gly Ser Glu Cys Leu Pro Ala Ala Pro Asp Gly
115         120         125
Ile Arg Gly Phe Pro Arg Cys Arg Tyr Val His Lys Val Ser Gly Thr
130         135         140

```

Gly Pro Cys Ala Gly Asp Phe Ala Phe His Lys Glu Gly Ala Phe Phe  
 145 150 155 160  
 Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Val Ile Tyr Arg Gly Thr Thr Phe  
 165 170 175  
 Ala Glu Gly Val Val Ala Phe Leu Ile Leu Pro Gln Ala Lys Lys Asp  
 180 185 190  
 Phe Phe Ser Ser His Pro Leu Arg Glu Pro Val Asn Ala Thr Glu Asp  
 195 200 205  
 Pro Ser Ser Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr Ile Arg Tyr Gln Ala Thr Gly  
 210 215 220  
 Phe Gly Thr Asn Glu Thr Glu Tyr Leu Phe Glu Val Asp Asn Leu Thr  
 225 230 235 240  
 Tyr Val Gln Leu Glu Ser Arg Phe Thr Pro Gln Phe Leu Leu Gln Leu  
 245 250 255  
 Asn Glu Thr Ile Tyr Ala Ser Gly Lys Arg Ser Asn Thr Thr Gly Lys  
 260 265 270  
 Leu Ile Trp Lys Val Asn Pro Glu Ile Asp Thr Thr Ile Gly Glu Trp  
 275 280 285  
 Ala Phe Trp Glu Thr Lys Lys Asn Leu Thr Arg Lys Ile Arg Ser Glu  
 290 295 300  
 Glu Leu Ser Phe Thr Ala Val Ser Asn Gly Pro Lys Asn Ile Ser Gly  
 305 310 315 320  
 Gln Ser Pro Ala Arg Thr Ser Ser Asp Pro Glu Thr Asn Thr Thr Asn  
 325 330 335  
 Glu Asp His Lys Ile Met Ala Ser Glu Asn Ser Ser Ala Met Val Gln  
 340 345 350  
 Val His Ser Gln Gly Arg Lys Ala Ala Val Ser His Leu Thr Thr Leu  
 355 360 365  
 Ala Thr Ile Ser Thr Ser Pro Gln Pro Pro Thr Thr Lys Thr Gly Pro  
 370 375 380  
 Asp Asn Ser Thr His Asn Thr Pro Val Tyr Lys Leu Asp Ile Ser Glu  
 385 390 395 400  
 Ala Thr Gln Val Gly Gln His His Arg Arg Ala Asp Asn Asp Ser Thr  
 405 410 415  
 Ala Ser Asp Thr Pro Pro Ala Thr Thr Ala Ala Gly Pro Leu Lys Ala  
 420 425 430  
 Glu Asn Thr Asn Thr Ser Lys Ser Ala Asp Ser Leu Asp Leu Ala Thr  
 435 440 445  
 Thr Thr Ser Pro Gln Asn Tyr Ser Glu Thr Ala Gly Asn Asn Asn Thr  
 450 455 460  
 His His Gln Asp Thr Gly Glu Glu Ser Ala Ser Ser Gly Lys Leu Gly  
 465 470 475 480  
 Leu Ile Thr Asn Thr Ile Ala Gly Val Ala Gly Leu Ile Thr Gly Gly  
 485 490 495  
 Arg Arg Thr Arg Arg Glu Val Ile Val Asn Ala Gln Pro Lys Cys Asn  
 500 505 510  
 Pro Asn Leu His Tyr Trp Thr Thr Gln Asp Glu Gly Ala Ala Ile Gly  
 515 520 525  
 Leu Ala Trp Ile Pro Tyr Phe Gly Pro Ala Ala Glu Gly Ile Tyr Thr  
 530 535 540  
 Glu Gly Leu Met His Asn Gln Asp Gly Leu Ile Cys Gly Leu Arg Gln  
 545 550 555 560

Leu Ala Asn Glu Thr Thr Gln Ala Leu Gln Leu Phe Leu Arg Ala Thr  
 565 570 575  
 Thr Glu Leu Arg Thr Phe Ser Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp Phe  
 580 585 590  
 Leu Leu Gln Arg Trp Gly Gly Thr Cys His Ile Leu Gly Pro Asp Cys  
 595 600 605  
 Cys Ile Glu Pro His Asp Trp Thr Lys Asn Ile Thr Asp Lys Ile Asp  
 610 615 620  
 Gln Ile Ile His Asp Phe Val Asp Lys Thr Leu Pro Asp Gln Gly Asp  
 625 630 635 640  
 Asn Asp Asn Trp Trp Thr Gly Trp Arg Gln Trp Ile Pro Ala Gly Ile  
 645 650 655  
 Gly Val Thr Gly Val Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu Phe Cys Ile Cys  
 660 665 670  
 Lys Phe Val Phe  
 675

<210> 315

<211> 676

<212> PRT

<213> Virut Ebola

<400> 315

Met Gly Val Thr Gly Ile Leu Gln Leu Pro Arg Asp Arg Phe Lys Arg  
 1 5 10 15  
 Thr Ser Phe Phe Leu Trp Val Ile Ile Leu Phe Gln Arg Thr Phe Ser  
 20 25 30  
 Ile Pro Leu Gly Val Ile His Asn Ser Thr Leu Gln Val Ser Asp Val  
 35 40 45  
 Asp Lys Leu Val Cys Arg Asp Lys Leu Ser Ser Thr Asn Gln Leu Arg  
 50 55 60  
 Ser Val Gly Leu Asn Leu Glu Gly Asn Gly Val Ala Thr Asp Val Pro  
 65 70 75 80  
 Ser Ala Thr Lys Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly Val Pro Pro Lys Val  
 85 90 95  
 Val Asn Tyr Glu Ala Gly Glu Trp Ala Glu Asn Cys Tyr Asn Leu Glu  
 100 105 110  
 Ile Lys Lys Pro Asp Gly Ser Glu Cys Leu Pro Ala Ala Pro Asp Gly  
 115 120 125  
 Ile Arg Gly Phe Pro Arg Cys Arg Tyr Val His Lys Val Ser Gly Thr  
 130 135 140  
 Gly Pro Cys Ala Gly Asp Phe Ala Phe His Lys Glu Gly Ala Phe Phe  
 145 150 155 160  
 Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Val Ile Tyr Arg Gly Thr Thr Phe  
 165 170 175  
 Ala Glu Gly Val Val Ala Phe Leu Ile Leu Pro Gln Ala Lys Lys Asp  
 180 185 190  
 Phe Phe Ser Ser His Pro Leu Arg Glu Pro Val Asn Ala Thr Glu Asp  
 195 200 205  
 Pro Ser Ser Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr Ile Arg Tyr Gln Ala Thr Gly  
 210 215 220  
 Phe Gly Thr Asn Glu Thr Glu Tyr Leu Phe Glu Val Asp Asn Leu Thr

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| 225 | 230 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |  |  |
| Tyr | Val | Gln | Leu | Glu | Ser | Arg | Phe | Thr | Pro | Gln | Phe | Leu | Leu | Gln | Leu |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |  |  |  |  |
| Asn | Glu | Thr | Ile | Tyr | Ala | Ser | Gly | Lys | Arg | Ser | Asn | Thr | Thr | Gly | Lys |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |  |  |
| Leu | Ile | Trp | Lys | Val | Asn | Pro | Glu | Ile | Asp | Thr | Thr | Ile | Gly | Glu | Trp |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |  |  |  |  |
| Ala | Phe | Trp | Glu | Thr | Lys | Lys | Asn | Leu | Thr | Arg | Lys | Ile | Arg | Ser | Glu |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |  |  |  |  |
| Glu | Leu | Ser | Phe | Thr | Ala | Val | Ser | Asn | Gly | Pro | Lys | Asn | Ile | Ser | Gly |     |  |  |  |  |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |     |     |  |  |  |  |
| Gln | Ser | Pro | Ala | Arg | Thr | Ser | Ser | Asp | Pro | Glu | Thr | Asn | Thr | Thr | Asn |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |     |  |  |  |  |
| Glu | Asp | His | Lys | Ile | Met | Ala | Ser | Glu | Asn | Ser | Ser | Ala | Met | Val | Gln |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |  |  |  |
| Val | His | Ser | Gln | Gly | Arg | Lys | Ala | Ala | Val | Ser | His | Leu | Thr | Thr | Leu |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |  |  |  |  |
| Ala | Thr | Ile | Ser | Thr | Ser | Pro | Gln | Pro | Pro | Thr | Thr | Lys | Thr | Gly | Pro |     |  |  |  |  |
| 370 |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Asp | Asn | Ser | Thr | His | Asn | Thr | Pro | Val | Tyr | Lys | Leu | Asp | Ile | Ser | Glu |     |  |  |  |  |
| 385 |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |     |     |  |  |  |  |
| Ala | Thr | Gln | Val | Gly | Gln | His | His | Arg | Arg | Ala | Asp | Asn | Asp | Ser | Thr |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |     |  |  |  |  |
| Ala | Ser | Asp | Thr | Pro | Pro | Ala | Thr | Thr | Ala | Ala | Gly | Pro | Leu | Lys | Ala |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |  |  |  |  |
| Glu | Asn | Thr | Asn | Thr | Ser | Lys | Ser | Ala | Asp | Ser | Leu | Asp | Leu | Ala | Thr |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |  |  |  |  |
| Thr | Thr | Ser | Pro | Gln | Asn | Tyr | Ser | Glu | Thr | Ala | Gly | Asn | Asn | Asn | Thr |     |  |  |  |  |
| 450 |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| His | His | Gln | Asp | Thr | Gly | Glu | Glu | Ser | Ala | Ser | Ser | Gly | Lys | Leu | Gly |     |  |  |  |  |
| 465 |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |     |     |  |  |  |  |
| Leu | Ile | Thr | Asn | Thr | Ile | Ala | Gly | Val | Ala | Gly | Leu | Ile | Thr | Gly | Gly |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |     |  |  |  |  |
| Arg | Arg | Thr | Arg | Arg | Glu | Val | Ile | Val | Asn | Ala | Gln | Pro | Lys | Cys | Asn |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |  |  |  |  |
| Pro | Asn | Leu | His | Tyr | Trp | Thr | Thr | Gln | Asp | Glu | Gly | Ala | Ala | Ile | Gly |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |  |  |  |  |
| Leu | Ala | Trp | Ile | Pro | Tyr | Phe | Gly | Pro | Ala | Ala | Glu | Gly | Ile | Tyr | Thr |     |  |  |  |  |
| 530 |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Glu | Gly | Leu | Met | His | Asn | Gln | Asp | Gly | Leu | Ile | Cys | Gly | Leu | Arg | Gln |     |  |  |  |  |
| 545 |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |     |     |  |  |  |  |
| Leu | Ala | Asn | Glu | Thr | Gln | Ala | Leu | Gln | Leu | Phe | Leu | Arg | Ala | Thr |     |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |     |  |  |  |  |
| Thr | Glu | Leu | Arg | Thr | Phe | Ser | Ile | Leu | Asn | Arg | Lys | Ala | Ile | Asp | Phe |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |  |  |  |  |
| Leu | Leu | Gln | Arg | Trp | Gly | Gly | Thr | Cys | His | Ile | Leu | Gly | Pro | Asp | Cys |     |  |  |  |  |
|     |     |     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |  |  |  |  |
| Cys | Ile | Glu | Pro | His | Asp | Trp | Thr | Lys | Asn | Ile | Thr | Asp | Lys | Ile | Asp |     |  |  |  |  |
| 610 |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Gln | Ile | Ile | His | Asp | Phe | Val | Asp | Lys | Thr | Leu | Pro | Asp | Gln | Gly | Asp |     |  |  |  |  |
| 625 |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |     |     |  |  |  |  |
| Asn | Asp | Asn | Trp | Trp | Thr | Gly | Trp | Arg | Gln | Trp | Ile | Pro | Ala | Gly | Ile |     |  |  |  |  |



Gly Val Thr Gly Val Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu Phe Cys Ile Cys  
 645 650 655  
 Lys Phe Val Phe  
 660 665 670  
 675

```
<210> 316
<211> 364
<212> PRT
<213> Virut Ebola
```

|           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <400> 316 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Met       | Gly | Val | Thr | Gly | Ile | Leu | Gln | Leu | Pro | Arg | Asp | Arg | Phe | Lys | Arg |
| 1         |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Thr       | Ser | Phe | Phe | Leu | Trp | Val | Ile | Ile | Leu | Phe | Gln | Arg | Thr | Phe | Ser |
|           |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ile       | Pro | Leu | Gly | Val | Ile | His | Asn | Ser | Thr | Leu | Gln | Val | Ser | Asp | Val |
|           |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Asp       | Lys | Leu | Val | Cys | Arg | Asp | Lys | Leu | Ser | Ser | Thr | Asn | Gln | Leu | Arg |
|           | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Ser       | Val | Gly | Leu | Asn | Leu | Glu | Gly | Asn | Gly | Val | Ala | Thr | Asp | Val | Pro |
| 65        |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ser       | Ala | Thr | Lys | Arg | Trp | Gly | Phe | Arg | Ser | Gly | Val | Pro | Pro | Lys | Val |
|           |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Val       | Asn | Tyr | Glu | Ala | Gly | Glu | Trp | Ala | Glu | Asn | Cys | Tyr | Asn | Leu | Glu |
|           |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Ile       | Lys | Lys | Pro | Asp | Gly | Ser | Glu | Cys | Leu | Pro | Ala | Ala | Pro | Asp | Gly |
|           |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Ile       | Arg | Gly | Phe | Pro | Arg | Cys | Arg | Tyr | Val | His | Lys | Val | Ser | Gly | Thr |
|           | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Gly       | Pro | Cys | Ala | Gly | Asp | Phe | Ala | Phe | His | Lys | Glu | Gly | Ala | Phe | Phe |
| 145       |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Leu       | Tyr | Asp | Arg | Leu | Ala | Ser | Thr | Val | Ile | Tyr | Arg | Gly | Thr | Thr | Phe |
|           |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Ala       | Glu | Gly | Val | Val | Ala | Phe | Leu | Ile | Leu | Pro | Gln | Ala | Lys | Lys | Asp |
|           |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Phe       | Phe | Ser | Ser | His | Pro | Leu | Arg | Glu | Pro | Val | Asn | Ala | Thr | Glu | Asp |
|           |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Pro       | Ser | Ser | Gly | Tyr | Tyr | Ser | Thr | Thr | Ile | Arg | Tyr | Gln | Ala | Thr | Gly |
|           | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Phe       | Gly | Thr | Asn | Glu | Thr | Glu | Tyr | Leu | Phe | Glu | Val | Asp | Asn | Leu | Thr |
| 225       |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Tyr       | Val | Gln | Leu | Glu | Ser | Arg | Phe | Thr | Pro | Gln | Phe | Leu | Leu | Gln | Leu |
|           |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Asn       | Glu | Thr | Ile | Tyr | Ala | Ser | Gly | Lys | Arg | Ser | Asn | Thr | Thr | Gly | Lys |
|           |     | 260 |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Leu       | Ile | Trp | Lys | Val | Asn | Pro | Glu | Ile | Asp | Thr | Thr | Ile | Gly | Glu | Trp |
|           | 275 |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Ala       | Phe | Trp | Glu | Thr | Lys | Lys | Thr | Ser | Leu | Glu | Lys | Phe | Ala | Val | Lys |
|           | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Ser       | Cys | Leu | Ser | Gln | Leu | Tyr | Gln | Thr | Asp | Pro | Lys | Thr | Ser | Val | Val |
| 305       |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |

Arg Val Arg Arg Glu Leu Leu Pro Thr Gln Arg Pro Thr Gln Gln Met  
                                   325                                  330                                  335  
 Lys Thr Thr Lys Ser Trp Leu Gln Lys Ile Pro Leu Gln Trp Phe Lys  
                                   340                                  345                                  350  
 Cys Thr Val Lys Glu Gly Lys Leu Gln Cys Arg Ile  
                                   355                                  360

<210> 317

<211> 360

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> aa 1-332: Zaire\_Ebola\_GP aa 33 đến 364 trong AHX24650

aa 333-360: đuôi myc-myc-hexahistidin

<400> 317

Ile Pro Leu Gly Val Ile His Asn Ser Thr Leu Gln Val Ser Asp Val  
   1                                  5                                  10                                  15  
 Asp Lys Leu Val Cys Arg Asp Lys Leu Ser Ser Thr Asn Gln Leu Arg  
                                   20                                  25                                  30  
 Ser Val Gly Leu Asn Leu Glu Gly Asn Gly Val Ala Thr Asp Val Pro  
                                   35                                  40                                  45  
 Ser Ala Thr Lys Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly Val Pro Pro Lys Val  
                                   50                                  55                                  60  
 Val Asn Tyr Glu Ala Gly Glu Trp Ala Glu Asn Cys Tyr Asn Leu Glu  
   65                                  70                                  75                                  80  
 Ile Lys Lys Pro Asp Gly Ser Glu Cys Leu Pro Ala Ala Pro Asp Gly  
                                   85                                  90                                  95  
 Ile Arg Gly Phe Pro Arg Cys Arg Tyr Val His Lys Val Ser Gly Thr  
                                   100                                  105                                  110  
 Gly Pro Cys Ala Gly Asp Phe Ala Phe His Lys Glu Gly Ala Phe Phe  
                                   115                                  120                                  125  
 Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Val Ile Tyr Arg Gly Thr Thr Phe  
                                   130                                  135                                  140  
 Ala Glu Gly Val Val Ala Phe Leu Ile Leu Pro Gln Ala Lys Lys Asp  
   145                                  150                                  155                                  160  
 Phe Phe Ser Ser His Pro Leu Arg Glu Pro Val Asn Ala Thr Glu Asp  
                                   165                                  170                                  175  
 Pro Ser Ser Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr Ile Arg Tyr Gln Ala Thr Gly  
                                   180                                  185                                  190  
 Phe Gly Thr Asn Glu Thr Glu Tyr Leu Phe Glu Val Asp Asn Leu Thr  
                                   195                                  200                                  205  
 Tyr Val Gln Leu Glu Ser Arg Phe Thr Pro Gln Phe Leu Leu Gln Leu  
                                   210                                  215                                  220  
 Asn Glu Thr Ile Tyr Ala Ser Gly Lys Arg Ser Asn Thr Thr Gly Lys  
   225                                  230                                  235                                  240  
 Leu Ile Trp Lys Val Asn Pro Glu Ile Asp Thr Thr Ile Gly Glu Trp  
                                   245                                  250                                  255  
 Ala Phe Trp Glu Thr Lys Lys Thr Ser Leu Glu Lys Phe Ala Val Lys  
                                   260                                  265                                  270  
 Ser Cys Leu Ser Gln Leu Tyr Gln Thr Asp Pro Lys Thr Ser Val Val

```

      275              280              285
Arg Val Arg Arg Glu Leu Leu Pro Thr Gln Arg Pro Thr Gln Gln Met
      290              295              300
Lys Thr Thr Lys Ser Trp Leu Gln Lys Ile Pro Leu Gln Trp Phe Lys
305              310              315              320
Cys Thr Val Lys Glu Gly Lys Leu Gln Cys Arg Ile Glu Gln Lys Leu
      325              330              335
Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
      340              345              350
Asp Leu His His His His His His
      355              360

```

<210> 318

<211> 628

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> aa 1-618: Zaire ebolavirut (chủng H.sapiens-  
wt/GIN/2014/Kissidougou-C15) GP (aa 33 đến 650  
(AHX24649.1))

aa 619-628: đuôi decahistidin

<400> 318

```

Ile Pro Leu Gly Val Ile His Asn Ser Thr Leu Gln Val Ser Asp Val
 1              5              10              15
Asp Lys Leu Val Cys Arg Asp Lys Leu Ser Ser Thr Asn Gln Leu Arg
      20              25              30
Ser Val Gly Leu Asn Leu Glu Gly Asn Gly Val Ala Thr Asp Val Pro
      35              40              45
Ser Ala Thr Lys Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly Val Pro Pro Lys Val
      50              55              60
Val Asn Tyr Glu Ala Gly Glu Trp Ala Glu Asn Cys Tyr Asn Leu Glu
65              70              75              80
Ile Lys Lys Pro Asp Gly Ser Glu Cys Leu Pro Ala Ala Pro Asp Gly
      85              90              95
Ile Arg Gly Phe Pro Arg Cys Arg Tyr Val His Lys Val Ser Gly Thr
      100              105              110
Gly Pro Cys Ala Gly Asp Phe Ala Phe His Lys Glu Gly Ala Phe Phe
      115              120              125
Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Val Ile Tyr Arg Gly Thr Thr Phe
      130              135              140
Ala Glu Gly Val Val Ala Phe Leu Ile Leu Pro Gln Ala Lys Lys Asp
145              150              155              160
Phe Phe Ser Ser His Pro Leu Arg Glu Pro Val Asn Ala Thr Glu Asp
      165              170              175
Pro Ser Ser Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr Ile Arg Tyr Gln Ala Thr Gly
      180              185              190
Phe Gly Thr Asn Glu Thr Glu Tyr Leu Phe Glu Val Asp Asn Leu Thr
      195              200              205
Tyr Val Gln Leu Glu Ser Arg Phe Thr Pro Gln Phe Leu Leu Gln Leu
      210              215              220

```

Asn Glu Thr Ile Tyr Thr Ser Gly Lys Arg Ser Asn Thr Thr Gly Lys  
 225 230 235 240  
 Leu Ile Trp Lys Val Asn Pro Glu Ile Asp Thr Thr Ile Gly Glu Trp  
 245 250 255  
 Ala Phe Trp Glu Thr Lys Lys Asn Leu Thr Arg Lys Ile Arg Ser Glu  
 260 265 270  
 Glu Leu Ser Phe Thr Val Val Ser Asn Gly Ala Lys Asn Ile Ser Gly  
 275 280 285  
 Gln Ser Pro Ala Arg Thr Ser Ser Asp Pro Gly Thr Asn Thr Thr Thr  
 290 295 300  
 Glu Asp His Lys Ile Met Ala Ser Glu Asn Ser Ser Ala Met Val Gln  
 305 310 315 320  
 Val His Ser Gln Gly Arg Glu Ala Ala Val Ser His Leu Thr Thr Leu  
 325 330 335  
 Ala Thr Ile Ser Thr Ser Pro Gln Ser Leu Thr Thr Lys Pro Gly Pro  
 340 345 350  
 Asp Asn Ser Thr His Asn Thr Pro Val Tyr Lys Leu Asp Ile Ser Glu  
 355 360 365  
 Ala Thr Gln Val Glu Gln His His Arg Arg Thr Asp Asn Asp Ser Thr  
 370 375 380  
 Ala Ser Asp Thr Pro Ser Ala Thr Thr Ala Ala Gly Pro Pro Lys Ala  
 385 390 395 400  
 Glu Asn Thr Asn Thr Ser Lys Ser Thr Asp Phe Leu Asp Pro Ala Thr  
 405 410 415  
 Thr Thr Ser Pro Gln Asn His Ser Glu Thr Ala Gly Asn Asn Asn Thr  
 420 425 430  
 His His Gln Asp Thr Gly Glu Glu Ser Ala Ser Ser Gly Lys Leu Gly  
 435 440 445  
 Leu Ile Thr Asn Thr Ile Ala Gly Val Ala Gly Leu Ile Thr Gly Gly  
 450 455 460  
 Arg Arg Thr Arg Arg Glu Ala Ile Val Asn Ala Gln Pro Lys Cys Asn  
 465 470 475 480  
 Pro Asn Leu His Tyr Trp Thr Thr Gln Asp Glu Gly Ala Ala Ile Gly  
 485 490 495  
 Leu Ala Trp Ile Pro Tyr Phe Gly Pro Ala Ala Glu Gly Ile Tyr Ile  
 500 505 510  
 Glu Gly Leu Met His Asn Gln Asp Gly Leu Ile Cys Gly Leu Arg Gln  
 515 520 525  
 Leu Ala Asn Glu Thr Thr Gln Ala Leu Gln Leu Phe Leu Arg Ala Thr  
 530 535 540  
 Thr Glu Leu Arg Thr Phe Ser Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp Phe  
 545 550 555 560  
 Leu Leu Gln Arg Trp Gly Gly Thr Cys His Ile Leu Gly Pro Asp Cys  
 565 570 575  
 Cys Ile Glu Pro His Asp Trp Thr Lys Asn Ile Thr Asp Lys Ile Asp  
 580 585 590  
 Gln Ile Ile His Asp Phe Val Asp Lys Thr Leu Pro Asp Gln Gly Asp  
 595 600 605  
 Asn Asp Asn Trp Trp Thr Gly Trp Arg Gln His His His His His  
 610 615 620  
 His His His His  
 625