(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) **1-0038800**

(51)[7] **A61K 39/00**; C07K 16/10; A61P 31/12; C07K 14/005; A61K 39/12; A61K 39/295

(13) **B**

(21) 1-2019-01344
(22) 15/09/2017
(86) PCT/SG2017/050465 15/09/2017
(87) WO 2018/052375 22/03/2018
(30) 10201607778X 16/09/2016 SG
(45) 26/02/2024 431
(43) 25/10/2019 379A
(73) 1. Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha (JP)
5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115-8543 Japan
2. AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH (SG)
1 Fusionopolis Way, #20-10 Connexis North Tower, Singapore 138632, Singapore
(72) SAMPEI, Zenjiro (JP); KOO, Xing'er Christine (SG); FINK, Katja (CH); ZUEST, Roland (CH).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP LIÊN KẾT VỚI PROTEIN E CỦA VIRUT DENGUE (DENV)

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng virut Dengue (DENV) và phương pháp bào chế chúng. Sáng chế cũng đề xuất các axit nucleic mã hoá kháng thể kháng DENV và tế bào chủ chứa các axit nucleic này. Các kháng thể kháng DENV có các ứng dụng bao gồm điều trị nhiễm DENV. Sáng chế cũng đề xuất các polypeptit chứa vùng Fc biến thể và phương pháp bào chế chúng. Các axit nucleic mã hóa polypeptit và các tế bào chủ chứa các axit nucleic này cũng được đề xuất. Các polypeptit có các ứng dụng bao gồm điều trị nhiễm virut.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng virut Dengue và phương pháp sử dụng chúng. Sáng chế cũng đề cập đến polypeptit chứa vùng Fc biến thể và phương pháp sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sốt Dengue (sốt xuất huyết) là bệnh do virut mang bởi động vật chân đốt hay gặp nhất trên thế giới. Virut gây bệnh sốt Dengue (hoặc được gọi trong bản mô tả này là DENV) có thể được phân chia thành 4 týp huyết thanh lây nhiễm khác nhau như DENV-1, DENV-2, DENV-3, và DENV-4. Các triệu chứng của nhiễm Dengue bao gồm sốt, đau cơ, đau đầu, số lượng tiểu cầu thấp và số lượng bạch cầu thấp, bệnh về đông máu, xuất huyết và vỡ mạch mà có thể dẫn đến hội chứng sốc xuất huyết. Khi một người bị phơi nhiễm virut Dengue sau khi đã bị nhiễm virut Dengue trước đó, các kháng thể kháng virut có thể tăng cường hấp thụ virut vào các tế bào chủ và bệnh nhân này sẽ có nguy cơ phát triển thể nặng của sốt Dengue cao hơn. Tuy nhiên, một vài thể nặng của sốt Dengue cũng có thể xảy ra trong lần nhiễm đầu tiên.

Cho dù là bệnh do virut mang bởi động vật chân đốt hay gặp nhất, cho đến nay, không có thuốc sẵn có để điều trị bệnh sốt Dengue. Các cách tiếp cận đối với bệnh sốt Dengue như là một bệnh, chủ yếu nhằm vào việc ngăn ngừa lây nhiễm và/hoặc điều trị giảm nhẹ triệu chứng.

Do đó, có nhu cầu cung cấp các chất có khả năng trung hoà và/hoặc liên kết với ít nhất một týp huyết thanh dengue. Gần đây, một vài nhóm nghiên cứu đã báo cáo về các kháng thể trung hoà kháng DENV (ví dụ, xem WO2012/082073, WO2013/089647, WO2013/151764, WO2013/173348, WO2014/025546, WO2015/123362, WO2015/122995, và WO2016/012800). Tuy nhiên, vẫn cần đến kháng thể có tính chất trị liệu ưu việt.

Vắcxin và liệu pháp kháng thể hiện đang được nghiên cứu phát triển để ngăn ngừa và điều trị bệnh nhiễm virut. Tuy nhiên, các cách điều trị dựa vào kháng thể không phải là không kèm theo các nguy cơ. Một trong những nguy cơ này là tăng cường phụ thuộc

kháng thể (ADE), xảy ra khi các kháng thể kháng virut không trung hoà tạo thuận lợi cho virut xâm nhập vào tế bào chủ, dẫn đến mức độ lây nhiễm gia tăng trong các tế bào này (Expert Rev Anti Infect Ther (2013) 11, 1147-1157). Cơ chế hay gặp nhất đối với ADE là tương tác của phức hợp virut-kháng thể thông qua phần Fc của kháng thể với các thụ thể Fc (FcR) trên bề mặt tế bào. Việc nhiễm virut thông thường thể nhẹ có thể bị tăng cường bởi ADE để trở thành bệnh đe doạ đến tính mạng. Đã có báo cáo là kháng thể kháng DENV có các đột biến trong vùng Fc mà ngăn chặn liên kết với FcγR không làm tăng cường sự nhiễm DENV (WO2010/043977). Tuy nhiên, vẫn có nhu cầu đối với các liệu pháp kháng thể mà không làm gia tăng nguy cơ tăng cường lây nhiễm phụ thuộc kháng thể.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể kháng DENV, các polypeptit chứa vùng Fc biến thể, và phương pháp sử dụng chúng.

Theo một số phương án, kháng thể kháng DENV được phân lập theo sáng chế liên kết với protein E của DENV. Theo một số phương án, kháng thể kháng DENV theo sáng chế chứa:

(a) (i) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin $GGX_1ALFYDSYTTPX_2DX_3GSWWFDP$, trong đó X_1 là R hoặc E, X_2 là R hoặc F, X_3 là G, D hoặc L (SEQ ID NO: 42), (ii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin $QQFX_1X_2LPIT$, trong đó X_1 là D, S hoặc E, X_2 là D hoặc A (SEQ ID NO: 45), và (iii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin $VINPRGGSX_1X_2SAQKFQG$, trong đó X_1 là T hoặc R, X_2 là A hoặc R (SEQ ID NO: 41);

(b) (i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin SX_1YX_2H, trong đó X_1 là N hoặc Y, X_2 là I hoặc M (SEQ ID NO: 40), (ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin $VINPRGGSX_1X_2SAQKFQG$, trong đó X_1 là T hoặc R, X_2 là A hoặc R (SEQ ID NO: 41), và (iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin $GGX_1ALFYDSYTTPX_2DX_3GSWWFDP$, trong đó X_1 là R hoặc E, X_2 là R hoặc F, X_3 là G, D hoặc L (SEQ ID NO: 42);

(c) (i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin SX_1YX_2H, trong đó X_1 là N hoặc Y, X_2 là I hoặc M (SEQ ID NO: 40), (ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin

VINPRGGSX$_1$X$_2$SAQKFQG, trong đó X$_1$ là T hoặc R, X$_2$ là A hoặc R (SEQ ID NO: 41), (iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin GGX$_1$ALFYDSYTTPX$_2$DX$_3$GSWWFDP, trong đó X$_1$ là R hoặc E, X$_2$ là R hoặc F, X$_3$ là G, D hoặc L (SEQ ID NO: 42), (iv) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin QASQX$_1$IRX$_2$YLN, trong đó X$_1$ là D hoặc E, X$_2$ là K hoặc Q (SEQ ID NO: 43); (v) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin DASX$_1$LKX$_2$, trong đó X$_1$ là N hoặc E, X$_2$ là T hoặc F (SEQ ID NO: 44); và (vi) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin QQFX$_1$X$_2$LPIT, trong đó X$_1$ là D, S hoặc E, X$_2$ là D hoặc A (SEQ ID NO: 45); hoặc

(d) (i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin QASQX$_1$IRX$_2$YLN, trong đó X$_1$ là D hoặc E, X$_2$ là K hoặc Q (SEQ ID NO: 43); (ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin DASX$_1$LKX$_2$, trong đó X$_1$ là N hoặc E, X$_2$ là T hoặc F (SEQ ID NO: 44); và (iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin QQFX$_1$X$_2$LPIT, trong đó X$_1$ là D, S hoặc E, X$_2$ là D hoặc A (SEQ ID NO: 45). Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế không phải là kháng thể chứa (i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11, (ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13, (iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 16, (iv) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21, (v) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24, và (vi) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27.

Theo một số phương án, kháng thể kháng DENV được phân lập theo sáng chế chứa:

(a) (i) HVR-H3 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6, (ii) HVR-L3 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10, và (iii) HVR-H2 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6;

(b) (i) HVR-H1 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6, (ii) HVR-H2 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6, và (iii) HVR-H3 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6;

(c) (i) HVR-H1 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6, (ii) HVR-H2 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6, (iii) HVR-H3 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6, (iv) HVR-L1 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10;

(v) HVR-L2 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10; và (vi) HVR-L3 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10;

(d) (i) HVR-L1 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10; (ii) HVR-L2 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10; và (iii) HVR-L3 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10; hoặc

(e) (i) HVR-H1 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6, (ii) HVR-H2 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6, (iii) HVR-H3 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6, (iv) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7; (v) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7; và (vi) HVR-L3 từ trình tự VL của trình tự SEQ ID NO: 7.

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế không phải là kháng thể chứa (i) HVR-H1 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 1, (iii) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 1, (iv) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7, (v) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7, và (vi) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7.

Theo một số phương án, kháng thể kháng DENV được phân lập của sáng chế còn chứa khung miền biến đổi chuỗi nặng FR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 31, FR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 32, FR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 33 hoặc SEQ ID NO: 34, FR4 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 35. Theo một số phương án, kháng thể kháng DENV được phân lập của sáng chế còn chứa khung miền biến đổi chuỗi nhẹ FR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 36, FR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 37, FR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 38, FR4 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 39.

Theo một số phương án, kháng thể kháng DENV được phân lập theo sáng chế chứa (a) trình tự VH có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% với trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; (b) trình tự VL có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% với trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự

SEQ ID NO: 8-10; (c) trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6 và trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10; hoặc (d) trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6 và trình tự VL của trình tự SEQ ID NO: 7.

Theo một số phương án, kháng thể kháng DENV được phân lập theo sáng chế là kháng thể đơn dòng. Theo một số phương án, kháng thể kháng DENV được phân lập theo sáng chế là kháng thể người, kháng thể được làm giống người hoặc kháng thể khảm. Theo một số phương án, kháng thể kháng DENV được phân lập theo sáng chế là mảnh kháng thể mà liên kết với DENV hoặc protein E của DENV. Theo một số phương án, kháng thể kháng DENV được phân lập theo sáng chế là kháng thể IgG có chiều dài đầy đủ.

Theo một số phương án, vùng Fc của kháng thể kháng DENV theo sáng chế bao gồm Ala ở vị trí 234 và Ala ở vị trí 235 theo hệ đánh số EU. Theo một số phương án, vùng Fc của kháng thể kháng DENV theo sáng chế có thể được chọn từ các vùng Fc biến thể được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế còn đề xuất các axit nucleic được phân lập mã hoá kháng thể kháng DENV theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất các tế bào chủ chứa axit nucleic theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế để sản sinh kháng thể.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa kháng thể kháng DENV theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Kháng thể kháng DENV theo sáng chế có thể được sử dụng làm thuốc. Theo một số phương án, kháng thể kháng DENV theo sáng chế có thể được sử dụng trong điều trị bệnh nhiễm DENV.

Kháng thể kháng DENV theo sáng chế có thể được sử dụng để sản xuất thuốc. Theo một số phương án, thuốc này để điều trị bệnh nhiễm DENV.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị cá thể mắc bệnh nhiễm DENV. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng hữu hiệu của kháng thể kháng DENV theo sáng chế. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể này dùng chất trị liệu bổ sung, ví dụ, như mô tả dưới

đây.

Theo một số phương án, vùng Fc biến thể theo sáng chế bao gồm ít nhất một thay đổi axit amin trong vùng Fc gốc. Theo các phương án khác, vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể so với vùng Fc gốc. Theo các phương án khác, vùng Fc biến thể không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể so với vùng Fc gốc.

Theo một số phương án, vùng Fc biến thể theo sáng chế bao gồm Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235, theo hệ đánh số EU. Theo các phương án khác, vùng Fc biến thể bao gồm các thay đổi axit amin ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí (a)-(c) sau đây: (a) các vị trí 267, 268, và 324, (b) các vị trí 236, 267, 268, 324, và 332, và (c) các vị trí 326 và 333; theo hệ đánh số EU.

Theo một số phương án, vùng Fc biến thể theo sáng chế bao gồm các axit amin được chọn từ nhóm gồm: (a) Glu ở vị trí 267, (b) Phe ở vị trí 268, (c) Thr ở vị trí 324, (d) Ala ở vị trí 236, (e) Glu ở vị trí 332, (f) Ala, Asp, Glu, Met, hoặc Trp ở vị trí 326, và (g) Ser ở vị trí 333; theo hệ đánh số EU.

Theo một số phương án, vùng Fc biến thể theo sáng chế còn bao gồm các axit amin được chọn từ nhóm gồm: (a) Ala ở vị trí 434, (b) Ala ở vị trí 434, Thr ở vị trí 436, Arg ở vị trí 438, và Glu ở vị trí 440, (c) Leu ở vị trí 428, Ala ở vị trí 434, Thr ở vị trí 436, Arg ở vị trí 438, và Glu ở vị trí 440, và (d) Leu ở vị trí 428, Ala ở vị trí 434, Arg ở vị trí 438, và Glu ở vị trí 440; theo hệ đánh số EU.

Theo một số phương án, vùng Fc biến thể theo sáng chế bao gồm thay đổi bất kỳ trong số các thay đổi axit amin, đơn lẻ hoặc tổ hợp, như được mô tả trong Bảng 4. Theo một số phương án, vùng Fc gốc được mô tả theo sáng chế là thu được từ IgG1 của người. Sáng chế đề xuất polypeptit chứa trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 51-59.

Theo một số phương án, polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế là kháng thể. Theo các phương án khác, kháng thể này là kháng thể kháng virut. Theo các phương án khác, kháng thể này chứa vùng biến đổi thu được từ kháng thể kháng DENV được mô tả trong bản mô tả này.

Theo các phương án khác, kháng thể này chứa:

(a) (i) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 16, (ii) HVR-

L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27, và (iii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13;

(b) (i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11, (ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13, và (iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 16;

(c) (i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11, (ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13, (iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 16, (iv) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21; (v) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24; và (vi) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27; hoặc

(d) (i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21; (ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24; và (iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27.

Theo các phương án khác, kháng thể này chứa:

(a) (i) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (ii) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10, và (iii) HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6;

(b) (i) HVR-H1 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (ii) HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, và (iii) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6;

(c) (i) HVR-H1 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (ii) HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (iii) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (iv) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; (v) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; và (vi) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10;

(d) (i) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; (ii) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; và (iii) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; hoặc

(e) (i) HVR-H1 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (ii) HVR-H2 từ trình tự

VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (iii) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (iv) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7; (v) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7; và (vi) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7;

Sáng chế còn đề xuất các axit nucleic được phân lập mã hoá polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất các tế bào chủ chứa axit nucleic theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất polypeptit bao gồm vùng Fc biến thể bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế để sản sinh polypeptit này.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Các polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế có thể được sử dụng làm thuốc. Theo một số phương án, các polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế có thể được sử dụng trong điều trị bệnh nhiễm virut.

Các polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế có thể được sử dụng để sản xuất thuốc. Theo một số phương án, thuốc này để điều trị bệnh nhiễm virut.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị cho cá thể mắc bệnh nhiễm virut. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể kháng DENV được mô tả trong bản mô tả này, còn bao gồm polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến quy trình bào chế kháng thể chứa: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24 và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27, quy trình này bao gồm các bước:

(a) kết hợp trình tự biến thể VH được chọn từ nhóm gồm: 3CH1047 (SEQ ID NO: 6), và 3CH1049 (SEQ ID NO: 95) với trình tự CH của IgG1 của người được chọn từ nhóm gồm: SG182 (SEQ ID NO: 46), SG1095 (SEQ ID NO: 54) và SG1106 (SEQ ID

NO: 59);

(b) kết hợp trình tự biến thể VL được chọn từ nhóm gồm 3CL (SEQ ID NO: 7) và 3CL633 (SEQ ID NO: 98), với trình tự CL của SK1 của người (SEQ ID NO: 60);

(c) tách dòng mỗi một trong số các tổ hợp này vào vectơ biểu hiện;

(d) biểu hiện các vectơ biểu hiện thu được trong các tế bào được đồng chuyển nhiễm (tế bào chủ); và

(e) tinh chế kháng thể thu được từ bước (d).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 (A)-(D) minh hoạ các đồ thị cảm biến BIACORE® của các kháng thể kháng DENV 3C và 3Cam đối với protein DENV-1 E (A), protein DENV-2 E (B), protein DENV-3 E (C), và protein DENV-4 E (D), như được mô tả trong Ví dụ 2.

Fig.2 minh hoạ ái lực liên kết của các kháng thể mang các biến thể Fc khác nhau đối với C1q của người như được mô tả trong Ví dụ 4. Xác định hoạt tính liên kết bằng ELISA. Các biến thể Fc được thử nghiệm là: WT, LALA + KWES, LALA + EFT + AE, LALA + EFT, và LALA.

Fig.3 minh hoạ ái lực liên kết của các kháng thể mang các biến thể Fc khác nhau đối với C1q của người như được mô tả trong Ví dụ 4. Xác định hoạt tính liên kết bằng ELISA. Các biến thể Fc được thử nghiệm là: WT, LALA, LALA + KWES, LALA + KAES, LALA + KDES, LALA + KEES, và LALA + KMES.

Fig.4 minh hoạ ái lực liên kết của các kháng thể mang các biến thể Fc khác nhau đối với C1q của người như được mô tả trong Ví dụ 4. Xác định hoạt tính liên kết bằng ELISA. Các biến thể Fc được thử nghiệm là: WT, LALA, LALA + ACT3, LALA + ACT5, LALA + KAES, LALA + ACT3 + KAES, và LALA + ACT5 + KAES.

Fig.5 minh hoạ ái lực liên kết của các kháng thể mang các biến thể Fc khác nhau đối với C1q của chuột, như được mô tả trong Ví dụ 4. Xác định hoạt tính liên kết bằng ELISA. Các biến thể Fc được thử nghiệm là: WT, LALA, LALA + ACT3, LALA + ACT5, LALA + KAES, LALA + ACT3 + KAES, và LALA + ACT5 + KAES.

Fig.6 (a)-(h) minh hoạ phân tích Biacore đối với các biến thể Fc liên kết với các FcγR của người, như được mô tả trong Ví dụ 5. Các biến thể Fc được thử nghiệm là: WT

(được mô tả là IgG WT trong hình vẽ này), KWES, EFT + AE, EFT, KAES, LALA + KWES, LALA + EFT + AE, LALA + EFT, LALA, LALA + ACT3, LALA + ACT5, LALA + KAES, LALA + KAES + ACT3, và LALA + KAES + ACT5. Các biến thể Fc này được thử nghiệm về khả năng liên kết với các FcγR bao gồm: (a) FcγR1a của người, (b) biến thể alen 167H của FcγR2a của người, (c) biến thể alen 167R của FcγR2a của người, (d) FcγR2b của người, (e) biến thể alen 158F của FcγR3a của người, (f) biến thể alen 158V của FcγR3a của người, (g) biến thể alen NA1 của FcγR3b của người, và (h) biến thể alen NA2 của FcγR3b của người. Mỗi biến thể Fc được đánh giá cả ở dạng kháng thể đơn độc mang biến thể Fc (được mô tả là Ab đơn độc) và ở dạng phức hợp miễn dịch được tạo thành với kháng thể và kháng nguyên CD154 trime (được mô tả là CD154 IC).

Fig.7 (a)-(d) minh hoạ phân tích Biacore đối với các biến thể Fc liên kết với các FcγR của chuột, như được mô tả trong Ví dụ 5. Các biến thể Fc được thử nghiệm là: WT (được mô tả là IgG WT trong hình vẽ này), KWES, EFT + AE, EFT, KAES, LALA + KWES, LALA + EFT + AE, LALA + EFT, LALA, LALA + ACT3, LALA + ACT5, LALA + KAES, LALA + KAES + ACT3, và LALA + KAES + ACT5. Các biến thể Fc này được thử nghiệm về khả năng liên kết với các FcγR bao gồm: (a) FcγR1 của chuột, (b) FcγR2b của chuột, (c) FcγR3 của chuột, và (d) FcγR4 của chuột. Mỗi biến thể Fc được đánh giá cả ở dạng kháng thể đơn độc mang biến thể Fc (được mô tả là Ab đơn độc) và ở dạng phức hợp miễn dịch được tạo thành với kháng thể và kháng nguyên CD154 trime (được mô tả là CD154 IC).

Fig.8 minh hoạ phân tích Biacore đối với các biến thể Fc liên kết với FcRn của người, như được mô tả trong Ví dụ 5. Các biến thể Fc được thử nghiệm là: WT (được ký hiệu là hIgG1 trên hình vẽ này), LALA, LALA + ACT3, LALA + ACT5, LALA + KAES, LALA + KAES + ACT3, và LALA + KAES + ACT5. Mỗi biến thể Fc được đánh giá ở dạng kháng thể đơn độc mang biến thể Fc (được ký hiệu là Ab đơn độc) và ở dạng phức hợp miễn dịch được tạo thành với kháng thể và kháng nguyên CD154 trime (được ký hiệu là CD154 IC).

Fig.9 minh hoạ virut-huyết ở ngày 3 sau lây nhiễm virut DENV-2 ở chuột AG129, như được mô tả trong Ví dụ 6. Các kháng thể kháng DENV 3C và 3Cam kết hợp với các biến thể Fc của WT (được mô tả là hIgG1), LALA, và LALA + KAES, hoặc PBS làm đối chứng âm tính được cho dùng ở ngày 2 sau khi lây nhiễm virut.

Fig.10 (A)-(D) minh hoạ các đồ thị cảm biến BIACORE® của các kháng thể kháng DENV 3C và 3Cam2 đối với protein DENV-1 E (A), protein DENV-2 E (B), protein DENV-3 E (C), và protein DENV-4 E (D), như được mô tả trong Ví dụ 2.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các kỹ thuật và quy trình được mô tả hoặc đề cập trong bản mô tả này thường là đã biết và thường được sử dụng bằng cách sử dụng phương pháp quy ước bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, như, ví dụ, các phương pháp được sử dụng rộng rãi được mô tả trong tài liệu Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al., eds., (2003)); xêri Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); và Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

I. Định nghĩa

Trừ khi được định nghĩa khác, các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như được hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Tài liệu Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994) và March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992) cung cấp cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật một hướng dẫn chung cho nhiều thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này. Tất cả các tài liệu tham khảo được đề cập trong bản mô tả này bao gồm các đơn và công bố patent, được kết hợp bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Để diễn giải bản mô tả này, các định nghĩa dưới đây sẽ áp dụng và bất kỳ khi nào thích hợp, các thuật ngữ được sử dụng ở số ít cũng sẽ bao gồm số nhiều và ngược lại. Nên hiểu là thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ là để mô tả các phương án cụ thể, và không nhằm giới hạn. Trong trường hợp định nghĩa bất kỳ nêu dưới đây mâu thuẫn với tài liệu bất kỳ được viện dẫn để tham khảo, định nghĩa nêu dưới đây sẽ được áp dụng.

"Khung thể nhận của người" cho các mục đích trong bản mô tả này là khung bao gồm trình tự axit amin của khung miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) hoặc khung miền biến đổi chuỗi nặng (VH) thu được từ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người, như được xác định sau đây. Khung thể nhận của người "thu được từ" khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người có thể bao gồm cùng trình tự axit amin của chúng, hoặc có thể chứa các thay đổi trình tự axit amin. Theo một số phương án, số lượng các thay đổi axit amin là 10 hoặc ít hơn, 9 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 7 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 5 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, 3 hoặc ít hơn, hoặc 2 hoặc ít hơn. Theo một số phương án, khung VL nhận của người là đồng nhất về trình tự với trình tự khung VL globulin miễn dịch của người hoặc trình tự khung liên ứng của người.

"Ái lực" chỉ cường độ tổng cộng các tương tác không cộng hoá trị giữa một vị trí liên kết đơn nhất của phân tử (ví dụ, kháng thể) và đối tác liên kết của nó (ví dụ, kháng nguyên). Trừ khi có chỉ dẫn khác, như được sử dụng trong bản mô tả này, "ái lực liên kết" chỉ ái lực liên kết nội tại mà phản ánh tương tác 1:1 giữa các thành viên của một cặp liên kết (ví dụ, kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của phân tử X với đối tác Y của nó thường có thể được biểu thị bằng hằng số phân ly (Kd). Có thể xác định ái lực bằng các

phương pháp thường đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Các phương án ví dụ và minh hoạ cụ thể để xác định ái lực liên kết được mô tả dưới đây.

Kháng thể "được làm trưởng thành ái lực" chỉ kháng thể có một hoặc nhiều thay đổi ở một hoặc nhiều vùng siêu biến (HVR), so với kháng thể mẹ mà không có các thay đổi này, các thay đổi này dẫn đến cải thiện ái lực của kháng thể với kháng nguyên.

Các thuật ngữ "kháng thể kháng DENV" và "kháng thể liên kết với DENV" chỉ kháng thể có khả năng liên kết DENV với ái lực đủ mạnh sao cho kháng thể này hữu ích làm chất chẩn đoán và/hoặc điều trị để nhắm đích DENV. Kháng thể này có thể liên kết protein E của DENV. Các thuật ngữ "kháng thể kháng protein E của DENV" và "kháng thể liên kết với protein E của DENV" chỉ kháng thể mà có khả năng liên kết protein E của DENV với ái lực đủ mạnh sao cho kháng thể này là hữu ích làm chất chẩn đoán và/hoặc điều trị để nhắm đích DENV. Theo một phương án, mức độ liên kết của kháng thể kháng protein E của DENV với protein không liên quan mà không phải là protein E của DENV là thấp hơn khoảng 10% mức độ liên kết của kháng thể này với protein E của DENV như được xác định, ví dụ, bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA). Theo các phương án nhất định, kháng thể mà liên kết với DENV và/hoặc protein E của DENV có hằng số phân ly (Kd) là 1 micro M hoặc nhỏ hơn, 100 nM hoặc nhỏ hơn, 10 nM hoặc nhỏ hơn, 1 nM hoặc nhỏ hơn, 0,1 nM hoặc nhỏ hơn, 0,01 nM hoặc nhỏ hơn, hoặc 0,001 nM hoặc nhỏ hơn (ví dụ, 10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, ví dụ từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M). Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng DENV liên kết với epitop của DENV mà được bảo toàn ở DENV từ các týp huyết thanh khác nhau. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng protein E của DENV liên kết với epitop của protein E của DENV mà được bảo toàn ở protein E của DENV từ các týp huyết thanh khác nhau.

Thuật ngữ "kháng thể" được sử dụng trong bản mô tả này theo nghĩa rộng nhất và bao gồm các cấu trúc kháng thể khác nhau, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đa dòng, các kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép), và các mảnh kháng thể miễn là chúng thể hiện hoạt tính liên kết kháng nguyên mong muốn.

"Tác dụng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể" hoặc

"ADCC" chỉ dạng tác dụng gây độc tế bào, trong đó Ig tiết ra được liên kết vào các thụ thể Fc (FcR) có mặt trên một số các tế bào gây độc tế bào (ví dụ tế bào NK, bạch cầu trung tính, và các đại thực bào) cho phép các tế bào hiệu ứng gây độc tế bào này liên kết đặc hiệu với tế bào đích mang kháng nguyên và sau đó tiêu diệt tế bào đích bằng độc tố tế bào. Tế bào sơ cấp điều tiết ADCC, các tế bào NK, chỉ biểu hiện Fc gama RIII, trong khi đó các bạch cầu đơn nhân biểu hiện Fc gama RI, Fc gama RII, và Fc gama RIII. Sự biểu hiện FcR trên các tế bào tạo huyết được tóm tắt trong Bảng 3, trang 464 của tài liệu Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm, có thể tiến hành thử nghiệm ADCC *in vitro*, như thử nghiệm được mô tả trong Patent Mỹ số 5,500,362 hoặc Patent Mỹ số 5,821,337 hoặc Patent Mỹ số 6,737,056 (Presta). Các tế bào hiệu ứng hữu ích cho các thử nghiệm này bao gồm các tế bào PBMC và NK. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, có thể đánh giá *in vivo* hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm, ví dụ, trên mô hình động vật như là được bộc lộ trong tài liệu Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

"Mảnh kháng thể" chỉ phân tử không phải là kháng thể nguyên vẹn mà bao gồm một phần của kháng thể nguyên vẹn liên kết với kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn liên kết với. Các ví dụ về mảnh kháng thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; các kháng thể đôi (diabody); các kháng thể mạch thẳng; các phân tử kháng thể đơn chuỗi (ví dụ scFv); và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo thành từ các mảnh kháng thể.

"Kháng thể liên kết vào cùng epitop" làm kháng thể tham chiếu chỉ kháng thể mà phong bế sự liên kết của kháng thể tham chiếu với kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh, và ngược lại, kháng thể tham chiếu phong bế sự liên kết của kháng thể này với kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh. Thử nghiệm cạnh tranh ví dụ được đưa ra trong bản mô tả này.

"C1q" là polypeptit mà bao gồm vị trí liên kết đối với vùng Fc của globulin miễn dịch. C1q cùng với hai serin proteaza, C1r và C1s, tạo thành phức hợp C1, thành phần thứ nhất của con đường gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC). C1q của người có thể mua được thương mại từ Quidel, San Diego, CA.

Thuật ngữ kháng thể "khảm" chỉ kháng thể trong đó phần chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ thu được từ một nguồn hoặc loài cụ thể, trong khi phần còn lại của chuỗi nặng

và/hoặc chuỗi nhẹ là thu được từ nguồn hoặc loài khác.

Thuật ngữ "lớp" kháng thể chỉ kiểu miền hằng định hoặc vùng hằng định của chuỗi nặng của nó. Có năm lớp kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một vài lớp trong số này có thể được phân chia tiếp thành các phân lớp (các isotyp), ví dụ, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, và IgA_2. Miền hằng định chuỗi nặng mà tương ứng với các lớp khác nhau của các globulin miễn dịch được gọi lần lượt là alpha, delta, epsilon, gama, và mu.

"Tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể" hoặc "CDC" chỉ sự phân giải tế bào đích khi có mặt bổ thể. Sự hoạt hoá con đường bổ thể cổ điển được khởi đầu bằng cách liên kết thành phần thứ nhất của hệ bổ thể (C1q) với các kháng thể (của phân lớp thích hợp), mà được liên kết với kháng nguyên cùng nguồn gốc của chúng. Để đánh giá mức độ hoạt hoá bổ thể, có thể tiến hành thử nghiệm CDC, ví dụ, như được mô tả trong Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996). Các biến thể polypeptit có trình tự axit amin vùng Fc được thay đổi (các polypeptit mang vùng Fc biến thể) và khả năng liên kết C1q tăng hoặc giảm được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 6,194,551 B1 và WO 1999/51642. Tương tự, ví dụ, xem Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Thuật ngữ "chất gây độc tế bào" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ chất mà ức chế hoặc ngăn ngừa chức năng của tế bào và/hoặc gây chết hoặc tiêu huỷ tế bào. Các chất gây độc tế bào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đồng vị phóng xạ (ví dụ, ^{211}At, ^{131}I, ^{125}I, ^{90}Y, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{212}Bi, ^{32}P, ^{212}Pb và các đồng vị phóng xạ của Lu); các chất hoặc thuốc hoá trị (ví dụ, methotrexat, adriamyxin, các vinca alkaloit (vincristin, vinblastin, etoposit), doxorubixin, melphalan, mitomyxin C, clorambuxil, daunorubixin hoặc các chất xen giữa khác); các chất ức chế tăng trưởng; các enzym và các mảnh của chúng như các enzym phân giải nhân; các kháng sinh; các độc tố như các độc tố phân tử nhỏ hoặc các độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, bao gồm các mảnh và/hoặc biến thể của chúng; và các chất chống khối u hoặc ung thư như được đề cập dưới đây.

"Các chức năng hiệu ứng" chỉ các hoạt tính sinh học do vùng Fc của kháng thể, mà có thể thay đổi theo isotyp kháng thể. Các ví dụ về các chức năng hiệu ứng kháng thể bao gồm: liên kết C1q và tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC); liên kết thụ

thể Fc; tác dụng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC); thực bào; điều hoà giảm các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B); và hoạt hoá tế bào B.

"Lượng hữu hiệu" của chất, ví dụ, dược phẩm, chỉ lượng hữu hiệu, ở các liều lượng và trong các khoảng thời gian cần thiết để đạt được kết quả điều trị hoặc dự phòng mong muốn.

Thuật ngữ "epitop" bao gồm phần quyết định kháng nguyên bất kỳ có khả năng liên kết bởi kháng thể. Epitop là vùng của kháng nguyên được liên kết bởi kháng thể mà nhắm đích kháng nguyên đó, và bao gồm các axit amin đặc hiệu tiếp xúc trực tiếp với kháng thể này. Các quyết định epitop có thể bao gồm các nhóm bề mặt có hoạt tính hoá học của các phân tử như các axit amin, các chuỗi bên của đường, các nhóm phosphoryl hoặc sulfonyl, và có thể có các đặc tính cấu trúc ba chiều đặc hiệu, và/hoặc các đặc tính tích điện đặc hiệu. Thường, các kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên đích cụ thể sẽ ưu tiên nhận biết epitop trên kháng nguyên đích này trong hỗn hợp phức tạp gồm các protein và/hoặc đại phân tử.

"Thụ thể Fc" hoặc "FcR" chỉ thụ thể mà liên kết với vùng Fc của kháng thể. Theo một số phương án, FcR là FcR của người tự nhiên. Theo một số phương án, FcR là thụ thể liên kết với kháng thể IgG (thụ thể gama) và bao gồm các thụ thể của các phân lớp FcγRI, FcγRII, và FcγRIII, bao gồm các biến thể alen và các dạng được ghép xen kẽ của các thụ thể đó. Các thụ thể FcγRII bao gồm FcγRIIA ("thụ thể hoạt hoá") và FcγRIIB ("thụ thể ức chế"), mà có trình tự axit amin tương tự khác nhau chủ yếu ở miền bào tương của chúng. Thụ thể hoạt hoá FcγRIIA chứa mô-típ hoạt hoá dựa vào tyrosin của thụ thể miễn dịch (ITAM) ở miền bào tương của nó. Thụ thể ức chế FcγRIIB chứa mô-típ ức chế dựa vào tyrosin của thụ thể miễn dịch (ITIM) ở miền bào tương của nó. (Ví dụ, xem Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Các FcR được tổng kết, ví dụ trong Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); và de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Các FcR khác, bao gồm các thụ thể sẽ được nhận diện trong tương lai, cũng được bao gồm trong định nghĩa "FcR" trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "thụ thể Fc" hoặc "FcR" cũng bao gồm thụ thể mới sinh, FcRn, có vai trò truyền các IgG của mẹ sang bào thai Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) và Kim

et al., J. Immunol. 24:249 (1994)) và điều hoà cân bằng nội mô của các globulin miễn dịch. Các phương pháp xác định khả năng liên kết với FcRn là đã biết (ví dụ, xem Ghetie and Ward., Immunol. Today 18(12):592-598 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology 15(7):637-640 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al.)). Có thể phân tích khả năng liên kết với FcRn của người *in vivo* và thời gian bán hủy trong huyết thanh của các polypeptit liên kết ái lực cao với FcRn của người, ví dụ, ở chuột chuyển gen hoặc các dòng tế bào của người được chuyển nhiễm biểu hiện FcRn của người, hoặc ở động vật linh trưởng mà được cho dùng các polypeptit mang vùng Fc biến thể. WO 2000/42072 (Presta) mô tả các biến thể kháng thể có khả năng liên kết với các FcR được cải thiện hoặc giảm đi. Ví dụ, xem thêm Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001).

Thuật ngữ "vùng Fc" được sử dụng trong bản mô tả này để xác định vùng đầu tận C của chuỗi nặng globulin miễn dịch mà chứa ít nhất một phần của vùng hằng định. Thuật ngữ này bao gồm các vùng Fc trình tự tự nhiên và các vùng Fc biến thể. Theo một phương án, vùng Fc chuỗi nặng của IgG của người kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận carboxyl của chuỗi nặng này. Tuy nhiên, lysin đầu tận C (Lys447) hoặc glyxin-lysin (các gốc 446-447) của vùng Fc có thể có mặt hoặc không. Trừ khi có quy định khác trong bản mô tả này, hệ đánh số các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng hằng định là theo hệ đánh số EU, còn được gọi là chỉ số EU, như Kabat et al mô tả trong Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Thuật ngữ "kháng thể chứa vùng Fc" chỉ kháng thể mà chứa vùng Fc. Lysin đầu tận C (gốc 447) hoặc glyxin-lysin (các gốc 446-447) của vùng Fc có thể được loại bỏ, ví dụ, trong quá trình tinh chế kháng thể hoặc bằng cách xử lý kỹ thuật tái tổ hợp axit nucleic mã hoá kháng thể này. Do đó, chế phẩm bao gồm kháng thể có vùng Fc theo sáng chế có thể bao gồm kháng thể có G446-K447, có G446 và không có K447, có toàn bộ G446-K447 được loại bỏ, hoặc hỗn hợp ba loại kháng thể nêu trên.

"Khung" hoặc "FR" chỉ các gốc miền biến đổi không phải là các gốc vùng siêu biến (HVR). FR của miền biến đổi thường gồm bốn miền FR: FR1, FR2, FR3, và FR4. Do đó, các trình tự HVR và FR thường xuất hiện theo trình tự sau trong VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Các thuật ngữ "kháng thể có chiều dài đầy đủ", "kháng thể nguyên vẹn" và "toàn bộ kháng thể" được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này để chỉ kháng thể có cấu trúc gần như tương tự với cấu trúc kháng thể tự nhiên hoặc có các chuỗi nặng chứa vùng Fc như được xác định trong bản mô tả này.

"Vùng Fc chức năng" có "chức năng hiệu ứng" của vùng Fc trình tự tự nhiên. "Các chức năng hiệu ứng" ví dụ bao gồm liên kết C1q; CDC; liên kết thụ thể Fc; ADCC; thực bào; điều hoà giảm các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B; BCR), *v.v.*. Các chức năng hiệu ứng này thường đòi hỏi vùng Fc kết hợp với miền liên kết (ví dụ, kháng thể miền biến đổi) và có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các thử nghiệm khác nhau như được đề cập, ví dụ trong các định nghĩa trong bản mô tả này.

Các thuật ngữ "tế bào chủ", "dòng tế bào chủ", "tế bào đồng chuyển nhiễm" và "giống cấy tế bào chủ" được sử dụng thay thế lẫn nhau và chỉ các tế bào mà axit nucleic ngoại sinh đã được đưa vào các tế bào này, bao gồm thế hệ sau của các tế bào này. Các tế bào chủ bao gồm "các thể biến nạp" và "các tế bào được biến nạp", mà bao gồm tế bào được biến nạp cấp một và thế hệ sau thu được từ các tế bào này bất kể số lần cấy chuyển. Thế hệ sau có thể không hoàn toàn đồng nhất về hàm lượng axit nucleic với tế bào gốc, mà có thể chứa các đột biến. Thế hệ sau đột biến có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc chọn lọc ở tế bào được biến nạp ban đầu được bao gồm trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, tế bào chủ hoặc tế bào đồng chuyển nhiễm là CHO-DXB11, CHO-K1 hoặc CHO-DG44. Tế bào chủ hoặc tế bào đồng chuyển nhiễm này có thể là tế bào biểu hiện chất vận chuyển taurin, thu được bằng cách đưa ADN mã hoá chất vận chuyển taurin (WO2007/119774) vào.

"Kháng thể của người" là kháng thể có trình tự axit amin tương ứng với trình tự axit amin của kháng thể do người hoặc tế bào của người sản sinh hoặc thu được từ nguồn không phải là người mà sử dụng tập hợp kháng thể của người hoặc các trình tự mã hoá kháng thể của người khác. Định nghĩa này về kháng thể của người cụ thể loại trừ kháng thể được làm giống người chứa các gốc liên kết kháng nguyên không phải của người.

"Khung liên ứng của người" là khung thể hiện các gốc hay gặp nhất trong chọn lọc trình tự khung VL hoặc VH của globulin miễn dịch của người. Thường, việc chọn lọc các trình tự VL hoặc VH của globulin miễn dịch của người là từ phân nhóm các trình tự miền biến đổi. Thường, phân nhóm các trình tự là phân nhóm như trong Kabat et al.,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. Theo một phương án, đối với VL, phân nhóm là phân nhóm kapa I như trong tài liệu của Kabat et al, như nêu trên. Theo một phương án, đối với VH, phân nhóm là phân nhóm III như trong tài liệu của Kabat et al, như nêu trên.

Kháng thể "được làm giống người" chỉ kháng thể khảm bao gồm các gốc axit amin từ các HVR không phải của người và các gốc axit amin từ các FR của người. Theo các phương án nhất định, kháng thể được làm giống người sẽ bao gồm gần như tất cả của ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó, tất cả hoặc gần như tất cả các HVR (ví dụ, các CDR) tương ứng với các vùng này của kháng thể không phải của người, và tất cả hoặc gần như tất cả các FR tương ứng với các vùng này của kháng thể của người. Kháng thể được làm giống người tuỳ ý có thể bao gồm ít nhất một phần của vùng hằng định của kháng thể thu được từ kháng thể của người. "Dạng được làm giống người" của kháng thể, ví dụ, kháng thể không phải của người, chỉ kháng thể đã được làm giống người.

Thuật ngữ "vùng siêu biến" hoặc "HVR" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ từng vùng trong số các vùng của miền biến đổi kháng thể mà siêu biến về trình tự ("các vùng quyết định bổ sung" hoặc "các CDR") và/hoặc tạo thành vòng có cấu trúc xác định ("vòng siêu biến") và/hoặc chứa các gốc tiếp xúc kháng nguyên ("các tiếp xúc kháng nguyên"). Thường, các kháng thể bao gồm sáu HVR: ba ở VH (H1, H2, H3), và ba ở VL (L1, L2, L3). Các HVR ví dụ trong bản mô tả này bao gồm:

(a) các vòng siêu biến xuất hiện ở các gốc axit amin 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), và 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));

(b) các CDR xuất hiện ở các gốc axit amin 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), và 95-102 (H3) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991);

(c) các tiếp xúc kháng nguyên ở các gốc axit amin 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), và 93-101 (H3) (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); và

(d) các tổ hợp của (a), (b), và/hoặc (c), bao gồm các gốc axit amin HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3), và 94-102 (H3).

Trừ khi có chỉ dẫn khác, các gốc HVR và các gốc khác trong miền biến đổi (ví dụ, các gốc FR) được đánh số trong bản mô tả này theo Kabat et al, như nêu trên.

"Thể liên hợp miễn dịch" là kháng thể được liên hợp với một hoặc nhiều phân tử khác loại, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chất gây độc tế bào.

"Cá thể" hoặc "đối tượng" là động vật có vú. Động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vật nuôi (ví dụ, bò, cừu, mèo, chó, và ngựa), động vật linh trưởng (ví dụ, người và động vật linh trưởng không phải là người như khỉ), thỏ, và các động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống). Theo các phương án nhất định, cá thể hoặc đối tượng này là người.

Kháng thể "được phân lập" là kháng thể mà đã được tách khỏi thành phần môi trường tự nhiên của nó. Theo một số phương án, kháng thể được tinh chế đến độ tinh khiết lớn hơn 95% hoặc 99% như được xác định bằng, ví dụ, kỹ thuật điện di (ví dụ, SDS-PAGE, hội tụ đẳng điện (IEF), điện di mao quản) hoặc sắc ký (ví dụ, trao đổi ion hoặc HPLC pha đảo). Để xem lại các phương pháp đánh giá độ tinh khiết kháng thể, ví dụ, xem Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

Axit nucleic "được phân lập" chỉ phân tử axit nucleic mà đã được tách khỏi thành phần môi trường tự nhiên của nó. Axit nucleic được phân lập bao gồm phân tử axit nucleic nằm trong các tế bào mà thường chứa phân tử axit nucleic này, nhưng phân tử axit nucleic này có mặt ngoài nhiễm sắc thể hoặc ở vị trí nhiễm sắc thể khác với vị trí nhiễm sắc thể tự nhiên của nó.

"Axit nucleic được phân lập mã hoá kháng thể" chỉ một hoặc nhiều phân tử axit nucleic mã hoá các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể (hoặc các mảnh của chúng), bao gồm (các) phân tử axit nucleic này trong một vectơ đơn nhất hoặc các vectơ riêng biệt, và (các) phân tử axit nucleic này có mặt ở một hoặc nhiều vị trí trong tế bào chủ.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ kháng thể thu được từ quần thể các kháng thể gần như đồng nhất, nghĩa là, các kháng thể đơn lẻ tạo thành quần thể này là đồng nhất và/hoặc liên kết với cùng epitop, ngoại trừ các

kháng thể biến thể có thể, ví dụ, chứa các đột biến có trong tự nhiên hoặc phát sinh trong quá trình sản xuất chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể này thường có mặt với lượng nhỏ. Trái với các chế phẩm kháng thể đa dòng, mà thường bao gồm các kháng thể khác nhau nhằm vào các quyết định kháng nguyên (các epitop) khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng trong chế phẩm kháng thể đơn dòng nhằm vào một quyết định kháng nguyên đơn nhất trên kháng nguyên. Do đó, từ bổ nghĩa "đơn dòng" chỉ đặc tính của kháng thể là thu được từ quần thể kháng thể gần như đồng nhất, và sẽ không được hiểu là cần sản xuất kháng thể này bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng sẽ được sử dụng theo sáng chế có thể được bào chế bằng nhiều kỹ thuật, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở phương pháp lai, các phương ADN tái tổ hợp, các phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn, và các phương pháp sử dụng các động vật chuyển gen chứa tất cả hoặc một phần các locut globulin miễn dịch của người, các phương pháp này và các phương pháp ví dụ khác để bào chế các kháng thể đơn dòng sẽ được mô tả trong bản mô tả này.

Kháng thể "trần" chỉ kháng thể mà không được liên hợp với gốc khác loại (ví dụ, gốc gây độc tế bào) hoặc chất đánh dấu phóng xạ. Kháng thể trần có thể có mặt ở trong dược phẩm.

"Các kháng thể tự nhiên" chỉ các phân tử globulin miễn dịch có trong tự nhiên có các cấu trúc khác nhau. Ví dụ, các kháng thể IgG tự nhiên là các glycoprotein heterotetrame khoảng 150.000 dalton, gồm có hai chuỗi nhẹ giống nhau và hai chuỗi nặng giống nhau mà liên kết bằng liên kết disulfua. Từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nặng có vùng biến đổi (VH), còn gọi là miền nặng biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nặng, tiếp theo là ba miền hằng định (CH1, CH2, và CH3). Tương tự, từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nhẹ có vùng biến đổi (VL), còn gọi là miền nhẹ biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ, tiếp theo là một miền nhẹ hằng định (CL). Chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được xếp vào một trong hai loại, gọi là kapa (κ) và lambda (λ), dựa vào trình tự axit amin của miền hằng định của nó.

"Vùng Fc trình tự tự nhiên" bao gồm trình tự axit amin đồng nhất với trình tự axit amin của vùng Fc tìm thấy trong tự nhiên. Các vùng Fc người trình tự tự nhiên bao gồm vùng Fc của IgG1 người trình tự tự nhiên (alotyp A và không phải là A); vùng Fc của IgG2 người trình tự tự nhiên; vùng Fc của IgG3 người trình tự tự nhiên; và vùng Fc của

IgG4 người trình tự tự nhiên cũng như các biến thể có trong tự nhiên của chúng.

Thuật ngữ "tờ hướng dẫn sử dụng" được dùng để chỉ các hướng dẫn sử dụng thường nằm trong các bao gói thương mại của sản phẩm điều trị, chứa thông tin về chỉ định, sử dụng, liều, cách dùng, liệu pháp kết hợp, chống chỉ định và/hoặc cảnh báo liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm điều trị này.

"Tỷ lệ phần trăm (%) độ đồng nhất trình tự axit amin" so với trình tự polypeptit tham chiếu là tỷ lệ phần trăm các gốc axit amin trong trình tự ứng viên mà đồng nhất với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit tham chiếu, sau khi sắp thẳng các trình tự và đưa vào các khoảng trống, nếu cần, để đạt được % độ đồng nhất trình tự tối đa, và không coi các thay thế bảo toàn bất kỳ là một phần của độ đồng nhất trình tự này. Việc sắp thẳng để xác định tỷ lệ phần trăm độ đồng nhất trình tự axit amin có thể đạt được bằng nhiều cách trong phạm vi trình độ của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ bằng cách sử dụng các phần mềm máy tính sẵn có như BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign (DNASTAR), hoặc GENETYX (nhãn hiệu đã được đăng ký (Genetyx Co., Ltd.). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định các tham số thích hợp để sắp thẳng các trình tự, bao gồm các thuật toán bất kỳ cần thiết để đạt được sự thẳng hàng tối đa trên toàn bộ chiều dài của các trình tự được so sánh.

Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 được tạo ra bởi Genentech, Inc., và mã nguồn đã được nộp lưu kèm theo tài liệu cho người sử dụng cho Cục Bản quyền Mỹ (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, ở đó nó được đăng ký bảo hộ dưới số đăng ký U.S. Copyright Registration No. TXU510087. Chương trình ALIGN-2 là sẵn có công khai từ Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể được biên soạn từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 nên được biên soạn để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, bao gồm UNIX V4.0D kỹ thuật số. Tất cả các tham số so sánh trình tự được cài đặt bởi chương trình ALIGN-2 và không thay đổi. Trong các trường hợp khi sử dụng ALIGN-2 để so sánh trình tự axit amin, % độ đồng nhất trình tự axit amin của trình tự axit amin đã cho A với, so với, hoặc đối với trình tự axit amin đã cho B (mà nói theo cách khác là trình tự axit amin đã cho A mà có hoặc bao gồm % độ đồng nhất trình tự axit amin nhất định với, so với, hoặc đối với trình tự axit amin đã cho B) được tính như sau:

$$100 \times X/Y$$

trong đó X là số lượng các gốc axit amin được tính điểm là các bắt cặp đồng nhất theo

chương trình sắp thẳng trình tự ALIGN-2 trong trình tự thẳng hàng của A và B trong chương trình đó, và trong đó Y là tổng số các gốc axit amin trong B. Nên hiểu là khi độ dài của trình tự axit amin A không bằng độ dài của trình tự axit amin B, % độ đồng nhất trình tự axit amin của A so với B sẽ không bằng % độ đồng nhất trình tự axit amin của B so với A. Trừ khi có quy định cụ thể khác, tất cả các giá trị % độ đồng nhất trình tự axit amin được sử dụng trong bản mô tả này là thu được như mô tả ở đoạn trên bằng cách sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2.

Thuật ngữ "dược phẩm" chỉ chế phẩm mà ở dạng cho phép hoạt tính sinh học của thành phần hoạt tính chứa trong đó là hữu hiệu, và không chứa các thành phần bổ sung mà có độc tính không thể chấp nhận đối với đối tượng sẽ dùng chế phẩm này.

"Chất mang dược dụng" chỉ thành phần trong dược phẩm, không phải là thành phần hoạt tính, mà không độc đối với đối tượng. Chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất đệm, tá dược, chất làm ổn định hoặc chất bảo quản.

Thuật ngữ "protein E của DENV", như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ protein E của DENV tự nhiên bất kỳ từ týp huyết thanh DENV bất kỳ, bao gồm DENV-1, DENV-2, DENV-3, và DENV-4, trừ khi có chỉ dẫn khác. Bộ gen DENV mã hoá ba protein cấu trúc (capsit (C), tiền màng/màng (prM/M), và vỏ (E)) và bảy protein phi cấu trúc (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, và NS5). Protein E, một glycoprotein khoảng 55 kDa, có mặt ở dạng heterodime cùng với protein PrM trước khi virion trưởng thành. Các nghiên cứu tinh thể học tia X miền ngoại bào của protein E đã cho thấy ba miền ống beta (beta-barrel) khác biệt được nối với màng virut bằng neo thân xoắn và hai miền xuyên màng đối song. Miền III (EDIII) có gấp nếp tương tự globulin miễn dịch và đã được gợi ý là có vai trò quan trọng trong các tương tác thụ thể. Miền II (EDII) là miền kéo dài gồm có hai cấu trúc tương tự ngón tay dài và chứa vòng dung hợp 13 axit amin được bảo toàn ở mức độ cao (EDII-FL) ở đầu mút, và tham gia vào dung hợp màng và dime hoá protein E. Miền trung tâm (miền I; EDI) là ống beta gồm chín sợi được nối với EDIII và EDII lần lượt bằng một và bốn cầu nối linh hoạt. Các protein E có vai trò quan trọng đối với việc lắp ghép virut, gắn thụ thể, xâm nhập, dung hợp virut và có thể lẩn tránh miễn dịch trong vòng đời của virut và, do đó, là các protein động học cần thiết để có được vài cấu hình phân biệt và sắp xếp trên hạt virut. Thuật ngữ này bao gồm protein E của DENV chưa được xử lý có "chiều dài đầy đủ" cũng như dạng bất kỳ của protein E

của DENV mà thu được từ việc xử lý trong tế bào. Thuật ngữ này cũng bao gồm các biến thể có trong tự nhiên của protein E của DENV, ví dụ, các biến thể týp huyết thanh hoặc giả loài.

Cụm từ "giảm đáng kể", "tăng đáng kể", hoặc "khác biệt đáng kể", như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ mức độ khác biệt đủ lớn giữa hai giá trị số (thường một giá trị liên quan đến một phân tử và giá trị còn lại liên quan đến phân tử tham chiếu/so sánh) sao cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ coi sự khác biệt giữa hai giá trị là có ý nghĩa thống kê trong ngữ cảnh đặc tính sinh học được xác định bằng các giá trị này (ví dụ, các giá trị Kd).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "sự điều trị" (và các biến thể ngữ pháp của nó như "điều trị" hoặc "việc điều trị") chỉ sự can thiệp lâm sàng trong nỗ lực nhằm làm thay đổi quá trình tự nhiên của đối tượng đang được điều trị, và có thể được tiến hành để dự phòng hoặc trong quá trình bệnh lý lâm sàng. Các tác dụng mong muốn của việc điều trị bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ngăn ngừa sự xuất hiện hoặc tái phát của bệnh, giảm nhẹ các triệu chứng, giảm bớt các hậu quả bệnh lý trực tiếp hoặc gián tiếp bất kỳ của bệnh, ngăn ngừa di căn, giảm tốc độ tiến triển của bệnh, cải thiện hoặc giảm nhẹ tình trạng bệnh, và thuyên giảm hoặc tiên lượng bệnh được cải thiện. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng để làm trì hoãn sự phát triển của bệnh hoặc làm chậm tiến triển của bệnh.

Thuật ngữ "vùng biến đổi" hoặc "miền biến đổi" chỉ miền của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể mà tham gia vào việc liên kết kháng thể với kháng nguyên. Các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (lần lượt là VH và VL) của kháng thể tự nhiên thường có các cấu trúc tương tự, trong đó mỗi miền bao gồm bốn vùng khung bảo toàn (FR) và ba vùng siêu biến (HVR). (Ví dụ, xem Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)). Một miền VH hoặc VL đơn nhất có thể là đủ để mang lại tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên. Hơn nữa, các kháng thể liên kết kháng nguyên cụ thể có thể được phân lập bằng cách sử dụng miền VH hoặc VL từ kháng thể liên kết với kháng nguyên này để lần lượt sàng lọc thư viện các miền VL hoặc VH bổ sung. Ví dụ, xem Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991).

"Vùng Fc biến thể" bao gồm trình tự axit amin mà khác với trình tự của vùng Fc

trình tự tự nhiên bởi ít nhất một cải biến (thay đổi) axit amin, tốt hơn là một hoặc nhiều thay thế axit amin. Tốt hơn là, vùng Fc biến thể có ít nhất một thay thế axit amin so với vùng Fc trình tự tự nhiên hoặc với vùng Fc của polypeptit mẹ, ví dụ, từ khoảng một đến khoảng mười thay thế axit amin, và tốt hơn là từ khoảng một đến khoảng năm thay thế axit amin trong vùng Fc trình tự tự nhiên hoặc trong vùng Fc của polypeptit mẹ. Vùng Fc biến thể trong bản mô tả này tốt hơn là có mức tương đồng ít nhất là khoảng 80% với vùng Fc trình tự tự nhiên và/hoặc với vùng Fc của polypeptit mẹ, và tốt nhất là có mức tương đồng ít nhất khoảng 90%, tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 95%.

Thuật ngữ "vectơ", như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ phân tử axit nucleic có khả năng nhân lên một axit nucleic khác mà nó được liên kết với. Thuật ngữ này bao gồm vectơ như là một cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vectơ được hợp nhất vào hệ gen của tế bào chủ mà vectơ này được đưa vào. Các vectơ nhất định có khả năng điều khiển quá trình biểu hiện các axit nucleic mà nó được liên kết chức năng vào. Các vectơ này được gọi trong bản mô tả này là "các vectơ biểu hiện".

II. Chế phẩm và phương pháp

Theo một khía cạnh, sáng chế dựa một phần vào các kháng thể kháng DENV và các ứng dụng của chúng. Theo các phương án nhất định, các kháng thể liên kết với DENV và/hoặc protein E của DENV được đề xuất. Các kháng thể theo sáng chế là hữu ích, ví dụ, để chẩn đoán hoặc điều trị bệnh nhiễm DENV.

Theo một khía cạnh, sáng chế dựa một phần vào các polypeptit chứa các vùng Fc biến thể và các ứng dụng của chúng. Theo các phương án nhất định, các polypeptit chứa các vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể được đề xuất. Theo các phương án nhất định, các polypeptit chứa các vùng Fc biến thể không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể được đề xuất. Theo các phương án cụ thể, các polypeptit theo sáng chế là các kháng thể. Các polypeptit chứa các vùng Fc biến thể theo sáng chế là hữu ích, ví dụ, để chẩn đoán hoặc điều trị bệnh nhiễm virut.

A. Kháng thể kháng DENV và polypeptit chứa vùng Fc biến thể điển hình

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các kháng thể được phân lập liên kết với DENV và/hoặc protein E của DENV. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng DENV phong bế sự liên kết DENV và/hoặc protein E của DENV với tế bào chủ. Theo

các phương án nhất định, kháng thể kháng DENV ức chế sự xâm nhập của DENV vào tế bào chủ. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng DENV liên kết với toàn bộ hạt DENV. Theo các phương án khác, kháng thể liên kết với toàn bộ hạt DENV tốt hơn so với protein E của DENV monome. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng DENV theo sáng chế liên kết với và/hoặc trung hoà ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, hoặc cả bốn týp huyết thanh DENV được chọn từ nhóm gồm týp huyết thanh DENV 1 (DENV-1), týp huyết thanh DENV 2 (DENV-2), týp huyết thanh DENV 3 (DENV-3), và týp huyết thanh DENV 4 (DENV-4). Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng DENV liên kết với và/hoặc trung hoà protein E của DENV thu được từ ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, hoặc cả bốn týp huyết thanh DENV được chọn từ nhóm gồm DENV-1, DENV-2, DENV-3, và DENV-4. "Týp huyết thanh" chỉ các biến đổi đặc trưng trong một loài virut.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng DENV chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 11-12; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 13-15; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 16-20; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 21-23; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 24-26; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 27-30.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng DENV chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 40; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 41; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 42; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 43; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 44; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 45.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng DENV chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit

amin được nêu trong SEQ ID NO: 12; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 23; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 26; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 30.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng DENV chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 11-12; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 13-15; và (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 16-20. Theo một phương án, kháng thể chứa HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 16-20. Theo một phương án khác, kháng thể chứa HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 16-20 và HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 27-30. Theo một phương án khác nữa, kháng thể chứa HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 16-20, HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 27-30, và HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 13-15. Theo một phương án khác nữa, kháng thể chứa (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 11-12; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 13-15; và (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 16-20.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 40; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 41; và (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 42. Theo một phương án, kháng thể chứa HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 42. Theo một phương án khác, kháng thể chứa HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 42 và HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 45. Theo một phương án khác nữa, kháng thể chứa HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 42, HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 45, và HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 41. Theo một phương án khác nữa, kháng thể chứa (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 40; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 41; và (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 42.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15; và (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20. Theo một phương án, kháng thể chứa HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20. Theo một phương án khác, kháng thể chứa HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20 và HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 30. Theo một phương án khác, kháng thể chứa HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20 và HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27. Theo một phương án khác nữa, kháng thể chứa HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20, HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 30, và HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15. Theo một phương án khác nữa, kháng thể chứa HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20, HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27, và HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15. Theo một phương án khác nữa, kháng thể chứa (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15; và (c) HVR-H3 bao gồm

trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (a) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 21-23; (b) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 24-26; và (c) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 27-30. Theo một phương án, kháng thể chứa (a) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 21-23; (b) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 24-26; và (c) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 27-30.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (a) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 43; (b) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 44; và (c) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 45. Theo một phương án, kháng thể chứa (a) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 43; (b) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 44; và (c) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 45.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (a) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 23; (b) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 26; và (c) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 30. Theo một phương án, kháng thể chứa (a) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 23; (b) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 26; và (c) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 30.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 11-12, (ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 13-15, và (iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 16-20; và (b) miền VL bao gồm ít nhất

một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 21-23, (ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 24-26, và (iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 27-30.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 40, (ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 41, và (iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 42; và (b) miền VL bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 43, (ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 44, và (iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 45.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12, (ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15, và (iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20; và (b) miền VL bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 23, (ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 26, và (iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 30.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12, (ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15, và (iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20; và (b) miền VL bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21, (ii) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24, và (iii) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 11-

12; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 13-15; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 16-20; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 21-23; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 24-26; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 27-30.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 40; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 41; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 42; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 43; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 44; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 45.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 23; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 26; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 30.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27.

Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều axit amin bất kỳ của kháng thể kháng DENV như đề xuất ở trên được thay thế ở các vị trí HVR sau: (a) trong HVR-H1 (SEQ ID NO: 11), ở các vị trí 2, và 4; (b) trong HVR-H2 (SEQ ID NO: 13), ở các vị trí 9, và 10; (c) trong HVR-H3 (SEQ ID NO: 16), ở các vị trí 3, 14, và 16; (d) trong HVR-L1 (SEQ ID NO: 21), ở các vị trí 5, và 8; (e) trong HVR-L2 (SEQ ID NO:24), ở các vị trí 4, và 7; và (f) trong HVR-L3 (SEQ ID NO:27), ở các vị trí 4, và 5.

Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều thay thế axit amin của kháng thể kháng DENV là các thay thế bảo toàn, như được đề xuất trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều thay thế bất kỳ sau có thể được tạo ra theo tổ hợp bất kỳ: (a) trong HVR-H1 (SEQ ID NO: 11), N2Y; I4M; (b) trong HVR-H2 (SEQ ID NO: 13), T9R; A10R; (c) trong HVR-H3 (SEQ ID NO: 16), R3E; R14F; G16D hoặc L; (d) trong HVR-L1 (SEQ ID NO: 21), D5E; K8Q; (e) trong HVR-L2 (SEQ ID NO: 24), N4E; T7F; và (f) trong HVR-L3 (SEQ ID NO: 27), D4S hoặc E; D5A.

Tất cả các tổ hợp có thể có của các thay thế trên đây đều được bao gồm trong các trình tự liên ứng được nêu trong SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, và SEQ ID NO: 45 lần lượt cho HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, và HVR-L3.

Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng DENV theo sáng chế không phải là kháng thể chứa (i) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11, (ii) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13, (iii) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 16, (iv) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21, (v) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24, và (vi) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng DENV chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; (b) HVR-H2 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; (c) HVR-H3 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; (d) HVR-L1 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10; (e) HVR-L2 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10; và (f) HVR-L3 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng DENV chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; (b) HVR-H2 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; (c) HVR-H3 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; (d) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong

SEQ ID NO: 7; (e) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7; và (f) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng DENV chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; (b) HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; (c) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; (d) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; (e) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; và (f) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng DENV chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; (b) HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; (c) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; (d) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7; (e) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7; và (f) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (a) HVR-H1 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; (b) HVR-H2 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; và (c) HVR-H3 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6. Theo một phương án, kháng thể chứa HVR-H3 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6. Theo một phương án khác, kháng thể bao gồm HVR-H3 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6 và HVR-L3 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10. Theo một phương án khác, kháng thể chứa HVR-H3 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6 và HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7. Theo một phương án khác nữa, kháng thể chứa HVR-H3 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6, HVR-L3 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10, và HVR-H2 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6. Theo một phương án khác nữa, kháng thể chứa HVR-H3 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6, HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7, và HVR-H2 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6. Theo một phương án khác

nữa, kháng thể chứa (a) HVR-H1 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; (b) HVR-H2 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; và (c) HVR-H3 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (a) HVR-H1 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; (b) HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; và (c) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo một phương án, kháng thể chứa HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo một phương án khác, kháng thể bao gồm HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6 và HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một phương án khác, kháng thể chứa HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6 và HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7. Theo một phương án khác nữa, kháng thể chứa HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10, và HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo một phương án khác nữa, kháng thể chứa HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7, và HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo một phương án khác nữa, kháng thể chứa (a) HVR-H1 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; (b) HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; và (c) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (a) HVR-L1 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10; (b) HVR-L2 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10; và (c) HVR-L3 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10. Theo một phương án, kháng thể chứa (a) HVR-L1 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10; (b) HVR-L2 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10; và (c) HVR-L3 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (a) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; (b) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; và (c)

HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo một phương án, kháng thể chứa (a) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; (b) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; và (c) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6, (ii) HVR-H2 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6, và (iii) HVR-H3 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; và (b) miền VL bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10, (ii) HVR-L2 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10, và (iii) HVR-L3 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6, (ii) HVR-H2 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6, và (iii) HVR-H3 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; và (b) miền VL bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7, (ii) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7, và (iii) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (ii) HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, và (iii) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; và (b) miền VL bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10, (ii) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10, và (iii) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể theo sáng chế chứa (a) miền VH bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (ii) HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID

NO: 6, và (iii) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; và (b) miền VL bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7, (ii) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7, và (iii) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa (a) HVR-H1 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; (b) HVR-H2 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; (c) HVR-H3 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; (d) HVR-L1 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10; (e) HVR-L2 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10; và (f) HVR-L3 từ trình tự VL của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa (a) HVR-H1 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; (b) HVR-H2 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; (c) HVR-H3 từ trình tự VH của trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6; (d) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7; (e) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7; và (f) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa (a) HVR-H1 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; (b) HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; (c) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; (d) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; (e) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; và (f) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa (a) HVR-H1 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; (b) HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; (c) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6; (d) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7; (e) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7; và (f) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7.

Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng DENV theo sáng chế không phải là kháng thể chứa (i) HVR-H1 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 1, (iii) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 1, (iv) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7, (v)

HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7, và (vi) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7.

Theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, kháng thể kháng DENV có thể được làm giống người. Theo một phương án, kháng thể kháng DENV chứa các HVR theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và còn chứa khung thể nhận của người, ví dụ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người. Theo một phương án khác, kháng thể kháng DENV chứa các HVR theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và còn chứa VH hoặc VL bao gồm trình tự FR. Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng DENV chứa trình tự FR miền biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ sau đây: Đối với miền biến đổi chuỗi nặng, FR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 31, FR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 32, FR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 33 hoặc 34, FR4 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 35. Đối với miền biến đổi chuỗi nhẹ, FR1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 36, FR2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 37, FR3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 38, FR4 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 39.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng DENV chứa trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6. Theo các phương án nhất định, trình tự VH có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% chứa các thay thế (ví dụ, các thay thế bảo toàn), cài xen hoặc xóa đoạn so với trình tự tham chiếu, nhưng kháng thể kháng DENV chứa trình tự đó vẫn giữ được khả năng liên kết với DENV. Theo các phương án nhất định, tổng số từ 1 đến 10 axit amin đã được thay thế, cài xen và/hoặc xóa trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6. Theo các phương án nhất định, các thay thế, cài xen hoặc xóa đoạn xảy ra ở các vùng ngoài các HVR (nghĩa là, ở các FR). Tuỳ ý, kháng thể kháng DENV chứa trình tự VH trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó. Theo phương án cụ thể, VH bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số

các trình tự SEQ ID NO: 11-12, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 13-15, và (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 16-20. Các cải biến sau dịch mã bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở cải biến của glutamin hoặc glutamat ở đầu tận N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ thành axit pyroglutamic bằng phản ứng pyroglutamyl hoá.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng DENV chứa miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6. Theo các phương án nhất định, trình tự VH có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% chứa các thay thế (ví dụ, các thay thế bảo toàn), cài xen hoặc xóa đoạn so với trình tự tham chiếu, nhưng kháng thể kháng DENV chứa trình tự đó vẫn giữ được khả năng liên kết với DENV. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin được thay thế, cài xen hoặc xóa đoạn trong SEQ ID NO: 6. Theo các phương án nhất định, các thay thế, cài xen hoặc xóa đoạn xảy ra ở các vùng ngoài các HVR (nghĩa là, ở các FR). Tuỳ ý, kháng thể kháng DENV chứa trình tự VH trong SEQ ID NO: 6, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó. Theo phương án cụ thể, VH bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15, và (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20. Các cải biến sau dịch mã bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở cải biến của glutamin hoặc glutamat ở đầu tận N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ thành axit pyroglutamic bằng phản ứng pyroglutamyl hoá.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng DENV được đề xuất, trong đó kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10. Theo các phương án nhất định, trình tự VL có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% chứa các thay thế thế (ví dụ, các thay thế bảo toàn), cài xen hoặc xóa đoạn so với trình tự tham chiếu, nhưng kháng thể kháng DENV chứa trình tự đó vẫn giữ được khả năng liên kết với DENV. Theo các phương án nhất định, tổng cộng

1 đến 10 axit amin được thay thế, cài xen hoặc xóa đoạn trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10. Theo các phương án nhất định, các thay thế, cài xen hoặc xóa đoạn xảy ra ở các vùng ngoài các HVR (nghĩa là, ở các FR). Tuỳ ý, kháng thể kháng DENV chứa trình tự VL trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó. Theo phương án cụ thể, VL bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ (a) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 21-23; (b) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 24-26; và (c) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 27-30. Các cải biến sau dịch mã bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở cải biến của glutamin hoặc glutamat ở đầu tận N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ thành axit pyroglutamic bằng phản ứng pyroglutamyl hoá.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng DENV được đề xuất, trong đó kháng thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 10. Theo các phương án nhất định, trình tự VL có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% chứa các thay thế (ví dụ, các thay thế bảo toàn), cài xen hoặc xóa đoạn so với trình tự tham chiếu, nhưng kháng thể kháng DENV chứa trình tự đó vẫn giữ được khả năng liên kết với DENV. Theo các phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin được thay thế, cài xen hoặc xóa đoạn trong SEQ ID NO: 10. Theo các phương án nhất định, các thay thế, cài xen hoặc xóa đoạn xảy ra ở các vùng ngoài các HVR (nghĩa là, ở các FR). Tuỳ ý, kháng thể kháng DENV chứa trình tự VL trong SEQ ID NO: 10, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó. Theo phương án cụ thể, VL bao gồm một, hai hoặc ba HVR được chọn từ (a) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 23; (b) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 26; và (c) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 30. Các cải biến sau dịch mã bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở cải biến của glutamin hoặc glutamat ở đầu tận N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ thành axit pyroglutamic bằng phản ứng pyroglutamyl hoá.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng DENV được đề xuất, trong đó kháng thể chứa VH như theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và VL như

theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên. Theo một phương án, kháng thể chứa các trình tự VH và VL lần lượt trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6 và trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 8-10, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó. Theo một phương án, kháng thể chứa các trình tự VH và VL lần lượt trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 2-6 và SEQ ID NO: 7, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó. Các cải biến sau dịch mã bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở cải biến của glutamin hoặc glutamat ở đầu tận N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ thành axit pyroglutamic bằng phản ứng pyroglutamyl hoá.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng DENV được đề xuất, trong đó kháng thể chứa VH như theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và VL như theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên. Theo một phương án, kháng thể chứa các trình tự VH và VL lần lượt trong SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 10, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó. Theo một phương án, kháng thể chứa các trình tự VH và VL lần lượt trong SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7, bao gồm các cải biến sau dịch mã của các trình tự đó. Các cải biến sau dịch mã bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở cải biến của glutamin hoặc glutamat ở đầu tận N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ thành axit pyroglutamic bằng phản ứng pyroglutamyl hoá.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể mà liên kết vào cùng epitop như kháng thể kháng DENV được đề xuất trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất mà liên kết với epitop bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm, ít nhất sáu, ít nhất bảy, hoặc tất cả các axit amin được chọn từ nhóm gồm G100, W101, K122, I162, S274, K310, W391 và F392 trong protein E của DENV-2. Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất mà liên kết với epitop bao gồm ít nhất một, ít nhất hai hoặc tất cả các axit amin được chọn từ nhóm gồm K122, I162, và S274 trong protein E của DENV-2. Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất mà liên kết với epitop còn bao gồm ít nhất một trong số các axit amin được chọn từ nhóm gồm G100, W101, K310, W391, và F392, khi epitop này bao gồm ít nhất một, ít nhất hai hoặc tất cả các axit amin được chọn từ nhóm gồm K122, I162, và S274.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, kháng thể kháng DENV theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể khảm,

kháng thể được làm giống người hoặc kháng thể của người. Theo một phương án, kháng thể kháng DENV là mảnh kháng thể, ví dụ, Fv, Fab, Fab', scFv, kháng thể đôi, hoặc mảnh $F(ab')_2$. Theo một phương án khác, kháng thể là kháng thể có chiều dài đầy đủ, ví dụ, kháng thể IgG1 nguyên vẹn hoặc lớp kháng thể hoặc isotyp kháng thể khác như được xác định trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng DENV theo sáng chế có thể có cải biến mà làm mất khả năng liên kết các kháng thể với các thụ thể Fc-gama (FcγR). Không muốn bị giới hạn theo lý thuyết nào, cải biến mà làm mất khả năng liên kết các kháng thể với các thụ thể Fc-gama có thể là có lợi bởi vì khả năng liên kết với FcR giảm đi có thể tránh được hiện tượng ADE (tăng cường phụ thuộc kháng thể) của bệnh lây nhiễm, mà được cho là chủ yếu được điều tiết bởi tương tác với FcR. Theo một phương án, vùng Fc của kháng thể kháng DENV theo sáng chế bao gồm Ala ở vị trí 234 và Ala ở vị trí 235 theo hệ đánh số EU.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng DENV theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể kết hợp dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu, đơn lẻ hoặc kết hợp, như được mô tả trong các Mục từ 1 đến 7 dưới đây:

1. Ái lực kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này có hằng số phân ly (Kd) là 1 micro M hoặc nhỏ hơn, 100 nM hoặc nhỏ hơn, 10 nM hoặc nhỏ hơn, 1 nM hoặc nhỏ hơn, 0,1 nM hoặc nhỏ hơn, 0,01 nM hoặc nhỏ hơn, hoặc 0,001 nM hoặc nhỏ hơn (ví dụ 10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, ví dụ từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M).

Theo một phương án, Kd được xác định bằng thử nghiệm liên kết kháng nguyên được đánh dấu phóng xạ (RIA). Theo một phương án, RIA được tiến hành với phiên bản Fab của kháng thể quan tâm và kháng nguyên của nó. Ví dụ, ái lực liên kết trong dung dịch của các Fab đối với kháng nguyên được xác định bằng cách cân bằng Fab với nồng độ tối thiểu của kháng nguyên được đánh dấu (^{125}I) khi có mặt một dãy hiệu giá của kháng nguyên không được đánh dấu, sau đó bắt giữ kháng nguyên đã liên kết bằng đĩa được phủ kháng thể kháng Fab (ví dụ, xem Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)). Để thiết lập các điều kiện cho thử nghiệm này, các đĩa nhiều giếng MICROTITER (nhãn hiệu được đăng ký bảo hộ) (Thermo Scientific) được phủ qua đêm với 5 micro g/mL

kháng thể kháng Fab bắt giữ (Cappel Labs) trong dung dịch natri cacbonat 50 mM (pH=9,6), và tiếp đó được phong bế bằng albumin huyết thanh bò 2% (trọng lượng/thể tích) trong PBS trong từ hai đến năm giờ ở nhiệt độ phòng (khoảng 23°C). Trong đĩa không hấp phụ (Nunc #269620), trộn 100 pM hoặc 26 pM kháng nguyên-[^{125}I] với các dung dịch pha loãng theo bậc chứa Fab quan tâm (ví dụ, phù hợp với phương pháp đánh giá kháng thể kháng VEGF, Fab-12, trong Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). Sau đó, ủ Fab quan tâm qua đêm; tuy nhiên, việc ủ có thể kéo dài hơn (ví dụ, khoảng 65 giờ) để đảm bảo đạt đến trạng thái cân bằng. Sau đó, chuyển hỗn hợp vào đĩa bắt giữ để ủ ở nhiệt độ phòng (ví dụ, trong một giờ). Tiếp đó, loại bỏ phần dung dịch và rửa đĩa này tám lần bằng polysorbat 20 0,1% (TWEEN-20 (nhãn hiệu được đăng ký bảo hộ)) trong PBS. Khi các đĩa đã khô, thêm vào 150 micro l/giếng chất phát sáng (MICROSCINT-20 ™; Packard), và các đĩa được đếm trên máy đếm gama TOPCOUNT™ (Packard) trong mười phút. Các nồng độ của mỗi Fab tạo ra khả năng liên kết nhỏ hơn hoặc bằng 20% khả năng liên kết tối đa được chọn để sử dụng trong các thử nghiệm liên kết cạnh tranh.

Theo một phương án khác, Kd được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt BIACORE (nhãn hiệu được đăng ký bảo hộ). Ví dụ, tiến hành thử nghiệm bằng cách sử dụng BIACORE (nhãn hiệu được đăng ký bảo hộ)-2000 hoặc BIACORE (nhãn hiệu được đăng ký bảo hộ)-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) ở 25°C với các chip CM5 kháng nguyên cố định ở ~10 đơn vị đáp ứng (RU). Theo một phương án, chip cảm biến sinh học dextran được carboxymetyl hoá (CM5, BIACORE, Inc.) được hoạt hoá bằng *N*-etyl-*N'*-(3-dimetylaminopropyl)-carbodiimit hydroclorua (EDC) và *N*-hydroxysuxinimit (NHS) theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Kháng nguyên được pha loãng bằng natri axetat 10 mM, độ pH=4,8, đến 5 µg/mL (~0,2 µM) trước khi tiêm ở tốc độ chảy 5 µl/phút để đạt được khoảng 10 đơn vị đáp ứng (RU) của protein đã tạo cặp. Sau khi tiêm kháng nguyên, tiêm etanolamin 1 M để phong bế các nhóm không phản ứng. Đối với các phép đo động học, tiêm các dung dịch pha loãng theo bậc hai lần chứa Fab (từ 0,78 nM đến 500 nM) vào PBS với chất hoạt động bề mặt polysorbat 20 0,05% (TWEEN-20™) (PBST) ở 25°C ở tốc độ chảy khoảng 25 µl/phút. Tính toán các tốc độ kết hợp (k_{on}) và tốc độ phân ly (k_{off}) bằng cách sử dụng mô hình liên kết Langmuir một đối một đơn giản (phần mềm đánh giá BIACORE (nhãn hiệu được đăng ký bảo hộ) phiên bản 3.2) bằng cách hiệu chỉnh (fitting) đồng thời đồ thị cảm biến của sự kết hợp và

phân ly. Tính hằng số phân ly cân bằng (Kd) theo tỷ lệ k_{off}/k_{on}. Ví dụ, xem Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Nếu tốc độ kết hợp vượt quá 10^6 M^{-1} s^{-1} theo thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt nêu trên, thì có thể xác định tốc độ kết hợp bằng cách sử dụng kỹ thuật dập tắt huỳnh quang mà xác định mức tăng hoặc giảm cường độ phát huỳnh quang (kích thích = 295 nm; phát xạ = 340 nm, thông dải 16 nm) ở 25°C của kháng thể kháng kháng nguyên 20 nM (dạng Fab) trong PBS, độ pH=7,2, khi có mặt nồng độ tăng dần của kháng nguyên như được xác định trong máy đo quang phổ, như máy đo quang phổ có lắp bộ ngừng dòng (Aviv Instruments) hoặc máy đo quang phổ SLM-AMINCO™ xê-ri 8000 (ThermoSpectronic) với cuvet được khuấy.

2. Mảnh kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này là mảnh kháng thể. Các mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các mảnh Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv, và scFv, và các mảnh khác được mô tả dưới đây. Để xem lại về một số mảnh kháng thể nhất định, xem trong Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003). Để xem lại về một số mảnh scFv, ví dụ, xem trong The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994) của Pluckthün; xem thêm WO 93/16185; và các Patent Mỹ số 5,571,894 và 5,587,458. Xem thảo luận về các mảnh Fab và $F(ab')_2$ bao gồm các gốc epitop liên kết thụ thể cứu hộ và có thời gian bán hủy *in vivo* tăng trong Patent Mỹ số 5,869,046.

Các kháng thể đôi là các mảnh kháng thể có hai vị trí liên kết kháng nguyên mà có thể có hoá trị hai hoặc đặc hiệu kép. Ví dụ, xem EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); và Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Các kháng thể ba (triabody) và kháng thể bốn (tetrabody) cũng được mô tả trong Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

Các kháng thể miền đơn nhất là các mảnh kháng thể bao gồm toàn bộ hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc toàn bộ hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo các phương án nhất định, kháng thể miền đơn nhất là kháng thể miền đơn nhất của người (Domantis, Inc., Waltham, MA; ví dụ, xem Patent Mỹ số 6,248,516 B1).

Các mảnh kháng thể có thể được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật, bao gồm nhưng không

chỉ giới hạn ở cắt phân giải protein kháng thể nguyên vẹn cũng như sản xuất bởi các tế bào chủ tái tổ hợp (ví dụ, *E. coli* hoặc thể thực khuẩn), như được mô tả trong bản mô tả này.

3. Kháng thể khảm và kháng thể được làm giống người

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này là kháng thể khảm. Một số các kháng thể khảm nhất định được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 4,816,567; và Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Theo một ví dụ, kháng thể khảm chứa vùng biến đổi không phải của người (ví dụ, vùng biến đổi thu được từ chuột nhắt, chuột cống, chuột đồng, thỏ, hoặc động vật linh trưởng không phải là người, như khỉ) và vùng hằng định của người. Theo một ví dụ khác, kháng thể khảm là kháng thể "được chuyển lớp" trong đó lớp hoặc phân lớp này được thay đổi từ lớp hoặc phân lớp của kháng thể mẹ. Các kháng thể khảm bao gồm các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng.

Theo các phương án nhất định, kháng thể khảm là kháng thể được làm giống người. Thông thường, kháng thể không phải của người được làm giống người để giảm tính gây miễn dịch đối với người, trong khi vẫn giữ được tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể mẹ không phải của người. Thường, kháng thể được làm giống người chứa một hoặc nhiều miền biến đổi, trong đó các HVR, ví dụ, các CDR, (các phần của chúng) thu được từ kháng thể không phải của người, và các FR (hoặc các phần của chúng) thu được từ các trình tự kháng thể người. Kháng thể được làm giống người tuỳ ý cũng sẽ chứa ít nhất một phần của vùng hằng định của người. Theo một số phương án, một số gốc FR trong kháng thể được làm giống người được thay thế bằng các gốc tương ứng từ kháng thể không phải của người (ví dụ, kháng thể mà từ đó thu được các gốc HVR), ví dụ, để khôi phục hoặc cải thiện tính đặc hiệu hoặc ái lực của kháng thể.

Các kháng thể được làm giống người và các phương pháp bào chế chúng được tổng kết, ví dụ, trong Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008), và còn được mô tả, ví dụ, trong Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); các Patent Mỹ số 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321, và 7,087,409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (mô tả kỹ thuật ghép vùng quyết định tính đặc hiệu (SDR)); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (mô tả "sự tái tạo bề mặt"); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (mô tả "sự xáo trộn

FR"); và Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) và Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (mô tả phương pháp "sự chọn lọc có hướng dẫn" để xáo trộn FR).

Các vùng khung của người mà có thể được sử dụng để làm tương thích với người bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: các vùng khung được chọn bằng cách sử dụng phương pháp "lắp vừa nhất" (ví dụ, xem Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993)); các vùng khung thu được từ trình tự liên ứng của các kháng thể của người thuộc một phân nhóm cụ thể của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng (ví dụ, xem Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); và Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993)); các vùng khung trưởng thành (được gây đột biến soma) của người hoặc vùng khung dòng mầm của người (ví dụ, xem Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)); và các vùng khung thu được từ việc sàng lọc các thư viện FR (ví dụ, xem Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) và Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)).

4. Kháng thể của người

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này là kháng thể của người. Các kháng thể của người có thể được sản xuất bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Các kháng thể của người được mô tả tổng quát trong van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) và Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008).

Các kháng thể của người có thể được bào chế bằng cách sử dụng chất gây miễn dịch cho động vật chuyển gen đã được cải biến để sản sinh các kháng thể người nguyên vẹn hoặc các kháng thể nguyên vẹn mang các vùng biến đổi của người đáp ứng với kích thích của kháng nguyên. Các động vật này thường chứa toàn bộ hoặc một phần của các locut globulin miễn dịch của người, các locut này thay thế các locut globulin miễn dịch nội sinh, hoặc các locut có mặt ngoài nhiễm sắc thể hoặc được kết hợp ngẫu nhiên vào các nhiễm sắc thể của động vật này. Ở chuột chuyển gen như vậy, các locut globulin miễn dịch nội sinh thường đã được bất hoạt. Để xem lại các phương pháp thu nhận kháng thể của người từ các động vật chuyển gen, xem Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005). Ví dụ, xem thêm các Patent Mỹ số 6,075,181 6,150,584 mô tả công nghệ XENOMOUSE™; Patent Mỹ số 5,770,429 mô tả công nghệ HUMAB (nhãn hiệu được đăng ký bảo hộ); Patent Mỹ số 7,041,870 mô tả công nghệ K-M MOUSE (nhãn hiệu

được đăng ký bảo hộ), và Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2007/0061900, mô tả công nghệ VELOCIMOUSE (nhãn hiệu được đăng ký bảo hộ)). Các vùng biến đổi của người từ các kháng thể nguyên vẹn được tạo ra bởi các động vật này có thể được cải biến tiếp, ví dụ, bằng cách kết hợp với vùng hằng định của người khác.

Các kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp dựa vào tế bào lai. Các dòng tế bào u tuỷ của người và u tuỷ khác loại của chuột-người để sản xuất các kháng thể đơn dòng của người đã được mô tả (Ví dụ, xem Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); và Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)). Các kháng thể của người được tạo ra bằng công nghệ tế bào lai tế bào B của người cũng được mô tả trong Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006). Các phương pháp bổ sung bao gồm các phương pháp được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 7,189,826 (mô tả việc sản xuất các kháng thể IgM đơn dòng của người từ các dòng tế bào lai) và Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (mô tả các tế bào lai người-người). Công nghệ tế bào lai của người (công nghệ Trioma) cũng được mô tả trong Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) và Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005).

Các kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng cách phân lập các trình tự miền biến đổi dòng Fv được chọn từ các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn thu được từ người. Các trình tự miền biến đổi này sau đó có thể được kết hợp với miền hằng định của người mong muốn. Các kỹ thuật để chọn lọc các kháng thể của người từ các thư viện kháng thể được mô tả dưới đây.

5. Kháng thể thu được từ thư viện

Các kháng thể theo sáng chế có thể được phân lập bằng cách sàng lọc các thư viện tổ hợp cho các kháng thể có hoạt tính hoặc các hoạt tính mong muốn. Ví dụ, nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực tạo ra các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn và sàng lọc các thư viện này cho các kháng thể có các đặc tính liên kết mong muốn. Các phương pháp này được tổng kết, ví dụ, trong Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) và còn được mô tả, ví dụ, trong McCafferty et al., Nature 348:552-554; Clackson et al., Nature 352: 624-628

(1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); trong Methods in Molecular Biology 248:161-175 của Marks và Bradbury (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); và Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004).

Trong một số phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn nhất định, các nguồn gen VH và VL được tách dòng riêng biệt bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và được tái tổ hợp ngẫu nhiên trong các thư viện thể thực khuẩn, các thư viện này sau đó có thể được sàng lọc cho thể thực khuẩn liên kết kháng nguyên như được mô tả trong Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Thể thực khuẩn thông thường biểu hiện các mảnh kháng thể, ở dạng các mảnh Fv đơn chuỗi (scFv) hoặc ở dạng các mảnh Fab. Các thư viện từ các nguồn đã gây miễn dịch cung cấp các kháng thể có tính ái lực cao đối với chất gây miễn dịch mà không cần phải xây dựng cấu trúc các tế bào lai. Theo cách khác, các nguồn chưa qua xử lý có thể được tách dòng (ví dụ, từ người) để cung cấp nguồn kháng thể đơn nhất đối với một khoảng rộng các kháng nguyên tự thân hoặc kháng nguyên không tự thân mà không gây miễn dịch bất kỳ như được mô tả bởi Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Cuối cùng, các thư viện chưa qua xử lý này cũng có thể được tạo ra bằng cách tổng hợp bằng cách tách dòng các đoạn gen V chưa được sắp xếp lại từ các tế bào gốc, và bằng cách sử dụng các đoạn mồi PCR có chứa trình tự ngẫu nhiên để mã hoá các vùng CDR3 biến đổi mức độ cao và thực hiện sự sắp xếp lại *in vitro*, như Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Các công bố Patent mô tả các thư viện thể thực khuẩn kháng thể của người bao gồm, ví dụ: Patent Mỹ số 5,750,373, và các công bố đơn sáng chế Mỹ số 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, và 2009/0002360.

Các kháng thể hoặc mảnh kháng thể được phân lập từ các thư viện kháng thể của người được coi là các kháng thể của người hoặc các mảnh kháng thể của người trong bản mô tả này.

6. Kháng thể đa đặc hiệu

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này là kháng thể đa đặc hiệu, ví dụ kháng thể đặc hiệu kép. Các kháng thể đa đặc hiệu là các

kháng thể đơn dòng mà có tính đặc hiệu liên kết với ít nhất hai vị trí khác nhau. Theo các phương án nhất định, một trong số các tính đặc hiệu liên kết là với protein E của DENV và tính đặc hiệu liên kết còn lại là với kháng nguyên khác bất kỳ. Theo các phương án nhất định, các kháng thể đặc hiệu kép có thể liên kết với hai epitop khác nhau của protein E của DENV. Các kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể được sử dụng để khu trú các chất gây độc tế bào vào các tế bào biểu hiện protein E của DENV. Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được bào chế dưới dạng các kháng thể có chiều dài đầy đủ hoặc các mảnh kháng thể.

Các kỹ thuật để bào chế các kháng thể đa đặc hiệu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đồng biểu hiện tái tổ hợp hai cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ globulin miễn dịch có tính đặc hiệu khác nhau (xem Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)), WO 93/08829, và Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)), và kỹ thuật xử lý "núm trong lỗ" (ví dụ, xem Patent Mỹ số 5,731,168). Các kháng thể đa đặc hiệu cũng có thể được tạo ra bằng cách xử lý kỹ thuật các hiệu ứng hướng tĩnh điện để tạo ra các phân tử Fc-heterodime kháng thể (WO 2009/089004A1); liên kết ngang hai hoặc nhiều kháng thể hoặc mảnh (ví dụ, xem Patent Mỹ số 4,676,980, và Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)); sử dụng các khoá kéo leuxin để sản xuất các kháng thể đặc hiệu kép (ví dụ, xem Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)); sử dụng công nghệ "kháng thể đôi" để tạo ra các mảnh kháng thể đặc hiệu kép (ví dụ, xem Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)); và sử dụng các dime Fv đơn chuỗi (scFv) (ví dụ, xem Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)); và tạo ra các kháng thể ba như được mô tả, ví dụ, trong Tutt et al. J. Immum nol. 147: 60 (1991).

Các kháng thể được xử lý kỹ thuật có ba hoặc nhiều hơn ba vị trí liên kết kháng nguyên chức năng, bao gồm "các kháng thể của bạch tuộc", cũng được bao gồm trong bản mô tả này (ví dụ, xem US 2006/0025576A1).

Kháng thể hoặc mảnh kháng thể trong bản mô tả này cũng bao gồm "Fab có tác dụng kép" hoặc "DAF" bao gồm một vị trí liên kết kháng nguyên mà liên kết với protein E của DENV cũng như kháng nguyên khác (ví dụ, xem US 2008/0069820).

7. Biến thể kháng thể

Theo các phương án nhất định, các biến thể trình tự axit amin của các kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này được bao gồm. Ví dụ, có thể mong muốn cải thiện ái

lực liên kết và/hoặc các tính chất sinh học khác của kháng thể. Các biến thể trình tự axit amin của kháng thể có thể được bào chế bằng cách đưa các cải biến thích hợp vào trình tự nucleotit mã hoá kháng thể, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Các cải biến này bao gồm, ví dụ, xóa đoạn từ, và/hoặc cài xen vào và/hoặc thay thế các gốc bên trong các trình tự axit amin của kháng thể. Cũng có thể tạo ra tổ hợp bất kỳ của đột biến xóa đoạn, cài xen và thay thế để đạt đến cấu trúc cuối cùng, miễn là cấu trúc cuối cùng này có các đặc tính mong muốn, ví dụ, liên kết kháng nguyên.

a) Các biến thể thay thế, cài xen, và xóa đoạn

Theo các phương án nhất định, các biến thể kháng thể có một hoặc nhiều thay thế axit amin được đề xuất. Các vị trí quan tâm để gây đột biến thế bao gồm các HVR và các FR. Các thay thế bảo toàn được thể hiện trong Bảng 1 trong cột "các thay thế được ưu tiên". Các thay đổi cơ bản hơn nữa được đề xuất trong Bảng 1 trong cột "các thay thế điển hình", và như được mô tả thêm dưới đây cho các nhóm chuỗi bên axit amin. Các thay thế axit amin có thể được đưa vào kháng thể quan tâm và các sản phẩm được sàng lọc cho hoạt tính mong muốn, ví dụ, khả năng liên kết kháng nguyên được giữ lại/cải thiện, khả năng gây miễn dịch giảm đi, hoặc ADCC hoặc CDC được cải thiện.

Bảng 1

Gốc ban đầu	Các thay thế điển hình	Các thay thế được ưu tiên
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleuxin	Leu
Leu (L)	Norleuxin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr

Gốc ban đầu	Các thay thế điển hình	Các thay thế được ưu tiên
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleuxin	Leu

Các axit amin có thể được phân nhóm theo các tính chất chuỗi bên chung:

(1) kỵ nước: Norleuxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) ưa nước trung tính: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) tính axit: Asp, Glu;

(4) tính bazơ: His, Lys, Arg;

(5) các gốc có ảnh hưởng đến hướng chuỗi bên: Gly, Pro;

(6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Các thay thế không bảo toàn sẽ dẫn đến sự trao đổi một thành viên của một trong số các nhóm này cho một nhóm khác.

Một loại biến thể thay thế bao gồm thay thế một hoặc nhiều gốc của vùng siêu biến của kháng thể mẹ (ví dụ, kháng thể được làm giống người hoặc kháng thể của người). Thường, (các) biến thể thu được được chọn lọc để nghiên cứu tiếp sẽ có các cải biến (ví dụ, các cải tiến) ở một số tính chất sinh học nhất định (ví dụ, ái lực gia tăng, tính gây miễn dịch giảm) so với kháng thể mẹ và/hoặc gần như vẫn giữ được các tính chất sinh học nhất định của kháng thể mẹ. Biến thể thay thế điển hình là kháng thể được làm trưởng thành ái lực, kháng thể này có thể được tạo ra một cách thuận tiện, ví dụ, bằng cách sử dụng các kỹ thuật làm trưởng thành ái lực dựa vào việc biểu hiện thể thực khuẩn như các kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này. Vắn tắt là, một hoặc nhiều gốc HVR được gây đột biến và các kháng thể biến thể được biểu hiện trên thể thực khuẩn và được sàng lọc cho một hoạt tính sinh học cụ thể (ví dụ ái lực liên kết).

Các biến đổi (ví dụ, các thay thế) có thể được tạo ra ở các HVR, ví dụ, để cải thiện ái lực của kháng thể. Các biến đổi này có thể được tạo ra ở "các điểm nóng" của HVR, nghĩa là, các gốc được mã hoá bởi các codon chịu đột biến ở tần suất cao trong quá trình

trưởng thành tế bào soma (ví dụ, xem Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)), và/hoặc các gốc tiếp xúc kháng nguyên, với VH hoặc VL biến thể thu được được thử nghiệm về ái lực liên kết. Làm trưởng thành ái lực bằng cách tạo cấu trúc và tái chọn lọc từ các thư viện cấp hai đã được mô tả, ví dụ, trong in Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). Theo một số phương án làm trưởng thành ái lực, tính đa dạng được đưa vào các gen biến đổi được chọn để làm trưởng thành bằng phương pháp bất kỳ trong số nhiều phương pháp (ví dụ, PCR dễ tạo lỗi, xáo trộn mạch, hoặc gây đột biến định hướng bằng oligonucleotit). Sau đó, thư viện cấp hai được tạo ra. Thư viện này tiếp đó được sàng lọc để nhận diện các biến thể kháng thể bất kỳ có ái lực mong muốn. Một phương pháp khác để đưa tính đa dạng vào bao gồm các phương pháp được định hướng bởi HVR, trong đó một vài gốc HVR (ví dụ, 4-6 gốc một lần) được ngẫu nhiên hoá. Các gốc HVR tham gia vào việc liên kết kháng nguyên có thể được xác định cụ thể, ví dụ, bằng cách sử dụng kỹ thuật gây đột biến quét alanin hoặc tạo mô hình. Cụ thể, thường nhằm vào CDR-H3 và CDR-L3.

Theo các phương án nhất định, các thay thế, cài xen hoặc xóa đoạn có thể xảy ra trong phạm vi một hoặc nhiều HVR miễn là các biến đổi này không làm giảm đáng kể khả năng liên kết kháng nguyên của kháng thể. Ví dụ, các biến đổi bảo toàn (ví dụ, các thay thế bảo toàn như được đề xuất trong bản mô tả này) mà không làm giảm đáng kể ái lực liên kết có thể được tạo ra trong các HVR. Các biến đổi này có thể, ví dụ, nằm ngoài các gốc tiếp xúc kháng nguyên trong các HVR. Theo các phương án nhất định của các trình tự VH và VL biến thể đề xuất ở trên, mỗi HVR là không được biến đổi, hoặc chứa không nhiều hơn một, hai hoặc ba thay thế axit amin.

Phương pháp hữu ích để xác định các gốc hoặc các vùng của kháng thể mà có thể được nhắm đích để gây đột biến được gọi là "kỹ thuật gây đột biến quét alanin" như được mô tả bởi Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085. Theo phương pháp này, gốc hoặc nhóm các gốc đích (ví dụ, các gốc tích điện như arg, asp, his, lys, và glu) được xác định và thay thế bằng axit amin trung tính hoặc mang điện tích âm (ví dụ, alanin hoặc polyalanin) để xác định xem liệu tương tác của kháng thể với kháng nguyên có bị ảnh hưởng hay không. Các thay thế khác nữa có thể được đưa vào ở các vị trí axit amin thể hiện tính nhạy cảm chức năng với các thay thế ban đầu. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-kháng thể có thể được phân tích để xác

định các điểm tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên. Các gốc tiếp xúc này và các gốc lân cận có thể được nhắm đích hoặc loại bỏ như là các ứng viên cho sự thay thế. Có thể sàng lọc các biến thể để xác định xem chúng có chứa các tính chất mong muốn hay không.

Cài xen trình tự axit amin bao gồm các thể dung hợp đầu tận amino và/hoặc carboxyl có độ dài nằm trong khoảng từ một gốc đến các polypeptit chứa một trăm hoặc nhiều hơn một trăm gốc, cũng như các cài xen bên trong trình tự của một gốc axit amin đơn nhất hoặc nhiều gốc axit amin. Các ví dụ về cài xen đầu tận bao gồm kháng thể có gốc methionyl đầu tận N. Các biến thể cài xen khác của phân tử kháng thể bao gồm thể dung hợp của enzym (ví dụ đối với ADEPT) hoặc polypeptit mà làm tăng thời gian bán hủy trong huyết tương của kháng thể với đầu tận N hoặc C của kháng thể này.

b) Biến thể glycosyl hoá

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này được biến đổi để tăng hoặc giảm mức độ mà kháng thể được glycosyl hoá. Có thể bổ sung hoặc loại bỏ các vị trí glycosyl hoá ở kháng thể một cách thuận tiện bằng cách biến đổi trình tự axit amin sao cho một hoặc nhiều vị trí glycosyl hoá được tạo ra hoặc loại bỏ.

Trong trường hợp kháng thể chứa vùng Fc, có thể biến đổi hydrat cacbon gắn vào nó. Các kháng thể tự nhiên được sản sinh bởi các tế bào động vật có vú thường bao gồm oligosacarit hai râu, phân nhánh mà thường được gắn bằng liên kết N vào Asn297 của miền CH2 của vùng Fc. Ví dụ, xem Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997). Oligosacarit này có thể bao gồm nhiều loại hydrat cacbon khác nhau, ví dụ, manoza, N-axetyl glucosamin (GlcNAc), galactoza, và axit sialic, cũng như fucoza được gắn với GlcNAc ở "phần thân" của cấu trúc oligosacarit hai râu. Theo một số phương án, có thể tạo ra các cải biến oligosacarit ở kháng thể theo sáng chế để tạo ra các biến thể kháng thể có tính chất nhất định được cải thiện.

Theo một phương án, các biến thể kháng thể được đề xuất có cấu trúc hydrat cacbon không có fucoza gắn (trực tiếp hoặc gián tiếp) với vùng Fc. Ví dụ, lượng fucoza trong kháng thể này có thể từ 1% đến 80%, từ 1% đến 65%, từ 5% đến 65% hoặc từ 20% đến 40%. Lượng fucoza được xác định bằng cách tính lượng fucoza trung bình trong mạch đường ở Asn297, so với tổng số các cấu trúc glyco protein gắn vào Asn 297 (ví dụ, các cấu trúc manoza cao, lai và phức hợp) như được xác định bằng phương pháp đo phổ khối MALDI-TOF, như được mô tả trong, ví dụ, WO 2008/077546. Asn297 chỉ gốc

asparagin ở khoảng vị trí 297 trong vùng Fc (hệ đánh số EU các gốc vùng Fc); tuy nhiên, Asn297 cũng có thể ở vị trí khoảng +/- 3 axit amin về phía trước hoặc phía sau vị trí 297, nghĩa là, giữa các vị trí 294 và 300, do các biến thiên mức độ nhỏ về trình tự ở các kháng thể. Các biến thể fucosyl hoá này có thể có chức năng ADCC được cải thiện. Ví dụ, xem các Công bố sáng chế Mỹ số US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Ví dụ về các công bố liên quan đến các biến thể kháng thể "được khử fucosyl" hoặc "thiếu hụt fucoza" bao gồm: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Các ví dụ về các dòng tế bào có khả năng sản sinh các kháng thể được khử fucosyl bao gồm các tế bào Lec13 CHO thiếu hụt khả năng fucosyl hoá protein (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); Đơn sáng chế Mỹ số US 2003/0157108 A1, Presta, L; và WO 2004/056312 A1, Adams et al, đặc biệt là Ví dụ 11), và các dòng tế bào "bất hoạt", như gen alpha-1,6-fucosyltransferaza, FUT8, các tế bào CHO bất hoạt (ví dụ, xem Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); và WO2003/085107).

Các biến thể kháng thể còn được đề xuất với các oligosacarit được cắt đôi, ví dụ, trong đó oligosacarit hai râu được gắn với vùng Fc của kháng thể được cắt đôi bởi GlcNAc. Các biến thể kháng thể này có thể có mức fucosyl hoá giảm đi và/hoặc chức năng ADCC được cải thiện. Ví dụ về các biến thể kháng thể này được mô tả, ví dụ, trong WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); Patent Mỹ số 6,602,684 (Umana et al.); và US 2005/0123546 (Umana et al.). Các biến thể kháng thể có ít nhất một gốc galactoza ở oligosacarit gắn vào vùng Fc cũng được đề xuất. Các biến thể kháng thể này có thể có chức năng CDC được cải thiện. Các biến thể kháng thể này được mô tả, ví dụ, trong WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); và WO 1999/22764 (Raju, S.).

c) Biến thể vùng Fc

Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều cải biến axit amin có thể được đưa vào vùng Fc của kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này, nhờ đó tạo ra biến thể vùng

Fc. Biến thể vùng Fc có thể bao gồm trình tự vùng Fc của người (ví dụ, vùng Fc của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người) bao gồm cải biến axit amin (ví dụ, thay thế) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin.

Theo các phương án nhất định, sáng chế bao gồm biến thể kháng thể có một vài nhưng không phải tất cả các chức năng hiệu ứng, các chức năng này làm cho biến thể này trở thành biến thể ứng viên mong muốn cho các ứng dụng trong đó thời gian bán hủy của kháng thể *in vivo* là quan trọng cho dù một số chức năng hiệu ứng nhất định (như ADCC) là không cần thiết hoặc có hại. Có thể tiến hành các thử nghiệm gây độc tế bào *in vitro* và/hoặc *in vivo* để xác định các hoạt tính CDC và/hoặc ADCC. Ví dụ, có thể thực hiện các thử nghiệm liên kết thụ thể Fc (FcR) để xác nhận xem kháng thể có khả năng liên kết Fc gama R (do đó có thể có hoạt tính ADCC) và/hoặc khả năng liên kết FcRn hay không. Các tế bào sơ cấp để điều tiết ADCC, các tế bào NK, chỉ biểu hiện Fc gama RIII, trong khi đó các bạch cầu đơn nhân biểu hiện Fc gama RI, Fc gama RII và Fc gama RIII. Sự biểu hiện FcR trên các tế bào tạo huyết được tóm tắt trong Bảng 3 ở trang 464 của tài liệu: Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991) của Ravetch và Kinet. Các ví dụ không nhằm giới hạn về các thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm được mô tả trong Patent Mỹ số 5,500,362 (ví dụ, xem Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) và Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (xem Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Theo cách khác, có thể sử dụng các phương pháp thử nghiệm không có hoạt tính phóng xạ (ví dụ, xem thử nghiệm gây độc tế bào không có hoạt tính phóng xạ ACT1™ cho kỹ thuật tế bào dòng chảy (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; và thử nghiệm gây độc tế bào không có hoạt tính phóng xạ CytoTox 96 (nhãn hiệu được đăng ký bảo hộ) (Promega, Madison, WI). Các tế bào hiệu ứng hữu ích cho các thử nghiệm này bao gồm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và các tế bào giết tự nhiên (NK). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, có thể đánh giá *in vivo* hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm, ví dụ, ở mô hình động vật như mô hình được đề cập trong Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 652-656 (1998). Cũng có thể tiến hành các thử nghiệm liên kết C1q để xác nhận xem kháng thể này có khả năng liên kết C1q hay không và do đó có hoạt tính CDC hay không. Ví dụ, xem ELISA liên kết C1q và C3c trong WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá khả năng hoạt hoá bổ thể, có thể tiến hành thử nghiệm CDC (ví dụ, xem Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163

(1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); và Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). Cũng có thể tiến hành xác định khả năng liên kết FcRn và thời gian bán hủy/thanh thải *in vivo* bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, xem Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

Các kháng thể có chức năng hiệu ứng được cải biến bao gồm các kháng thể có thay thế một hoặc nhiều gốc vùng Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (Patent Mỹ số 6,737,056). Các thể đột biến Fc này bao gồm các thể đột biến Fc có các thay thế ở hai hoặc nhiều hơn hai vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm thể đột biến Fc được gọi là "DANA" có thay thế thế ở các gốc 265 và 297 thành alanin (Patent Mỹ số 7,332,581).

Các biến thể kháng thể nhất định có khả năng liên kết với các FcR biến đổi được mô tả. (Ví dụ, xem Patent Mỹ số 6,737,056; WO 2004/056312, và Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)).

Theo các phương án nhất định, biến thể kháng thể chứa vùng Fc có một hoặc nhiều thay thế axit amin mà làm biến đổi ADCC, ví dụ, các thay thế ở vị trí 298, 333, và/hoặc 334 của vùng Fc (hệ đánh số EU cho các gốc).

Theo một số phương án, các biến đổi được tạo ra ở vùng Fc mà dẫn đến khả năng liên kết C1q và/hoặc tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) được biến đổi (nghĩa là, tăng hoặc giảm), ví dụ, như được mô tả trong Patent Mỹ số 6,194,551, WO 99/51642, WO2011/091078, và Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Các kháng thể có thời gian bán hủy tăng và khả năng liên kết với thụ thể Fc mới sinh (FcRn) tăng, mà chịu trách nhiệm truyền các IgG của mẹ sang thai nhi Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) và Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), được mô tả trong US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Các kháng thể này chứa vùng Fc có một hoặc nhiều thay thế trong đó làm tăng khả năng liên kết của vùng Fc với FcRn. Các biến thể Fc này bao gồm các biến thể có các thay thế ở một hoặc nhiều gốc vùng Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 hoặc 434, ví dụ, thay thế ở gốc 434 vùng Fc (Patent Mỹ số 7,371,826).

Xem thêm Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); Patent Mỹ số 5,648,260;

Patent Mỹ số 5,624,821; và WO 94/29351 đề cập đến các ví dụ khác của biến thể vùng Fc.

Theo một phương án khác, kháng thể có thể chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế được mô tả chi tiết dưới đây trong bản mô tả này.

d) Biến thể kháng thể được xử lý kỹ thuật với xystein

Theo các phương án nhất định, có thể mong muốn tạo ra các kháng thể được xử lý kỹ thuật với xystein, ví dụ, các "thioMAb", trong đó một hoặc nhiều gốc của kháng thể được thay thế bằng gốc xystein. Theo các phương án cụ thể, các gốc được thay thế xuất hiện ở các vị trí có thể tiếp cận của kháng thể. Bằng cách thay thế các gốc đó bằng xystein, các nhóm thiol có tính phản ứng nhờ đó được đặt ở vị trí có thể tiếp cận của kháng thể và có thể được sử dụng để liên hợp kháng thể với các gốc khác, như các gốc dược chất hoặc các gốc dược chất-cầu nối, để tạo ra thể liên hợp miễn dịch, như được mô tả dưới đây trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều gốc bất kỳ trong số các gốc dưới đây có thể được thay thế bằng xystein: V205 (hệ đánh số của Kabat) của chuỗi nhẹ; A118 (hệ đánh số EU) của chuỗi nặng; và S400 (hệ đánh số EU) của vùng Fc chuỗi nặng. Các kháng thể được xử lý kỹ thuật với xystein có thể được tạo ra như mô tả trong, ví dụ, Patent Mỹ số 7,521,541.

e) Dẫn xuất kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này có thể còn được cải biến tiếp để chứa các gốc không phải là protein bổ sung đã biết trong lĩnh vực này và sẵn có. Các gốc thích hợp để tạo dẫn xuất cho kháng thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các polyme tan trong nước. Các ví dụ không giới hạn về các polyme tan trong nước bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), các copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymetylxenluloza, dextran, rượu polyvinylic, polyvinyl pyrolidon, poly-1, 3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme etylen/maleic anhydrit, các poly axit amin (homopolyme hoặc các copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrolidon)polyetylen glycol, polypropylen glycol homopolyme, các co-polyme polypropylen oxit/etylen oxit, các polyol được polyoxyetyl hoá (ví dụ, glyxerol), rượu polyvinylic, và hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có các ưu điểm trong sản xuất do độ ổn định trong nước của nó. Polyme có thể có khối lượng phân tử bất kỳ, và có thể có mạch nhánh hoặc không phân

nhánh. Số lượng các polyme gắn vào kháng thể có thể thay đổi, và nếu nhiều hơn một polyme được gắn vào, chúng có thể là các phân tử giống nhau hoặc khác nhau. Thường, số lượng và/hoặc loại polyme được sử dụng để tạo dẫn xuất có thể được xác định dựa trên các cân nhắc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tính chất hoặc chức năng cụ thể của kháng thể cần cải thiện, liệu dẫn xuất kháng thể có được sử dụng trong liệu pháp trong các điều kiện xác định hay không, v.v..

Theo một phương án khác, các thể liên hợp của kháng thể và gốc không phải là protein mà có thể được gia nhiệt chọn lọc bằng cách chiếu xạ được đề xuất. Theo một phương án, gốc không phải là protein là ống nano cacbon (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). Việc chiếu xạ có thể ở bước sóng bất kỳ, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bước sóng mà không gây hại đến các tế bào thông thường, mà gia nhiệt gốc không phải là protein đến nhiệt độ ở đó các tế bào ở gần gốc không phải là protein-kháng thể bị tiêu diệt.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập chứa vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập chứa vùng Fc biến thể không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập chứa vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể. Theo một vài khía cạnh, polypeptit là kháng thể. Theo một vài khía cạnh, polypeptit là protein dung hợp Fc. Theo các phương án nhất định, vùng Fc biến thể bao gồm ít nhất một biến đổi gốc axit amin (ví dụ, thay thế) so với trình tự tương ứng ở vùng Fc của trình tự biến thể tự nhiên hoặc trình tự tham chiếu (đôi khi được gọi chung trong bản mô tả này là vùng Fc "gốc"). Theo các phương án nhất định, vùng Fc biến thể theo sáng chế có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể so với vùng Fc gốc. Theo các phương án nhất định, vùng Fc biến thể theo sáng chế không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể so với vùng Fc gốc. Theo các phương án nhất định, FcγR là FcγR của người, FcγR của khỉ (ví dụ, FcγR của khỉ cynomolgus, khỉ rhesus, khỉ đuôi sóc, tinh tinh, hoặc khỉ đầu chó), hoặc FcγR của chuột.

Theo một khía cạnh, vùng Fc biến thể theo sáng chế có hoạt tính liên kết giảm đáng kể đối với một hoặc nhiều FcγR của người bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở FcγRIa, FcγRIIa (bao gồm các biến thể alen 167H và 167R), FcγRIIb, FcγRIIIa (bao gồm

các biến thể alen 158F và 158V), và FcγRIIIb (bao gồm các biến thể alen NA1 và NA2), so với vùng Fc gốc. Theo một khía cạnh khác, vùng Fc biến thể theo sáng chế có hoạt tính liên kết giảm đáng kể đối với FcγRIa, FcγRIIa (bao gồm các biến thể alen 167H và 167R), FcγRIIb, FcγRIIIa (bao gồm các biến thể alen 158F và 158V), và FcγRIIIb (bao gồm các biến thể alen NA1 và NA2) của người, so với vùng Fc gốc.

Theo một khía cạnh, vùng Fc biến thể theo sáng chế có hoạt tính liên kết giảm đáng kể đối với một hoặc nhiều FcγR của chuột bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở FcγRI, FcγRIIb, FcγRIII, và FcγRIV, so với vùng Fc gốc. Theo một khía cạnh khác, vùng Fc biến thể theo sáng chế có hoạt tính liên kết giảm đáng kể đối với FcγRI, FcγRIIb, FcγRIII, và FcγRIV của chuột, so với vùng Fc gốc.

"Các thụ thể Fcγ" (trong bản mô tả này, được gọi là các thụ thể Fcγ, FcγR hoặc FcgR) chỉ các thụ thể mà có thể liên kết với vùng Fc của các kháng thể đơn dòng IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4, và thực tế có nghĩa là thành viên bất kỳ của họ các protein được mã hoá bởi các gen thụ thể Fcγ. Ở người, họ này bao gồm FcγRI (CD64) bao gồm các đồng dạng FcγRIa, FcγRIb, và FcγRIc; FcγRII (CD32) bao gồm các đồng dạng FcγRIIa (bao gồm các alotyp H131 (typ H) và R131 (typ R)), FcγRIIb (bao gồm FcγRIIb-1 và FcγRIIb-2), và FcγRIIc; và FcγRIII (CD16) bao gồm các đồng dạng FcγRIIIa (bao gồm các alotyp V158 và F158), và FcγRIIIb (bao gồm các alotyp FcγRIIIb-NA1 và FcγRIIIb-NA2), và các FcγR bất kỳ của người, các đồng dạng hoặc alotyp FcγR chưa được phát hiện, nhưng không chỉ giới hạn ở các đồng dạng này. FcγRIIb1 và FcγRIIb2 đã được báo cáo là các biến thể ghép nối của FcγRIIb của người. Ngoài ra, biến thể ghép nối gọi là FcγRIIb3 đã được báo cáo (J Exp Med, 1989, 170: 1369-1385). Ngoài các biến thể ghép nối này, FcγRIIb của người bao gồm tất cả các biến thể ghép nối đã đăng ký với NCBI, đó là NP_001002273.1, NP_001002274.1, NP_001002275.1, NP_001177757.1, và NP_003992.3. Hơn nữa, FcγRIIb của người bao gồm mọi dạng đa hình di truyền đã được báo cáo trước đây, cũng như FcγRIIb (Arthritis Rheum. 48:3242-3252 (2003); Kono et al., Hum. Mol. Genet. 14:2881-2892 (2005); và Kyogoju et al., Arthritis Rheum. 46:1242-1254 (2002)), và mọi dạng đa hình di truyền sẽ được báo cáo trong tương lai.

Trong FcγRIIa, có hai alotyp, một alotyp trong đó axit amin ở vị trí 167 của FcγRIIa là histidin (typ H) và một alotyp trong đó axit amin ở vị trí 167 được thay thế bằng arginin (typ R) (Warrmerdam, J. Exp. Med. 172:19-25 (1990)).

FcγR bao gồm các FcγR thu được từ người, chuột nhắt, chuột cống, thỏ, và khỉ, nhưng không chỉ giới hạn ở các FcγR này, và có thể thu được từ sinh vật bất kỳ. Các FcγR của chuột nhắt bao gồm FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16), và FcγRIV (CD16-2), và các FcγR của chuột nhắt bất kỳ, hoặc các đồng dạng FcγR, nhưng không chỉ giới hạn ở các thụ thể này.

Trình tự axit amin của FcγRIa của người được nêu trong SEQ ID NO: 69; trình tự axit amin của FcγRIIa của người (167H) được nêu trong SEQ ID NO: 70; trình tự axit amin của FcγRIIa của người (167R) được nêu trong SEQ ID NO: 71; trình tự axit amin của FcγRIIb của người được nêu trong SEQ ID NO: 72; trình tự axit amin của FcγRIIIa của người (158F) được nêu trong SEQ ID NO: 73; trình tự axit amin của FcγRIIIa của người (158V) được nêu trong SEQ ID NO: 74; trình tự axit amin của FcγRIIIb của người (NA1) được nêu trong SEQ ID NO: 75; và trình tự axit amin của FcγRIIIb của người (NA2) được nêu trong SEQ ID NO: 76.

Trình tự axit amin của FcγRI của chuột được nêu trong SEQ ID NO: 77; trình tự axit amin của FcγRIIb của chuột được nêu trong SEQ ID NO: 78; trình tự axit amin của FcγRIII của chuột được nêu trong SEQ ID NO: 79; và trình tự axit amin của FcγRIV của chuột được nêu trong SEQ ID NO: 80.

Theo một khía cạnh, vùng Fc biến thể theo sáng chế có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể mà là nhỏ hơn 50%, nhỏ hơn 45%, nhỏ hơn 40%, nhỏ hơn 35%, nhỏ hơn 30%, nhỏ hơn 25%, nhỏ hơn 20%, nhỏ hơn 15%, nhỏ hơn 10%, nhỏ hơn 5%, nhỏ hơn 2%, nhỏ hơn 1%, nhỏ hơn 0,5%, nhỏ hơn 0,2%, hoặc nhỏ hơn 0,1% theo hàm của hoạt tính liên kết FcγR cho vùng Fc gốc. Theo một khía cạnh, vùng Fc biến thể theo sáng chế có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể, nghĩa là tỷ lệ giữa [chênh lệch các giá trị RU của biểu đồ cảm biến mà thay đổi trước và sau sự tương tác của FcγR với vùng Fc biến thể]/[chênh lệch các giá trị RU của biểu đồ cảm biến mà thay đổi trước và sau khi bắt giữ FcγR vào chip cảm biến] là nhỏ hơn 1, nhỏ hơn 0,8, nhỏ hơn 0,5, nhỏ hơn 0,3, nhỏ hơn 0,2, nhỏ hơn 0,1, nhỏ hơn 0,08, nhỏ hơn 0,05, nhỏ hơn 0,03, nhỏ hơn 0,02, nhỏ hơn 0,01, nhỏ hơn 0,008, nhỏ hơn 0,005, nhỏ hơn 0,003, nhỏ hơn 0,002, hoặc nhỏ hơn 0,001.

Theo một khía cạnh, vùng Fc biến thể theo sáng chế không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể, nghĩa là mức chênh lệch của hoạt tính liên kết C1q giữa vùng Fc biến thể và vùng Fc gốc của sáng chế là nhỏ hơn 50%, nhỏ hơn 45%, nhỏ hơn 40%, nhỏ hơn

35%, nhỏ hơn 30%, nhỏ hơn 25%, nhỏ hơn 20%, nhỏ hơn 15%, nhỏ hơn 10%, hoặc nhỏ hơn 5% theo hàm của hoạt tính liên kết C1q cho vùng Fc gốc.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập chứa vùng Fc biến thể có hoạt tính ADCC giảm đáng kể. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập chứa vùng Fc biến thể không có hoạt tính CDC giảm đáng kể. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập chứa vùng Fc biến thể có hoạt tính ADCC giảm đáng kể và không có hoạt tính CDC giảm đáng kể.

Theo một khía cạnh, vùng Fc biến thể theo sáng chế có hoạt tính ADCC giảm đáng kể mà nhỏ hơn 50%, nhỏ hơn 45%, nhỏ hơn 40%, nhỏ hơn 35%, nhỏ hơn 30%, nhỏ hơn 25%, nhỏ hơn 20%, nhỏ hơn 15%, nhỏ hơn 10%, nhỏ hơn 5%, nhỏ hơn 2%, nhỏ hơn 1%, nhỏ hơn 0,5%, nhỏ hơn 0,2%, hoặc nhỏ hơn 0,1% theo hàm của hoạt tính ADCC cho vùng Fc gốc.

Theo một khía cạnh, vùng Fc biến thể theo sáng chế không có hoạt tính CDC giảm đáng kể, nghĩa là mức chênh lệch của hoạt tính CDC giữa vùng Fc biến thể và vùng Fc gốc của sáng chế là nhỏ hơn 50%, nhỏ hơn 45%, nhỏ hơn 40%, nhỏ hơn 35%, nhỏ hơn 30%, nhỏ hơn 25%, nhỏ hơn 20%, nhỏ hơn 15%, nhỏ hơn 10%, hoặc nhỏ hơn 5% theo hàm của hoạt tính CDC cho vùng Fc gốc.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập chứa vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể, so với polypeptit chứa vùng Fc gốc. Theo các khía cạnh khác nữa, polypeptit của sáng chế chứa ít nhất một thay đổi axit amin của ít nhất một vị trí được chọn từ nhóm gồm: 234, 235, 236, 267, 268, 324, 326, 332, và 333, theo hệ đánh số EU.

Theo một khía cạnh, vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể bao gồm Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235 và ít nhất một thay đổi axit amin của ít nhất một vị trí được chọn từ nhóm gồm: 236, 267, 268, 324, 326, 332, và 333, theo hệ đánh số EU.

Theo một khía cạnh, vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể bao gồm Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235 và các thay đổi axit amin khác nữa ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí (a)-(c) sau đây: (a) các vị trí 267, 268, và 324; (b) các vị trí 236, 267, 268, 324, và 332; và (c) các vị trí 326

và 333, theo hệ đánh số EU.

Theo một khía cạnh khác, vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể bao gồm các axit amin được chọn từ nhóm gồm: (a) Glu ở vị trí 267; (b) Phe ở vị trí 268; (c) Thr ở vị trí 324; (d) Ala ở vị trí 236; (e) Glu ở vị trí 332; (f) Ala, Asp, Glu, Met, hoặc Trp ở vị trí 326; và (g) Ser ở vị trí 333, theo hệ đánh số EU.

Theo một khía cạnh, vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể bao gồm các axit amin: Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235, Ala ở vị trí 326, và Ser ở vị trí 333, theo hệ đánh số EU. Theo một khía cạnh, vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể bao gồm các axit amin: Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235, Asp ở vị trí 326, và Ser ở vị trí 333, theo hệ đánh số EU. Theo một khía cạnh, vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể bao gồm các axit amin: Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235, Glu ở vị trí 326, và Ser ở vị trí 333, theo hệ đánh số EU. Theo một khía cạnh, vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể bao gồm các axit amin: Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235, Met ở vị trí 326, và Ser ở vị trí 333, theo hệ đánh số EU. Theo một khía cạnh, vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể bao gồm các axit amin: Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235, Trp ở vị trí 326, và Ser ở vị trí 333, theo hệ đánh số EU.

Theo một khía cạnh khác, vùng Fc biến thể theo sáng chế có thể còn bao gồm ít nhất một thay đổi axit amin của ít nhất một vị trí được chọn từ nhóm gồm: 428, 434, 436, 438, và 440, theo hệ đánh số EU.

Theo một khía cạnh khác, vùng Fc biến thể có thể còn bao gồm các axit amin được chọn từ nhóm gồm: (a) Ala ở vị trí 434; (b) Ala ở vị trí 434, Thr ở vị trí 436, Arg ở vị trí 438, và Glu ở vị trí 440; (c) Leu ở vị trí 428, Ala ở vị trí 434, Thr ở vị trí 436, Arg ở vị trí 438, và Glu ở vị trí 440; và (d) Leu ở vị trí 428, Ala ở vị trí 434, Arg ở vị trí 438, và Glu ở vị trí 440, theo hệ đánh số EU (xem thêm WO2016/125495 mô tả mối liên quan giữa các thay đổi axit amin và hoạt tính liên kết FcRn của vùng Fc biến thể).

Theo một khía cạnh khác, vùng Fc biến thể theo sáng chế bao gồm các axit amin: Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235, Ala ở vị trí 326, Ser ở vị trí 333, Leu ở vị trí 428, Ala ở

vị trí 434, Thr ở vị trí 436, Arg ở vị trí 438, và Glu ở vị trí 440, theo hệ đánh số EU. Theo một khía cạnh khác, vùng Fc biến thể theo sáng chế bao gồm các axit amin: Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235, Ala ở vị trí 326, Ser ở vị trí 333, Leu ở vị trí 428, Ala ở vị trí 434, Arg ở vị trí 438, và Glu ở vị trí 440, theo hệ đánh số EU.

Theo một khía cạnh, tốt hơn là vùng Fc biến thể theo sáng chế không có hoạt tính liên kết FcRn tăng đáng kể, đặc biệt là ở độ pH=7,4, so với vùng Fc gốc.

"FcRn" là tương tự về mặt cấu trúc với các polypeptit của phức hợp tương hợp mô chính (MHC) lớp I, và thể hiện độ đồng nhất trình tự từ 22% đến 29% với các phân tử MHC lớp I. FcRn được biểu hiện dưới dạng heterodime gồm chuỗi β tan hoặc chuỗi nhẹ tan (β2 microglobulin) được tạo phức với chuỗi α xuyên màng hoặc chuỗi nặng xuyên màng. Tương tự MHC, chuỗi α của FcRn chứa ba miền ngoại bào (α1, α2, và α3), và miền bào tương ngắn của nó buộc chúng vào bề mặt tế bào. Các miền α1 và α2 tương tác với miền liên kết FcRn của vùng Fc của kháng thể. Polynucleotit và trình tự axit amin của FcRn của người có thể thu được, ví dụ, từ các tiền chất lần lượt được thể hiện trong NM_004107.4 và NP_004098.1 (chứa trình tự tín hiệu).

Trình tự axit amin của FcRn của người (chuỗi α) được nêu trong SEQ ID NO: 81; và trình tự axit amin của microglobulin β2 của người được nêu trong SEQ ID NO: 82.

Theo một khía cạnh, tốt hơn là vùng Fc biến thể theo sáng chế không có hoạt tính liên kết FcRn tăng đáng kể, đặc biệt là ở độ pH=7,4, hoạt tính này nhỏ hơn 1000 lần, nhỏ hơn 500 lần, nhỏ hơn 200 lần, nhỏ hơn 100 lần, nhỏ hơn 90 lần, nhỏ hơn 80 lần, nhỏ hơn 70 lần, nhỏ hơn 60 lần, nhỏ hơn 50 lần, nhỏ hơn 40 lần, nhỏ hơn 30 lần, nhỏ hơn 20 lần, nhỏ hơn 10 lần, nhỏ hơn 5 lần, nhỏ hơn 3 lần, hoặc nhỏ hơn 2 lần so với hoạt tính liên kết FcRn của vùng Fc gốc. Theo một khía cạnh, vùng Fc biến thể theo sáng chế không có hoạt tính liên kết FcRn tăng đáng kể, đặc biệt là ở độ pH=7,4, nghĩa là tỷ lệ giữa [mức chênh lệch các giá trị RU của các đồ thị cảm biến mà thay đổi trước và sau tương tác của FcRn với vùng Fc biến thể]/[mức chênh lệch các giá trị RU của các đồ thị cảm biến mà thay đổi trước và sau khi bắt giữ FcRn vào các chíp cảm biến] là nhỏ hơn 0,5, nhỏ hơn 0,3, nhỏ hơn 0,2, nhỏ hơn 0,1, nhỏ hơn 0,08, nhỏ hơn 0,05, nhỏ hơn 0,03, nhỏ hơn 0,02, nhỏ hơn 0,01, nhỏ hơn 0,008, nhỏ hơn 0,005, nhỏ hơn 0,003, nhỏ hơn 0,002, hoặc nhỏ hơn 0,001.

Theo một khía cạnh khác, vùng Fc biến thể theo sáng chế bao gồm thay đổi axit

amin bất kỳ trong số các thay đổi axit amin, đơn lẻ hoặc tổ hợp, được mô tả trong Bảng 4. Theo một khía cạnh khác, vùng Fc biến thể theo sáng chế bao gồm ít nhất một thay đổi axit amin bất kỳ trong số các thay đổi axit amin được mô tả trong Bảng 4. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polypeptit chứa trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 51-59.

Theo một số phương án, polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế là vùng hằng định chuỗi nặng của kháng thể. Theo một số phương án, polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế còn chứa miền liên kết kháng nguyên. Theo một phương án khác nữa, polypeptit là chuỗi nặng của kháng thể. Theo một phương án khác nữa, polypeptit là kháng thể. Theo các phương án nhất định, kháng thể là kháng thể khảm, hoặc kháng thể được làm giống người. Nguồn gốc của kháng thể là không bị giới hạn cụ thể, nhưng các ví dụ bao gồm kháng thể người, kháng thể của chuột nhắt, kháng thể của chuột cống, và kháng thể của thỏ. Theo một phương án khác nữa, polypeptit là protein dung hợp Fc.

Hai hoặc nhiều polypeptit chứa vùng Fc biến thể được mô tả trong bản mô tả này có thể được bao gồm trong một phân tử, trong đó hai polypeptit chứa các vùng Fc biến thể được kết hợp, tương tự ở kháng thể. Týp kháng thể không bị giới hạn, và IgA (IgA1, IgA2), IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), và IgM, hoặc kháng thể tương tự có thể được sử dụng.

Theo một số phương án, polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế là kháng thể. Theo các phương án khác, polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế là kháng thể kháng virut.

Theo các phương án khác, polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi của kháng thể bao gồm:

(a) (i) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 16, (ii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27, và (iii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13;

(b) (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13, và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 16;

(c) (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11, (ii) HVR-

H2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 13, (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 16, (iv) HVR-L1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21; (v) HVR-L2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24; và (vi) HVR-L3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27; hoặc

(d) (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21; (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24; và (iii) HVR-L3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27.

Theo các phương án khác, polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế bao gồm vùng biến đổi của kháng thể bao gồm:

(a) (i) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (ii) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10, và (iii) HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6;

(b) (i) HVR-H1 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (ii) HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, và (iii) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6;

(c) (i) HVR-H1 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (ii) HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (iii) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (iv) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; (v) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; và (vi) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10;

(d) (i) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; (ii) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; và (iii) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 10; hoặc

(e) (i) HVR-H1 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (ii) HVR-H2 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (iii) HVR-H3 từ trình tự VH được nêu trong SEQ ID NO: 6, (iv) HVR-L1 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7; (v) HVR-L2 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7; và (vi) HVR-L3 từ trình tự VL được nêu trong SEQ ID NO: 7.

Theo các phương án khác, polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế bao gồm vùng VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1 và vùng VL chứa

trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa vùng VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1 và vùng Fc biến thể chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 54 trong chuỗi nặng, và vùng VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7 trong chuỗi nhẹ. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa vùng VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1 và vùng Fc biến thể chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 58 trong chuỗi nặng, và vùng VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7 trong chuỗi nhẹ. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể chứa vùng VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1 và vùng Fc biến thể chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 59 trong chuỗi nặng, và vùng VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7 trong chuỗi nhẹ.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể kháng DENV được mô tả trong bản mô tả này, còn bao gồm polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế. Theo một số phương án, kháng thể kháng DENV theo sáng chế chứa vùng VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6 và vùng Fc biến thể chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 54 trong chuỗi nặng, và vùng VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 10 trong chuỗi nhẹ. Theo một số phương án, kháng thể kháng DENV theo sáng chế chứa vùng VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6 và vùng Fc biến thể chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 58 trong chuỗi nặng, và vùng VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 10 trong chuỗi nhẹ. Theo một số phương án, kháng thể kháng DENV theo sáng chế chứa vùng VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6 và vùng Fc biến thể chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 59 trong chuỗi nặng, và vùng VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 10 trong chuỗi nhẹ.

Theo một số phương án, kháng thể kháng DENV theo sáng chế chứa vùng VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6 và vùng Fc biến thể chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 59 trong chuỗi nặng, và vùng VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7 trong chuỗi nhẹ.

"Vùng Fc gốc" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ vùng Fc trước khi đưa vào (các) biến đổi axit amin được mô tả trong bản mô tả này. Các ví dụ được ưu tiên về vùng Fc gốc bao gồm các vùng Fc thu được từ các kháng thể tự nhiên. Các kháng thể bao

gồm, ví dụ, IgA (IgA1, IgA2), IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), và IgM, hoặc kháng thể tương tự kháng thể này. Các kháng thể có thể thu được từ người hoặc khỉ (ví dụ, khỉ cynomolgus, khỉ rhesus, khỉ đuôi sóc, tinh tinh, hoặc khỉ đầu chó). Các kháng thể tự nhiên cũng có thể bao gồm các đột biến có trong tự nhiên. Nhiều trình tự alotyp của các IgG do tính đa hình di truyền được mô tả trong "Sequences of proteins of immunological interest", NIH Publication No. 91-3242, và trình tự bất kỳ trong số các trình tự đó có thể được sử dụng trong sáng chế. Cụ thể là, đối với IgG1 của người, trình tự axit amin ở các vị trí từ 356 đến 358 (hệ đánh số EU) có thể là DEL hoặc EEM. Các ví dụ được ưu tiên của vùng Fc gốc bao gồm các vùng Fc thu được từ vùng hằng định chuỗi nặng của IgG1 của người (SEQ ID NO: 83), IgG2 của người (SEQ ID NO: 84), IgG3 của người (SEQ ID NO: 85), và IgG4 của người (SEQ ID NO: 86). Một ví dụ được ưu tiên khác của vùng Fc gốc là vùng Fc thu được từ vùng hằng định chuỗi nặng SG1 (SEQ ID NO: 87). Một ví dụ được tiên khác của vùng Fc gốc là vùng Fc thu được từ vùng hằng định chuỗi nặng SG182 (SEQ ID NO: 46). Hơn nữa, vùng Fc gốc có thể là vùng Fc được tạo ra bằng cách bổ sung (các) biến đổi axit amin mà không phải là (các) biến đổi axit amin được mô tả trong bản mô tả này vào vùng Fc thu được từ kháng thể tự nhiên.

Ngoài ra, các biến đổi axit amin được thực hiện cho (các) mục đích khác có thể được kết hợp trong vùng Fc biến thể được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, có thể bổ sung thêm các thay thế axit amin mà cải thiện hoạt tính liên kết FcRn (Hinton et al., *J. Immunol.* 176(1):346-356 (2006); Dall'Acqua et al., *J. Biol. Chem.* 281(33):23514-23524 (2006); Petkova et al., Intl. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006); Zalevsky et al., Nat. Biotechnol. 28(2):157-159 (2010); WO 2006/019447; WO 2006/053301; và WO 2009/086320), và các thay thế axit amin nhằm cải thiện tính không đồng nhất hoặc độ ổn định của kháng thể (WO 2009/041613). Theo cách khác, các polypeptit có tính chất tăng cường sự thải trừ kháng nguyên, mà được mô tả trong WO 2011/122011, WO 2012/132067, WO 2013/046704 hoặc WO 2013/180201, các polypeptit có tính chất liên kết đặc hiệu với mô đích, mà được mô tả trong WO 2013/180200, các polypeptit có tính chất liên kết lặp lại với nhiều phân tử kháng nguyên, mà được mô tả trong WO 2009/125825, WO 2012/073992 hoặc WO 2013/047752, có thể được kết hợp vào vùng Fc biến thể được mô tả trong bản mô tả này. Theo cách khác, nhằm mục đích mang lại khả năng liên kết với các kháng nguyên khác, các biến đổi axit amin đã bộc lộ trong

EP1752471 và EP1772465 có thể được kết hợp trong CH3 của vùng Fc biến thể được mô tả trong bản mô tả này. Theo cách khác, nhằm mục đích tăng thời gian lưu trong huyết tương, các biến đổi axit amin mà làm giảm pI của vùng hằng định (WO 2012/016227) có thể được kết hợp trong vùng Fc biến thể được mô tả trong bản mô tả này. Theo cách khác, nhằm mục đích tăng cường hấp thụ vào các tế bào, các biến đổi axit amin mà làm tăng pI của vùng hằng định (WO 2014/145159) có thể được kết hợp trong vùng Fc biến thể được mô tả trong bản mô tả này. Theo cách khác, nhằm mục đích tăng cường thải trừ phân tử đích từ huyết tương, các biến đổi axit amin mà làm tăng pI của vùng hằng định (WO2016/125495 và WO2016/098357) có thể được kết hợp trong vùng Fc biến thể được mô tả trong bản mô tả này.

Các biến đổi axit amin tăng cường hoạt tính liên kết FcRn của người ở độ pH axit cũng có thể được kết hợp trong vùng Fc biến thể được mô tả trong bản mô tả này. Cụ thể là, các biến đổi này có thể bao gồm, ví dụ, thay Met bằng Leu ở vị trí 428 và thay Asn bằng Ser ở vị trí 434, theo hệ đánh số EU (Nat Biotechnol, 2010, 28: 157-159); thay Asn bằng Ala ở vị trí 434 (Drug Metab Dispos, 2010 Apr; 38(4): 600-605); thay Met bằng Tyr ở vị trí 252, thay Ser bằng Thr ở vị trí 254 và thay Thr bằng Glu ở vị trí 256 (J Biol Chem, 2006, 281: 23514-23524); thay Thr bằng Gln ở vị trí 250 và thay Met bằng Leu ở vị trí 428 (J Immunol, 2006, 176(1): 346-356); thay thế Asn bằng His ở vị trí 434 (Clin Pharmacol Ther, 2011, 89(2): 283-290), và các biến đổi được mô tả trong WO2010/106180, WO2010/045193, WO2009/058492, WO2008/022152, WO2006/050166, WO2006/053301, WO2006/031370, WO2005/123780, WO2005/047327, WO2005/037867, WO2004/035752, WO2002/060919, hoặc các biến đổi tương tự. Theo một phương án khác, các biến đổi này có thể bao gồm, ví dụ, ít nhất một biến đổi được chọn từ nhóm gồm thay Met bằng Leu ở vị trí 428, thay Asn bằng Ala ở vị trí 434 và thay Tyr bằng Thr ở vị trí 436. Các biến đổi này còn có thể bao gồm thay Gln bằng Arg ở vị trí 438 và/hoặc thay Ser bằng Glu ở vị trí 440 (WO2016/125495).

Theo sáng chế, biến đổi axit amin nghĩa là biến đổi bất kỳ trong số biến đổi thay thế, xóa đoạn, bổ sung, cài xen, và cải biến, hoặc tổ hợp của chúng. Theo sáng chế, biến đổi axit amin có thể nói theo cách khác là đột biến axit amin.

Các biến đổi axit amin được tạo ra bằng nhiều phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Các phương pháp này bao gồm phương

pháp gây đột biến định hướng vị trí (Hashimoto-Gotoh et al., Gene 152:271-275 (1995); Zoller, Meth. Enzymol. 100:468-500 (1983); Kramer et al., Nucleic Acids Res. 12: 9441-9456 (1984)); Kramer and Fritz, Methods Enzymol. 154: 350-367 (1987); và Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985)), phương pháp đột biến PCR, và phương pháp đột biến cat-xet, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này.

Số lượng các biến đổi axit amin được đưa vào vùng Fc không bị giới hạn. Theo các phương án nhất định, số lượng này có thể là 1, 2 hoặc ít hơn, 3 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, 5 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 10 hoặc ít hơn, 12 hoặc ít hơn, 14 hoặc ít hơn, 16 hoặc ít hơn, 18 hoặc ít hơn, hoặc 20 hoặc ít hơn.

Hơn nữa, polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế có thể được cải biến hoá học bằng nhiều loại phân tử như polyetylen glycol (PEG) và các chất gây độc tế bào. Các phương pháp để cải biến hoá học polypeptit được thiết lập trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án, polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế là kháng thể hoặc là protein dung hợp Fc chứa (các) miền mà có thể liên kết với kháng nguyên bất kỳ. Ví dụ về các kháng nguyên mà có thể được liên kết bởi các kháng thể này và các protein dung hợp Fc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các phối tử (các xytokin, chemokin, và các chất tương tự các chất này), các thụ thể, các kháng nguyên ung thư, các kháng nguyên virut, các kháng nguyên MHC, các kháng nguyên biệt hoá, các globulin miễn dịch, và các phức hợp miễn dịch chứa một phần globulin miễn dịch.

B. Phương pháp tái tổ hợp và chế phẩm

Theo một ví dụ, sáng chế đề cập tới quy trình bào chế kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

(a) kết hợp trình tự biến thể VH như được mô tả trong bản mô tả này với trình tự CH của IgG1 của người như được mô tả trong bản mô tả này;

(b) kết hợp trình tự biến thể VL như được mô tả trong bản mô tả này, với trình tự CL của người SK1;

(c) tách dòng mỗi một trong số các tổ hợp này vào vectơ biểu hiện;

(d) biểu hiện vectơ biểu hiện thu được trong các tế bào đồng chuyển nhiễm (tế bào chủ); và

(e) tinh chế kháng thể thu được từ bước (d).

Trong các ví dụ nhất định, tế bào chủ là CHO-DXB11, CHO-K1 hoặc CHO-DG44. Tế bào chủ này có thể là tế bào biểu hiện chất vận chuyển taurin, thu được bằng cách đưa ADN mã hoá chất vận chuyển taurin vào (WO2007/119774). Các vectơ có thể được sử dụng để sản xuất các kháng thể này là đã biết trong lĩnh vực này. Thường, các kháng thể có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các chế phẩm và phương pháp tái tổ hợp, ví dụ, như được mô tả trong Patent Mỹ số 4,816,567. Theo một phương án, axit nucleic được phân lập mã hoá kháng thể kháng DENV được mô tả trong bản mô tả này được đề xuất. Theo một phương án khác, axit nucleic được phân lập mã hoá polypeptit chứa vùng Fc biến thể hoặc vùng Fc gốc được mô tả trong bản mô tả này được đề xuất. Axit nucleic này có thể mã hoá trình tự axit amin bao gồm VL và/hoặc trình tự axit amin bao gồm VH của kháng thể (ví dụ, các chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể). Theo một phương án khác nữa, một hoặc nhiều vectơ (ví dụ, các vectơ biểu hiện) chứa axit nucleic này được đề xuất. Theo một phương án khác nữa, tế bào chủ chứa axit nucleic này được đề xuất. Theo một phương án này, tế bào chủ chứa (ví dụ, đã được biến nạp với): (1) vectơ chứa axit nucleic mã hoá trình tự axit amin bao gồm VL của kháng thể và trình tự axit amin bao gồm VH của kháng thể này, hoặc (2) vectơ thứ nhất chứa axit nucleic mã hoá trình tự axit amin bao gồm VL của kháng thể và vectơ thứ hai chứa axit nucleic mã hoá trình tự axit amin bao gồm VH của kháng thể này. Theo một phương án, tế bào chủ là có nhân điển hình, ví dụ tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) hoặc tế bào lympho (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp2/0). Theo một phương án, phương pháp tạo ra kháng thể kháng DENV được đề xuất, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ chứa axit nucleic mã hoá kháng thể, như đề xuất ở trên, trong điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể này, và tuỳ ý thu hồi kháng thể từ tế bào chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chủ). Theo một phương án khác, phương pháp tạo ra polypeptit chứa vùng Fc biến thể hoặc vùng Fc gốc được đề xuất, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ chứa (các) axit nucleic mã hoá polypeptit như kháng thể, vùng Fc, hoặc vùng Fc biến thể, như đề xuất ở trên, trong điều kiện thích hợp để biểu hiện polypeptit này, và tuỳ ý thu hồi polypeptit này từ tế bào chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chủ).

Để sản xuất tái tổ hợp kháng thể kháng DENV, axit nucleic mã hoá kháng thể, ví

dụ, như được mô tả ở trên, được phân lập và chèn vào một hoặc nhiều vectơ để tách dòng tiếp và/hoặc biểu hiện ở tế bào chủ. Để sản xuất tái tổ hợp vùng Fc, axit nucleic mã hoá vùng Fc được phân lập và chèn vào một hoặc nhiều vectơ để tách dòng tiếp và/hoặc biểu hiện ở tế bào chủ. Axit nucleic này có thể dễ dàng được phân lập và giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng các đoạn dò oligonucleotit mà có khả năng liên kết đặc hiệu với các gen mã hoá các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể).

Các tế bào chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện các vectơ mã hoá kháng thể bao gồm các tề bào chưa có nhân hoặc có nhân điển hình được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, các kháng thể có thể được sản xuất ở vi khuẩn, cụ thể là khi phản ứng glycosyl hoá và chức năng hiệu ứng Fc là không cần thiết. Để biểu hiện các mảnh kháng thể và các polypeptit ở vi khuẩn, ví dụ, xem các Patent Mỹ số 5,648,237, 5,789,199, và 5,840,523. (xem cả Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, mô tả sự biểu hiện các mảnh kháng thể ở E. coli). Sau khi biểu hiện, có thể phân lập kháng thể từ khối tế bào vi khuẩn ở phân đoạn hoà tan và có thể được tinh chế tiếp.

Ngoài các tế bào chưa có nhân, vi sinh vật có nhân điển hình như nấm sợi hoặc nấm men là các vật chủ tách dòng hoặc biểu hiện thích hợp cho các vectơ mã hoá kháng thể, bao gồm các chủng nấm và nấm men mà con đường glycosyl hoá của chúng đã "được làm giống người", dẫn đến sản sinh kháng thể có kiểu mẫu glycosyl hoá của người một phần hoặc hoàn toàn. Xem Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004) và Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006).

Các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể được glycosyl hoá cũng thu được từ sinh vật đa bào (động vật không có xương sống và động vật có xương sống). Các ví dụ về tế bào động vật không có xương sống bao gồm các tế bào thực vật và côn trùng. Nhiều chủng baculovirut đã được xác định mà có thể được sử dụng kết hợp với các tế bào côn trùng, cụ thể là để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Cũng có thể sử dụng các môi trường nuôi cấy tế bào thực vật làm vật chủ. Ví dụ, xem các Patent Mỹ số 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, và 6,417,429 (mô tả công nghệ PLANTIBODIES™ để sản xuất kháng thể ở các thực vật chuyển gen).

Cũng có thể sử dụng các tế bào động vật có xương sống làm vật chủ. Ví dụ, các

dòng tế bào động vật có vú mà được làm thích ứng để sinh trưởng trong hỗn dịch có thể là hữu ích. Ví dụ khác về các dòng tế bào chủ của động vật có vú hữu ích là dòng CV1 của thận khỉ được biến nạp bởi SV40 (COS-7); dòng tế bào thận phôi người (293 hoặc tế bào 293 như được mô tả, ví dụ, trong Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); tế bào thận chuột đồng con (BHK); tế bào sertoli của chuột (các tế bào TM4 như được mô tả, ví dụ, trong Biol. Reprod. 23:243-251 (1980) của Mather); tế bào thận khỉ (CV1); tế bào thận khỉ xanh châu Phi (VERO-76); tế bào caxinom cổ tử cung của người (HELA); tế bào thận của chó (MDCK); tế bào gan của chuột buffalo (BRL 3A); tế bào phổi của người (W138); tế bào gan của người (Hep G2); khối u vú của chuột (MMT 060562); tế bào TRI, như được mô tả, ví dụ, trong Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982); tế bào MRC 5; và tế bào FS4. Các dòng tế bào chủ của động vật có vú hữu ích khác bao gồm tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), bao gồm các tế bào DHFR$^-$ CHO (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); và các dòng tế bào u tuỷ như Y0, NS0 và Sp2/0. Để xem lại về các dòng tế bào chủ của động vật có vú thích hợp để sản xuất kháng thể, ví dụ, xem Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

Các kháng thể đa dòng tốt hơn là được tạo ra ở động vật bằng cách tiêm kháng nguyên thích hợp và tá dược dưới da (sc) hoặc trong màng bụng (ip) nhiều lần. Có thể hữu ích khi liên hợp kháng nguyên thích hợp với protein gây miễn dịch ở các loài cần được gây miễn dịch, ví dụ, hemoxyanin của ốc biển keyhole limpet (*Megathura crenulata*), albumin huyết thanh, thyroglobulin của bò, hoặc chất ức chế trypsin đậu tương bằng cách sử dụng chất hai chức hoặc chất tạo dẫn xuất, ví dụ, maleimidobenzoyl sulfosuxinimit este (liên hợp qua các gốc xystein), N-hydroxysuxinimit (qua các gốc lysin), glutaraldehyt, anhydrit của axit suxinic, $SOCl_2$, hoặc $R^1N{=}C{=}NR$, trong đó R và R^1 là các nhóm alkyl khác nhau.

Các động vật (thường là các động vật có vú không phải là người) được gây miễn dịch kháng lại kháng nguyên, các thể liên hợp gây miễn dịch, hoặc các dẫn xuất bằng cách kết hợp, ví dụ, 100 µg hoặc 5 µg protein hoặc thể liên hợp (lần lượt cho thỏ hoặc chuột nhắt) với 3 thể tích tá dược hoàn chỉnh của Freund và tiêm dung dịch này trong da ở nhiều vị trí. Một tháng sau, các con vật này được tiêm mũi nhắc lại với lượng bằng từ 1/5 đến 1/10 lượng ban đầu của peptit hoặc thể liên hợp trong tá dược hoàn chỉnh của

Freund bằng cách tiêm dưới da ở nhiều vị trí. 7 đến 14 ngày sau đó, các con vật này được lấy máu và huyết thanh được phân tích về hiệu giá kháng thể. Các con vật được tiêm nhắc lại cho đến khi hiệu giá ổn định. Tốt hơn là, con vật được tiêm nhắc lại bằng thể liên hợp của cùng một kháng nguyên, nhưng được liên hợp với một protein khác và/hoặc thông qua chất phản ứng liên kết ngang khác. Các thể liên hợp cũng có thể được tạo ra trong môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp dưới dạng các thể dung hợp protein. Các chất kết tụ, như phèn, cũng được sử dụng thích hợp để tăng cường đáp ứng miễn dịch.

Các kháng thể đơn dòng thu được từ quần thể các kháng thể gần như đồng nhất, nghĩa là các kháng thể đơn lẻ tạo thành quần thể này là tương đồng, trừ các đột biến có trong tự nhiên có thể có và/hoặc các cải biến sau dịch mã (ví dụ, đồng phân hoá, amit hoá) mà có thể có mặt với những lượng nhỏ. Do đó, từ bổ nghĩa "đơn dòng" chỉ đặc tính của kháng thể không phải là hỗn hợp của các kháng thể riêng biệt.

Ví dụ, có thể tạo ra các kháng thể đơn dòng bằng cách sử dụng phương pháp lai lần đầu tiên được mô tả bởi Kohler et al., Nature 256(5517):495-497 (1975). Trong phương pháp lai, chuột nhắt hoặc động vật chủ thích hợp khác, như chuột đồng, được gây miễn dịch như được mô tả ở trên để kích thích các lympho bào mà sản sinh hoặc có khả năng sản xuất kháng thể sẽ liên kết đặc hiệu với protein được sử dụng để gây miễn dịch. Theo cách khác, các lympho bào có thể được gây miễn dịch *in vitro*.

Chất gây miễn dịch thường sẽ bao gồm protein có tính kháng nguyên hoặc biến thể dung hợp của nó. Thường, các lympho bào máu ngoại vi (PBL) được sử dụng nếu mong muốn các tế bào có nguồn gốc của người, hoặc các tế bào lá lách hoặc tế bào hạch bạch huyết được sử dụng nếu mong muốn các nguồn động vật có vú không phải là người. Các lympho bào tiếp đó được dung hợp với dòng tế bào được làm bất tử bằng cách sử dụng chất dung hợp thích hợp, như polyetylen glycol, để tạo thành tế bào lai (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986), pp. 59-103).

Các dòng tế bào được làm bất tử thường là các tế bào của động vật có vú được biến nạp, cụ thể là các tế bào u tuỷ có nguồn gốc từ loài gặm nhấm, bò và người. Thường, các dòng tế bào u tuỷ của chuột cống hoặc chuột nhắt được sử dụng. Các tế bào lai được tạo ra như trên được gieo và nuôi trong môi trường nuôi cấy thích hợp mà tốt hơn là chứa một hoặc nhiều chất mà ức chế sự sinh trưởng hoặc sống sót của các tế bào u tuỷ gốc không được dung hợp. Ví dụ, nếu tế bào u tuỷ gốc thiếu enzym hypoxanthin guanin

phosphoribosyl transferaza (HGPRT hoặc HPRT), môi trường nuôi cấy cho các tế bào lai này thường sẽ bao gồm hypoxanthin, aminopterin, và thymidin (môi trường HAT), mà là các chất ngăn ngừa sự phát triển của các tế bào thiếu hụt HGPRT.

Các tế bào u tuỷ được làm bất tử được ưu tiên là các tế bào mà dung hợp có hiệu quả, hỗ trợ sản sinh kháng thể ở mức cao, ổn định bởi các tể bào sản xuất kháng thể đã chọn, và nhạy cảm với môi trường như môi trường HAT. Trong số các tế bào này, được ưu tiên là các dòng tế bào u tuỷ của chuột, như các dòng tế bào thu được từ khối u của chuột nhắt MOPC-21 và MPC-11 sẵn có từ Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, và các tế bào SP-2 (và các dẫn xuất của chúng, ví dụ, X63-Ag8-653) sẵn có từ Bộ sưu tập chủng chuẩn của Mỹ, Manassas, Virginia, Mỹ. Các dòng tế bào u tuỷ của người và u tuỷ khác loại của chuột-người cũng được được mô tả để sản xuất các kháng thể đơn dòng của người (Kozbor et al. J. Immunol. 133(6):3001-3005 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 51-63 (1987)).

Môi trường nuôi cấy trong đó các tế bào lai sinh trưởng được thử nghiệm về khả năng sản sinh các kháng thể đơn dòng nhằm kháng lại kháng nguyên. Tốt hơn là, tính đặc hiệu liên kết của các kháng thể đơn dòng được sản xuất bởi các tế bào lai được xác định bằng thử nghiệm kết tủa miễn dịch hoặc bằng thử nghiệm liên kết *in vitro*, như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA). Các kỹ thuật và thử nghiệm này là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, có thể xác định ái lực liên kết bằng phân tích Scatchard của tài liệu Munson, Anal. Biochem. 107(1):220-239 (1980).

Sau khi các tế bào lai được xác định là sản sinh các kháng thể có tính đặc hiệu, ái lực và/hoặc hoạt tính mong muốn, các dòng có thể được tách dòng phụ bằng các quy trình pha loãng giới hạn và được nuôi bằng các phương pháp tiêu chuẩn (Goding, như nêu trên). Môi trường nuôi cấy thích hợp cho mục đích này bao gồm, ví dụ, môi trường D-MEM hoặc RPMI-1640. Ngoài ra, các tế bào lai có thể được nuôi *in vivo* dưới dạng các khối u ở động vật có vú.

Các kháng thể đơn dòng được tiết ra bởi các dòng phụ được phân tách thích hợp từ môi trường nuôi cấy, dịch cổ trướng, hoặc huyết thanh bằng các quy trình tinh chế globulin miễn dịch thông thường, như, ví dụ, protein A-Sepharose, sắc ký hydroxyapatit,

điện di gel, thẩm tách, hoặc sắc ký ái lực.

Vùng Fc có thể thu được bằng cách tái rửa giải phân đoạn được hấp phụ lên cột protein A sau khi cắt một phần các kháng thể đơn dòng IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 hoặc bằng cách sử dụng proteaza như pepsin. Proteaza không bị giới hạn cụ thể miễn là nó có thể cắt kháng thể có độ dài đầy đủ sao cho Fab và F(ab')2 sẽ được tạo ra theo cách giới hạn bằng cách thiết lập thích hợp các điều kiện phản ứng của enzym, như độ pH, và các ví dụ bao gồm pepsin và papain.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất polypeptit chứa vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể so với polypeptit chứa vùng Fc gốc, bao gồm bước đưa ít nhất một biến đổi axit amin vào vùng Fc gốc. Theo một vài khía cạnh, polypeptit được sản xuất là kháng thể. Theo các phương án nhất định, kháng thể là kháng thể khảm, hoặc kháng thể được làm giống người. Theo một vài khía cạnh, polypeptit được sản xuất là protein dung hợp Fc.

Theo một khía cạnh, ít nhất một axit amin được biến đổi trong phương pháp nêu trên để sản xuất polypeptit chứa vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể, ở ít nhất một vị trí được chọn từ nhóm gồm: 234, 235, 236, 267, 268, 324, 326, 332, và 333, theo hệ đánh số EU.

Theo một khía cạnh khác, hai axit amin được biến đổi trong phương pháp nêu trên để sản xuất polypeptit chứa vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể, ở các vị trí 234 và 235.

Theo một khía cạnh khác, các axit amin được biến đổi trong phương pháp nêu trên để sản xuất polypeptit chứa vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể, các biến đổi bao gồm: (a) hai biến đổi axit amin ở các vị trí 234 và 235, và (b) ít nhất một biến đổi axit amin ở ít nhất một vị trí được chọn từ nhóm gồm: 236, 267, 268, 324, 326, 332, và 333, theo hệ đánh số EU.

Theo một khía cạnh khác, các axit amin được biến đổi trong phương pháp nêu trên để sản xuất polypeptit chứa vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể, các biến đổi bao gồm: (a) hai biến đổi axit amin ở các vị trí 234 và 235, và (b) ít nhất một biến đổi axit amin ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí (i)-(iii) sau: (i) các vị trí 267, 268, và 324; (ii) các vị trí 236, 267, 268, 324, và

332; và (iii) các vị trí 326 và 333, theo hệ đánh số EU.

Theo một khía cạnh khác, biến đổi axit amin trong phương pháp nêu trên để sản xuất polypeptit chứa vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể, được chọn ở mỗi vị trí từ nhóm bao gồm: (a) Ala ở vị trí 234; (b) Ala ở vị trí 235; (c) Glu ở vị trí 267; (d) Phe ở vị trí 268; (e) Thr ở vị trí 324; (f) Ala ở vị trí 236; (g) Glu ở vị trí 332; (h) Ala, Asp, Glu, Met, Trp ở vị trí 326; và (i) Ser ở vị trí 333, theo hệ đánh số EU.

Theo một khía cạnh khác, các biến đổi axit amin trong phương pháp nêu trên để sản xuất polypeptit chứa vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể, là: Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235, Ala ở vị trí 326, và Ser ở vị trí 333; theo hệ đánh số EU. Theo một khía cạnh khác, các biến đổi axit amin trong phương pháp nêu trên để sản xuất polypeptit chứa vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể, là: Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235, Asp ở vị trí 326, và Ser ở vị trí 333; theo hệ đánh số EU. Theo một khía cạnh khác, các biến đổi axit amin trong phương pháp nêu trên để sản xuất polypeptit chứa vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể, và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể, là: Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235, Glu ở vị trí 326, và Ser ở vị trí 333; theo hệ đánh số EU. Theo một khía cạnh khác, các biến đổi axit amin trong phương pháp nêu trên để sản xuất polypeptit chứa vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể, và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể, là: Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235, Met ở vị trí 326, và Ser ở vị trí 333; theo hệ đánh số EU. Theo một khía cạnh khác, các biến đổi axit amin trong phương pháp nêu trên để sản xuất polypeptit chứa vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể, và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể, là: Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235, Trp ở vị trí 326, và Ser ở vị trí 333; theo hệ đánh số EU.

Theo một khía cạnh khác, ít nhất một axit amin được biến đổi tiếp trong phương pháp nêu trên, ở ít nhất một vị trí được chọn từ nhóm gồm: 428, 434, 436, 438, và 440, theo hệ đánh số EU.

Theo một khía cạnh khác, biến đổi axit amin trong phương pháp nêu trên còn được chọn từ các biến đổi từ (a) đến (d) sau đây: (a) Ala ở vị trí 434; (b) Ala ở vị trí 434, Thr ở vị trí 436, Arg ở vị trí 438, và Glu ở vị trí 440; (c) Leu ở vị trí 428, Ala ở vị trí 434, Thr

ở vị trí 436, Arg ở vị trí 438, và Glu ở vị trí 440; và (d) Leu ở vị trí 428, Ala ở vị trí 434, Arg ở vị trí 438, và Glu ở vị trí 440, theo hệ đánh số EU (xem cả WO2016/125495 mô tả mối liên quan giữa các biến đổi axit amin và hoạt tính liên kết FcRn của vùng Fc biến thể).

Theo một khía cạnh khác, các biến đổi axit amin trong phương pháp nêu trên là: Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235, Ala ở vị trí 326, Ser ở vị trí 333, Leu ở vị trí 428, Ala ở vị trí 434, Thr ở vị trí 436, Arg ở vị trí 438, và Glu ở vị trí 440, theo hệ đánh số EU. Theo một khía cạnh khác, các biến đổi axit amin trong phương pháp nêu trên là: Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235, Ala ở vị trí 326, Ser ở vị trí 333, Leu ở vị trí 428, Ala ở vị trí 434, Arg ở vị trí 438, và Glu ở vị trí 440, theo hệ đánh số EU.

Theo một khía cạnh, tốt hơn là vùng Fc biến thể theo sáng chế không có hoạt tính liên kết FcRn tăng đáng kể, đặc biệt là ở độ pH=7,4, so với vùng Fc gốc.

Theo một khía cạnh khác, các biến đổi axit amin trong các phương pháp sản xuất nêu trên được chọn từ biến đổi đơn nhất bất kỳ, tổ hợp của các biến đổi đơn nhất, hoặc tổ hợp các biến đổi được mô tả trong Bảng 4.

Các polypeptit chứa vùng Fc biến thể được sản xuất bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên hoặc các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này đều được bao gồm trong sáng chế.

C. Thử nghiệm

Các kháng thể kháng DENV được đề xuất trong bản mô tả này có thể được nhận diện, sàng lọc, hoặc mô tả cho các tính chất vật lý/hoá học và/hoặc các hoạt tính sinh học bằng nhiều loại thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực này.

Các vùng Fc biến thể được đề xuất trong bản mô tả này có thể được nhận diện, sàng lọc, hoặc mô tả cho các tính chất vật lý/hoá học và/hoặc các hoạt tính sinh học bằng nhiều loại thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực này.

1. Thử nghiệm liên kết và các thử nghiệm khác

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó, ví dụ, bằng các phương pháp đã biết, như ELISA, thẩm tách Western, *v.v.*. Theo một khía cạnh, polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó, ví dụ, bằng các phương pháp đã

biết như ELISA, thẩm tách Western, *v.v.*.

Theo một khía cạnh khác, các thử nghiệm cạnh tranh có thể được sử dụng để nhận diện kháng thể mà cạnh tranh để liên kết với DENV và/hoặc protein E của DENV với kháng thể kháng DENV bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, khi kháng thể cạnh tranh này có mặt với lượng dư, nó phong bế (ví dụ, làm giảm) khả năng liên kết của kháng thể tham chiếu với DENV và/hoặc protein E của DENV ít nhất là 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% hoặc hơn nữa. Trong một vài trường hợp, khả năng liên kết bị ức chế ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc hơn nữa. Theo các phương án nhất định, kháng thể cạnh tranh này liên kết vào cùng epitop (ví dụ, epitop mạch thẳng hoặc cấu hình) mà được liên kết bởi kháng thể kháng DENV được mô tả trong bản mô tả này. Các phương pháp minh hoạ chi tiết để lập bản đồ epitop mà kháng thể liên kết vào đó được đề xuất trong Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

Trong thử nghiệm cạnh tranh minh hoạ, DENV hoặc protein E của DENV cố định được ủ trong dung dịch bao gồm kháng thể được đánh dấu thứ nhất mà liên kết với DENV và/hoặc protein E của DENV và kháng thể không được đánh dấu thứ hai mà đang được thử nghiệm về khả năng cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để liên kết với DENV hoặc protein E của DENV. Kháng thể thứ hai có thể có mặt trong dịch nổi bề mặt tế bào lai. Để làm đối chứng, DENV hoặc protein E của DENV cố định được ủ trong dung dịch bao gồm kháng thể được đánh dấu thứ nhất nhưng không có kháng thể không được đánh dấu thứ hai. Sau khi ủ trong điều kiện cho phép liên kết kháng thể thứ nhất với DENV hoặc protein E của DENV, kháng thể không liên kết còn dư được loại bỏ, và lượng chất đánh dấu kết hợp với DENV hoặc protein E của DENV cố định được xác định. Nếu lượng chất đánh dấu kết hợp với DENV hoặc protein E của DENV cố định giảm đáng kể trong mẫu thử so với mẫu đối chứng, thì điều đó cho thấy là kháng thể thứ hai cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để liên kết với DENV hoặc protein E của DENV. Xem Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Các thử nghiệm để xác định hoạt tính liên kết của polypeptit chứa vùng Fc biến thể đối với một hoặc nhiều thành viên của họ FcR được mô tả trong bản mô tả này hoặc

là đã biết trong lĩnh vực này. Các thử nghiệm liên kết này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở phân tích BIACORE®, sử dụng hiện tượng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR), sàng lọc thử nghiệm đồng nhất lân cận phát quang khuếch đại (ALPHA), ELISA, và phân loại tế bào được kích hoạt huỳnh quang (FACS) (Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103(11): 4005-4010).

Theo một phương án, phân tích BIACORE® có thể được sử dụng để đánh giá xem hoạt tính liên kết của polypeptit chứa vùng Fc biến thể có được tăng cường, hay duy trì hay giảm đi hay không so với một thành viên của họ FcR cụ thể. Ví dụ, bằng cách quan sát xem có sự giảm hay tăng giá trị hằng số phân ly (Kd) thu được từ phân tích đồ thị cảm biến hay không, trong đó nhiều loại FcR được cho tương tác dưới dạng chất phân tích với các polypeptit chứa vùng Fc biến thể được cố định hoặc được bắt giữ lên chíp cảm biến bằng cách sử dụng các phương pháp và chất phản ứng đã biết như Protein A, Protein L, Protein A/G, Protein G, các kháng thể kháng chuỗi lamda, các kháng thể kháng chuỗi kapa, các peptit có tính kháng nguyên, các protein có tính kháng nguyên). Các biến đổi về hoạt tính liên kết cũng có thể được xác định bằng cách so sánh các thay đổi về giá trị đơn vị cộng hưởng (RU) trên đồ thị cảm biến trước và sau khi một hoặc nhiều loại FcR được cho tương tác dưới dạng các chất phân tích với các polypeptit bị bắt giữ chứa vùng Fc biến thể. Theo cách khác, FcR có thể được cố định hoặc bắt giữ lên các chíp cảm biến, và các polypeptit chứa vùng Fc biến thể được sử dụng làm chất phân tích.

Trong phân tích BIACORE®, một trong số các chất (phối tử), khi quan sát tương tác, được cố định lên màng mỏng bằng vàng trên chíp cảm biến, và bằng cách chiếu sáng từ mặt bên kia của chip cảm biến này sao cho hiện tượng phản xạ toàn phần diễn ra ở mặt phân cách giữa màng mỏng bằng vàng này và phiến kính, một phần của cường độ phản xạ giảm đi được tạo thành trong phần ánh sáng phản xạ (tín hiệu SPR). Khi chất còn lại trong số các chất này (chất phân tích), khi quan sát tương tác, được cho chảy lên bề mặt chip cảm biến và phối tử liên kết với chất phân tích, khối lượng của phân tử phối tử được cố định gia tăng và chỉ số khúc xạ của dung môi trên bề mặt chip cảm biến thay đổi. Vị trí của tín hiệu SPR dịch chuyển do sự thay đổi của chỉ số khúc xạ này (mặt khác, vị trí tín hiệu quay trở lại khi liên kết này phân ly). Hệ thống BIACORE® chỉ ra mức dịch chuyển nêu trên, hoặc cụ thể hơn là sự biến đổi khối lượng theo thời gian bằng cách vẽ đồ thị sự thay đổi khối lượng trên bề mặt chip cảm biến trên một toạ độ là dữ liệu đo

được (đồ thị cảm biến). Lượng chất phân tích được liên kết với phối tử bị giữ trên bề mặt chip cảm biến được xác định từ đồ thị cảm biến này. Các tham số động học như hằng số tốc độ kết hợp (ka) và hằng số tốc độ phân ly (kd) được xác định từ đường cong của đồ thị cảm biến, và hằng số phân ly (Kd) được xác định từ tỷ lệ giữa các hằng số này. Trong phương pháp BIACORE®, tốt hơn là sử dụng phương pháp đo tác dụng ức chế. Ví dụ về phương pháp đo tác dụng ức chế được mô tả trong Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11):4005-4010 (2006).

Tiến hành sàng lọc ALPHA bằng công nghệ ALPHA mà sử dụng hai loại hạt, hạt cho và hạt nhận, dựa vào nguyên tắc sau đây. Các tín hiệu phát quang được phát hiện chỉ khi các phân tử được liên kết với các hạt cho tương tác vật lý với các phân tử được liên kết với các hạt nhận, và hai hạt ở gần nhau. Chất cảm quang được kích thích bằng laze trong các hạt cho làm biến đổi oxy trong không khí thành oxy mức đơn phân tử ở trạng thái bị kích thích. Oxy mức đơn phân tử được phân tán xung quanh các hạt cho, và khi oxy này đến được các hạt nhận liền kề, phản ứng phát quang hoá học được cảm ứng trong các hạt này, và cuối cùng phát sáng. Khi các phân tử được liên kết với các hạt cho không tương tác với các phân tử được liên kết với các hạt nhận, phản ứng phát quang hoá học không diễn ra do oxy mức đơn phân tử sản sinh bởi các hạt cho không đến được các hạt nhận.

Ví dụ, phức hợp polypeptit được biotin hoá được liên kết với các hạt cho, và thụ thể Fc được gắn nhãn glutathion S transferaza (GST) được liên kết với các hạt nhận. Khi không có mặt phức hợp polypeptit cạnh tranh chứa vùng Fc biến thể, phức hợp polypeptit chứa vùng Fc gốc tương tác với thụ thể Fc và sản sinh các tín hiệu 520-620 nm. Phức hợp polypeptit chứa vùng Fc biến thể không được gắn nhãn cạnh tranh với phức hợp polypeptit chứa vùng Fc gốc để tương tác với thụ thể Fc. Có thể xác định các hoạt tính liên kết tương đối bằng cách định lượng mức giảm huỳnh quang được quan sát thấy do sự cạnh tranh này. Biotin hoá các phức hợp polypeptit như các kháng thể bằng cách sử dụng Sulfo-NHS-biotin và chất tương tự là đã biết. Phương pháp biểu hiện thụ thể Fc và GST trong tế bào mang gen dung hợp được tạo ra bằng cách dung hợp polynucleotit mã hoá thụ thể Fc trong khung với polynucleotit mã hoá GST trong vectơ có thể biểu hiện, và tiến hành tinh chế bằng cách sử dụng cột glutathion được ứng dụng thích hợp làm phương pháp gắn nhãn thụ thể Fc bằng GST. Các tín hiệu thu được tốt hơn là được phân

tích, ví dụ, bằng cách hiệu chỉnh (fitting) chúng với mô hình cạnh tranh một vị trí sử dụng phân tích hồi quy không tuyến tính có sử dụng phần mềm như GRAPHPAD PRISM (GraphPad, San Diego).

Vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcR giảm chỉ vùng Fc mà liên kết với FcR có hoạt tính liên kết yếu hơn đáng kể so với vùng Fc gốc khi tiến hành các thử nghiệm có sử dụng gần như cùng một lượng vùng Fc gốc tương ứng và vùng Fc biến thể. Hơn nữa, vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcR tăng chỉ vùng Fc mà liên kết với FcR có hoạt tính liên kết mạnh hơn đáng kể so với vùng Fc gốc tương ứng khi tiến hành các thử nghiệm có sử dụng gần như cùng một lượng vùng Fc gốc tương ứng và vùng Fc biến thể. Vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcR được duy trì chỉ vùng Fc mà liên kết với FcR có hoạt tính liên kết tương đương hoặc gần như không khác với hoạt tính liên kết của vùng Fc gốc khi tiến hành các thử nghiệm có sử dụng gần như cùng một lượng vùng Fc gốc tương ứng và polypeptit chứa vùng Fc biến thể.

Các hoạt tính liên kết của vùng Fc đối với nhiều loại FcR được tăng hay giảm có thể được xác định từ sự tăng hay giảm khả năng liên kết của nhiều loại FcR với vùng Fc, mà đã được xác định theo phương pháp đo nêu trên. Ở đây, mức độ liên kết của nhiều loại FcR với vùng Fc có thể được đánh giá dưới dạng giá trị thu được bằng cách chia mức chênh lệch các giá trị RU của các đồ thị cảm biến mà thay đổi trước và sau tương tác của nhiều loại FcR làm chất phân tích với vùng Fc, cho mức chênh lệch các giá trị RU của các đồ thị cảm biến mà thay đổi trước và sau khi bắt giữ các vùng Fc này vào các chíp cảm biến. Hoạt tính liên kết của vùng Fc với FcγR hoặc FcRn có thể được xác định bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 5 trong bản mô tả này.

Theo sáng chế, hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể tốt hơn nghĩa là, ví dụ, hoạt tính liên kết của vùng Fc biến thể với FcγR là nhỏ hơn 50%, nhỏ hơn 45%, nhỏ hơn 40%, nhỏ hơn 35%, nhỏ hơn 30%, nhỏ hơn 25%, nhỏ hơn 20%, nhỏ hơn 15%, nhỏ hơn 10%, nhỏ hơn 5%, nhỏ hơn 2%, nhỏ hơn 1%, nhỏ hơn 0,5%, nhỏ hơn 0,2%, hoặc nhỏ hơn 0,1% theo hàm số của hoạt tính liên kết FcγR với vùng Fc gốc. Tốt hơn là nó còn có nghĩa là, ví dụ, tỷ lệ giữa [mức chênh lệch các giá trị RU của các đồ thị cảm biến mà thay đổi trước và sau tương tác của FcγR đối với vùng Fc biến thể]/[mức chênh lệch các giá trị RU của các đồ thị cảm biến mà thay đổi trước và sau khi bắt giữ FcγR vào các chíp cảm biến] nhỏ hơn 1, nhỏ hơn 0,8, nhỏ hơn 0,5, nhỏ hơn 0,3, nhỏ hơn 0,2, nhỏ hơn 0,1, nhỏ hơn

0,08, nhỏ hơn 0,05, nhỏ hơn 0,03, nhỏ hơn 0,02, nhỏ hơn 0,01, nhỏ hơn 0,008, nhỏ hơn 0,005, nhỏ hơn 0,003, nhỏ hơn 0,002, hoặc nhỏ hơn 0,001.

Theo sáng chế, hoạt tính liên kết FcRn tăng đáng kể, đặc biệt là ở độ pH=7,4, tốt hơn là có nghĩa là, ví dụ, hoạt tính liên kết của vùng Fc biến thể đối với FcRn là nhỏ hơn 1000 lần, nhỏ hơn 500 lần, nhỏ hơn 200 lần, nhỏ hơn 100 lần, nhỏ hơn 90 lần, nhỏ hơn 80 lần, nhỏ hơn 70 lần, nhỏ hơn 60 lần, nhỏ hơn 50 lần, nhỏ hơn 40 lần, nhỏ hơn 30 lần, nhỏ hơn 20 lần, nhỏ hơn 10 lần, nhỏ hơn 5 lần, nhỏ hơn 3 lần, hoặc nhỏ hơn 2 lần so với hoạt tính liên kết FcRn của vùng Fc gốc. Cũng tốt hơn là, ví dụ, tỷ lệ giữa [mức chênh lệch các giá trị RU của các đồ thị cảm biến mà thay đổi trước và sau tương tác của FcRn với vùng Fc biến thể]/[mức chênh lệch các giá trị RU của các đồ thị cảm biến mà thay đổi trước và sau khi bắt giữ FcRn vào các chíp cảm biến] là nhỏ hơn 0,5, nhỏ hơn 0,3, nhỏ hơn 0,2, nhỏ hơn 0,1, nhỏ hơn 0,08, nhỏ hơn 0,05, nhỏ hơn 0,03, nhỏ hơn 0,02, nhỏ hơn 0,01, nhỏ hơn 0,008, nhỏ hơn 0,005, nhỏ hơn 0,003, nhỏ hơn 0,002, hoặc nhỏ hơn 0,001.

Để xác định hoạt tính liên kết của polypeptit có chứa vùng Fc biến thể với C1q, có thể tiến hành ELISA liên kết C1q. Vắn tắt là, các đĩa thử nghiệm có thể được phủ qua đêm ở 4°C với polypeptit chứa vùng Fc biến thể hoặc polypeptit chứa vùng Fc gốc (đối chứng) trong dịch đệm phủ. Sau đó, rửa và phong bế các đĩa này. Sau khi rửa, có thể thêm phần phân ước của C1q của người vào mỗi giếng và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa thêm, có thể thêm 100 µl kháng thể được liên hợp peroxidaza kháng bổ thể C1q của cừu vào mỗi giếng và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa lại đĩa này bằng dịch đệm rửa và có thể thêm 100 µl dịch đệm cơ chất chứa OPD (o-phenylendiamin dihydroclorua (Sigma)) vào mỗi giếng. Phản ứng oxy hoá, được quan sát thấy nhờ sự xuất hiện màu vàng, có thể được để diễn ra trong 30 phút và dừng phản ứng bằng cách cho thêm 100 µl H_2SO_4 4,5 N. Sau đó, đọc độ hấp thụ ở (492-405) nm. Hoạt tính liên kết của vùng Fc với C1q có thể được xác định bằng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 4 trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh, mức chênh lệch hoạt tính liên kết C1q giữa vùng Fc biến thể và vùng Fc gốc của sáng chế là nhỏ hơn 50%, nhỏ hơn 45%, nhỏ hơn 40%, nhỏ hơn 35%, nhỏ hơn 30%, nhỏ hơn 25%, nhỏ hơn 20%, nhỏ hơn 15%, nhỏ hơn 10%, hoặc nhỏ hơn 5% theo hàm số của hoạt tính liên kết C1q với vùng Fc gốc.

2. Thử nghiệm hoạt tính

Theo một khía cạnh, các thử nghiệm được đề xuất để nhận diện các kháng thể kháng DENV có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học có thể bao gồm, ví dụ, phong bế sự liên kết của protein E của DENV với tế bào chủ, ức chế DENV xâm nhập vào tế bào chủ, ức chế và/hoặc ngăn ngừa nhiễm DENV ở tế bào chủ, *v.v.*. Các kháng thể có hoạt tính sinh học này *in vivo* và/hoặc *in vitro* cũng được đề xuất.

Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính sinh học này. Theo các phương án nhất định, thử nghiệm trung hoà giảm mảng bám (PRNT) có thể được sử dụng để đo hoạt tính hoặc hiệu lực trung hoà của kháng thể thử nghiệm. Theo một số phương án, động vật chủ có thể được sử dụng để đo hoạt tính kháng DENV *in vivo*.

Theo các phương án nhất định, các tế bào có thể được thử nghiệm trực tiếp về khả năng liên kết giữa DENV và kháng thể thử nghiệm. Các kỹ thuật hoá mô miễn dịch, các kỹ thuật đồng tiêu, và/hoặc các kỹ thuật khác để đánh giá khả năng liên kết là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Các dòng tế bào khác nhau có thể được sử dụng cho các thử nghiệm sàng lọc này, bao gồm các tế bào được xử lý kỹ thuật riêng cho mục đích này. Các ví dụ về các tế bào được sử dụng trong các thử nghiệm sàng lọc bao gồm tế bào động vật có vú, tế bào nấm, tế bào vi khuẩn, hoặc tế bào virut. Tế bào có thể là tế bào được kích thích, như tế bào được kích thích bằng yếu tố tăng trưởng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu được là sáng chế được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm nhiều loại thử nghiệm để xác định khả năng của kháng thể thử nghiệm liên kết với DENV.

Tuỳ thuộc vào thử nghiệm, có thể cần đến môi trường nuôi cấy tế bào và/hoặc mô. Có thể kiểm tra tế bào bằng cách sử dụng thử nghiệm bất kỳ trong số nhiều thử nghiệm sinh lý khác nhau. Theo cách khác hoặc ngoài ra, phân tích phân tử có thể được tiến hành bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp thẩm tách Western để theo dõi sự biểu hiện protein và/hoặc kiểm tra các tương tác protein-protein; phương pháp đo khối phổ để theo dõi các cải biến hoá học khác *v.v.*.

Theo một số phương án, các phương pháp này sử dụng vật chủ là động vật. Ví dụ, các động vật chủ thích hợp cho sáng chế có thể là động vật chủ có vú bất kỳ, bao gồm động vật linh trưởng, chồn sương, mèo, chó, bò, ngựa và các động vật gặm nhấm như

chuột nhắt, chuột đồng, thỏ, và chuột cống. Theo một số phương án, động vật chủ này được tiêm chủng bằng, gây nhiễm bằng, hoặc theo cách khác được phơi nhiễm virut trước khi hoặc đồng thời với việc sử dụng kháng thể thử nghiệm. Các động vật chưa sử dụng thuốc và/hoặc đã được tiêm chủng có thể được sử dụng cho nghiên cứu bất kỳ trong nhiều loại nghiên cứu. Ví dụ, các mô hình động vật này có thể được sử dụng cho các nghiên cứu truyền nhiễm virut như đã biết trong lĩnh vực này. Kháng thể thử nghiệm có thể dùng cho động vật chủ thích hợp trước, trong hoặc sau các nghiên cứu truyền nhiễm virut để xác định hiệu lực của kháng thể thử nghiệm trong việc phong bế sự liên kết và/hoặc khả năng gây nhiễm ở động vật chủ.

Theo một khía cạnh, các thử nghiệm được đề xuất để nhận diện các polypeptit chứa các vùng Fc biến thể có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học có thể bao gồm, ví dụ, hoạt tính ADCC và hoạt tính CDC. Các polypeptit chứa các vùng Fc biến thể có hoạt tính sinh học này *in vivo* và/hoặc *in vitro* cũng được đề xuất.

Theo các phương án nhất định, polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt tính sinh học. Theo các khía cạnh nhất định, polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế điều biến chức năng hiệu ứng so với polypeptit chứa vùng Fc gốc. Theo một khía cạnh nhất định, tác dụng điều biến này là điều biến ADCC và/hoặc CDC.

Có thể thực hiện các thử nghiệm gây độc tế bào *in vitro* và/hoặc *in vivo* để xác nhận có các hoạt tính CDC và/hoặc ADCC. Ví dụ, có thể thực hiện các thử nghiệm liên kết thụ thể Fc (FcR) để đảm bảo là kháng thể có liên kết FcγR (do đó có thể có hoạt tính ADCC), và giữ được khả năng liên kết FcRn. Các tế bào sơ cấp để điều tiết ADCC, các tế bào NK chỉ biểu hiện FcγRIII, trong khi đó các bạch cầu đơn nhân biểu hiện FcγRI, FcγRII và FcγRIII. Sự biểu hiện FcR trên các tế bào tạo huyết được tóm tắt trong Bảng 3 ở trang 464 trong Ravetch and Kinet, Annu Rev Immunol (1991) 9, 457-492. Các ví dụ không làm giới hạn về các thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm được mô tả trong Patent Mỹ số 5,500,362 (ví dụ, xem Hellstrom et al, Proc Natl Acad Sci USA (1986) 83, 7059-7063) và Hellstrom et al, Proc Natl Acad Sci USA (1985) 82, 1499-1502; Patent Mỹ số US 5,821,337 (xem Bruggemann et al, J Exp Med (1987) 166, 1351-1361). Theo cách khác, có thể sử dụng các phương pháp thử nghiệm không có hoạt tính phóng xạ (ví dụ, xem thử nghiệm tác dụng gây độc tế bào không có

hoạt tính phóng xạ ACTI™ cho kỹ thuật đếm tế bào theo dòng (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); và thử nghiệm tác dụng gây độc tế bào không có hoạt tính phóng xạ CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Các tế bào hiệu ứng hữu ích cho các thử nghiệm này bao gồm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và các tế bào giết tự nhiên (NK). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử cần quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, ở mô hình động vật như mô hình được bộc lộ trong Proc Natl Acad Sci USA (1998) 95, 652-656 của Clynes et al. Cũng có thể thực hiện các thử nghiệm liên kết Clq để xác nhận kháng thể có liên kết Clq hay không và do đó có hoạt tính CDC hay không. Ví dụ, xem ELISA liên kết Clq và C3c trong WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá khả năng hoạt hoá bổ thể, có thể tiến hành thử nghiệm CDC (ví dụ, xem Gazzano-Santoro et al, J Immunol Methods (1997) 202, 163-171; Cragg et al, Blood (2003) 101, 1045-1052; và Cragg and Glennie, Blood (2004) 103, 2738-2743). Cũng có thể tiến hành xác định khả năng liên kết FcRn và thời gian bán hủy/thanh thải *in vivo* bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, xem Petkova et al, Int Immunol (2006) 18, 1759-1769).

D. Thể liên hợp miễn dịch

Theo một số phương án, sáng chế còn đề xuất các thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể kháng DENV trong bản mô tả này được liên hợp với một hoặc nhiều chất gây độc tế bào, như các chất hoặc thuốc hoá trị, các chất ức chế sự tăng trưởng, các độc tố (ví dụ, độc tố protein, độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, hoặc các mảnh của chúng), hoặc các đồng vị phóng xạ. Theo một số phương án, sáng chế còn đề xuất các thể liên hợp miễn dịch bao gồm polypeptit chứa vùng Fc biến thể trong bản mô tả này được liên hợp với một hoặc nhiều chất gây độc tế bào, như các chất hoặc thuốc hoá trị, các chất ức chế sự tăng trưởng, các độc tố (ví dụ, độc tố protein, độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, hoặc các mảnh của chúng), hoặc các đồng vị phóng xạ.

Theo một phương án, thể liên hợp miễn dịch là thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC), trong đó kháng thể được liên hợp với một hoặc nhiều dược chất, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở maytansinoit (xem các Patent Mỹ số 5,208,020, 5,416,064 và Patent châu Âu số EP 0 425 235 B1); auristatin như các gốc dược chất monometylauristatin DE và DF (MMAE và MMAF) (xem các Patent Mỹ số 5,635,483 và 5,780,588, và Patent

Mỹ số 7,498,298); dolastatin; calicheamicin hoặc dẫn xuất của chúng (xem các Patent Mỹ số 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, và 5,877,296; Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); và Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)); anthraxyclin như daunomyxin hoặc doxorubixin (xem Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002); và Patent Mỹ số 6,630,579); methotrexat; vindesin; taxan như docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, và ortataxel; trichothexen; và CC1065.

Theo một phương án khác, thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này được liên hợp với độc tố có hoạt tính enzym hoặc mảnh của nó, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chuỗi A độc tố gây bệnh bạch hầu, các mảnh có hoạt tính không liên kết của độc tố bệnh bạch hầu, chuỗi A ngoại độc tố (từ *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi A rixin A, chuỗi A abrin A, chuỗi A modeccin A, alpha-sarcin, các protein của *Aleurites fordii*, các protein dianthin, các protein của *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế *Momordica charantia*, curcin, crotin, chất ức chế *Saponaria officinalis*, gelonin, mitogellin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin, và các tricothexen.

Theo một phương án khác, thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này được liên hợp với nguyên tử có hoạt tính phóng xạ để tạo thành thể liên hợp phóng xạ. Nhiều loại đồng vị phóng xạ là sẵn có để sản xuất thể liên hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm ^{211}At, ^{131}I, ^{125}I, ^{90}Y, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{212}Bi, ^{32}P, ^{212}Pb và các đồng vị phóng xạ của Lu. Khi thể liên hợp phóng xạ được sử dụng để phát hiện, thể liên hợp này có thể bao gồm nguyên tử có hoạt tính phóng xạ cho các nghiên cứu biểu đồ nhấp nháy, ví dụ Tc-99m hoặc ^{123}I, hoặc nhãn spin để chụp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (còn gọi là chụp cộng hưởng từ, MRI), như iốt-123, iốt-131, inđi-111, flo-19, cacbon-13, nitơ-15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắt.

Các thể liên hợp của kháng thể và chất gây độc tế bào có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều loại chất ghép cặp protein hai chức như N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), suxinimidyl-4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1-

carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), các dẫn xuất hai chức của các imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), các este hoạt tính (như disuxinimidyl suberat), các aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexandiamin), các dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendiamin), các diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và các hợp chất bis-flo có hoạt tính (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được điều chế như được mô tả trong Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminpentaaxetic được đánh dấu cacbon-14 (MX-DTPA) là chất chelat hoá điển hình để liên hợp nuclit phóng xạ với kháng thể. Xem WO94/11026. Phần tử liên kết có thể là "phần tử liên kết phân cắt được" tạo điều kiện để giải phóng dược chất gây độc tế bào trong tế bào. Ví dụ, có thể sử dụng phần tử liên kết không bền với axit, phần tử liên kết nhạy với peptidaza, phần tử liên kết không bền với ánh sáng, phần tử liên kết dimetyl hoặc phần tử liên kết chứa disulfua (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); U.S. Patent No. 5,208,020).

Các thể liên hợp miễn dịch hoặc các ADC trong bản mô tả này rõ ràng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các thể liên hợp được tạo ra với các chất phản ứng liên kết ngang bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (suxinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) có bán trên thị trường (ví dụ, từ Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

E. Phương pháp và chế phẩm để chẩn đoán và phát hiện

Theo các phương án nhất định, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng DENV được đề xuất trong bản mô tả này là hữu ích để phát hiện sự có mặt của DENV và/hoặc protein E của DENV trong mẫu sinh phẩm. Thuật ngữ "phát hiện" như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm phát hiện định tính hoặc định lượng. Theo các phương án nhất định, mẫu sinh phẩm bao gồm tế bào hoặc mô, như huyết thanh, máu toàn phần, huyết tương, mẫu sinh thiết, mẫu mô, hỗn dịch tế bào, nước bọt, đờm, dịch miệng, dịch não tuỷ, dịch màng ối, dịch cổ trướng, sữa, sữa non, dịch tiết tuyến vú, bạch huyết, nước tiểu, mồ hôi, dịch nước mắt, dịch dạ dày, hoạt dịch, dịch màng bụng, dịch nhãn cầu, hoặc dịch nhầy.

Theo một phương án, kháng thể kháng DENV để sử dụng trong phương pháp chẩn đoán hoặc phát hiện được đề xuất. Theo một khía cạnh khác, phương pháp phát hiện sự có mặt của DENV trong mẫu sinh phẩm được đề xuất. Theo các phương án nhất định, phương pháp này bao gồm bước cho mẫu sinh phẩm tiếp xúc với kháng thể kháng DENV như được mô tả trong bản mô tả này trong điều kiện cho phép kháng thể kháng DENV liên kết với DENV, và phát hiện xem có tạo thành phức hợp giữa kháng thể kháng DENV và DENV hay không. Phương pháp này có thể là phương pháp *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một khía cạnh khác, phương pháp phát hiện sự có mặt của protein E của DENV trong mẫu sinh phẩm được đề xuất. Theo các phương án nhất định, phương pháp này bao gồm bước cho mẫu sinh phẩm tiếp xúc với kháng thể kháng DENV như được mô tả trong bản mô tả này trong điều kiện cho phép kháng thể kháng DENV liên kết với protein E của DENV, và phát hiện xem có tạo thành phức hợp giữa kháng thể kháng DENV và protein E của DENV hay không. Phương pháp này có thể là phương pháp *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một phương án, kháng thể kháng DENV được sử dụng để chọn lọc các đối tượng đủ điều kiện dùng liệu pháp kháng thể kháng DENV, ví dụ trong đó DENV hoặc protein E của DENV là chất đánh dấu sinh học để chọn lọc các bệnh nhân.

Các rối loạn ví dụ mà có thể chẩn đoán bằng cách sử dụng kháng thể theo sáng chế gồm nhiễm DENV và các bệnh và/hoặc triệu chứng gây ra bởi hoặc có liên quan đến nhiễm DENV như sốt Dengue, sốt xuất huyết Dengue (DHF), và hội chứng sốc Dengue (DSS).

Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng DENV được đánh dấu được đề xuất. Các chất đánh dấu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất đánh dấu hoặc các gốc mà được phát hiện trực tiếp (như các chất đánh dấu huỳnh quang, chất mang màu, chất giàu electron, chất phát quang hoá học, và chất có hoạt tính phóng xạ), cũng như các gốc, như các enzym hoặc phối tử, mà được phát hiện gián tiếp, ví dụ, thông qua phản ứng enzym hoặc tương tác phân tử. Các chất đánh dấu ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đồng vị phóng xạ ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, và ^{131}I, các chất huỳnh quang như các chelat đất hiếm hoặc florexein và các dẫn xuất của nó, rhodamin và các dẫn xuất của nó, dansyl, umbelliferon, các luxeriferaza, ví dụ, luxiferaza của đom đóm và luxiferaza của vi khuẩn (Patent Mỹ số 4,737,456), luxiferin, 2,3-dihydrophtalazindion, peroxidaza của cải ngựa (HRP), phosphataza kiềm, beta-galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, các

sacarit oxidaza, ví dụ, glucoza oxidaza, galactoza oxidaza, và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza, các oxidaza dị vòng như uricaza và xanthin oxidaza, các chất được ghép cặp với enzym mà sử dụng hydro peroxit để oxy hoá tiền chất chất nhuộm màu như HRP, lactoperoxidaza, hoặc microperoxidaza, biotin/avidin, nhãn spin, các chất đánh dấu thể thực khuẩn, các gốc tự do ổn định, và các chất tương tự.

Theo một phương án, kháng thể chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế có thể được sử dụng làm chất tinh chế ái lực. Trong quy trình này, biến thể kháng thể được cố định trên pha rắn như nhựa Sephadex hoặc giấy lọc, bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Biến thể kháng thể đã cố định được cho tiếp xúc với mẫu chứa kháng nguyên cần tinh chế, và sau đó nền được rửa bằng dung môi thích hợp mà sẽ loại bỏ gần như toàn bộ nguyên liệu có trong mẫu trừ kháng nguyên cần tinh chế, kháng nguyên này được liên kết với biến thể kháng thể đã cố định. Cuối cùng, rửa nền bằng một dung môi thích hợp khác, như dịch đệm glyxin, độ pH=5,0, dung môi này sẽ giải phóng kháng nguyên ra khỏi biến thể kháng thể.

Biến thể kháng thể cũng có thể hữu ích trong các thử nghiệm chẩn đoán, ví dụ, để phát hiện sự biểu hiện của kháng nguyên quan tâm trong các tế bào, mô, hoặc huyết thanh cụ thể.

Biến thể kháng thể có thể được sử dụng trong phương pháp định lượng đã biết bất kỳ, như các thử nghiệm liên kết cạnh tranh, các thử nghiệm bánh kẹp trực tiếp và gián tiếp, và các thử nghiệm kết tủa miễn dịch. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, (1987) pp. 147-158, CRC Press, Inc..

F. Dược phẩm

Các dược phẩm chứa kháng thể kháng DENV như được mô tả trong bản mô tả này được bào chế bằng cách trộn kháng thể có độ tinh khiết mong muốn với một hoặc nhiều chất mang dược dụng tuỳ ý (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), ở dạng chế phẩm đông khô hoặc dung dịch nước.

Các dược phẩm của polypeptit chứa vùng Fc biến thể như được mô tả trong bản mô tả này được bào chế bằng cách trộn polypeptit có độ tinh khiết mong muốn này với một hoặc nhiều chất mang dược dụng tuỳ ý ở dạng chế phẩm đông khô hoặc dung dịch nước.

Chất mang dược dụng thường là không độc đối với đối tượng tiếp nhận ở các liều lượng và nồng độ đã sử dụng, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: các chất đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxy hoá bao gồm axit ascorbic và methionin; các chất bảo quản (như octadexyldimetylbenzyl amoni clorua; hexamethoni clorua; benzalkoni clorua; benzethoni clorua; phenol, butyl hoặc rượu benxylic; các alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); các polypeptit phân tử lượng thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); các protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc các globulin miễn dịch; các polyme ưa nước như polyvinylpyrolidon; các axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; các monosacarit, các disacarit, và các hydratcacbon khác bao gồm glucoza, mannoza, hoặc các dextrin; các chất chelat hóa như EDTA; các đường như sucroza, manitol, trehaloza hoặc sorbitol; các ion đối tạo muối như natri; các phức kim loại (ví dụ các phức Zn-protein); và/hoặc các chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Các chất mang dược dụng điển hình trong bản mô tả này còn bao gồm các chất phân tán dược chất kẽ như các glycoprotein hyaluronidaza có hoạt tính trung tính tan (sHASEGP), ví dụ, glycoprotein hyaluronidaza PH-20 tan của người, như rHuPH20 (HYLENEX (nhãn hiệu được đăng ký bảo hộ), Baxter International, Inc.). Một vài sHASEGP ví dụ và các phương pháp sử dụng, bao gồm rHuPH20, được mô tả trong các Công bố sáng chế Mỹ số 2005/0260186 và 2006/0104968. Theo một khía cạnh, sHASEGP được kết hợp với một hoặc nhiều glycosaminoglycanaza bổ sung như chondroitinaza.

Chế phẩm kháng thể đông khô điển hình được mô tả trong Patent Mỹ số 6,267,958. Chế phẩm kháng thể trong nước bao gồm các chế phẩm được mô tả trong Patent Mỹ số 6,171,586 và WO2006/044908, các chế phẩm này bao gồm chất đệm histidin-axetat.

Chế phẩm trong bản mô tả này cũng có thể có chứa nhiều hơn một thành phần hoạt tính nếu cần thiết cho chỉ định cụ thể cần điều trị, tốt hơn là các thành phần này có các hoạt tính bổ trợ mà không ảnh hưởng bất lợi đến nhau. Ví dụ, có thể mong muốn cung cấp thêm chất kháng virut, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, các interferon (ví dụ, interferon α-2b, interferon-γ, v.v.), các kháng thể đơn dòng kháng DENV, các kháng thể đa dòng kháng DENV, các chất ức chế ARN polymeraza, các chất ức chế proteaza, các chất ức chế helicaza, các chất điều biến miễn dịch, các hợp chất đối nghĩa, các ARN can

thiệp ngắn, các ARN kẹp tóc ngắn, các micro ARN, các aptame ARN, các ribozym, và tổ hợp của chúng. Các thành phần hoạt tính này có mặt thích hợp trong hỗn hợp với lượng hữu hiệu cho mục đích dự định.

Các thành phần hoạt tính có thể được giữ trong các vi nang được tạo ra, ví dụ, bằng các kỹ thuật đồng giọt tụ hoặc bằng cách polyme hoá mặt phân cách, ví dụ, vi nang hydroxymetylxenluloza hoặc gelatin và vi nang poly-(metylmetacrylat), lần lượt, trong các hệ phân phối thuốc dạng keo (ví dụ, liposom, vi cầu albumin, vi nhũ tương, các hạt nano và các nang nano) hoặc trong nhũ tương thô. Các kỹ thuật này được bộc lộ trong *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Có thể bào chế các chế phẩm giải phóng kéo dài. Ví dụ thích hợp về các chế phẩm giải phóng kéo dài bao gồm các chất nền bán thấm chứa polyme kỵ nước rắn có chứa kháng thể, các chất nền này ở dạng sản phẩm được tạo hình, ví dụ màng mỏng, hoặc các vi nang.

Các chế phẩm để dùng *in vivo* thường là vô trùng. Độ vô trùng có thể dễ dàng đạt được, ví dụ, bằng cách lọc qua các màng lọc vô trùng.

G. Phương pháp điều trị và các chế phẩm

Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng DENV được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng DENV để sử dụng làm thuốc được đề xuất. Theo các khía cạnh khác nữa, kháng thể kháng DENV để sử dụng trong điều trị nhiễm DENV được đề xuất. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng DENV để sử dụng trong phương pháp điều trị được đề xuất. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng DENV để sử dụng trong phương pháp điều trị cho cá thể nhiễm DENV bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng DENV. Theo một phương án này, phương pháp còn bao gồm bước cho cá thể dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung, ví dụ, như mô tả dưới đây. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng DENV để sử dụng trong việc phong bế sự liên kết của protein E của DENV với và/hoặc xâm nhập của DENV vào tế bào chủ. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng DENV để sử dụng trong phương pháp phong bế sự liên kết của protein E của DENV với và/hoặc xâm nhập của DENV vào tế

bào chủ ở một cá thể bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng DENV để phong bế sự liên kết của protein E của DENV với và/hoặc sự xâm nhập của DENV vào tế bào chủ. "Cá thể" theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên tốt hơn là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế bộc lộ việc sử dụng kháng thể kháng DENV trong sản xuất hoặc bào chế thuốc. Theo một phương án, thuốc này để điều trị nhiễm DENV. Theo một phương án khác nữa, thuốc là để sử dụng trong phương pháp điều trị nhiễm DENV bao gồm bước cho cá thể nhiễm DENV dùng lượng hữu hiệu của thuốc này. Theo một phương án này, phương pháp còn bao gồm bước cho cá thể dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung, ví dụ, như mô tả dưới đây. Theo một phương án khác nữa, thuốc là để phong bế sự liên kết của protein E của DENV với và/hoặc xâm nhập của DENV vào tế bào chủ. Theo một phương án khác nữa, thuốc là để sử dụng trong phương pháp phong bế sự liên kết của protein E của DENV với và/hoặc xâm nhập của DENV vào tế bào chủ ở một cá thể bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của thuốc để phong bế sự liên kết của protein E của DENV với và/hoặc xâm nhập của DENV vào tế bào chủ. "Cá thể" theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế bộc lộ phương pháp điều trị bệnh nhiễm DENV. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể nhiễm DENV dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng DENV. Theo một phương án này, phương pháp còn bao gồm bước cho cá thể dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung, như mô tả dưới đây. "Cá thể" theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế bộc lộ phương pháp phong bế sự liên kết của protein E của DENV với và/hoặc xâm nhập của DENV vào tế bào chủ ở cá thể. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng DENV để phong bế sự liên kết của protein E của DENV với và/hoặc sự xâm nhập của DENV vào tế bào chủ. Theo một phương án, "cá thể" là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các dược phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng DENV được đề xuất trong bản mô tả này, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp điều trị nêu trên. Theo một phương

án, dược phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng DENV được đề xuất trong bản mô tả này và chất mang dược dụng. Theo một phương án khác, dược phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng DENV được đề xuất trong bản mô tả này và ít nhất một chất trị liệu bổ sung, ví dụ, như mô tả dưới đây.

Theo một khía cạnh khác, dược phẩm là để điều trị bệnh nhiễm DENV. Theo một phương án khác nữa, dược phẩm là để phong bế sự liên kết của protein E của DENV với và/hoặc sự xâm nhập của DENV vào tế bào chủ. Theo một phương án, dược phẩm được dùng cho cá thể bị nhiễm DENV. "Cá thể" theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên tốt hơn là người.

Theo các phương án nhất định, nhiễm DENV có thể bao gồm các bệnh và/hoặc triệu chứng gây ra bởi hoặc có liên quan đến nhiễm DENV như sốt Dengue, bệnh sốt xuất huyết Dengue (DHF), và hội chứng sốc Dengue (DSS).

Polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit chứa vùng Fc biến thể được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị.

Theo một khía cạnh, polypeptit chứa vùng Fc biến thể để sử dụng làm thuốc được đề xuất. Theo các phương án nhất định, polypeptit chứa vùng Fc biến thể để sử dụng trong phương pháp điều trị được đề xuất. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất polypeptit chứa vùng Fc biến thể để sử dụng trong phương pháp điều trị cho cá thể bị rối loạn bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của polypeptit chứa vùng Fc biến thể. Theo một phương án này, phương pháp còn bao gồm bước cho cá thể dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung. Theo một phương án, rối loạn là nhiễm virut. Theo một phương án, "cá thể" là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế bộc lộ việc sử dụng polypeptit chứa vùng Fc biến thể trong sản xuất hoặc bào chế thuốc. Theo một phương án, thuốc này để điều trị rối loạn. Theo một vài khía cạnh, polypeptit là kháng thể. Theo một vài khía cạnh, polypeptit là protein dung hợp Fc. Theo một phương án khác nữa, thuốc là để sử dụng trong phương pháp điều trị rối loạn bao gồm bước cho cá thể mắc rối loạn cần điều trị dùng lượng hữu hiệu của thuốc này. Theo một phương án này, phương pháp còn bao gồm bước cho cá thể dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung. Theo một phương án, rối loạn là nhiễm virut. Theo một phương án, "cá thể" là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế bộc lộ phương pháp điều trị rối loạn. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể bị rối loạn dùng lượng hữu hiệu của polypeptit chứa vùng Fc biến thể. Theo một phương án này, phương pháp này còn bao gồm bước cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu bổ sung. Theo một phương án, rối loạn là nhiễm virut. Theo một phương án, "cá thể" là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các dược phẩm chứa polypeptit chứa vùng Fc biến thể được đề xuất trong bản mô tả này, để sử dụng trong phương pháp điều trị như phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp điều trị được mô tả trong bản mô tả này. Theo một phương án, dược phẩm chứa polypeptit chứa vùng Fc biến thể được đề xuất trong bản mô tả này và chất mang dược dụng. Theo một phương án khác, dược phẩm chứa polypeptit chứa vùng Fc biến thể được đề xuất trong bản mô tả này và ít nhất một chất trị liệu bổ sung.

Theo một khía cạnh khác, dược phẩm là để điều trị rối loạn. Theo một phương án, dược phẩm được dùng cho cá thể bị rối loạn. Theo một phương án, rối loạn là nhiễm virut. Theo một phương án, "cá thể" là người.

Các kháng thể kháng virut mà bao gồm vùng Fc biến thể theo sáng chế có thể ức chế sự tăng cường phụ thuộc kháng thể (ADE) được quan sát thấy khi dùng các kháng thể kháng virut thông thường. ADE là hiện tượng trong đó virut liên kết với kháng thể được thực bào thông qua các FcγR hoạt hoá do đó tăng cường gây nhiễm virut cho tế bào. Các cải biến Fc mà làm giảm tương tác với các FcγR hoạt hoá có thể giảm nguy cơ ADE. Các đột biến ở các vị trí 234 và 235 từ leuxin thành alanin để tạo thành các thể đột biến LALA đã chứng tỏ là làm giảm nguy cơ ADE của bệnh nhiễm Dengue *in vivo* (Cell Host Microbe (2010) 8, 271-283). Tuy nhiên, các cải biến này làm giảm các chức năng hiệu ứng miễn dịch khác gây ra bởi các kháng thể, như ADCC và CDC. Đặc biệt là, CDC có thể được cho là có vai trò quan trọng trong ức chế ADE, do đó sự liên kết thành phần bổ thể C1q của các vùng Fc không cần phải giảm đi để có hiệu lực điều trị. Hơn nữa, thời gian bán hủy kháng thể có thể kéo dài bằng cách xử lý kỹ thuật các vùng Fc mà làm thay đổi ái lực liên kết với thụ thể cứu hộ của nó, FcRn, mà có thể dẫn đến việc sử dụng các kháng thể theo cách dự phòng để bảo vệ khỏi sự lây nhiễm virut.

Virut tốt hơn là được chọn từ adenovirut, astrovirut, hepadnavirut, virut herpes, papovavirut, virut đậu mùa, arenavirut, bunyavirut, calcivirut, coronavirut, filovirut,

flavivirut, orthomyxovirut, paramyxovirut, picornavirut, reovirut, retrovirut, rhabdovirut, hoặc togavirut.

Theo các phương án được ưu tiên, adenovirut bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, adenovirut của người. Theo các phương án được ưu tiên, astrovirut bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, mamastrovirut. Theo các phương án được ưu tiên, hepadnavirut bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virut viêm gan B. Theo các phương án được ưu tiên, virut herpes bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virut herpes simplex typ I, virut herpes simplex typ 2, cytomegalovirut của người, virut Epstein-Barr, virut varicella zoster, roseolovirut, và virut herpes có liên quan đến bệnh sarcom Kaposi. Theo các phương án được ưu tiên, papovavirut bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virut u nhú ở người và virut polyoma ở người. Theo các phương án được ưu tiên, virut đậu mùa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virut variola, virut vaccinia, virut bệnh đậu mùa ở bò, virut bệnh đậu mùa ở khỉ, virut bệnh đậu mùa, virut giả bệnh đậu mùa ở bò, virut viêm miệng có nốt sần, virut tanapox, virut gây khối u ở khỉ Yaba, và virut u mềm lây. Theo các phương án được ưu tiên, arenavirut bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở viêm màng não đám rối màng mạch lympho bào, virut lassa, virut machupo, và virut junin. Theo các phương án được ưu tiên, bunyavirut bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virut hanta, nairovirut, orthobunyavirut, và phlebovirut. Theo các phương án được ưu tiên, calcivirut bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vesivirut, norovirut, như virut Norwalk và sapovirut. Theo các phương án được ưu tiên, coronavirut bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, coronavirut ở người (tác nhân căn nguyên gây hội chứng hô hấp cấp tính nặng (SARS)). Theo các phương án được ưu tiên, filovirut bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virut Ebola và virut Marburg. Theo các phương án được ưu tiên, flavivirut bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virut gây sốt vàng, virut West Nile, virut Dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4), virut viêm gan C, virut viêm não truyền từ ve, virut viêm não Nhật Bản, virut viêm não Murray Valley, virut viêm não St. Louis, virut viêm não xuân-hè Nga, virut Dengue Omsk, virut gây tiêu chảy ở bò, virut Rừng Kyasanus, và virut viêm não Powassan. Theo các phương án được ưu tiên, orthomyxovirut bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virut cúm typ A, virut cúm typ B, và virut cúm typ C. Theo các phương án được ưu tiên, paramyxovirut bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virut parainfluenza, virut rubula (bệnh quai bị), morbillivirut (bệnh sởi), pneumovirut, như virut hợp bào hô hấp ở người, và virut viêm tiểu não gây cứng bán cấp. Theo các phương

án được ưu tiên, picornavirut bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, poliovirut, rhinovirut, coxsackievirut A, coxsackievirut B, virut viêm gan A, echovirut, và eneterovirut. Theo các phương án được ưu tiên, reovirut bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, virut sốt do con tích Colorado và rotavirut. Theo các phương án được ưu tiên, retrovirut bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lentivirut, như virut gây suy giảm miễn dịch ở người, và virut lympho T (HTLV). Theo các phương án được ưu tiên, rhabdovirut bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lyssavirut, như virut bệnh dại, virut viêm miệng bọng nước và virut gây bệnh hoại tử cơ quan tạo máu truyền nhiễm. Theo các phương án được ưu tiên, togavirut bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, alphavirut, như virut sông Ross, virut O'nyong'nyong, virut Sindbis, virut gây viêm não ở ngựa Venezuela, virut gây viêm não ở ngựa Eastern, và virut gây viêm não ở ngựa Western, và virut rubella.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp bào chế thuốc hoặc dược phẩm, bao gồm bước trộn kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng DENV được đề xuất trong bản mô tả này với chất mang dược dụng, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp điều trị nêu trên. Theo một phương án, các phương pháp bào chế thuốc hoặc dược phẩm còn bao gồm bước bổ sung ít nhất một chất trị liệu bổ sung vào thuốc hoặc dược phẩm này.

Các kháng thể của sáng chế có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các chất khác trong liệu pháp. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể được cho dùng đồng thời với ít nhất một chất trị liệu bổ sung. Theo các phương án nhất định, chất trị liệu bổ sung là chất kháng virut, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, các interferon (ví dụ, interferon α-2b, interferon-γ, v.v.), các kháng thể đơn dòng kháng DENV, các kháng thể đa dòng kháng DENV, các chất ức chế ARN polymeraza, các chất ức chế proteaza, chất ức chế helicaza, các chất điều biến miễn dịch, các hợp chất đối nghĩa, các ARN can thiệp ngắn, các ARN kẹp tóc ngắn, các micro ARN, các aptame ARN, các ribozym, và các tổ hợp của chúng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp bào chế thuốc hoặc dược phẩm, bao gồm bước trộn polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit chứa vùng Fc biến thể được đề xuất trong bản mô tả này với chất mang dược dụng, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp điều trị nêu trên. Theo một phương án, các phương pháp bào chế thuốc hoặc dược phẩm còn bao gồm bước bổ sung ít nhất

một chất trị liệu bổ sung vào thuốc hoặc dược phẩm.

Các polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các chất khác trong liệu pháp. Ví dụ, polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế có thể được cho dùng đồng thời với ít nhất một chất trị liệu bổ sung. Theo các phương án nhất định, chất trị liệu bổ sung là chất kháng virut, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, các interferon (ví dụ, interferon α-2b, interferon-γ, v.v.), các kháng thể đơn dòng kháng virut, các kháng thể đa dòng kháng virut, các chất ức chế ARN polymeraza, các chất ức chế proteaza, chất ức chế helicaza, các chất điều biến miễn dịch, các hợp chất đối nghĩa, các ARN can thiệp ngắn, các ARN kẹp tóc ngắn, các micro ARN, các aptame ARN, các ribozym, và tổ hợp của chúng.

Các liệu pháp kết hợp như nêu trên bao gồm sử dụng kết hợp (trong đó hai hoặc nhiều chất trị liệu được bao gồm trong cùng chế phẩm hoặc trong các chế phẩm riêng biệt), và sử dụng riêng rẽ, trong trường hợp này, việc sử dụng kháng thể hoặc polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế có thể diễn ra trước, đồng thời và/hoặc sau khi sử dụng chất hoặc các chất trị liệu bổ sung. Theo một phương án, việc sử dụng kháng thể kháng DENV và sử dụng chất trị liệu bổ sung diễn ra cách nhau khoảng một tháng, hoặc cách nhau khoảng một, hai hoặc ba tuần, hoặc cách nhau khoảng một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu ngày. Theo một phương án khác, việc sử dụng polypeptit chứa vùng Fc biến thể và sử dụng chất trị liệu bổ sung diễn ra cách nhau khoảng một tháng, hoặc cách nhau khoảng một, hai hoặc ba tuần, hoặc cách nhau khoảng một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu ngày.

Kháng thể hoặc polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế (và chất trị liệu bổ sung bất kỳ) có thể được dùng theo cách thích hợp bất kỳ, bao gồm sử dụng ngoài đường tiêu hoá, trong phổi, và trong mũi, và, nếu muốn để điều trị tại chỗ, sử dụng tại vị trí tổn thương. Truyền ngoài đường tiêu hoá bao gồm sử dụng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong màng bụng, hoặc dưới da. Việc dùng liều có thể theo đường dùng thích hợp bất kỳ, ví dụ bằng cách tiêm, như tiêm trong tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da, tuỳ thuộc một phần vào việc sử dụng là trong thời gian ngắn hay kéo dài. Bản mô tả này bao gồm nhiều phác đồ liều khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sử dụng một lần duy nhất hoặc nhiều lần ở nhiều thời điểm khác nhau, sử dụng bằng cách tiêm nhanh một liều lớn, và truyền theo nhịp.

Các kháng thể hoặc các polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế sẽ được bào chế, phân liều, và sử dụng theo cách phù hợp với thực hành y khoa tốt. Các yếu tố để cân nhắc trong trường hợp này bao gồm rối loạn cụ thể đang điều trị, động vật có vú cụ thể đang điều trị, tình trạng lâm sàng của cá thể bệnh nhân, nguyên nhân của rối loạn, vị trí chuyển chất, phương pháp sử dụng, phác đồ sử dụng và các yếu tố khác đã biết đối với thầy thuốc. Chất này không nhất thiết, nhưng tuỳ ý được tạo ra với một hoặc nhiều chất hiện được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị tình trạng rối loạn quan tâm. Lượng hữu hiệu của các chất khác này tuỳ thuộc vào lượng chất có mặt trong chế phẩm, loại rối loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác được đề cập trên đây. Các chất này thường được sử dụng với cùng các liều lượng và bằng các đường dùng như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc trong khoảng từ 1 đến 99% các liều lượng được mô tả trong bản mô tả này, hoặc theo liều lượng bất kỳ và qua đường dùng bất kỳ mà được xác định là thích hợp trên thực tiễn/lâm sàng.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp của kháng thể hoặc polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế (khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung khác) sẽ tuỳ thuộc vào loại bệnh sẽ điều trị, týp kháng thể, loại polypeptit chứa vùng Fc biến thể, mức độ nghiêm trọng và tiến trình của bệnh này, dù kháng thể hoặc polypeptit chứa vùng Fc biến thể được dùng cho mục đích dự phòng hay điều trị, liệu pháp trước đó, tiền sử lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng với kháng thể hoặc polypeptit chứa vùng Fc biến thể, và suy xét của thầy thuốc điều trị. Kháng thể hoặc polypeptit chứa vùng Fc biến thể được dùng thích hợp cho bệnh nhân một lần hoặc qua một loạt điều trị. Tuỳ thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh, liều lượng trong khoảng từ 1 micro g/kg đến 15 mg/kg (ví dụ, 0,1mg/kg-10mg/kg) kháng thể hoặc polypeptit chứa vùng Fc biến thể có thể là liều ứng viên ban đầu để dùng cho bệnh nhân dù, ví dụ, bằng một lần hay nhiều lần sử dụng riêng rẽ, hay bằng cách truyền liên tục. Một liều hàng ngày thường có thể nằm trong khoảng từ 1 micro g/kg đến 100 mg/kg hoặc cao hơn, tuỳ thuộc vào các yếu tố nêu trên. Để dùng lặp lại trong vài ngày hoặc kéo dài hơn, tuỳ thuộc vào tình trạng, việc điều trị thường sẽ được duy trì cho đến khi tác dụng ngăn chặn các triệu chứng của bệnh đạt mức mong muốn. Một liều điển hình của kháng thể hoặc polypeptit chứa vùng Fc biến thể sẽ nằm trong khoảng từ 0,05 mg/kg đến khoảng 10 mg/kg. Do đó, một hoặc nhiều liều khoảng 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg hoặc 10 mg/kg (hoặc kết hợp bất kỳ các liều này) có thể được dùng cho bệnh nhân.

Các liều này có thể được sử dụng gián đoạn, ví dụ một tuần một lần hoặc ba tuần một lần (ví dụ sao cho bệnh nhân tiếp nhận từ khoảng hai đến khoảng hai mươi, hoặc ví dụ khoảng sáu liều của kháng thể hoặc polypeptit chứa vùng Fc biến thể). Liều nạp ban đầu cao hơn, tiếp theo là một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể sử dụng. Sự tiến triển của liệu pháp này được theo dõi một cách dễ dàng bằng các kỹ thuật và thử nghiệm thường.

Cần hiểu là, chế phẩm hoặc phương pháp bất kỳ trong số các chế phẩm hoặc các phương pháp điều trị nêu trên có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thể liên hợp miễn dịch của sáng chế thay vì hoặc ngoài kháng thể kháng DENV. Tương tự, cũng cần hiểu là chế phẩm hoặc phương pháp bất kỳ trong số các chế phẩm hoặc các phương pháp điều trị nêu trên có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thể liên hợp miễn dịch của sáng chế thay vì hoặc ngoài polypeptit chứa vùng Fc biến thể được đề xuất trong bản mô tả này.

H. Vật phẩm

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, vật phẩm có chứa các chất hữu ích để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn nêu trên được đề xuất. Vật phẩm này bao gồm vật chứa và nhãn gắn trên hoặc hướng dẫn sử dụng kèm theo vật chứa. Vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, bơm tiêm, túi dịch truyền tĩnh mạch, *v.v.*. Các vật chứa có thể được chế tạo bằng nhiều loại chất liệu như thuỷ tinh hoặc chất dẻo. Vật chứa chứa đựng chế phẩm mà tự nó hoặc kết hợp với một chế phẩm khác là hữu hiệu để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh lý và có thể có miệng vào vô trùng (ví dụ vật chứa có thể là túi dịch truyền tĩnh mạch hoặc lọ có nút đậy có thể chọc xuyên qua bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất một thành phần hoạt tính trong chế phẩm này là kháng thể hoặc polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế. Nhãn hoặc hướng dẫn sử dụng chỉ ra rằng chế phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý theo lựa chọn. Hơn nữa, vật phẩm có thể bao gồm (a) vật chứa thứ nhất chứa chế phẩm, trong đó chế phẩm này bao gồm kháng thể hoặc polypeptit chứa vùng Fc biến thể theo sáng chế; và (b) vật chứa thứ hai chứa chế phẩm, trong đó chế phẩm này bao gồm chất gây độc tế bào hoặc chất trị liệu khác nữa. Vật phẩm theo phương án này của sáng chế có thể còn bao gồm hướng dẫn sử dụng chỉ ra rằng các chế phẩm có thể được sử dụng để điều trị một tình trạng bệnh cụ thể. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, vật phẩm này có thể còn bao gồm vật chứa thứ hai (hoặc thứ ba) bao gồm đệm dược dụng, như nước kìm khuẩn để tiêm (BWFI), nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Vật phẩm này có thể còn bao

gồm các chất khác mong muốn có trên quan điểm thương mại và người dùng, bao gồm các chất đệm, chất pha loãng, màng lọc, kim tiêm và bơm tiêm khác.

Cần hiểu là vật phẩm bất kỳ trong số các vật phẩm nêu trên có thể bao gồm thể liên hợp miễn dịch của sáng chế thay vì hoặc ngoài kháng thể kháng DENV. Có thể hiểu là vật phẩm bất kỳ trong số các vật phẩm nêu trên có thể bao gồm thể liên hợp miễn dịch của sáng chế thay vì hoặc ngoài polypeptit chứa vùng Fc biến thể.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây là về các phương pháp và các chế phẩm theo sáng chế. Cần hiểu là các phương án khác có thể được thực hiện, dựa vào phần mô tả chung ở trên.

Ví dụ 1: Bào chế các kháng nguyên và kháng thể

Biểu hiện và tinh chế protein E hoà tan tái tổ hợp từ DENV-1, DENV-2, DENV-3, và DENV-4

Các protein E hoà tan tái tổ hợp (0.8E-His) từ DENV-1, DENV-2, DENV-3, và DENV-4 có nhãn 8x Histidin đầu tận carboxy (theo thứ tự SEQ ID NO: 65-68) được biểu hiện tạm thời bằng cách sử dụng dòng tế bào FreeStyle293-F hoặc dòng tế bào Expi293 (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA). Bằng cách biểu hiện prM0.8E-His từ DENV-1, DENV-2, DENV-3, và DENV-4 (theo thứ tự SEQ ID NO: 61-64), prM0.8E-His được biểu hiện dưới dạng polypeptit đơn nhất trong các tế bào, polypeptit này tiếp đó được xử lý nội bào để được phân cắt giữa prM và 0.8E-His. Do đó, 0.8E-His được tiết vào môi trường nuôi cấy tế bào. Môi trường có điều kiện chứa 0.8E-His được đưa lên cột nạp nhựa sắc ký ái lực kim loại được cố định (IMAC) có nạp niken hoặc coban, tiếp đó rửa giải bằng imidazol. Các phân đoạn chứa 0.8E-His được gộp lại và đưa qua cột lọc gel Superdex 200 (GE healthcare, Uppsala, Sweden). Các phân đoạn chứa 0.8E-His được gộp lại và bảo quản ở -80°C.

Biểu hiện và tinh chế các FcγR của người tái tổ hợp

Các miền ngoại bào của các FcγR của người được điều chế bằng phương pháp sau. Đầu tiên, gen miền ngoại bào của FcγR được tổng hợp bằng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Ở thời điểm đó, trình tự của từng FcγR được tạo ra dựa trên thông tin đã đăng ký với NCBI. Cụ thể là, FcγRIa được tạo ra dựa trên dựa trên trình tự đăng ký có số truy cập NCBI là NM_000566 (Phiên bản

số NM_000566.3), FcγRIIa được tạo ra dựa trên trình tự đã đăng ký có số truy cập NCBI là NM_001136219 (Phiên bản số NM_001136219.1), FcγRIIb được tạo ra dựa trên trình tự đã đăng ký có số truy cập NCBI là NM_004001 (Phiên bản số NM_004001.3), FcγRIIIa được tạo ra dựa trên trình tự đã đăng ký có số truy cập NCBI là NM_001127593 (Phiên bản số NM_001127593.1), và FcγRIIIb được tạo ra dựa trên trình tự đã đăng ký có số truy cập NCBI là NM_000570 (Phiên bản số NM_000570.3), và nhãn His được gắn với đầu tận C của từng cấu trúc FcγR. Hơn nữa, có hiện tượng đa hình là đã biết đối với FcγRIIa, FcγRIIIa, và FcγRIIIb, và các vị trí đa hình được tạo ra, tham khảo tài liệu Warmerdam et al. (J Exp Med (1990) 172, 19-25) đối với FcγRIIa; Wu et al. (J Clin Invest (1997) 100, 1059-1070) đối với FcγRIIIa; và Ory et al. (J Clin Invest (1989) 84, 1688-1691) đối với FcγRIIIb.

Các vectơ biểu hiện được tạo cấu trúc bằng cách chèn các mảnh gen đã thu được vào các vectơ biểu hiện tế bào động vật. Các vectơ biểu hiện đã được tạo cấu trúc này được đưa tạm thời vào các tế bào FreeStyle293 thu được từ tế bào ung thư thận phôi người (Invitrogen) để biểu hiện các protein quan tâm. Các dịch lỏng được điều chế bằng cách lọc các dịch nổi nuôi cấy qua màng lọc 0,22 μm thu được từ môi trường nuôi cấy của các tế bào đã được đưa vào tạm thời trên đây, được tinh chế, về nguyên tắc, theo bốn bước sau: (i) sắc ký cột trao đổi cation (SP Sepharose FF); (ii) sắc ký cột ái lực cho nhãn His (HisTrap HP); (iii) sắc ký cột lọc gel (Superdex200); và (iv) lọc vô trùng. Để tinh chế FcγRI, sắc ký cột trao đổi anion với Q sepharose FF được sử dụng cho bước (i). Độ hấp thụ của protein đã tinh chế được đo ở 280 nm bằng cách sử dụng máy đo quang phổ. Dựa trên các giá trị đã đo, tính nồng độ của protein đã tinh chế bằng cách sử dụng hệ số tắt được xác định bằng phương pháp như PACE (Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

Biểu hiện và tinh chế các FcγR của chuột tái tổ hợp

Miền ngoại bào của các FcγR của chuột (mFcγRs) được điều chế bằng phương pháp sau: đầu tiên, gen của miền ngoại bào FcγR được tổng hợp bằng phương pháp thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Đối với quy trình tổng hợp này, trình tự của từng FcγR được tạo ra dựa trên thông tin đã đăng ký với NCBI. Cụ thể là, mFcγRI được tạo ra dựa trên trình tự của trình tự tham chiếu của NCBI: NP_034316.1; mFcγRIIb được tạo ra dựa trên trình tự của trình tự tham chiếu của NCBI: NP_034317.1; mFcγRIII được tạo ra dựa trên trình tự của trình tự tham chiếu của NCBI:

NP_034318.2; và mFcγRIV được tạo ra dựa trên trình tự của trình tự tham chiếu của NCBI: NP_653142.2. Mỗi trình tự trong số các trình tự này được gắn nhãn His ở đầu tận C.

Mỗi mảnh gen thu được được chèn vào các vectơ để biểu hiện ở các tế bào động vật để tạo ra các vectơ biểu hiện. Các vectơ biểu hiện tạo ra được chuyển tạm thời vào các tế bào FreeStyle 293 thu được từ tế bào ung thư thận phôi người (Invitrogen) để biểu hiện protein quan tâm. Thu hồi dịch nổi nuôi cấy thu được và cho đi qua màng lọc 0,22 µm để thu được dịch nổi nuôi cấy. Tinh chế dịch nổi nuôi cấy thu được theo thông lệ, bằng bốn bước sau: (i) sắc ký cột trao đổi ion, (ii) sắc ký cột ái lực cho nhãn His (HisTrap HP), (iii) sắc ký cột lọc gel (Superdex 200), và (iv) lọc vô trùng. Tiến hành sắc ký cột trao đổi ion của bước (i) bằng cách sử dụng Q Sepharose HP cho mFcγRI, SP Sepharose FF cho mFcγRIIb và mFcγRIV, và SP Sepharose HP cho mFcγRIII. Sử dụng D-PBS(-) làm dung môi trong bước (iii) hoặc bước sau đó, đồng thời sử dụng D-PBS(-) chứa arginin 0,1 M cho mFcγRIII. Đo độ hấp thụ cho mỗi protein đã tinh chế ở 280 nm bằng cách sử dụng máy đo quang phổ, và nồng độ của protein đã tinh chế được tính bằng cách sử dụng hệ số tắt được tính từ giá trị thu được bằng phương pháp như PACE (Protein Science (1995) 4, 2411-2423).

Biểu hiện và tinh chế FcRn của người tái tổ hợp

FcRn là heterodime của chuỗi FcRn alpha và beta2-microglobulin. Các đoạn mồi oligo-ADN được điều chế dựa trên trình tự gen FcRn của người đã công bố (J Exp Med (1994) 180, 2377-2381). Mảnh ADN mã hoá toàn bộ gen thu được bằng PCR bằng cách sử dụng cADN của người (Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech) làm khuôn và các đoạn mồi đã điều chế. Bằng cách sử dụng mảnh ADN thu được làm khuôn, mảnh ADN mã hoá miền ngoại bào chứa vùng tín hiệu (Met1-Leu290) được khuếch đại bằng PCR, và được chèn vào vectơ biểu hiện ở tế bào động vật có vú. Tương tự, các đoạn mồi oligo-ADN được điều chế dựa trên trình tự gen beta2-microglobulin của người đã công bố (Proc Natl Acad Sci USA (2002) 99, 16899-16903). Mảnh ADN mã hoá toàn bộ gen thu được bằng PCR bằng cách sử dụng cADN của người (Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech) làm khuôn và các đoạn mồi đã điều chế. Bằng cách sử dụng mảnh ADN thu được làm khuôn, mảnh ADN mã hoá toàn bộ protein chứa vùng tín hiệu (Met1-Met119) được khuếch đại bằng PCR và được chèn vào vectơ biểu hiện ở tế bào

động vật có vú.

FcRn hoà tan của người được biểu hiện bằng quy trình sau. Các plasmit được tạo cấu trúc để biểu hiện FcRn chuỗi alpha của người (SEQ ID NO: 81) và beta2-microglobulin (SEQ ID NO: 82) được đưa vào tế bào của dòng tế bào thu được từ ung thư thận phôi người HEK293H (Invitrogen) bằng phương pháp chuyển liposom sử dụng PEI (Polyscience). Gom dịch nổi nuôi cấy thu được, và tinh chế FcRn bằng cách sử dụng IgG Sepharose 6 Fast Flow (Amersham Biosciences), tiếp đó tinh chế tiếp bằng cách sử dụng HiTrap Q HP (GE Healthcare) (J Immunol (2002) 169, 5171-5180).

Biểu hiện và tinh chế các kháng thể tái tổ hợp

Các kháng thể tái tổ hợp được biểu hiện tạm thời bằng cách sử dụng dòng tế bào FreeStyle293-F hoặc dòng tế bào Expi293 (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA). Tinh chế từ môi trường có điều kiện biểu hiện kháng thể bằng phương pháp thông thường sử dụng protein A. Tiến hành lọc gel tiếp, nếu cần.

Biểu hiện và tinh chế CD154 của người hoà tan tái tổ hợp

Gen CD154 của người được tổng hợp dựa trên trình tự protein đã công bố (NP_000065.1). Mảnh ADN mã hoá dạng hoà tan của CD154 (shCD154) của người với nhãn FLAG được điều chế bằng PCR, bằng cách sử dụng ADN đã tổng hợp làm khuôn, và các mảnh ADN thu được được chèn vào vectơ biểu hiện của tế bào động vật có vú, nhờ đó tạo ra vectơ biểu hiện FLAG-shCD154 (SEQ ID NO: 106). Các trình tự nucleotit của các vectơ biểu hiện thu được được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. FLAG-shCD154 được biểu hiện bằng cách sử dụng dòng tế bào FreeStyle 293 (Invitrogen) như được mô tả theo quy trình do nhà sản xuất cung cấp. Sau khi chuyển nhiễm, các tế bào được cho sinh trưởng trong thời gian thích hợp trước khi thu hoạch môi trường có điều kiện. Môi trường có điều kiện này được chạy sắc ký trao đổi cation bằng cách sử dụng MES 25 mM (độ pH=6,0), và FLAG-shCD154 được rửa giải bằng gradien liên tục MES 25 mM, NaCl 1M (độ pH=6,0). Các phân đoạn pic được gộp lại, cô bằng cách sử dụng AmiconUltra Ultracel và chạy sắc ký lọc gel bằng cách sử dụng nước muối đệm phosphat (Wako). Các phân đoạn pic lại được gộp lại và cô bằng cách sử dụng AmiconUltra Ultracel, tiếp đó tiệt trùng bằng cách lọc qua bộ lọc màng PVDF 0,22 micromet. Để xác định nồng độ của FLAG-shCD154, đo độ hấp thụ ở 280 nm bằng cách sử dụng máy đo

quang phổ. Nồng độ protein được tính từ các giá trị đã xác định bằng cách sử dụng hệ số hấp thụ được tính theo phương pháp được mô tả trong Protein Science (1995) 4: 2411-2423.

Ví dụ 2: Tạo ra các biến thể kháng thể có ái lực với protein E của DENV được cải thiện

Các gen mã hoá VH (3CH, SEQ ID NO: 1) và VL (3CL, SEQ ID NO: 7) của kháng thể kháng protein E của DENV được tổng hợp và kết hợp lần lượt với CH của IgG1 người (SG182, SEQ ID NO: 46) và CL của người (SK1, SEQ ID NO: 60), và cả hai cấu trúc được tách dòng vào vectơ biểu hiện đơn nhất. Kháng thể được ký hiệu trong bản mô tả này là DG_3CH-SG182/3CL-SK1, hoặc là 3C.

Số lượng các đột biến và các tổ hợp của chúng được kiểm tra để nhận diện các đột biến và tổ hợp mà làm cải thiện các tính chất liên kết của 3C. Sau đó, nhiều đột biến được đưa vào các vùng biến đổi để tăng cường ái lực liên kết với protein E. Từ đó, tạo ra các biến thể VH được tối ưu hoá, 3CH912 (SEQ ID NIO: 2), 3CH953 (SEQ ID NO: 3), 3CH954 (SEQ ID NO: 4), 3CH955 (SEQ ID NO: 5), 3CH1047 (SEQ ID NO: 6), 3CH987 (SEQ ID NO: 90), 3CH989 (SEQ ID NO: 91), 3CH992 (SEQ ID NO: 92), 3CH1000 (SEQ ID NO: 93), 3CH1046 (SEQ ID NO: 94), 3CH1049 (SEQ ID NO: 95), và các biến thể VL được tối ưu hoá, 3CL499 (SEQ ID NO: 8), 3CL563 (SEQ ID NO: 9), 3CL658 (SEQ ID NO: 10), 3CL012 (SEQ ID NO: 96), 3CL119 (SEQ ID NO: 97), 3CL633 (SEQ ID NO: 98), 3CL666 (SEQ ID NO: 99), 3CL668 (SEQ ID NO: 100). Các gen mã hoá VH được kết hợp với CH của IgG1 người (bất kỳ trong số SG182, SEQ ID NO: 46; SG1095, SEQ ID NO: 54; hoặc SG1106, SEQ ID NO: 59), và các gen mã hoá VL được kết hợp với CL của người (SK1, SEQ ID NO: 60). Mỗi gen này được tách dòng vào vectơ biểu hiện. Các trình tự axit amin của các biến thể kháng thể được tóm tắt trong Bảng 2. Một trong số các biến thể DG_3CH1047-SG182/3CL658-SK1, còn được ký hiệu trong bản mô tả này là 3Cam và một biến thể khác, DG_3CH1047-SG182/3CL-SK1, được ký hiệu trong bản mô tả này là 3Cam2.

Các kháng thể được biểu hiện trong các tế bào HEK293 được đồng chuyển nhiễm với hỗn hợp các vectơ biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và được tinh chế bằng protein A.

Bảng 2

Trình tự axit amin của 3C và các biến thể 3C

	SEQ ID NO:									
Kháng thể	VH	VL	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3	CH	CL
DG_3CH-SG182/3CL-SK1	1	7	11	13	16	21	24	27	46	60
DG_3CH912-SG182/3CL-SK1	2	7	11	14	17	21	24	27	46	60
DG_3CH953-SG182/3CL-SK1	3	7	11	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH954-SG182/3CL-SK1	4	7	11	15	18	21	24	27	46	60
DG_3CH955-SG182/3CL-SK1	5	7	11	15	19	21	24	27	46	60
DG_3CH-SG182/3CL499-SK1	1	8	11	13	16	21	25	28	46	60
DG_3CH-SG182/3CL563-SK1	1	9	11	13	16	22	25	29	46	60
DG_3CH953-SG182/3CL499-SK1	3	8	11	15	17	21	25	28	46	60
DG_3CH953-SG182/3CL563-SK1	3	9	11	15	17	22	25	29	46	60
DG_3CH955-SG182/3CL499-SK1	5	8	11	15	19	21	25	28	46	60
DG_3CH955-SG182/3CL563-SK1	5	9	11	15	19	22	25	29	46	60
DG_3CH1047-SG182/3CL658-SK1	6	10	12	15	20	23	26	30	46	60
DG_3CH1000-SG182/3CL-SK1	93	7	12	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH1047-SG182/3CL-SK1	6	7	12	15	20	21	24	27	46	60
DG_3CH953-SG1095/3CL-SK1	3	7	11	15	17	21	24	27	54	60
DG_3CH1000-SG1095/3CL-SK1	93	7	12	15	17	21	24	27	54	60
DG_3CH1047-SG1095/3CL-SK1	6	7	12	15	20	21	24	27	54	60
DG_3CH953-SG1106/3CL-SK1	3	7	11	15	17	21	24	27	59	60
DG_3CH1000-SG1106/3CL-SK1	93	7	12	15	17	21	24	27	59	60
DG_3CH1047-SG1106/3CL-SK1	6	7	12	15	20	21	24	27	59	60
DG_3CH953-SG1095/3CL012-SK1	3	96	11	15	17	21	24	30	54	60
DG_3CH1000-SG1095/3CL012-SK1	93	96	12	15	17	21	24	30	54	60
DG_3CH1047-SG1095/3CL012-SK1	6	96	12	15	20	21	24	30	54	60
DG_3CH953-SG1106/3CL012-SK1	3	96	11	15	17	21	24	30	59	60
DG_3CH1000-SG1106/3CL012-SK1	93	96	12	15	17	21	24	30	59	60
DG_3CH1047-SG1106/3CL012-SK1	6	96	12	15	20	21	24	30	59	60
DG_3CH953-SG1095/3CL119-SK1	3	97	11	15	17	23	24	27	54	60
DG_3CH1000-SG1095/3CL119-SK1	93	97	12	15	17	23	24	27	54	60
DG_3CH1047-SG1095/3CL119-SK1	6	97	12	15	20	23	24	27	54	60
DG_3CH953-SG1106/3CL119-SK1	3	97	11	15	17	23	24	27	59	60
DG_3CH1000-SG1106/3CL119-SK1	93	97	12	15	17	23	24	27	59	60
DG_3CH1047-SG1106/3CL119-SK1	6	97	12	15	20	23	24	27	59	60
DG_3CH1049-SG182/3CL-SK1	95	7	12	15	20	21	24	27	46	60
DG_3CH1046-SG182/3CL-SK1	94	7	12	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH989-SG182/3CL-SK1	91	7	11	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH992-SG182/3CL-SK1	92	7	101	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH987-SG182/3CL-SK1	90	7	101	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH1049-SG182/3CL012-SK1	95	96	12	15	20	21	24	30	46	60
DG_3CH1046-SG182/3CL012-SK1	94	96	12	15	17	21	24	30	46	60
DG_3CH989-SG182/3CL012-SK1	91	96	11	15	17	21	24	30	46	60
DG_3CH992-SG182/3CL012-SK1	92	96	101	15	17	21	24	30	46	60
DG_3CH987-SG182/3CL012-SK1	90	96	101	15	17	21	24	30	46	60
DG_3CH1049-SG182/3CL119-SK1	95	97	12	15	20	23	24	27	46	60
DG_3CH1046-SG182/3CL119-SK1	94	97	12	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH989-SG182/3CL119-SK1	91	97	11	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH992-SG182/3CL119-SK1	92	97	101	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH987-SG182/3CL119-SK1	90	97	101	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH1049-SG182/3CL668-SK1	95	100	12	15	20	21	24	30	46	60
DG_3CH1046-SG182/3CL668-SK1	94	100	12	15	17	21	24	30	46	60
DG_3CH989-SG182/3CL668-SK1	91	100	11	15	17	21	24	30	46	60
DG_3CH1049-SG182/3CL666-SK1	95	99	12	15	20	23	24	27	46	60
DG_3CH1046-SG182/3CL666-SK1	94	99	12	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH989-SG182/3CL666-SK1	91	99	11	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH1049-SG182/3CL633-SK1	95	98	12	15	20	21	24	27	46	60
DG_3CH1046-SG182/3CL633-SK1	94	98	12	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH989-SG182/3CL633-SK1	91	98	11	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH953-SG182/3CL668-SK1	3	100	11	15	17	21	24	30	46	60
DG_3CH1000-SG182/3CL668-SK1	93	100	12	15	17	21	24	30	46	60
DG_3CH953-SG182/3CL666-SK1	3	99	11	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH1000-SG182/3CL666-SK1	93	99	12	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH953-SG182/3CL633-SK1	3	98	11	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH1000-SG182/3CL633-SK1	93	98	12	15	17	21	24	27	46	60
DG_3CH1047-SG182/3CL666-SK1	6	99	12	15	20	23	24	27	46	60
DG_3CH992-SG182/3CL666-SK1	92	99	101	15	17	23	24	27	46	60
DG_3CH1047-SG182/3CL633-SK1	6	98	12	15	20	21	24	27	46	60
DG_3CH992-SG182/3CL633-SK1	92	98	101	15	17	21	24	27	46	60

Ái lực của các kháng thể kháng protein E của DENV liên kết với protein E của DENV-1, DENV-2, DENV-3, và DENV-4 được xác định ở 25°C bằng cách sử dụng thiết bị Biacore T200 (GE Healthcare). Kháng thể kháng histidin (GE Healthcare) được cố định vào tất cả các tế bào dòng chảy của chip cảm biến CM4 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin (GE Healthcare). Tất cả các kháng thể và các chất phân tích được tạo ra trong PBS, độ pH=7,4, chứa natri phosphat 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05% và

NaN_3 0,005%. Protein E của DENV-1, DENV-2, DENV-3, và DENV-4 với nhãn His ở đầu tận C được bắt giữ vào tế bào dòng chảy 2 hoặc 3, với tế bào dòng chảy 1 làm tế bào dòng chảy tham chiếu. Lượng bắt giữ protein E được mong đợi là ở 200 đơn vị cộng hưởng (RU). Các kháng thể kháng protein E của DENV được tiêm ở 250 nM lên toàn bộ bề mặt cảm biến trong 180 giây, tiếp đó là phân ly trong 300 giây. Bề mặt cảm biến được tái tạo sau mỗi chu trình bằng cách sử dụng 10 mM Gly-HCl độ pH=1,5. Ái lực liên kết được xác định bằng cách xử lý và khớp dữ liệu vào mô hình liên kết 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm đánh giá của Biacore T200, phiên bản 2.0 (GE Healthcare).

Bảng 3a và Bảng 3b thể hiện ái lực (K_d) của các kháng thể kháng protein E của DENV liên kết với protein E của DENV-1 (được ký hiệu là DV1 trong Bảng), DENV-2 (được ký hiệu là DV2 trong Bảng), DENV-3 (được ký hiệu là DV3 trong Bảng), và DENV-4 (được ký hiệu là DV4 trong Bảng). Mỗi biến thể 3C thể hiện ái lực liên kết gia tăng kháng lại cả bốn týp huyết thanh DENV, so với 3C gốc. Ví dụ, các đồ thị cảm biến của kháng thể 3C gốc (DG_3CH-SG182/3CL-SK1) và một trong số kháng thể biến thể 3Cam (DG_3CH1047-SG182/3CL658-SK1) được thể hiện trên Fig.1. Tương tự, các đồ thị cảm biến của kháng thể gốc 3C (DG_3CH-SG182/3CL-SK1) và một trong số kháng thể biến thể 3Cam2 (DG_3CH1047-SG182/3CL-SK1) được thể hiện trên Fig.10.

Bảng 3a

Giá trị Kd của 3C và biến thể 3C kháng lại bốn týp huyết thanh DENV

Biến thể Fv	**KD (M)**			
	DV1	**DV2**	**DV3**	**DV4**
DG_3CH-SG182/3CL-SK1	3,21E-08	1,40E-08	6,07E-09	1,69E-08
DG_3CH912-SG182/3CL-SK1	1,85E-09	8,11E-10	2,44E-10	8,78E-09
DG_3CH953-SG182/3CL-SK1	1,41E-09	7,76E-10	1,36E-10	6,20E-09
DG_3CH954-SG182/3CL-SK1	8,87E-10	1,22E-10	1,24E-10	4,35E-09
DG_3CH955-SG182/3CL-SK1	1,13E-09	7,94E-10	2,05E-10	7,80E-09
DG_3CH-SG182/3CL499-SK1	1,11E-08	4,73E-09	4,03E-09	8,35E-09
DG_3CH-SG182/3CL563-SK1	1,34E-08	4,43E-09	3,52E-09	1,18E-08
DG_3CH953-SG182/3CL499-SK1	1,46E-09	9,05E-10	2,11E-10	5,99E-09
DG_3CH953-SG182/3CL563-SK1	1,88E-09	9,22E-10	2,64E-10	8,21E-09
DG_3CH955-SG182/3CL499-SK1	1,26E-09	1,03E-09	3,31E-10	8,26E-09
DG_3CH955-SG182/3CL563-SK1	1,91E-09	1,04E-09	2,90E-10	1,22E-08
DG_3CH1047-SG182/3CL658-SK1	3,51E-09	7,65E-10	3,82E-12*	9,11E-09
DG_3CH1047-SG182/3CL-SK1	2,14E-09	8,43E-10	2,31E-13*	5,61E-09

Lưu ý: * các chất gắn kết mạnh, tốc độ phân ly chậm < 1E-05 không thể xác định riêng.

Bảng 3b

Giá trị Kd của 3C và biến thể 3C kháng lại các týp huyết thanh DENV1 và DENV3

Biến thể Fv	KD (M)	
	DV1	DV3
DG_3CH-SG182/3CL-SK1	2,25E-08	6,35E-09
DG_3CH 1047-SG182/3CL658-SK1	2,98E-09	5,01E-12*
DG_3CH953-SG182/3CL-SK1	1,80E-09	9,85E-13*
DG_3CH 1000-SG182/3CL-SK1	1,79E-09	3,49E-12*
DG_3CH 1047-SG182/3CL-SK1	2,06E-09	7,22E-11 *
DG_3C H953-SG1095/3CL-SK1	1,79E-09	7,03E-12*
DG_3CH 1000-SG1095/3CL-SK1	1,80E-09	1,68E-11 *
DG_3CH 1047-SG1095/3CL-SK1	2,09E-09	2,93E-12*
DG_3CH953-SG1106/3CL-SK1	1,85E-09	7,08E-12*
DG_3CH 1000-SG1106/3CL-SK1	1,84E-09	2,99E-13*
DG_3CH 1047-SG1106/3CL-SK1	2,12E-09	4,71E-12*
DG_3CH953-SG1095/3CL012-SK1	1,86E-09	5,53E-12*
DG_3CH 1000-SG1095/3CL012-SK1	1,83E-09	9,59E-13*
DG_3CH 1047-SG1095/3CL012-SK1	2,21E-09	3,17E-12*
DG_3CH953-SG1106/3CL012-SK1	1,89E-09	1,06E-11 *
DG_3CH 1000-SG1106/3CL012-SK1	1,91E-09	1,01E-13*
DG_3CH 1047-SG1106/3CL012-SK1	2,18E-09	2,36E-12*
DG_3CH953-SG1095/3CL119-SK1	1,99E-09	7,18E-12*
DG_3CH 1000-SG1095/3CL119-SK1	1,92E-09	4,28E-14*
DG_3CH 1047-SG1095/3CL119-SK1	2,23E-09	3,79E-12*
DG_3CH953-SG1106/3CL119-SK1	1,96E-09	2,17E-12*
DG_3CH 1000-SG1106/3CL119-SK1	1,91E-09	1,82E-12*
DG_3CH 1047-SG1106/3CL119-SK1	2,29E-09	4,36E-12*
DG_3CH 1049-SG182/3CL-SK1	2,14E-09	2,39E-12*
DG_3CH 1046-SG182/3CL-SK1	1,91E-09	2,13E-13*
DG_3CH989-SG182/3CL-SK1	1,84E-09	4,48E-13*
DG_3CH992-SG182/3CL-SK1	2,02E-09	4,03E-12*
DG_3CH987-SG182/3CL-SK1	1,82E-09	9,86E-13*
DG_3CH 1049-SG182/30 L012-SK1	2,26E-09	1,05E-12*
DG_3CH 1046-SG182/30 L012-SK1	1,92E-09	1,45E-13*
DG_3CH989-SG182/3CL012-SK1	1,52E-09	9,67E-14*
DG_3CH992-SG182/3CL012-SK1	1,72E-09	1,07E-12*
DG_3CH987-SG182/3CL012-SK1	142E-09	2,67E-12*
DG_3CH 1049-SG182/3CL119-SK1	1,72E-09	5,09E-12*
DG_3CH 1046-SG182/3CL119-SK1	1,53E-09	2,73E-12*
DG_3CH989-SG 182/3CL119-SK1	1,53E-09	6,83E-12*
DG_3CH992-SG 182/3CL119-SK1	1,87E-09	5,15E-13*
DG_3CH987-SG 182/3CL119-SK1	1,53E-09	7,15E-13*
DG_3CH 1049-SG182/3CL668-SK1	1,70E-09	1,55E-12*
DG_3CH 1046-SG182/3CL668-SK1	1,56E-09	5,59E-13*
DG_3CH989-SG182/3CL668-SK1	1,50E-09	3,03E-12*
DG_3CH 1049-SG182/3CL666-SK1	1,72E-09	2,95E-12*
DG_3CH 1046-SG182/3CL666-SK1	1,52E-09	4,70E-13 *
DG_3CH989-SG182/3CL666-SK1	1,50E-09	1,96E-12*
DG_3CH 1049-SG182/3CL633-SK1	1,73E-09	4,10E-12*
DG_3CH 1046-SG182/3CL633-SK1	1,64E-09	2,01E-13*
DG_3CH989-SG182/3CL633-SK1	1,54E-09	2,37E-12*
DG_3CH953-SG182/3CL668-SK1	1,68E-09	2,36E-12*
DG_3CH 1000-SG182/3CL668-SK1	1,68E-09	8,00E-13*
DG_3CH953-SG182/3CL666-SK1	1,69E-09	5,48E-12*
DG_3CH 1000-SG182/3CL666-SK1	1,66E-09	2,50E-12*
DG_3CH953-SG182/3CL633-SK1	1,65E-09	4,96E-12*
DG_3CH 1000-SG182/30 L633-SK1	1,77E-09	4,25E-12*
DG_3CH 1047-SG182/30 L666-SK1	9,82E-10	4,20E-11 *
DG_3CH992-SG182/3CL666-SK1	1,39E-09	8,02E-13*
DG_3CH 1047-SG182/3CL633-SK1	9,56E-10	4,37E-13*
DG_3CH992-SG182/3CL633-SK1	1,27E-09	2,95E-12*

Lưu ý: * các chất gắn kết mạnh, tốc độ phân ly chậm < 1E-05 không thể xác định riêng.

Ví dụ 3: Tạo ra các biến thể CH của kháng thể cho các tính chất được cải thiện

Nhiều đột biến được đưa vào vùng hằng định chuỗi nặng CH của IgG1 người (SG182, SEQ ID NO: 46), và do đó, tạo ra các biến thể CH của IgG1 người, SG192 (SEQ ID NO: 47), SG1085 (SEQ ID NO: 48), SG1086 (SEQ ID NO: 49), SG1087 (SEQ ID NO: 50), SG1088 (SEQ ID NO: 51), SG1089 (SEQ ID NO: 52), SG1090 (SEQ ID NO: 53), SG1095 (SEQ ID NO: 54), SG1096 (SEQ ID NO: 55), SG1097 (SEQ ID NO: 56), SG1098 (SEQ ID NO: 57), SG1105 (SEQ ID NO: 58), SG1106 (SEQ ID NO: 59), SG1109 (SEQ ID NO: 107), SG1044 (SEQ ID NO: 108), và SG1045 (SEQ ID NO: 109). Các gen mã hoá các biến thể CH được kết hợp với VH của 3C (3CH, SEQ ID NO: 1), một trong số các biến thể 3C (3CH1047, SEQ ID NO: 6), hoặc kháng thể kháng CD154 (SLAPH0336a, SEQ ID NO: 88). Gen VL của kháng thể kháng CD154 (SLAPL0336a, SEQ ID NO: 89) được kết hợp với CL của người (SK1, SEQ ID NO: 60). Mỗi trong số này được tách dòng vào vectơ biểu hiện. Chi tiết về các biến thể CH được tóm tắt trong Bảng 4. Vùng biến đổi của kháng thể kháng CD154 SLAPH0336a/SLAPL0366a, mà có thể tạo thành phức hợp miễn dịch lớn khi có mặt kháng nguyên trime CD154, được sử dụng để đánh giá khả lực liên kết của các biến thể CH với thụ thể Fc.

Các kháng thể được biểu hiện trong các tế bào HEK293 được đồng chuyển nhiễm với hỗn hợp các vectơ biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và được tinh chế bằng protein A.

Bảng 4

Trình tự axit amin của các vùng Fc biến thể

Tên biến thể	ID	Đột biến	SEQ ID NO:
WT	SG182	-	46
LALA	SG192	L234A, L235A	47
KWES	SG1085	K326W, E333S	48
EFT + AE	SG1086	G236A, S267E, H268F, S324T, I332E	49
EFT	SG1087	S267E, H268F, S324T	50
LALA + KWES	SG1088	L234A, L235A, K326W, E333S	51
LALA + EFT + AE	SG1089	L234A, L235A, G236A, S267E, H268F, S324T, I332E	52
LALA + EFT	SG1090	L234A, L235A, S267E, H268F, S324T	53
LALA + KAES	SG1095	L234A, L235A, K326A, E333S	54
LALA + KDES	SG1096	L234A, L235A, K326D, E333S	55
LALA + KEES	SG1097	L234A, L235A, K326E, E333S	56
LALA + KMES	SG1098	L234A, L235A, K326M, E333S	57
LALA + ACT3 + KAES	SG1105	L234A, L235A, K326A, E333S, M428L, N434A, Y436T, Q438R, S440E	58
LALA + ACT5 + KAES	SG1106	L234A, L235A, K326A, E333S, M428L, N434A, Q438R, S440E	59
KAES	SG1109	K326A, E333S	107
LALA + ACT3	SG1044	L234A, L235A, M428L, N434A, Y436T, Q438R, S440E	108
LALA + ACT5	SG1045	L234A, L235A, M428L, N434A, Q438R, S440E	109

Ví dụ 4: Ái lực liên kết của kháng thể mang các biến thể Fc với bổ thể C1q

Thử nghiệm liên kết C1q của người

Các kháng thể kháng CD154 mang các biến thể Fc (các kháng thể nội bộ, mà đã được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 3) được phân phối lên Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) và để yên qua đêm ở 4°C. Sau khi rửa bằng PBST, phong bế đĩa bằng TBST chứa BSA 0,5% và 1 × Block Ace: Thuốc thử phong bế (DS Pharma) trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa đĩa, C1q của người (Calbiochem) được chuyển vào đĩa, và để yên trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa đĩa, và kháng thể kháng C1q của người được đánh dấu HRP (Bio Rad) được thêm vào để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, và tiến hành rửa. Sau đó, cơ chất TMB (Invitrogen) được thêm vào. Đo tín hiệu bằng thiết bị đọc đĩa ở bước sóng 450 nm (bước sóng thử) và 570 nm (bước sóng tham chiếu). Ái lực liên kết của kháng thể có vùng Fc kiểu dại (WT) với C1q của người được giảm bằng cách đưa các đột biến LALA vào vùng Fc, và ái lực liên kết giảm với C1q của người được phục hồi bằng cách đưa thêm các đột biến KWES, EFT, hoặc EFT + AE vào ngoài các đột biến LALA (Fig.2). Các đột biến LALA + KMES làm tăng nhẹ ái lực liên kết, trong khi đó các đột biến LALA + KWES, LALA + KAES, và LALA + KEES liên kết với C1q với ái lực tương đương với WT (Fig.3). Tính chất liên kết của LALA hoặc các thể đột biến LALA + KAES nêu trên không bị ảnh hưởng do đưa thêm các đột biến ACT3 hoặc ACT5 vào (Fig.4).

Thử nghiệm liên kết C1q của chuột

Các kháng thể kháng CD154 mang các biến thể Fc (các kháng thể nội bộ, mà đã được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong Ví dụ 3) được phân phối lên Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) và để yên qua đêm ở 4°C. Sau khi rửa bằng PBST, phong bế đĩa bằng TBST chứa BSA 0,5% và 1 × Block Ace: Thuốc thử phong bế (DS Pharma) trong 7 giờ ở 4°C. Sau khi rửa đĩa, 10% huyết tương chuột (Innovative Research) được chuyển vào đĩa, và để yên qua đêm ở 4°C. Rửa đĩa, và kháng thể kháng C1q chuột được biotin hoá (Hycult Biotech) được thêm vào để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, và tiến hành rửa. Streptavidin-HRP (Pierce) được thêm vào để phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, và tiến hành rửa. Sau đó, cơ chất ABTS ELISA HRP (KPL) được thêm vào. Đo tín hiệu bằng thiết bị đọc đĩa ở bước sóng 405 nm. Ái lực liên kết của kháng thể có vùng Fc kiểu dại (WT) với C1q của chuột được giảm

bằng cách đưa các đột biến LALA vào vùng Fc, và ái lực liên kết với C1q của chuột giảm đi được phục hồi bằng cách đưa thêm các đột biến KAES ngoài các đột biến LALA vào. Tính chất liên kết của các thể đột biến LALA hoặc LALA + KAES nêu trên không bị ảnh hưởng do đưa thêm các đột biến ACT3 hoặc ACT5 vào (Fig.5).

Ví dụ 5: Phân tích Biacore đối với các biến thể Fc liên kết với các FcγR và FcRn

Sự liên kết của các biến thể Fc với các FcγR của người hoặc của chuột và FcRn của người ở độ pH=7,4 được xác định ở 25°C bằng cách sử dụng thiết bị Biacore T200 (GE Healthcare). Tất cả các kháng thể và các FcγR hoặc FcRn được tạo ra trong PBS-P độ pH=7,4 chứa 50 mM Na-Phosphat, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, NaN_3 0,005%. Đối với thử nghiệm liên kết các FcγR, kháng thể kháng Histidin (GE Healthcare) được cố định vào tất cả các tế bào dòng chảy của chip cảm biến CM4 bằng cách sử dụng bộ kit ghép cặp amin (GE Healthcare). Mỗi FcγR được bắt giữ vào tế bào dòng chảy 2, 3, hoặc 4 bởi kháng thể kháng Histidin, với tế bào dòng chảy 1 làm tế bào dòng chảy tham chiếu. Lượng bắt giữ FcγR được mong đợi là 400 đơn vị cộng hưởng (RU). Các kháng thể được tiêm ở nồng độ 100 nM vào tất cả các tế bào dòng chảy. Phức hợp miễn dịch được tạo ra bằng cách trộn theo tỷ lệ mol 1:1 giữa kháng thể và CD154 trime, và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Bề mặt cảm biến được tái tạo sau mỗi chu trình bằng cách sử dụng 10 mM Glyxin-HCl, độ pH=1,5.

Đối với thử nghiệm liên kết FcRn, thuốc thử Biotin CAPture (GE Healthcare) được cố định vào cả hai tế bào dòng chảy 1 và 2 của chip cảm biến CAP bằng cách sử dụng bộ kit Biotin CAPture (GE Healthcare). FcRn được biotin hoá được bắt giữ lên tế bào dòng chảy 2 với tế bào dòng chảy 1 làm tế bào dòng chảy tham chiếu. Lượng bắt giữ FcRn được mong đợi là 400 đơn vị cộng hưởng. Tất cả các kháng thể được tiêm ở nồng độ 100 nM vào các tế bào dòng chảy 1 và 2. Phức hợp miễn dịch được tạo ra bằng cách trộn theo tỷ lệ mol 1:1 giữa kháng thể và CD154 trime, và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Bề mặt cảm biến được tái tạo sau mỗi chu trình bằng cách sử dụng 8M Guanidin-HCl, NaOH 1M (3:1 thể tích/thể tích).

Các nồng độ liên kết được chuẩn hoá theo lượng bắt giữ của các FcγR hoặc FcRn tương ứng. Khả năng liên kết của kháng thể đơn lẻ hoặc phức hợp miễn dịch (kháng thể và kháng nguyên CD154 trime) đối với các FcγR của người hoặc của chuột và FcRn của người được theo dõi dựa trên mức đáp ứng liên kết. Phức hợp miễn dịch được sử dụng

để đánh giá khả năng liên kết tăng cường với các FcγR hoặc FcRn thông qua các hiệu ứng khả lực. Các kết quả đối với FcγR1a, FcγR2a 167H và 167R, FcγR2b, FcγR3a 158F và 158V, FcγR3b NA1 và NA2 của người được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.6 (a) đến Fig.6 (h). Các kết quả đối với FcγR1, FcγR2b, FcγR3, FcγR4 của chuột được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.7 (a) đến Fig.7 (d). Khả năng liên kết của vùng Fc kiểu dại (được ký hiệu là IgG WT) giảm đáng kể bằng cách đưa các đột biến LALA, LALA +KAES, hoặc LALA + KWES vào vùng Fc cho mỗi trong số các FcγR được thử nghiệm. Xu hướng này là gần giống nhau giữa các thử nghiệm sử dụng kháng thể đơn lẻ (được mô tả là Ab đơn lẻ) và phức hợp miễn dịch (được mô tả là CD154 IC). Khả năng liên kết của các thể đột biến KAES hoặc KWES không giảm đáng kể so với của IgG WT cho đa số các FcγR được thử nghiệm. Các kết quả đối với FcRn của người được thể hiện trên Fig.8. Khả năng liên kết của vùng Fc kiểu dại (được ký hiệu là "hIgG1") với FcRn của người có vẻ không bị ảnh hưởng, ngay cả sau khi đưa các đột biến LALA hoặc LALA +KAES vào vùng Fc. Khả năng liên kết tăng nhẹ khi đưa thêm các đột biến ACT3 hoặc ACT5 vào nhưng vẫn ở mức tương đối thấp (Fig.8).

Ví dụ 6: Hiệu lực *in vivo* của các kháng thể kháng DENV chống lại bệnh nhiễm DENV

Chuột AG129 từ 6 đến 8 tuần tuổi được gây nhiễm trong màng bụng 10^6 đơn vị tạo mảng bám (pfu) DENV-2 chủng D2Y98P. 48 giờ sau, các con chuột được điều trị bằng 25μg kháng thể trong PBS. Kháng thể được tiêm trong tĩnh mạch qua đường sau hốc mắt. Sau thêm 24 giờ nữa, tức là 72 giờ sau khi gây nhiễm ban đầu, máu được lấy. Trong các nghiên cứu trước đây (Zust et al, J Virol (2014) 88, 7276-7285; Tan et al, PLOS Negl Trop Dis (2010) 4, e672)), đã được thiết lập là pic virut-huyết sau khi gây nhiễm bằng D2Y98P đạt được trong vòng 3-4 ngày sau gây nhiễm. Chiết ARN của virut từ huyết tương lấy từ mỗi con chuột và tiến hành PCR định lượng và so sánh với chuẩn DENV-2 có độ gây nhiễm đã biết trong thử nghiệm mảng bám. Cả hai kháng thể 3C và 3Cam giảm đáng kể virut-huyết, so với đối chứng PBS trên mô hình chuột, và hiệu lực của cả hai kháng thể là tương đương nhau. Kháng thể có đột biến LALA + KAES trong vùng Fc thể hiện hiệu lực mạnh hơn so với kháng thể chỉ có đột biến LALA. Điều này đúng với cả hai kháng thể 3C và 3Cam (Fig.9). Kết quả này cho thấy sự phục hồi hoạt tính liên kết C1q bằng cách bổ sung thêm đột biến KAES vào đột biến LALA góp phần vào hiệu lực kháng virut của các kháng thể.

Mặc dù phần mô tả sáng chế ở trên đã được mô tả chi tiết nhất định theo cách minh hoạ và ví dụ nhằm mục đích để hiểu rõ, các mô tả và ví dụ này không được hiểu là giới hạn phạm vi của của sáng chế. Phần bộc lộ của tất cả các patent và tài liệu khoa học nêu trong bản mô tả này được kết hợp bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập liên kết với protein E của virut Dengue (DENV), trong đó kháng thể này chứa:

(i) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 14, (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 17, (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21, (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27,

(ii) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15, (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 17, (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21, (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27,

(iii) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15, (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 18, (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21, (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27,

(iv) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15, (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 19, (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 43, (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 44 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 45,

(v) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15, (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 17, (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21, (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 25 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 28,

(vi) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 11, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15, (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 17, (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin được

nêu trong SEQ ID NO: 22, (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 25 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 29,

(vii) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15, (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20, (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 23, (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 26 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 30, hoặc

(viii) (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 12, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 15, (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 20, (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 21, (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 24 và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 27.

2. Kháng thể được phân lập, chứa (a) trình tự VH có trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 2-6; (b) trình tự VL có trình tự axit amin được nêu trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 8-10; hoặc (c) trình tự VH được nêu trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 2-6 và trình tự VL được nêu trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 7-10.

3. Kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, chứa vùng Fc biến thể bao gồm ít nhất một biến đổi axit amin trong vùng Fc gốc, trong đó vùng Fc biến thể có hoạt tính liên kết FcγR giảm đáng kể và không có hoạt tính liên kết C1q giảm đáng kể so với vùng Fc gốc.

4. Kháng thể theo điểm 3, trong đó vùng Fc biến thể bao gồm Ala ở vị trí 234, Ala ở vị trí 235 và cả các biến đổi axit amin thêm ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí (a)-(c) sau đây:

(a) các vị trí 267, 268, và 324;

(b) các vị trí 236, 267, 268, 324, và 332; và

(c) các vị trí 326 và 333;

theo hệ đánh số EU.

5. Kháng thể theo điểm 4, trong đó vùng Fc biến thể bao gồm các axit amin được chọn từ nhóm gồm:

(a) Glu ở vị trí 267;

(b) Phe ở vị trí 268;

(c) Thr ở vị trí 324;

(d) Ala ở vị trí 236;

(e) Glu ở vị trí 332;

(f) Ala, Asp, Glu, Met, hoặc Trp ở vị trí 326; và

(g) Ser ở vị trí 333;

theo hệ đánh số EU.

6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 5, trong đó vùng Fc biến thể bao gồm các axit amin được chọn từ nhóm gồm:

(a) Ala ở vị trí 434;

(b) Ala ở vị trí 434, Thr ở vị trí 436, Arg ở vị trí 438, và Glu ở vị trí 440;

(c) Leu ở vị trí 428, Ala ở vị trí 434, Thr ở vị trí 436, Arg ở vị trí 438, và Glu ở vị trí 440; và

(d) Leu ở vị trí 428, Ala ở vị trí 434, Arg ở vị trí 438, và Glu ở vị trí 440;

theo hệ đánh số EU.

7. Kháng thể được phân lập liên kết với protein E của virut Dengue (DENV), trong đó kháng thể này chứa:

(a) VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7, CH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 46 và CL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 60,

(b) VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 3, VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7, CH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 46 và CL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 60,

(c) VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 3, VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7, CH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 54 và CL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 60,

(d) VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 3, VL chứa trình

tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7, CH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 59 và CL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 60,

(e) VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4, VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7, CH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 46 và CL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 60,

(f) VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 5, VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7, CH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 46 và CL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 60,

(g) VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 3, VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 8, CH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 46 và CL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 60,

(h) VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 3, VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 9, CH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 46 và CL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 60,

(i) VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6, VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 10, CH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 46 và CL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 60,

(j) VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6, VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 10, CH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 59 và CL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 60,

(k) VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6, VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7, CH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 46 và CL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 60,

(l) VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6, VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7, CH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 54 và CL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 60, và

(m) VH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 6, VL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 7, CH chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 59 và CL chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 60.

Fig.1 (A)

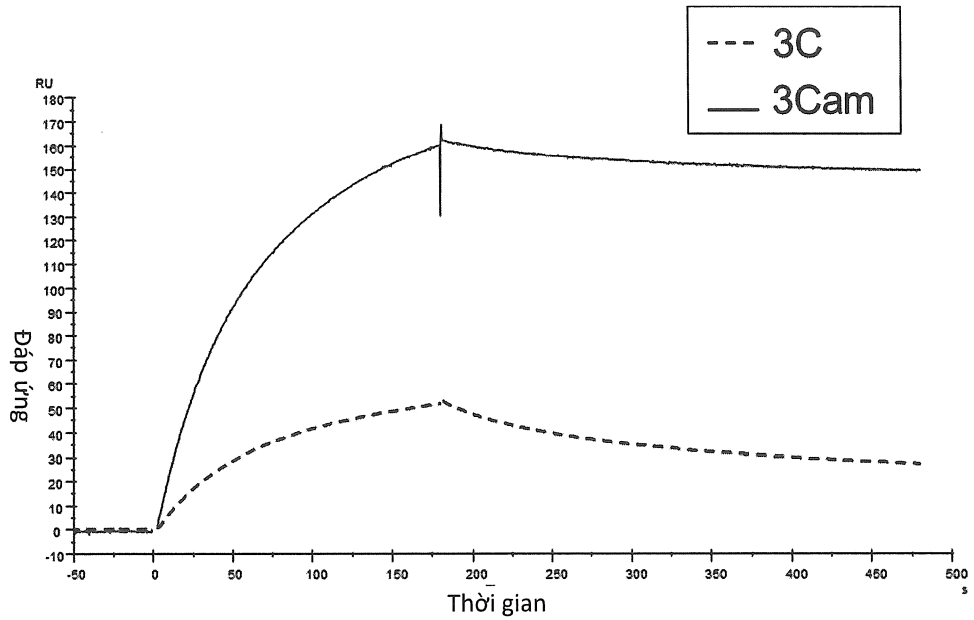


Fig.1(B)

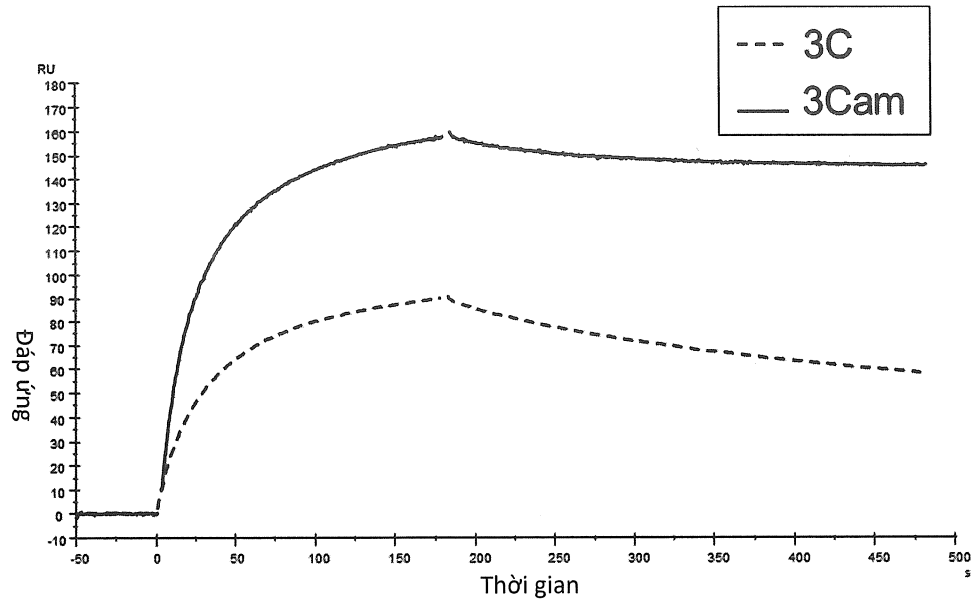


Fig.1 (C)

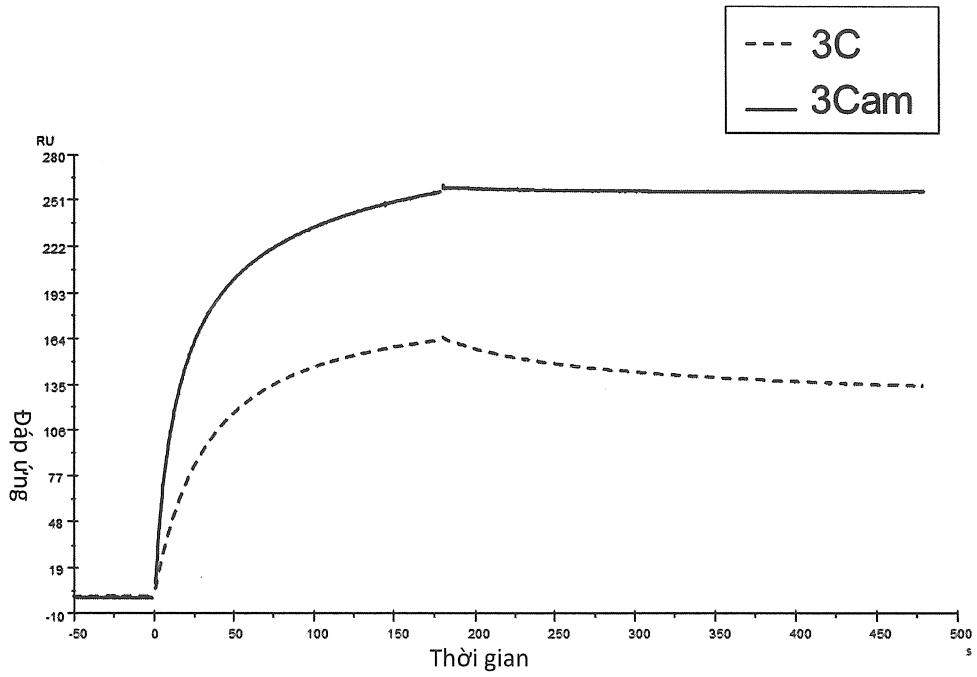

3C
3Cam
RU
280
251
222
193
164
135
106
77
48
19
-10
Đáp ứng
-50
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
s
Thời gian

Fig.1 (D)

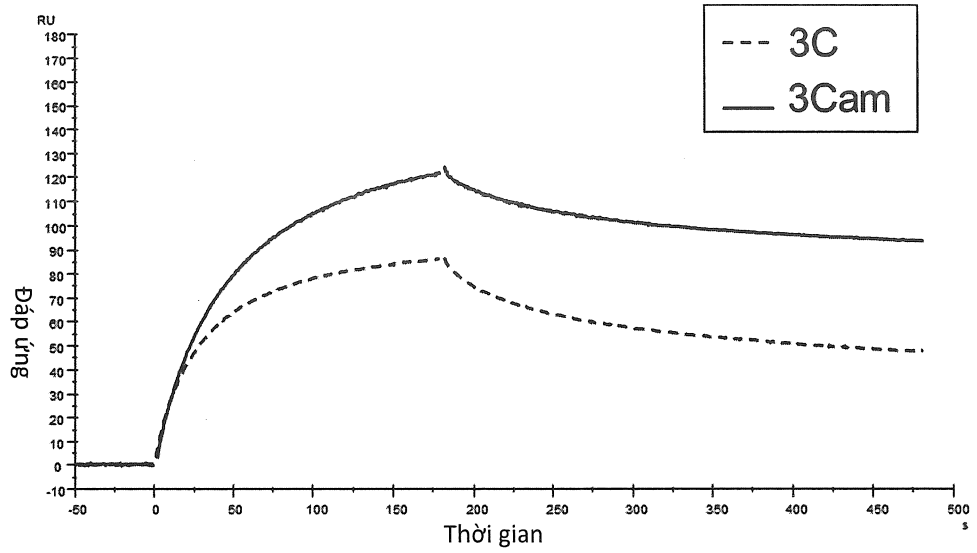

3C
3Cam
RU
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
Đáp ứng
-50
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
s
Thời gian

Fig.2

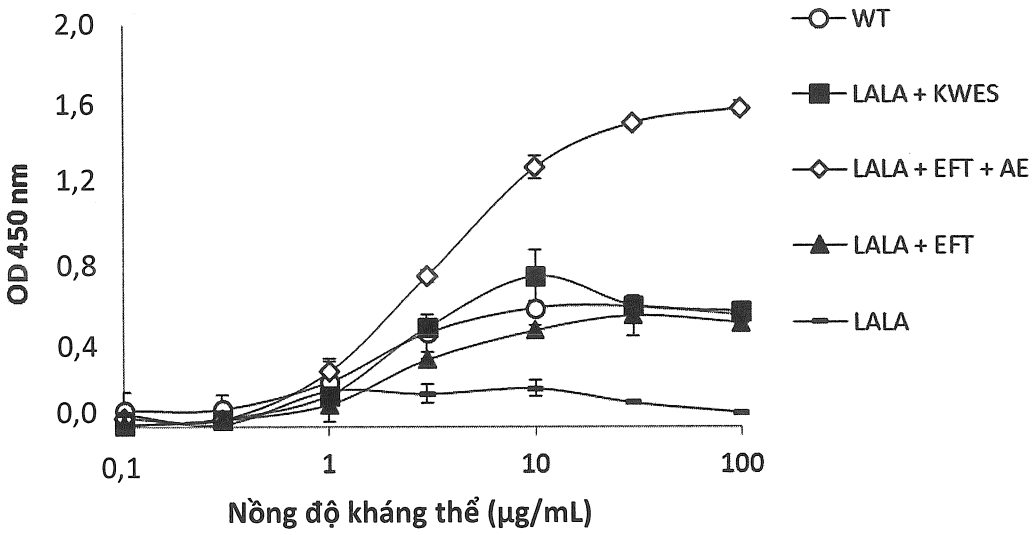

2,0
1,6
1,2
0,8
0,4
0,0
OD 450 nm
0,1
1
10
100
Nồng độ kháng thể (µg/mL)
WT
LALA + KWES
LALA + EFT + AE
LALA + EFT
LALA

Fig.3

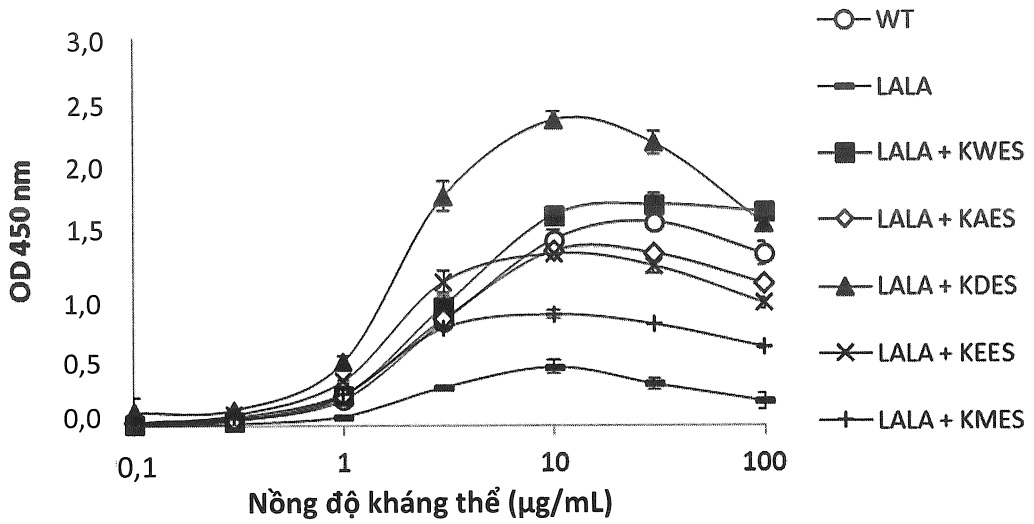

3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
OD 450 nm
0,1
1
10
100
Nồng độ kháng thể (µg/mL)
WT
LALA
LALA + KWES
LALA + KAES
LALA + KDES
LALA + KEES
LALA + KMES

Fig.4

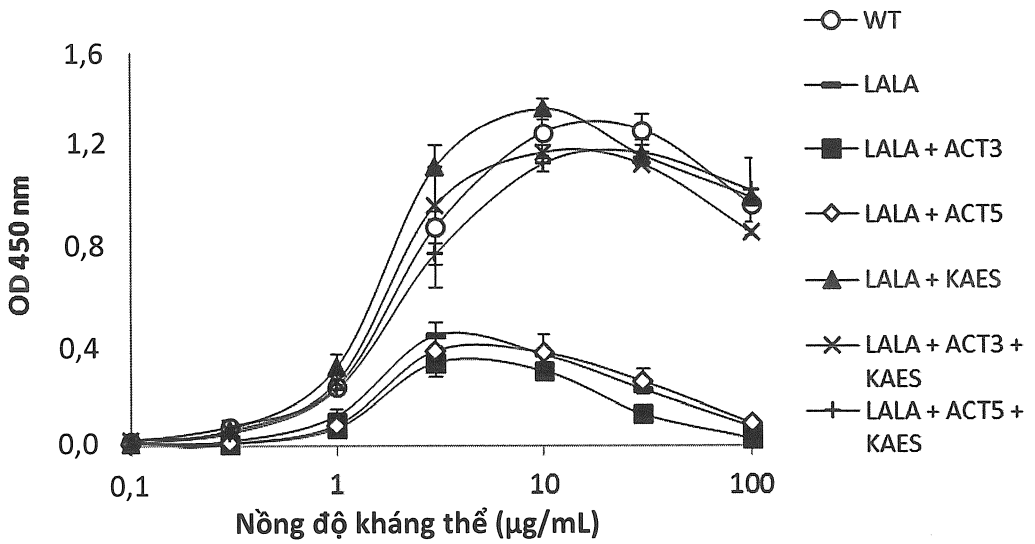

OD 450 nm
1,6
1,2
0,8
0,4
0,0
0,1
1
10
100
Nồng độ kháng thể (µg/mL)
WT
LALA
LALA + ACT3
LALA + ACT5
LALA + KAES
LALA + ACT3 + KAES
LALA + ACT5 + KAES

Fig.5

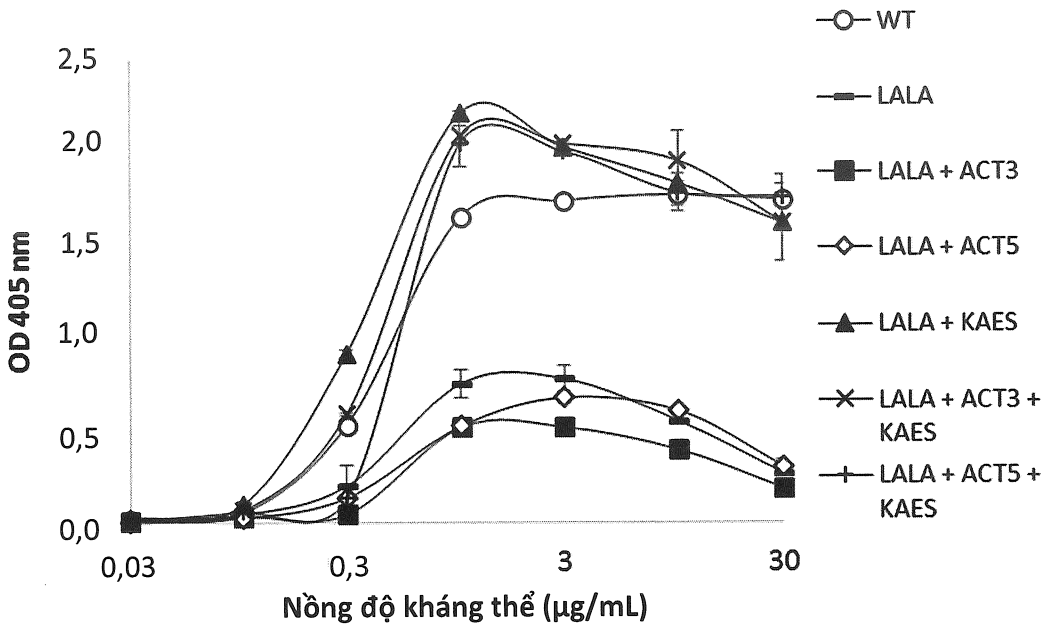

OD 405 nm
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0,03
0,3
3
30
Nồng độ kháng thể (µg/mL)
WT
LALA
LALA + ACT3
LALA + ACT5
LALA + KAES
LALA + ACT3 + KAES
LALA + ACT5 + KAES

Fig.6 (A)

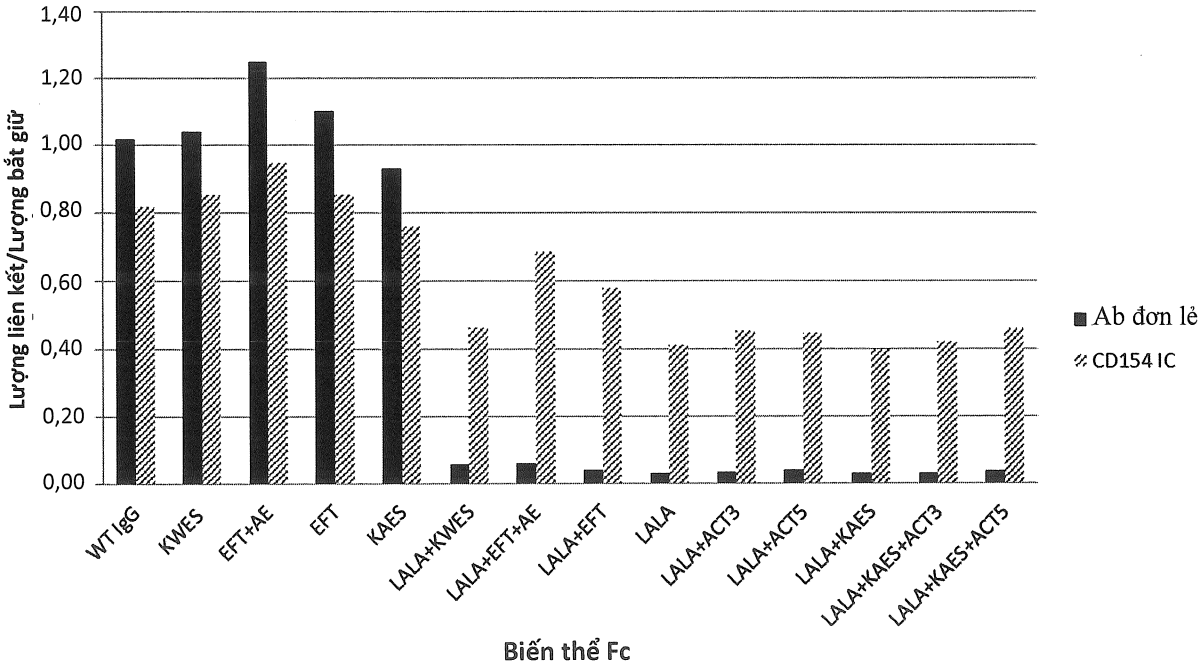

1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Lượng liên kết/Lượng bắt giữ
WT IgG
KWES
EFT+AE
EFT
KAES
LALA+KWES
LALA+EFT+AE
LALA+EFT
LALA
LALA+ACT3
LALA+ACT5
LALA+KAES
LALA+KAES+ACT3
LALA+KAES+ACT5
Biến thể Fc
Ab đơn lẻ
CD154 IC

Fig.6 (B)

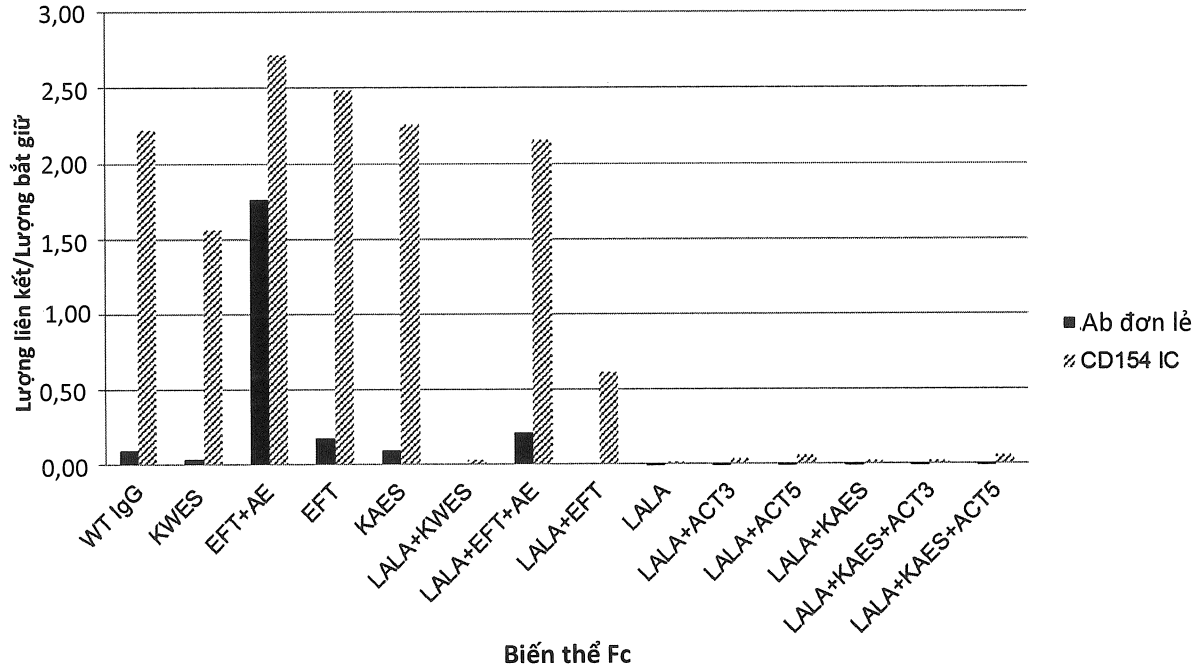

3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
Lượng liên kết/Lượng bắt giữ
WT IgG
KWES
EFT+AE
EFT
KAES
LALA+KWES
LALA+EFT+AE
LALA+EFT
LALA
LALA+ACT3
LALA+ACT5
LALA+KAES
LALA+KAES+ACT3
LALA+KAES+ACT5
Biến thể Fc
Ab đơn lẻ
CD154 IC

Fig.6 (C)

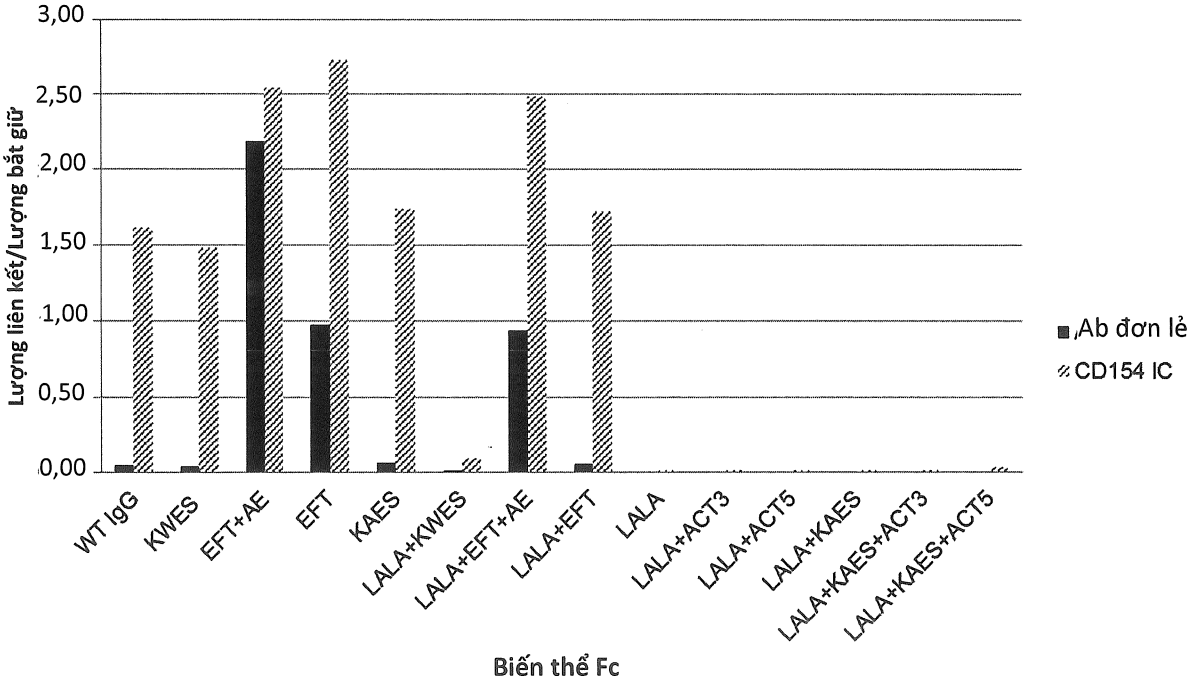

3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
Lượng liên kết/Lượng bắt giữ
WT IgG
KWES
EFT+AE
EFT
KAES
LALA+KWES
LALA+EFT+AE
LALA+EFT
LALA
LALA+ACT3
LALA+ACT5
LALA+KAES
LALA+KAES+ACT3
LALA+KAES+ACT5
Biến thể Fc
Ab đơn lẻ
CD154 IC

Fig.6 (D)

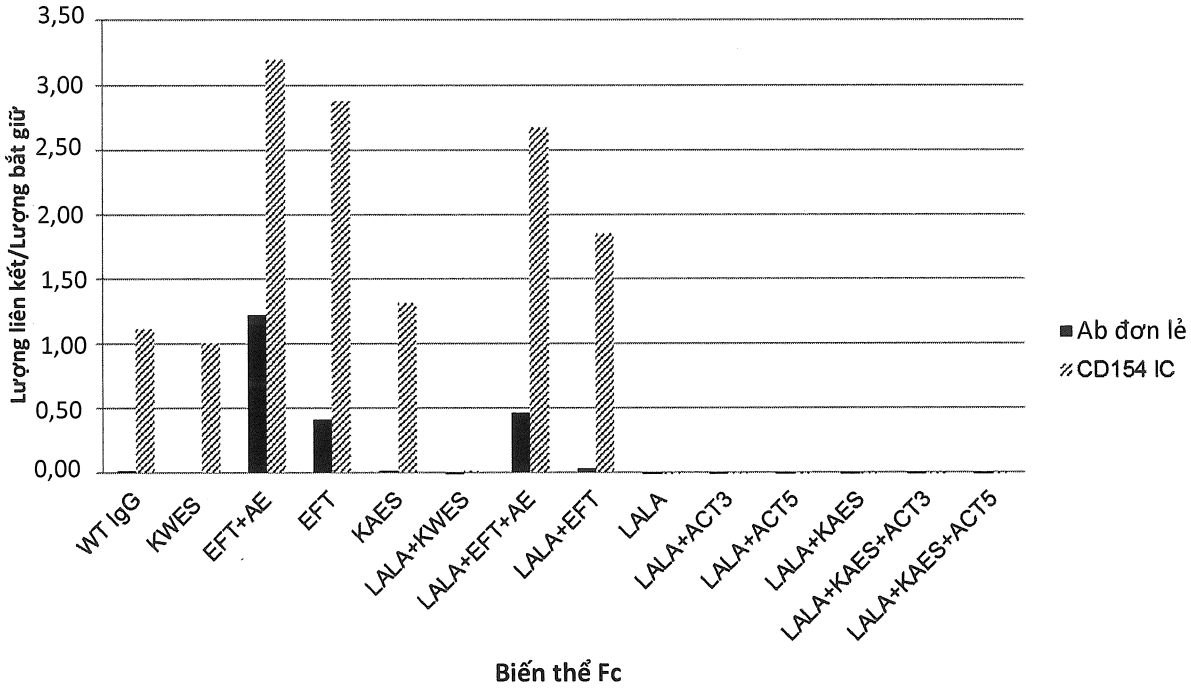

3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
Lượng liên kết/Lượng bắt giữ
WT IgG
KWES
EFT+AE
EFT
KAES
LALA+KWES
LALA+EFT+AE
LALA+EFT
LALA
LALA+ACT3
LALA+ACT5
LALA+KAES
LALA+KAES+ACT3
LALA+KAES+ACT5
Biến thể Fc
Ab đơn lẻ
CD154 IC

Fig.6 (E)

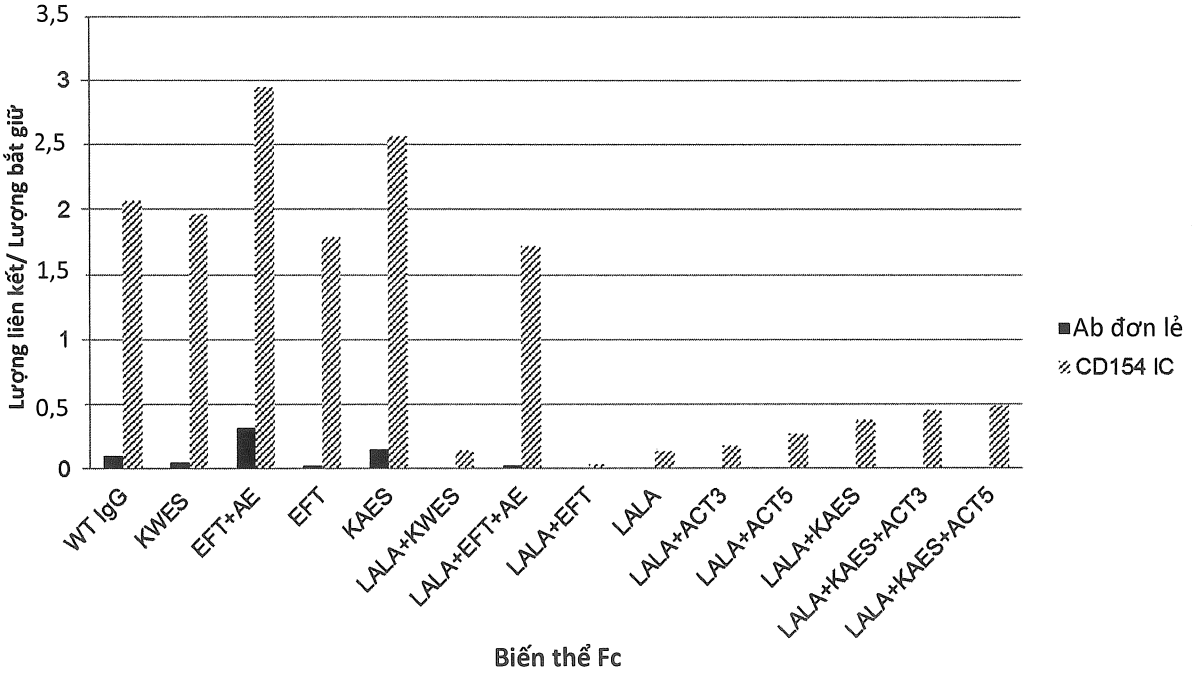

3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Lượng liên kết/ Lượng bắt giữ
WT IgG
KWES
EFT+AE
EFT
KAES
LALA+KWES
LALA+EFT+AE
LALA+EFT
LALA
LALA+ACT3
LALA+ACT5
LALA+KAES
LALA+KAES+ACT3
LALA+KAES+ACT5
Biến thể Fc
Ab đơn lẻ
CD154 IC

Fig.6 (F)

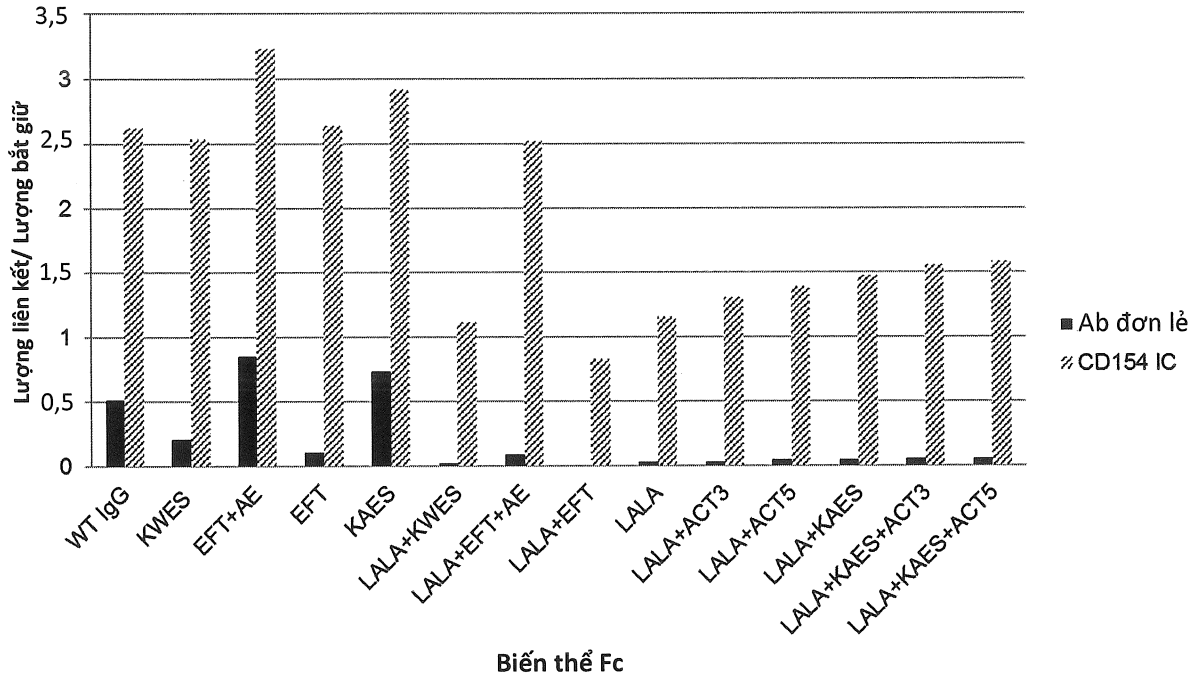

3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Lượng liên kết/ Lượng bắt giữ
WT IgG
KWES
EFT+AE
EFT
KAES
LALA+KWES
LALA+EFT+AE
LALA+EFT
LALA
LALA+ACT3
LALA+ACT5
LALA+KAES
LALA+KAES+ACT3
LALA+KAES+ACT5
Biến thể Fc
Ab đơn lẻ
CD154 IC

Fig.6 (G)

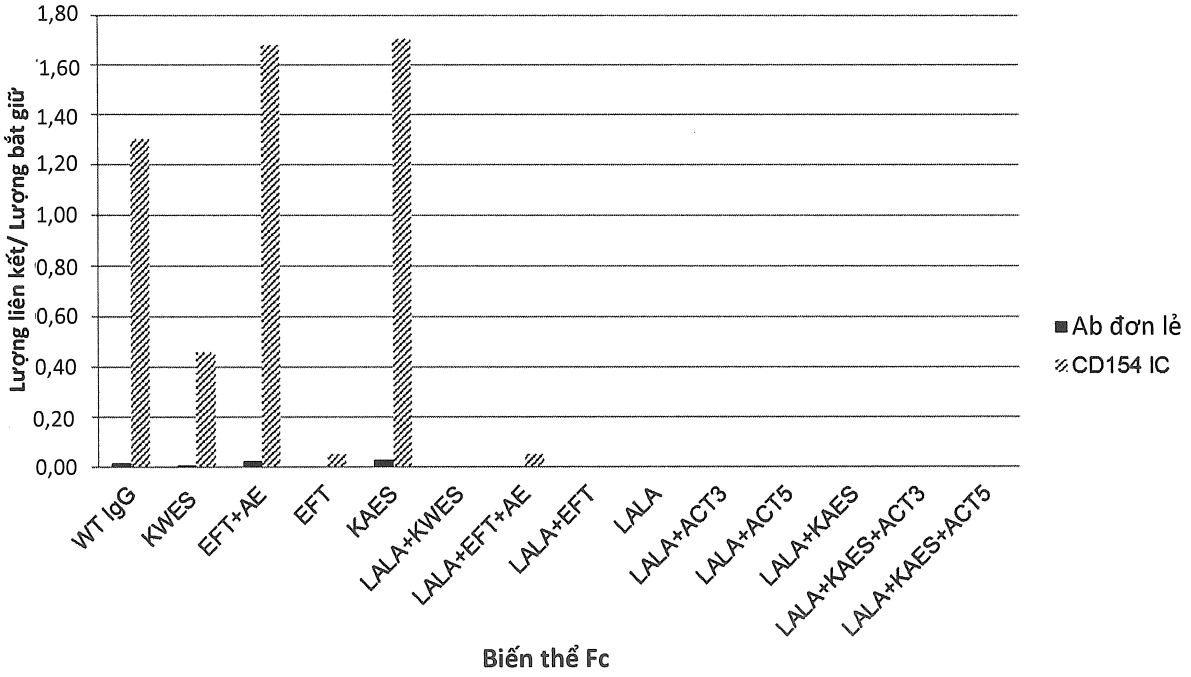

1,80
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Lượng liên kết/ Lượng bắt giữ
WT IgG
KWES
EFT+AE
EFT
KAES
LALA+KWES
LALA+EFT+AE
LALA+EFT
LALA
LALA+ACT3
LALA+ACT5
LALA+KAES
LALA+KAES+ACT3
LALA+KAES+ACT5
Biến thể Fc
Ab đơn lẻ
CD154 IC

Fig.6 (H)

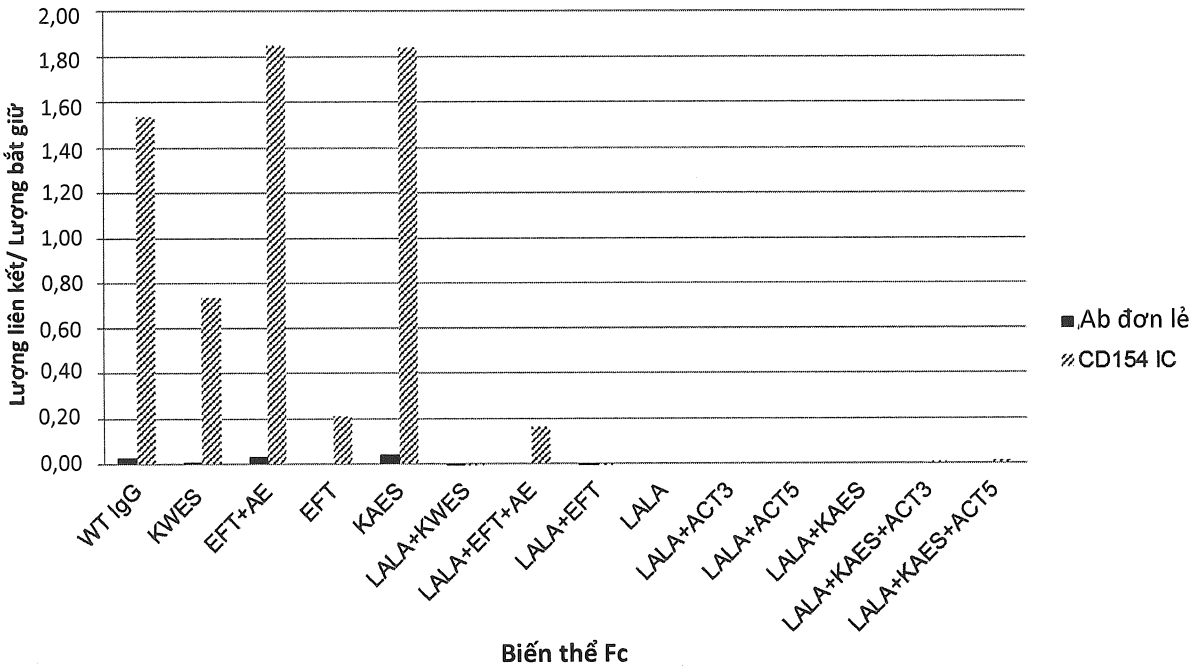

2,00
1,80
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Lượng liên kết/ Lượng bắt giữ
WT IgG
KWES
EFT+AE
EFT
KAES
LALA+KWES
LALA+EFT+AE
LALA+EFT
LALA
LALA+ACT3
LALA+ACT5
LALA+KAES
LALA+KAES+ACT3
LALA+KAES+ACT5
Biến thể Fc
Ab đơn lẻ
CD154 IC

Fig.7 (A)

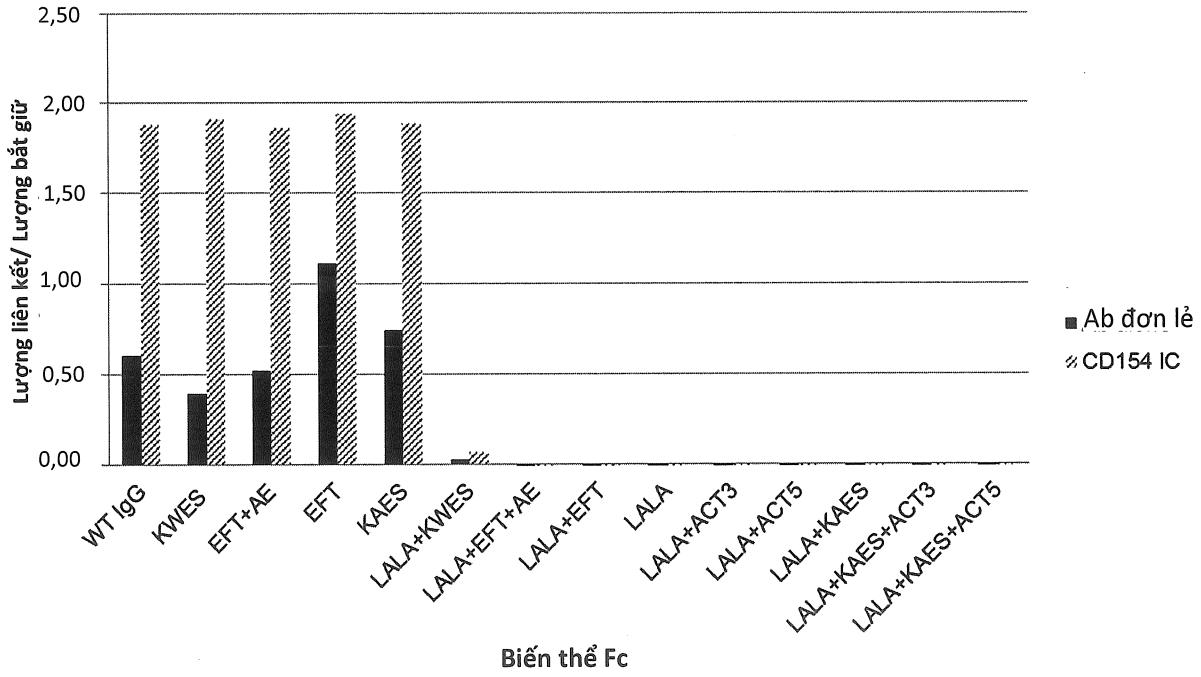

2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
Lượng liên kết/ Lượng bắt giữ
WT IgG
KWES
EFT+AE
EFT
KAES
LALA+KWES
LALA+EFT+AE
LALA+EFT
LALA
LALA+ACT3
LALA+ACT5
LALA+KAES
LALA+KAES+ACT3
LALA+KAES+ACT5
Biến thể Fc
Ab đơn lẻ
CD154 IC

Fig.7 (B)

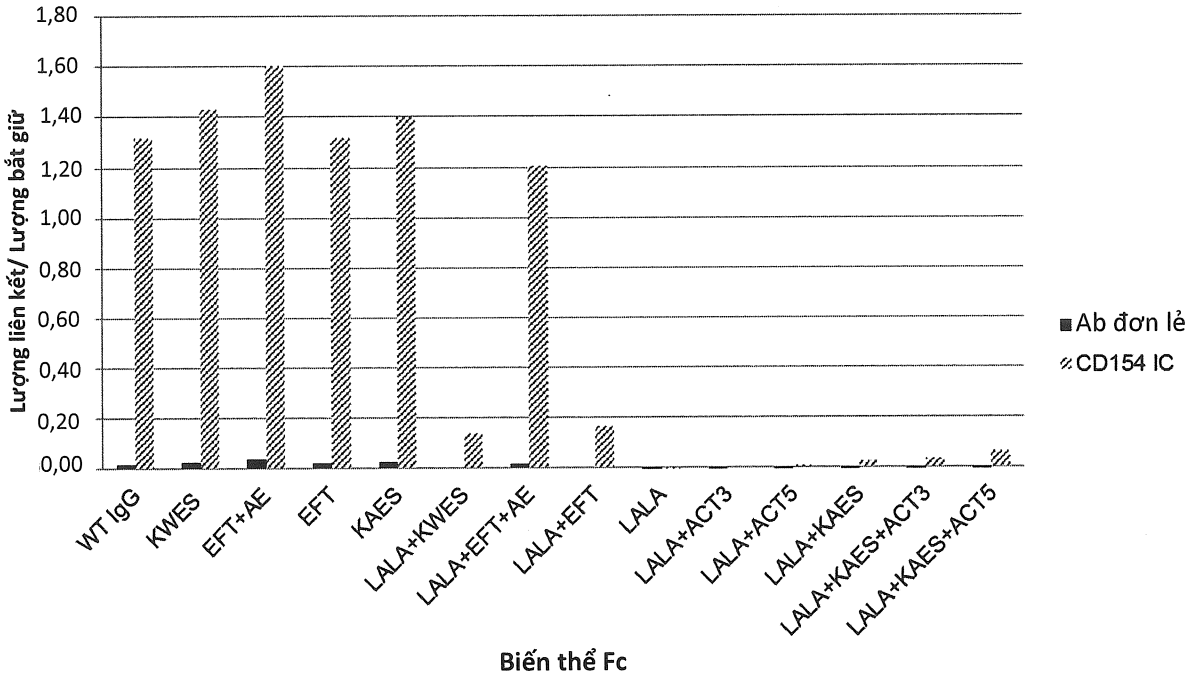

1,80
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Lượng liên kết/ Lượng bắt giữ
WT IgG
KWES
EFT+AE
EFT
KAES
LALA+KWES
LALA+EFT+AE
LALA+EFT
LALA
LALA+ACT3
LALA+ACT5
LALA+KAES
LALA+KAES+ACT3
LALA+KAES+ACT5
Biến thể Fc
Ab đơn lẻ
CD154 IC

Fig.7 (C)

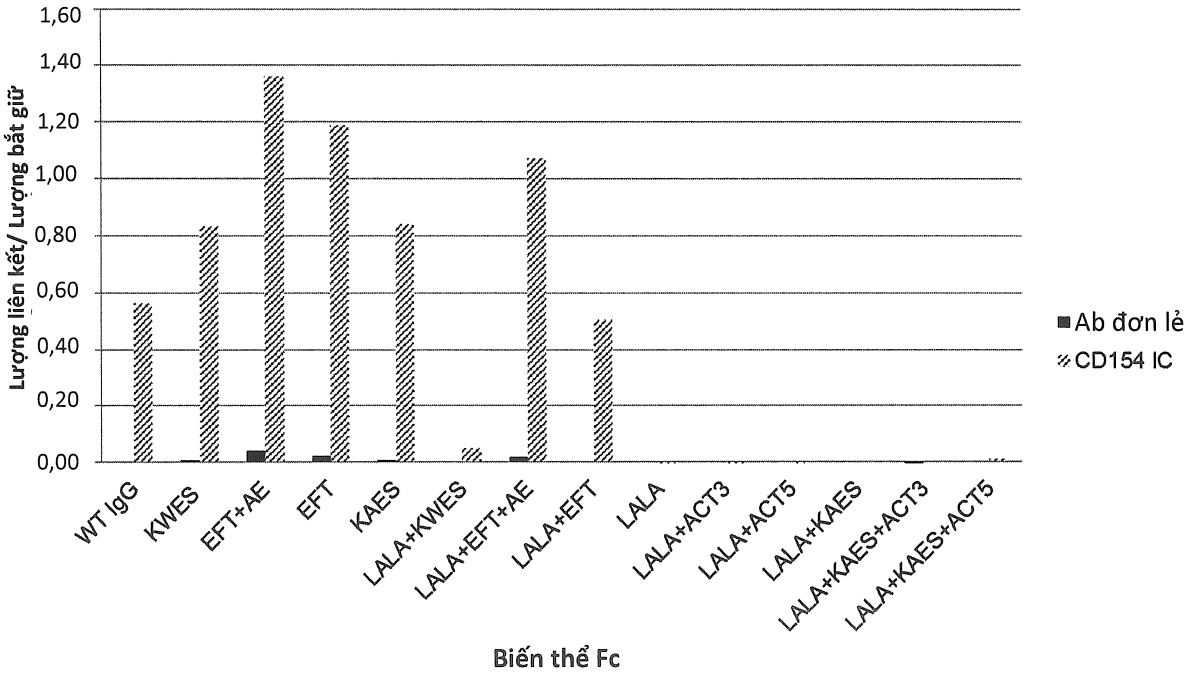

1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Lượng liên kết/ Lượng bắt giữ
WT IgG
KWES
EFT+AE
EFT
KAES
LALA+KWES
LALA+EFT+AE
LALA+EFT
LALA
LALA+ACT3
LALA+ACT5
LALA+KAES
LALA+KAES+ACT3
LALA+KAES+ACT5
Biến thể Fc
Ab đơn lẻ
CD154 IC

Fig.7 (D)

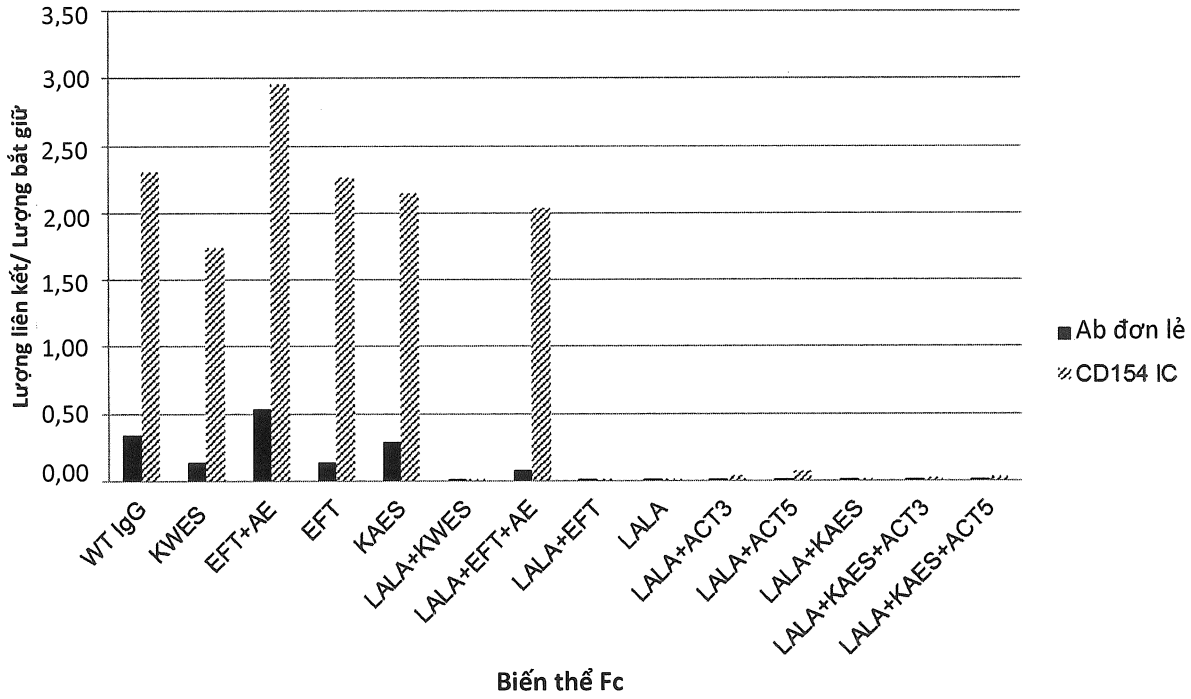

3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
Lượng liên kết/ Lượng bắt giữ
WT IgG
KWES
EFT+AE
EFT
KAES
LALA+KWES
LALA+EFT+AE
LALA+EFT
LALA
LALA+ACT3
LALA+ACT5
LALA+KAES
LALA+KAES+ACT3
LALA+KAES+ACT5
Biến thể Fc
Ab đơn lẻ
CD154 IC

Fig.8

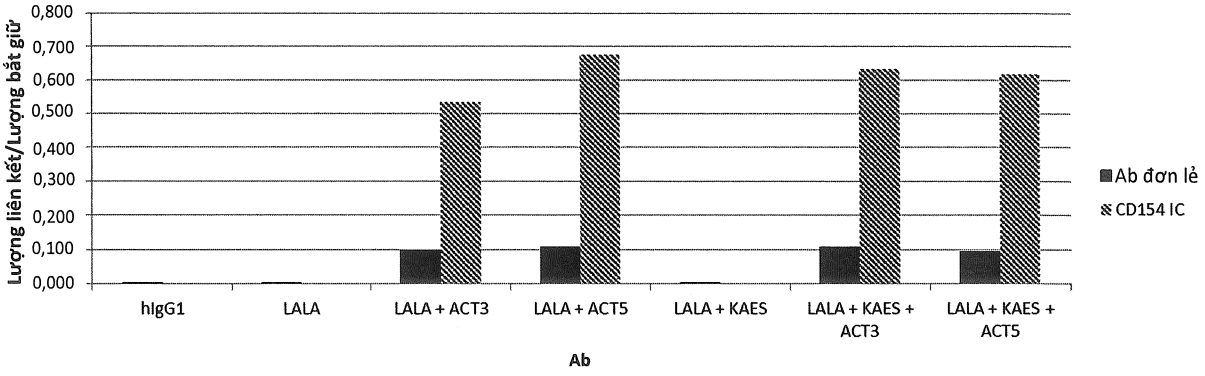

Lượng liên kết/Lượng bắt giữ
0,800
0,700
0,600
0,500
0,400
0,300
0,200
0,100
0,000
hIgG1
LALA
LALA + ACT3
LALA + ACT5
LALA + KAES
LALA + KAES + ACT3
LALA + KAES + ACT5
Ab
Ab đơn lẻ
CD154 IC

Fig.9

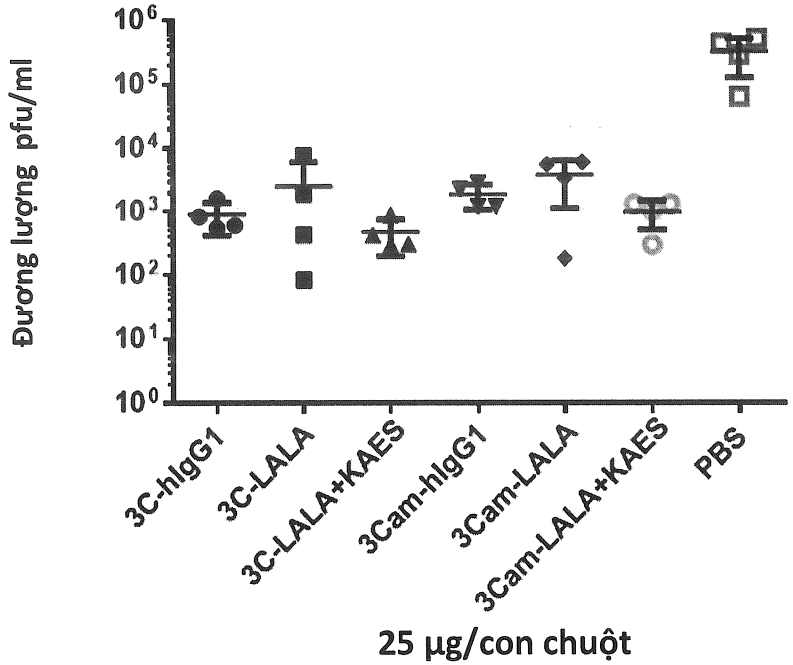

Đương lượng pfu/ml
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
3C-hIgG1
3C-LALA
3C-LALA+KAES
3Cam-hIgG1
3Cam-LALA
3Cam-LALA+KAES
PBS
25 µg/con chuột

Fig.10 (A)

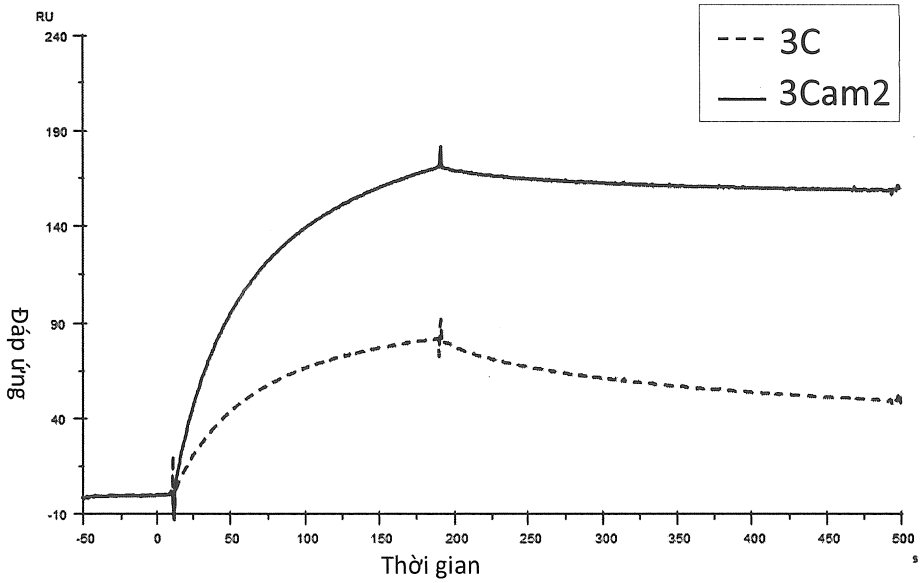


Fig.10 (B)

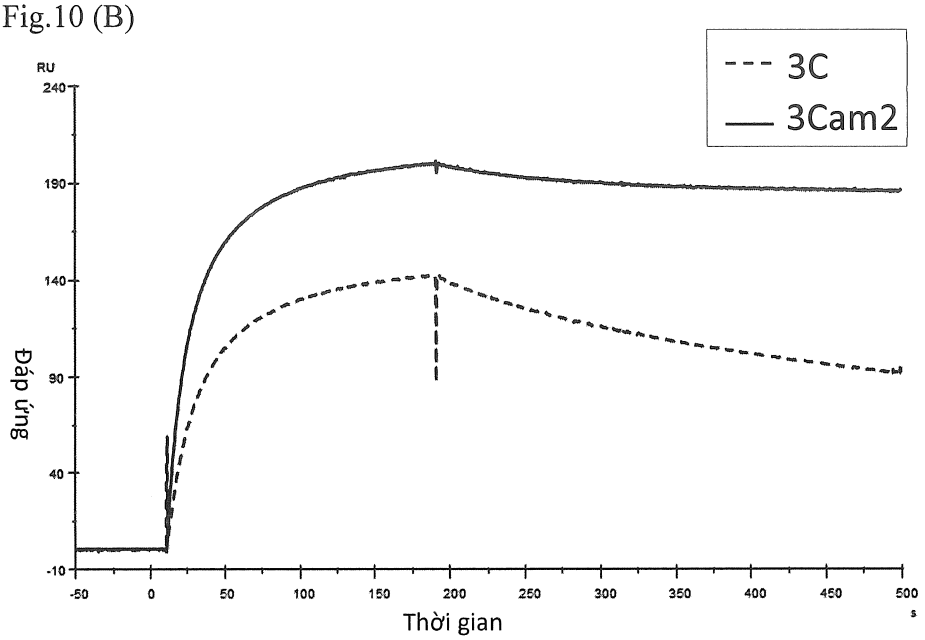


Fig.10 (C)

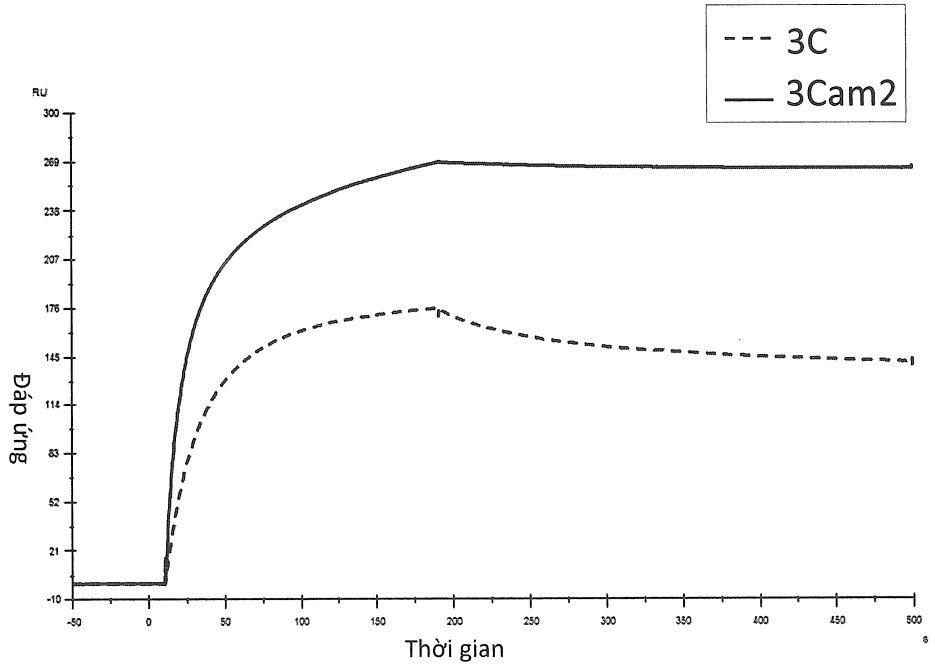
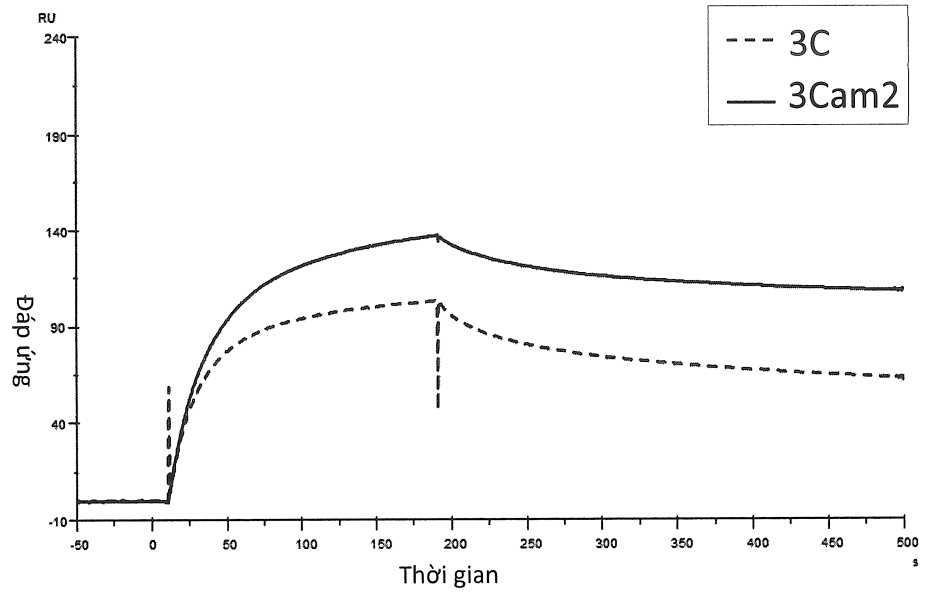


Fig.10 (D)



Danh mục Trình tự

<110> Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha
Agency for Science, Technology and Research

<120> KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP LIÊN KẾT VỚI PROTEIN E CỦA VIRUT DENGUE (DENV)

<130> 34246SG1/MBR(JKN)/ndh

<160> 109

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 132
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Thr Ala Ser Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ile Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Arg
100 105 110
Asp Gly Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
115 120 125
Thr Val Ser Ser
130

<210> 2
<211> 132
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 2
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Ala Ser Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ile 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 Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe
            100                 105                 110
Asp Gly Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
        115                 120                 125
Thr Val Ser Ser
    130
```

<210> 3
<211> 132
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 3

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

<210> 4
<211> 132
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 4

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

<210> 5
<211> 132
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 5

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

<210> 6
<211> 132
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Glu 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 Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Arg Ser Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ile 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 Gly Gly Glu Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe
            100                 105                 110
Asp Gly Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
        115                 120                 125
Thr Val Ser Ser
    130
<210>  7
<211>  107
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  7

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15
Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Lys Tyr
            20                  25                  30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Asp Leu Pro Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Gln Ile Lys
            100                 105
<210>  8
<211>  107
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  VL

<400>  8

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15
Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Lys Tyr
            20                  25                  30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Lys Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Ala Leu Pro Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Gln Ile Lys
            100                 105
<210>  9
<211>  107
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> VL

<400> 9

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Gln Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Lys Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Ser Ala Leu Pro Ile
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Gln Ile Lys
100 105
<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL

<400> 10

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Glu Ile Arg Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Glu Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Glu Asp Leu Pro Ile
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Gln Ile Lys
100 105
<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Ser Asn Tyr Ile His
1 5
<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-H1

<400> 12

Ser Tyr Tyr Met His
1 5
<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Thr Ala Ser Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-H2

<400> 14

Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Ala Ser Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-H2

<400> 15

Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Arg Ser Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 16
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Arg Asp Gly
1 5 10 15
Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro
20

<210> 17
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-H3

<400> 17

Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe Asp Gly
1 5 10 15
Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro
20
<210> 18
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-H3

<400> 18

Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Arg Asp Asp
1 5 10 15
Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro
20
<210> 19
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-H3

<400> 19

Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Arg Asp Leu
1 5 10 15
Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro
20
<210> 20
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-H3

<400> 20

Gly Gly Glu Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe Asp Gly
1 5 10 15
Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro
20
<210> 21

<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Lys Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-L1

<400> 22

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Gln Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-L1

<400> 23

Gln Ala Ser Gln Glu Ile Arg Lys Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Asp Ala Ser Asn Leu Lys Thr
1 5
<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-L2

<400> 25

Asp Ala Ser Asn Leu Lys Phe
1 5
<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-L2

<400> 26

Asp Ala Ser Glu Leu Lys Thr
1 5
<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Gln Gln Phe Asp Asp Leu Pro Ile Thr
1 5
<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-L3

<400> 28

Gln Gln Phe Asp Ala Leu Pro Ile Thr
1 5
<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-L3

<400> 29

Gln Gln Phe Ser Ala Leu Pro Ile Thr
1 5
<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-L3

<400> 30

Gln Gln Phe Glu Asp Leu Pro Ile Thr
1 5
<210> 31
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10
<210> 33
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Arg Ile Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30
<210> 34
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR-H3

<400> 34

Arg Ile Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30
<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 36
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys
20
<210> 37
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 38
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30
<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Gln Ile Lys
1 5 10
<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-H1
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa là Asn hoặc Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa là Ile hoặc Met

<400> 40

Ser Xaa Tyr Xaa His
1 5
<210> 41
<211> 17
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-H2
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa là Thr hoặc Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Xaa là Ala hoặc Arg

<400> 41

Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Xaa Xaa Ser Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 42
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-H3
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa là Arg hoặc Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Xaa là Arg hoặc Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> Xaa là Gly, Asp hoặc Leu

<400> 42

Gly Gly Xaa Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Xaa Asp Xaa
1 5 10 15
Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro
20
<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-L1
<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)
<223> Xaa là Asp hoặc Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa là Lys hoặc Gln

<400> 43

Gln Ala Ser Gln Xaa Ile Arg Xaa Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-L2
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa là Asn hoặc Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa là Thr hoặc Phe

<400> 44

Asp Ala Ser Xaa Leu Lys Xaa
1 5
<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-L3
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa là Asp, Ser hoặc Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa là Asp hoặc Ala

<400> 45

Gln Gln Phe Xaa Xaa Leu Pro Ile Thr
1 5
<210> 46
<211> 328
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CH

<400> 46

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                  10                  15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 47
<211> 328
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CH

<400> 47

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 48
<211> 328
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CH

<400> 48

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

```
            20                  25                  30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205
Trp Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ser Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
<210>  49
<211>  328
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  CH

<400>  49

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60
```

```
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140
Val Val Val Asp Val Glu Phe Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Thr Asn
        195                 200                 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
<210>  50
<211>  328
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  CH

<400>  50

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

```
            100                 105                 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140
Val Val Val Asp Val Glu Phe Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Thr Asn
        195                 200                 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
<210>  51
<211>  328
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  CH

<400>  51

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

```
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205
Trp Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ser Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
<210>  52
<211>  328
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  CH

<400>  52

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

```
            180                 185                 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Thr Asn
        195                 200                 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
<210>  53
<211>  328
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  CH

<400>  53

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

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 54
<211> 328
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CH

<400> 54

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

```
            260                 265                 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
<210>  55
<211>  328
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  CH

<400>  55

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

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 56
<211> 328
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CH

<400> 56

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Glu Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ser Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 57

<211> 328
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CH

<400> 57

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                  10                  15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205
Met Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ser Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 58
<211> 328
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH

<400> 58

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ser Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr Thr
305 310 315 320
Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 59
<211> 328
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CH

<400> 59

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

```
1               5                   10                  15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205
Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ser Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
                325
<210>  60
<211>  107
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  CL

<400>  60

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

```
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
    50                  55                  60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65                  70                  75                  80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
                85                  90                  95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            100                 105
<210>  61
<211>  585
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  DENV

<400>  61

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

305 310 315 320
Val Ile Val Thr Val His Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly Asn Glu
325 330 335
Thr Thr Glu His Gly Thr Ile Ala Thr Ile Thr Pro Gln Ala Pro Thr
340 345 350
Ser Glu Ile Gln Leu Thr Asp Tyr Gly Thr Leu Thr Leu Asp Cys Ser
355 360 365
Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Thr Met Lys
370 375 380
Glu Lys Ser Trp Leu Val His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu
385 390 395 400
Pro Trp Thr Ser Gly Ala Ser Thr Ser Gln Glu Thr Trp Asn Arg Gln
405 410 415
Asp Leu Leu Val Thr Phe Lys Thr Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val
420 425 430
Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly
435 440 445
Ala Thr Glu Ile Gln Thr Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala Gly His
450 455 460
Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser
465 470 475 480
Tyr Val Met Cys Thr Gly Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu
485 490 495
Thr Gln His Gly Thr Val Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp
500 505 510
Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr
515 520 525
Gln Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu
530 535 540
Lys Pro Val Asn Ile Glu Thr Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile
545 550 555 560
Ile Val Gly Ala Gly Glu Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys
565 570 575
Gly His His His His His His His His
580 585

<210> 62
<211> 585
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> DENV

<400> 62

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

```
Thr Thr Thr Gly Glu His Arg Arg Glu Lys Arg Ser Val Ala Leu Val
            100                 105                 110
Pro His Val Gly Met Gly Leu Glu Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met Ser
        115                 120                 125
Ser Glu Gly Ala Trp Lys His Ala Gln Arg Ile Glu Thr Trp Ile Leu
    130                 135                 140
Arg His Pro Gly Phe Thr Ile Met Ala Ala Ile Leu Ala Tyr Thr Ile
145                 150                 155                 160
Gly Thr Thr His Phe Gln Arg Ala Leu Ile Phe Ile Leu Leu Thr Ala
                165                 170                 175
Val Ala Pro Ser Met Thr Met Arg Cys Ile Gly Ile Ser Asn Arg Asp
            180                 185                 190
Phe Val Glu Gly Val Ser Gly Gly Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu
        195                 200                 205
His Gly Ser Cys Val Thr Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp
    210                 215                 220
Phe Glu Leu Ile Lys Thr Glu Ala Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys
225                 230                 235                 240
Tyr Cys Ile Glu Ala Lys Leu Thr Asn Thr Thr Thr Asp Ser Arg Cys
                245                 250                 255
Pro Thr Gln Gly Glu Pro Ser Leu Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe
            260                 265                 270
Val Cys Lys His Ser Met Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly
        275                 280                 285
Leu Phe Gly Lys Gly Gly Ile Val Thr Cys Ala Met Phe Thr Cys Lys
    290                 295                 300
Lys Asn Met Lys Gly Lys Val Val Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Ile Val Ile Thr Pro His Ser Gly Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp
                325                 330                 335
Thr Gly Lys His Gly Lys Glu Ile Lys Ile Thr Pro Gln Ser Ser Ile
            340                 345                 350
Thr Glu Ala Glu Leu Thr Gly Tyr Gly Thr Val Thr Met Glu Cys Ser
        355                 360                 365
Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Gln Met Glu
    370                 375                 380
Asn Lys Ala Trp Leu Val His Arg Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu
385                 390                 395                 400
Pro Trp Leu Pro Gly Ala Asp Thr Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys
                405                 410                 415
Glu Thr Leu Val Thr Phe Lys Asn Pro His Ala Lys Lys Gln Asp Val
            420                 425                 430
Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly
        435                 440                 445
Ala Thr Glu Ile Gln Met Ser Ser Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His
    450                 455                 460
Leu Lys Cys Arg Leu Arg Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser
465                 470                 475                 480
Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu
                485                 490                 495
Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly
            500                 505                 510
Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His
        515                 520                 525
Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp
    530                 535                 540
Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile
```

```
545                 550                 555                 560
Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys
                565                 570                 575
Gly His His His His His His His His
            580                 585
<210>  63
<211>  583
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  DENV

<400>  63

Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys
1               5                   10                  15
Phe His Leu Thr Ser Arg Asp Gly Glu Pro Arg Met Ile Val Gly Lys
            20                  25                  30
Asn Glu Arg Gly Lys Ser Leu Leu Phe Lys Thr Ala Ser Gly Ile Asn
        35                  40                  45
Met Cys Thr Leu Ile Ala Met Asp Leu Gly Glu Met Cys Asp Asp Thr
    50                  55                  60
Val Thr Tyr Lys Cys Pro His Ile Thr Glu Val Glu Pro Glu Asp Ile
65                  70                  75                  80
Asp Cys Trp Cys Asn Leu Thr Ser Thr Trp Val Thr Tyr Gly Thr Cys
                85                  90                  95
Asn Gln Ala Gly Glu His Arg Arg Asp Lys Arg Ser Val Ala Leu Ala
            100                 105                 110
Pro His Val Gly Met Gly Leu Asp Thr Arg Thr Gln Thr Trp Met Ser
        115                 120                 125
Ala Glu Gly Ala Trp Arg Gln Val Glu Lys Val Glu Thr Trp Ala Leu
    130                 135                 140
Arg His Pro Gly Phe Thr Ile Leu Ala Leu Phe Leu Ala His Tyr Ile
145                 150                 155                 160
Gly Thr Ser Leu Thr Gln Lys Val Val Ile Phe Ile Leu Leu Met Leu
                165                 170                 175
Val Thr Pro Ser Met Thr Met Arg Cys Val Gly Val Gly Asn Arg Asp
            180                 185                 190
Phe Val Glu Gly Leu Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu
        195                 200                 205
His Gly Gly Cys Val Thr Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp
    210                 215                 220
Ile Glu Leu Gln Lys Thr Glu Ala Thr Gln Leu Ala Thr Leu Arg Lys
225                 230                 235                 240
Leu Cys Ile Glu Gly Lys Ile Thr Asn Ile Thr Thr Asp Ser Arg Cys
                245                 250                 255
Pro Thr Gln Gly Glu Ala Ile Leu Pro Glu Glu Gln Asp Gln Asn Tyr
            260                 265                 270
Val Cys Lys His Thr Tyr Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly
        275                 280                 285
Leu Phe Gly Lys Gly Ser Leu Val Thr Cys Ala Lys Phe Gln Cys Leu
    290                 295                 300
Glu Ser Ile Glu Gly Lys Val Val Gln His Glu Asn Leu Lys Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Val Ile Ile Thr Val His Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly Asn Glu
                325                 330                 335
```

Thr Gln Gly Val Thr Ala Glu Ile Thr Ser Gln Ala Ser Thr Ala Glu
340 345 350
Ala Ile Leu Pro Glu Tyr Gly Thr Leu Gly Leu Glu Cys Ser Pro Arg
355 360 365
Thr Gly Leu Asp Phe Asn Glu Met Ile Leu Leu Thr Met Lys Asn Lys
370 375 380
Ala Trp Met Val His Arg Gln Trp Phe Phe Asp Leu Pro Leu Pro Trp
385 390 395 400
Thr Ser Gly Ala Thr Thr Lys Thr Pro Thr Trp Asn Arg Lys Glu Leu
405 410 415
Leu Val Thr Phe Lys Asn Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val Val Val
420 425 430
Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr
435 440 445
Glu Ile Gln Thr Ser Gly Gly Thr Ser Ile Phe Ala Gly His Leu Lys
450 455 460
Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Lys Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ala
465 470 475 480
Met Cys Leu Asn Thr Phe Val Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu Thr Gln
485 490 495
His Gly Thr Ile Leu Ile Lys Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp Ala Pro
500 505 510
Cys Lys Ile Pro Phe Ser Thr Glu Asp Gly Gln Gly Lys Ala His Asn
515 520 525
Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Val Thr Lys Lys Glu Glu Pro
530 535 540
Val Asn Ile Glu Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Asn Ile Val Ile
545 550 555 560
Gly Ile Gly Asp Lys Ala Leu Lys Ile Asn Trp Tyr Arg Lys Gly His
565 570 575
His His His His His His His
580

<210> 64
<211> 585
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> DENV

<400> 64

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

```
        115                 120                 125
Ser Glu Gly Ala Trp Lys His Ala Gln Arg Val Glu Ser Trp Ile Leu
    130                 135                 140
Arg Asn Pro Gly Phe Ala Leu Leu Ala Gly Phe Met Ala Tyr Met Ile
145                 150                 155                 160
Gly Gln Thr Gly Ile Gln Arg Thr Val Phe Phe Val Leu Met Met Leu
                165                 170                 175
Val Ala Pro Ser Tyr Gly Met Arg Cys Val Gly Val Gly Asn Arg Asp
            180                 185                 190
Phe Val Glu Gly Val Ser Gly Gly Ala Trp Val Asp Leu Val Leu Glu
        195                 200                 205
His Gly Gly Cys Val Thr Thr Met Ala Gln Gly Lys Pro Thr Leu Asp
    210                 215                 220
Phe Glu Leu Thr Lys Thr Thr Ala Lys Glu Val Ala Leu Leu Arg Thr
225                 230                 235                 240
Tyr Cys Ile Glu Ala Ser Ile Ser Asn Ile Thr Thr Ala Thr Arg Cys
                245                 250                 255
Pro Thr Gln Gly Glu Pro Tyr Leu Lys Glu Glu Gln Asp Gln Gln Tyr
            260                 265                 270
Ile Cys Arg Arg Asp Val Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly
        275                 280                 285
Leu Phe Gly Lys Gly Gly Val Val Thr Cys Ala Lys Phe Ser Cys Ser
    290                 295                 300
Gly Lys Ile Thr Gly Asn Leu Val Gln Ile Glu Asn Leu Glu Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Val Val Val Thr Val His Asn Gly Asp Thr His Ala Val Gly Asn Asp
                325                 330                 335
Thr Ser Asn His Gly Val Thr Ala Met Ile Thr Pro Arg Ser Pro Ser
            340                 345                 350
Val Glu Val Lys Leu Pro Asp Tyr Gly Glu Leu Thr Leu Asp Cys Glu
        355                 360                 365
Pro Arg Ser Gly Ile Asp Phe Asn Glu Met Ile Leu Met Lys Met Lys
    370                 375                 380
Lys Lys Thr Trp Leu Val His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu
385                 390                 395                 400
Pro Trp Thr Ala Gly Ala Asp Thr Ser Glu Val His Trp Asn Tyr Lys
                405                 410                 415
Glu Arg Met Val Thr Phe Lys Val Pro His Ala Lys Arg Gln Asp Val
            420                 425                 430
Thr Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Met His Ser Ala Leu Ala Gly
        435                 440                 445
Ala Thr Glu Val Asp Ser Gly Asp Gly Asn His Met Phe Ala Gly His
    450                 455                 460
Leu Lys Cys Lys Val Arg Met Glu Lys Leu Arg Ile Lys Gly Met Ser
465                 470                 475                 480
Tyr Thr Met Cys Ser Gly Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu
                485                 490                 495
Thr Gln His Gly Thr Thr Val Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly
            500                 505                 510
Ala Pro Cys Lys Val Pro Ile Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys Glu Lys
        515                 520                 525
Val Val Gly Arg Ile Ile Ser Ser Thr Pro Leu Ala Glu Asn Thr Asn
    530                 535                 540
Ser Val Thr Asn Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile
545                 550                 555                 560
Val Ile Gly Val Gly Asn Ser Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg Lys
                565                 570                 575
```

Gly His His His His His His His His
580 585

<210> 65
<211> 403
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> DENV

<400> 65

Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser
1 5 10 15
Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr
20 25 30
Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Leu Lys Thr
35 40 45
Glu Val Thr Asn Pro Ala Val Leu Arg Lys Leu Cys Ile Glu Ala Lys
50 55 60
Ile Ser Asn Thr Thr Thr Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala
65 70 75 80
Thr Leu Val Glu Glu Gln Asp Ala Asn Phe Val Cys Arg Arg Thr Val
85 90 95
Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser
100 105 110
Leu Leu Thr Cys Ala Lys Phe Lys Cys Val Thr Lys Leu Glu Gly Lys
115 120 125
Ile Val Gln Tyr Glu Asn Leu Lys Tyr Ser Val Ile Val Thr Val His
130 135 140
Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly Asn Glu Thr Thr Glu His Gly Thr
145 150 155 160
Ile Ala Thr Ile Thr Pro Gln Ala Pro Thr Ser Glu Ile Gln Leu Thr
165 170 175
Asp Tyr Gly Thr Leu Thr Leu Asp Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp
180 185 190
Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Thr Met Lys Glu Lys Ser Trp Leu Val
195 200 205
His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ser Gly Ala
210 215 220
Ser Thr Ser Gln Glu Thr Trp Asn Arg Gln Asp Leu Leu Val Thr Phe
225 230 235 240
Lys Thr Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val Val Val Leu Gly Ser Gln
245 250 255
Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Thr
260 265 270
Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys
275 280 285
Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly
290 295 300
Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val
305 310 315 320
Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro
325 330 335
Phe Ser Thr Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile
340 345 350
Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu

```
        355                 360                 365
Thr Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Ile Val Gly Ala Gly Glu
    370                 375                 380
Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly His His His His His
385                 390                 395                 400
His His His
```

<210> 66
<211> 403
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> DENV

<400> 66

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

Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro
325 330 335
Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile
340 345 350
Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu
355 360 365
Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro
370 375 380
Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly His His His His His
385 390 395 400
His His His

<210> 67
<211> 401
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> DENV

<400> 67

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

```
        275                 280                 285
Lys Leu Lys Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ala Met Cys Leu Asn Thr Phe
    290                 295                 300
Val Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Leu Ile
305                 310                 315                 320
Lys Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser
                325                 330                 335
Thr Glu Asp Gly Gln Gly Lys Ala His Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala
            340                 345                 350
Asn Pro Val Val Thr Lys Lys Glu Glu Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu
        355                 360                 365
Pro Pro Phe Gly Glu Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala
    370                 375                 380
Leu Lys Ile Asn Trp Tyr Arg Lys Gly His His His His His His His
385                 390                 395                 400
His
```

<210> 68
<211> 403
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> DENV

<400> 68

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

```
Lys Val Pro His Ala Lys Arg Gln Asp Val Thr Val Leu Gly Ser Gln
                245                 250                 255
Glu Gly Ala Met His Ser Ala Leu Ala Gly Ala Thr Glu Val Asp Ser
            260                 265                 270
Gly Asp Gly Asn His Met Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Lys Val Arg
        275                 280                 285
Met Glu Lys Leu Arg Ile Lys Gly Met Ser Tyr Thr Met Cys Ser Gly
    290                 295                 300
Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Thr
305                 310                 315                 320
Val Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly Ala Pro Cys Lys Val Pro
                325                 330                 335
Ile Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys Glu Lys Val Val Gly Arg Ile Ile
            340                 345                 350
Ser Ser Thr Pro Leu Ala Glu Asn Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu
        355                 360                 365
Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Asn
    370                 375                 380
Ser Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg Lys Gly His His His His His
385                 390                 395                 400
His His His
```

<210> 69
<211> 374
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

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

```
Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg Asn
225                 230                 235                 240
Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser Gly
                245                 250                 255
Leu Tyr Trp Cys Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys Arg
            260                 265                 270
Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Leu Gln Leu Pro Thr Pro
        275                 280                 285
Val Trp Phe His Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu
    290                 295                 300
Val Asn Thr Val Leu Trp Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys
305                 310                 315                 320
Lys Lys Trp Asp Leu Glu Ile Ser Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys
                325                 330                 335
Val Ile Ser Ser Leu Gln Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys
            340                 345                 350
Cys Gln Glu Gln Lys Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys
        355                 360                 365
Glu Pro Gln Gly Ala Thr
    370
<210>  70
<211>  316
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  70

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

```
Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Ser Thr Asp Pro Val Lys Ala Ala
                245                 250                 255
Gln Phe Glu Pro Pro Gly Arg Gln Met Ile Ala Ile Arg Lys Arg Gln
            260                 265                 270
Leu Glu Glu Thr Asn Asn Asp Tyr Glu Thr Ala Asp Gly Gly Tyr Met
        275                 280                 285
Thr Leu Asn Pro Arg Ala Pro Thr Asp Asp Asp Lys Asn Ile Tyr Leu
    290                 295                 300
Thr Leu Pro Pro Asn Asp His Val Asn Ser Asn Asn
305                 310                 315
<210>  71
<211>  316
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  71

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

<210> 72
<211> 291
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72

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

<210> 73
<211> 254
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73

```
Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
1               5                  10                  15
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
            20                  25                  30
Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
```

```
        35                  40                  45
Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
    50                  55                  60
Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65                  70                  75                  80
Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
                85                  90                  95
Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
            100                 105                 110
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
        115                 120                 125
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
    130                 135                 140
Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
145                 150                 155                 160
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe
                165                 170                 175
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
            180                 185                 190
Gly Leu Ser Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
        195                 200                 205
Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
    210                 215                 220
Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp
225                 230                 235                 240
Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys
                245                 250
<210>  74
<211>  254
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  74

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

```
            180                 185                 190
Gly Leu Ser Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
        195                 200                 205
Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
    210                 215                 220
Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp
225                 230                 235                 240
Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys
                245                 250
<210>  75
<211>  233
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  75

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
1               5                   10                  15
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
            20                  25                  30
Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
        35                  40                  45
Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
    50                  55                  60
Asn Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65                  70                  75                  80
Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
                85                  90                  95
Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Val Gly Trp Leu Leu Leu Gln
            100                 105                 110
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
        115                 120                 125
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
    130                 135                 140
Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro
145                 150                 155                 160
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
                165                 170                 175
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
            180                 185                 190
Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln
        195                 200                 205
Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
    210                 215                 220
Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
225                 230
<210>  76
<211>  233
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  76

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
1               5                   10                  15
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
            20                  25                  30
```

```
Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
        35                  40                  45
Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
    50                  55                  60
Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65                  70                  75                  80
Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
                85                  90                  95
Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
            100                 105                 110
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
        115                 120                 125
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
    130                 135                 140
Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro
145                 150                 155                 160
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
                165                 170                 175
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
            180                 185                 190
Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln
        195                 200                 205
Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
    210                 215                 220
Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
225                 230
<210>  77
<211>  404
<212>  PRT
<213>  Mus musculus

<400>  77

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

```
Thr Val Lys Glu Leu Phe Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser
        195                 200                 205
Ser Pro Phe Pro Glu Gly Ser Leu Val Thr Leu Asn Cys Glu Thr Asn
    210                 215                 220
Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln Leu His Phe Ser Phe Tyr Val
225                 230                 235                 240
Gly Ser Lys Ile Leu Glu Tyr Arg Asn Thr Ser Ser Glu Tyr His Ile
                245                 250                 255
Ala Arg Ala Glu Arg Glu Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Glu Val Ala
            260                 265                 270
Thr Glu Asp Ser Ser Val Leu Lys Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln
        275                 280                 285
Val Leu Gly Pro Gln Ser Ser Ala Pro Val Trp Phe His Ile Leu Phe
    290                 295                 300
Tyr Leu Ser Val Gly Ile Met Phe Ser Leu Asn Thr Val Leu Tyr Val
305                 310                 315                 320
Lys Ile His Arg Leu Gln Arg Glu Lys Lys Tyr Asn Leu Glu Val Pro
                325                 330                 335
Leu Val Ser Glu Gln Gly Lys Lys Ala Asn Ser Phe Gln Gln Val Arg
            340                 345                 350
Ser Asp Gly Val Tyr Glu Glu Val Thr Ala Thr Ala Ser Gln Thr Thr
        355                 360                 365
Pro Lys Glu Ala Pro Asp Gly Pro Arg Ser Ser Val Gly Asp Cys Gly
    370                 375                 380
Pro Glu Gln Pro Glu Pro Leu Pro Pro Ser Asp Ser Thr Gly Ala Gln
385                 390                 395                 400
Thr Ser Gln Ser
```

<210> 78
<211> 293
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 78

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

```
Phe Ser Ile Pro Lys Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr Tyr Cys
            180                 185                 190
Lys Gly Ser Leu Gly Arg Thr Leu His Gln Ser Lys Pro Val Thr Ile
        195                 200                 205
Thr Val Gln Gly Pro Lys Ser Ser Arg Ser Leu Pro Val Leu Thr Ile
    210                 215                 220
Val Ala Ala Val Thr Gly Ile Ala Val Ala Ala Ile Val Ile Ile Leu
225                 230                 235                 240
Val Ser Leu Val Tyr Leu Lys Lys Lys Gln Val Pro Asp Asn Pro Pro
                245                 250                 255
Asp Leu Glu Glu Ala Ala Lys Thr Glu Ala Glu Asn Thr Ile Thr Tyr
            260                 265                 270
Ser Leu Leu Lys His Pro Glu Ala Leu Asp Glu Glu Thr Glu His Asp
        275                 280                 285
Tyr Gln Asn His Ile
    290
<210>  79
<211>  267
<212>  PRT
<213>  Mus musculus

<400>  79

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

<210> 80
<211> 249
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 80

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

<210> 81
<211> 365
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

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

```
                85                  90                  95
Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr
            100                 105                 110
Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val
        115                 120                 125
Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp
    130                 135                 140
Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile
145                 150                 155                 160
Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr
                165                 170                 175
Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg
            180                 185                 190
Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys
        195                 200                 205
Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe
    210                 215                 220
Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu
225                 230                 235                 240
Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser
                245                 250                 255
Phe His Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His
            260                 265                 270
Tyr Cys Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val
        275                 280                 285
Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys Ser Ser Val Leu Val Val Gly Ile Val
    290                 295                 300
Ile Gly Val Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala Val Gly Gly Ala Leu Leu
305                 310                 315                 320
Trp Arg Arg Met Arg Ser Gly Leu Pro Ala Pro Trp Ile Ser Leu Arg
                325                 330                 335
Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp
            340                 345                 350
Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala
        355                 360                 365
<210>  82
<211>  119
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  82

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

115

<210> 83
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 84
<211> 326
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1               5                  10                  15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            100                 105                 110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        115                 120                 125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
    130                 135                 140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145                 150                 155                 160
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
                165                 170                 175
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
            180                 185                 190
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
        195                 200                 205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
    210                 215                 220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225                 230                 235                 240
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
                245                 250                 255
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
            260                 265                 270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
        275                 280                 285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
    290                 295                 300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305                 310                 315                 320
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325
```

<210> 85
<211> 377
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85

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

```
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80
Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95
Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
            100                 105                 110
Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
        115                 120                 125
Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
    130                 135                 140
Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145                 150                 155                 160
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
                165                 170                 175
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
            180                 185                 190
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
        195                 200                 205
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    210                 215                 220
Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225                 230                 235                 240
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                245                 250                 255
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
            260                 265                 270
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
        275                 280                 285
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    290                 295                 300
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305                 310                 315                 320
Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                325                 330                 335
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
            340                 345                 350
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
        355                 360                 365
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    370                 375
<210>  86
<211>  327
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  86

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

```
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
            100                 105                 110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        115                 120                 125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    130                 135                 140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145                 150                 155                 160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
                165                 170                 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            180                 185                 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
        195                 200                 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    210                 215                 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225                 230                 235                 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                245                 250                 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            260                 265                 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        275                 280                 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
    290                 295                 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305                 310                 315                 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
                325
<210>  87
<211>  328
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  CH

<400>  87

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

```
        115                 120                 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
<210>  88
<211>  119
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  VH

<400>  88

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Lys Pro Gly Gly
1               5                   10                  15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp His
            20                  25                  30
Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Ile Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Ser Tyr Pro Asp Ser Met
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ile Leu His
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Thr Arg Glu Ser Asn Gly Lys Pro Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
        115
<210>  89
<211>  111
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> VL

<400> 89

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ala
20 25 30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr
85 90 95
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
<210> 90
<211> 132
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 90

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Glu 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 Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Arg Ser Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ile 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 Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe
100 105 110
Asp Gly Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
115 120 125
Thr Val Ser Ser
130
<210> 91
<211> 132
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 91

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 Asn
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Arg Ser 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 Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe
100 105 110
Asp Gly Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
115 120 125
Thr Val Ser Ser
130

<210> 92
<211> 132
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 92

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 Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Arg Ser 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 Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe
100 105 110
Asp Gly Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
115 120 125
Thr Val Ser Ser
130

<210> 93
<211> 132
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 93

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Glu 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 Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Arg Ser Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ile 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 Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe
100 105 110
Asp Gly Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
115 120 125
Thr Val Ser Ser
130

<210> 94
<211> 132
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 94

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 Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Arg Ser 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 Gly Gly Arg Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe
100 105 110
Asp Gly Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
115 120 125
Thr Val Ser Ser
130

<210> 95
<211> 132
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VH

<400> 95

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 Val Ile Asn Pro Arg Gly Gly Ser Arg Arg Ser 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 Gly Gly Glu Ala Leu Phe Tyr Asp Ser Tyr Thr Thr Pro Phe
            100                 105                 110
Asp Gly Gly Ser Trp Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val
        115                 120                 125
Thr Val Ser Ser
    130
<210>  96
<211>  107
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  VL

<400>  96

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15
Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Lys Tyr
            20                  25                  30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Lys Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Glu Asp Leu Pro Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Gln Ile Lys
            100                 105
<210>  97
<211>  107
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  VL

<400>  97

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

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

<210> 98
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL

<400> 98

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

<210> 99
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL

<400> 99

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

<210> 100

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

<220>
<223> VL

<400> 100

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

<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-H1

<400> 101

Ser Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 102
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR-H1

<400> 102

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
20 25 30

<210> 103
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR-H3

<400> 103

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 104
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR-L1

<400> 104

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 105
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR-L3

<400> 105

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

<210> 106
<211> 157
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CD154

<400> 106

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

```
            100                 105                 110
Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln
        115                 120                 125
Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser
    130                 135                 140
His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu
145                 150                 155
<210>  107
<211>  328
<212>  PRT
<213>  Trình tự nhân tạo

<220>
<223>  CH

<400>  107

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 108
<211> 328
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CH

<400> 108

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Thr Thr
305 310 315 320
Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 109
<211> 328

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CH

<400> 109

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                  10                  15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Arg Lys Glu Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```