



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0039496

(51)⁸ C07K 16/08; A61K 39/42; C07K 16/10; (13) B
A61K 39/00; C07K 14/005

(21) 1-2018-00642 (22) 07/10/2016
(86) PCT/EP2016/074114 07/10/2016 (87) WO 2017/060504 13/04/2017
(30) PCT/EP2015/001970 07/10/2015 EP
(45) 25/04/2024 433 (43) 25/09/2018 366A
(73) HUMABS BIOMED SA (CH)
Via dei Gaggini 3, Bellinzona, 6500, Switzerland
(72) Davide CORTI (IT).
(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) KHÁNG THỂ PHÂN LẬP ĐƯỢC TRUNG HÒA VIRUT VIÊM GAN B VÀ ĐƯỢC PHÂN CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập và mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với khu vực vòng kháng nguyên của kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg) và trung hòa mạnh sự lây nhiễm của cả virus viêm gan B (HBV) và virus viêm gan delta (HDV). Sáng chế còn đề cập đến quyết định kháng nguyên liên kết kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên, axit nucleic mã hóa và tế bào sản xuất kháng thể và mảnh kháng thể này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến dược phẩm và kit chứa kháng thể và các mảnh kháng thể này được sử dụng để chẩn đoán, phòng ngừa và điều trị viêm gan B và viêm gan D.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực của các kháng thể chống virus viêm gan B (HBV) và chống virus viêm gan delta (HDV) và sử dụng chúng. Các kháng thể chống viêm gan B mạnh theo sáng chế liên kết với quyết định kháng nguyên được đặt trong khu vực vòng kháng nguyên của miền S của các protein vỏ bọc HBV (HBsAg), như được xác định theo sáng chế. Sáng chế cũng đề cập đến các axit nucleic mã hóa và các tế bào B cố định và các tương bào được nuôi cấy mà sản xuất các kháng thể và các mảnh kháng thể này. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến sử dụng các kháng thể và các mảnh kháng thể theo sáng chế trong các phương pháp sàng lọc cũng như trong việc chẩn đoán, phòng ngừa, và điều trị các bệnh, cụ thể là viêm gan B và viêm gan D.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virus viêm gan B (HBV) bao gồm (i) vỏ chứa ba protein bề mặt liên quan (kháng nguyên bề mặt viêm gan B, HBsAg) và lipid và (ii) nucleocapsit hai mươi mặt bao quanh hệ gen ADN virus và polymeraza ADN. Capsit HBV được tạo ra trong dung dịch bào tương của tế bào bị nhiễm trong quá trình bao phức hợp sao chép tiền hệ gen ARN và đạt được khả năng nảy chồi trong quá trình tổng hợp hệ gen ADN virus bằng cách phiên mã ngược tiền hệ gen trong xoang của hạt. Ba protein vỏ bọc HBV S-HBsAg, M-HBsAg, và L-HBsAg tạo thành hình nếp gấp xuyên màng phức hợp ở lưới nội bào, và tạo ra đồng dimer và dị dimer được liên kết với disulfit. Trong suốt quá trình nảy chồi ở màng nội bào, miền tuyến tính ngắn trong vùng PreS dung dịch bào tương tương tác với các vị trí liên kết trên bề mặt capsit. Các virion sau đó được tiết ra vào máu. Thêm vào đó, các protein bề mặt có thể nảy chồi khi không có mặt của các capsit và tạo ra các hạt virus con (SVP's) mà cũng được tiết ra vượt quá lôga 3-4 so với các virion. Mức cao HBsAg có thể làm cạn kiệt đáp ứng tế bào T đặc hiệu với HBsAg, và được đề xuất là yếu tố quan trọng đối với dung nạp miễn dịch virus ở bệnh nhân viêm gan B mạn tính (CHB) (Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF, Pathologie Biologie, 2010;58:258–66).

Virus viêm gan B gây ra các bệnh lây nhiễm gan mạn tính và cấp tính có thể đe dọa tính mạng. Viêm gan B cấp tính được đặc trưng bởi virus huyết, có hoặc không có các triệu chứng, với nguy cơ xảy ra viêm gan B mau chóng (Liang TJ, Block TM, McMahon BJ, Ghany MG, Urban S, Guo JT, Locarnini S, Zoulim F, Chang KM, Lok

AS. Present and future therapies of hepatitis B: From discovery to cure. *Hepatology*. 2015 Aug 3. doi: 10.1002/hep.28025. [Công bố điện tử trước khi in]). Mặc dù vaccin hiệu quả chống lại viêm gan B có bán từ năm 1982, nhưng WHO báo cáo rằng có 240 triệu người bị nhiễm viêm gan B mạn tính và hơn 780.000 người chết hàng năm do các biến chứng viêm gan B. Ước tính một phần ba bệnh nhân viêm gan B mạn tính (CHB) phát triển thành bệnh xơ gan, suy gan và bệnh ung thư biểu mô tế bào gan ước tính khoảng 600.000 người chết mỗi năm (Liang TJ, Block TM, McMahon BJ, Ghany MG, Urban S, Guo JT, Locarnini S, Zoulim F, Chang KM, Lok AS. Present and future therapies of hepatitis B: From discovery to cure. *Hepatology*. Ngày 3 tháng Tám năm 2015. doi: 10.1002/hep.28025. [Công bố điện tử trước khi in]).

Các phương pháp điều trị viêm gan B mạn tính hiện có bao gồm interferon-alpha (được pegyl hóa) (IFN- α hoặc pegIFN- α) và các dược chất kháng virus tác động trực tiếp tương tự nucleos(t)it ức chế polymeraza ADN virus viêm gan B (HBV) (“các chất ức chế polymeraza”). Các chất ức chế polymeraza bao gồm Lamivudin, Adefovir Entecavir, Telbivudin và Tenofovir. Các chất ức chế polymeraza (Lamivudin, Adefovir Entecavir, Telbivudin, Tenofovir) ngăn chặn chức năng phiên mã ngược của polymeraza ADN HBV và do đó gây cản trở sự tổng hợp ADN virus từ ARN tiền hệ gen. Việc điều trị này không ngăn chặn sự lây lan virus, sự tạo ra cccADN và không ảnh hưởng đến sự giải phóng HBsAg. Hơn nữa, các chất ức chế polymeraza giới hạn sự tiến triển bệnh nhưng hiếm khi làm sạch virus. Do đó, sự tái phát virus thường được quan sát sau khi dừng điều trị và, do đó, các chất ức chế polymeraza nên được dùng trong thời hạn sử dụng. Ngoài ra, các đột biến kháng dược chất xuất hiện sau khi điều trị kéo dài. PEG-IFN- α ức chế HBV một cách gián tiếp thông qua các tác dụng điều biến miễn dịch và trực tiếp bằng cách giảm các mức trạng thái ổn định của các bản phiên mã HBV (sự acety hóa của các histon liên kết cccADN tăng lên). Tuy nhiên, PEG-IFN- α đã giới hạn độ hiệu quả và gây ra các tác dụng phụ nghiêm trọng.

Trong khi pegIFN- α hữu hiệu ở khoảng một phần ba bệnh nhân được điều trị, các chất ức chế polymeraza giảm đáng kể tải lượng virus ở hầu hết các bệnh nhân này được điều trị (Timothy M. Block, Robert Gish, Haitao Guo, Anand Mehta, Andrea Cuconati, W. Thomas London, Ju-Tao Guo Chronic hepatitis B: What should be the goal for new therapies? *Antiviral Research* 98 (2013) 27–34). Interferon α có liên quan đến nhiều phản ứng phụ và không thể được sử dụng ở bệnh nhân mắc bệnh xơ gan giai đoạn nặng

hoặc chống chỉ định được chất tế/tâm thần (Liang TJ, Block TM, McMahon BJ, Ghany MG, Urban S, Guo JT, Locarnini S, Zoulim F, Chang KM, Lok AS. Present and future therapies of hepatitis B: From discovery to cure. *Hepatology*. Ngày 3 tháng Tám năm 2015. doi: 10.1002/hep.28025. [Công bố điện tử trước khi in]). Mặc dù các chất ức chế polymeraza như entecavir và tenofovir dường như có các tác dụng phụ ít hơn, các tỷ lệ đảo ngược huyết thanh HBeAG và giảm HBsAG là thấp đối với các dược chất này. Do đó, hầu hết các bệnh nhân cần điều trị suốt đời cùng với các chi phí liên quan và các nguy cơ của các phản ứng phụ, kháng được chất và không kết dính. Do đó, việc điều trị viêm gan B mạn tính hiện có vẫn còn khiếm khuyết bởi các giới hạn khác nhau và không thể xem là chữa khỏi. Do đó, - mặc dù điều trị HBV đã được cải thiện - các bệnh nhân HBV thường cần các liệu pháp điều trị suốt đời và việc chữa khỏi vẫn là mục tiêu thách thức. (Liang TJ, Block TM, McMahon BJ, Ghany MG, Urban S, Guo JT, Locarnini S, Zoulim F, Chang KM, Lok AS. Present and future therapies of hepatitis B: From discovery to cure. *Hepatology*. Ngày 3 tháng Tám năm 2015. doi: 10.1002/hep.28025. [Công bố điện tử trước khi in]). Kết quả gần nhất để chữa viêm gan B mạn tính (CHB) và điểm cuối lý tưởng của việc điều trị sẽ là đạt được tổn hao kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg), tuy nhiên, chưa đạt được hiệu quả với các phương pháp điều trị viêm gan B mạn tính hiện có (Xem, Gish R.G. và cộng sự, 2015, *Antiviral Research* 121:47-58).

Các bệnh nhân HBV mất cân bằng nghiêm trọng mắc viêm gan cấp tính hoặc bệnh ung thư biểu mô tế bào gan được chỉ ra đối với việc ghép gan đúng vị trí. Sau OLT, tỷ lệ tái phát viêm gan B là lớn hơn 80% mà không ngăn ngừa, trong khi lớn hơn 90% người nhận ghép được kiểm soát lâm sàng với globulin miễn dịch viêm gan B kết hợp (HBIG) và điều trị chất tương tự nucleos(t)it. Các globulin miễn dịch viêm gan B (HBIG) là các globulin miễn dịch đa dòng được tinh chế từ những người cho được tiêm chủng. Tuy nhiên, việc dùng HBIG lâu dài có liên quan đến một số vấn đề chưa được giải quyết, bao gồm tính có sẵn giới hạn và chi phí quá cao (Takaki A, Yasunaka T, Yagi T. Molecular mechanism to control post-transplantation hepatitis B recurrence. *Int J Mol Sci*. ngày 30 tháng 7 năm 2015;16(8):17494-513). Hơn nữa, các liều quá cao phải được dùng, cụ thể là 10 gam (có 10.000IU trên cơ sở các thử nghiệm liên kết) được dùng cho người nhận trong suốt quá trình ghép bằng cách truyền tĩnh mạch. Sau đó 2 gam được dùng trong tĩnh mạch hàng ngày trong khoảng thời gian 8 ngày và việc truyền

thêm được đưa ra mỗi 1 đến 3 tháng để duy trì các mức huyết thanh kháng HBsAg lớn hơn 100 IU/ml. Một lần nữa, cần điều trị suốt đời.

Thậm chí nhiều biến chứng nghiêm trọng được quan sát thấy khi đồng nhiễm hoặc bội nhiễm do sự xuất hiện virus viêm gan delta (HDV). Theo WHO, viêm gan D lây nhiễm khoảng 15 triệu người trên toàn thế giới. HDV được xem là vệ tinh virus con bởi vì nó có thể chỉ lan truyền khi có mặt HBV. HDV là một trong số các virus động vật nhỏ nhất (40nm), nhờ đó hệ gen của nó chỉ 1,6kb và mã hóa cho S và L HDAG. Tất cả các protein khác cần đối với việc sao chép hệ gen của HDV, bao gồm polymerase ARN, được tạo ra bởi tế bào chủ và vỏ bọc HDV được tạo ra bởi HDV. Mặt khác, HDV là virus khuyết cần đồng nhiễm với HBV cho sự sao chép của nó từ khi nó sử dụng protein bao bọc viêm gan B (HBsAg) làm lớp phủ virion của riêng nó. Khi được đưa vào các tế bào cho phép, hệ gen ARN HDV sao chép và liên kết với nhiều bản sao của các protein được mã hóa bởi HDV để tập hợp phức hợp ribonucleoprotein (RNP). RNP được xuất từ tế bào bởi các protein vỏ bọc HBV, mà có thể tập hợp các bao bọc lipoprotein nảy chồi vào xoang của ngăn pre-Golgi trước khi được tiết ra. Hơn nữa, các protein vỏ bọc HBV cũng cung cấp cơ chế để nhắm trúng đích của HDV đến tế bào không bị nhiễm, nhờ đó đảm bảo sự lây lan của HDV.

Các biến chứng do HDV gây ra bao gồm khả năng bị suy gan cao hơn trong các bệnh lây nhiễm cấp tính và sự tiến triển nhanh thành bệnh xơ gan, với cơ hội phát triển ung thư gan trong các lây nhiễm mạn tính. Kết hợp với virus viêm gan B, viêm gan D có tỷ lệ tử vong cao nhất trong tất cả các lây nhiễm viêm gan, ở mức 20% (Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. *Gut*. 2000 Mar;46(3):420-6). Liệu pháp chỉ được chấp thuận cho sự lây nhiễm HDV mạn tính là interferon-alpha. Tuy nhiên, việc điều trị HDV bằng interferon-alpha là tương đối không hiệu quả và không được dung nạp tốt. Việc điều trị bằng interferon-alpha dẫn đến đáp ứng virus học kéo dài 6 tháng sau khi điều trị ở một phần bốn số các bệnh nhân. Ngoài ra, các chất tương tự nucleos(t)it (NAs) đã được thử nghiệm rộng rãi trong viêm gan delta, nhưng chúng dường như không hiệu quả. Việc điều trị kết hợp của NAs với interferon cũng đã chứng minh là thất vọng và cần có các tùy chọn liệu pháp mới (Zaigham Abbas, Minaam Abbas Management of hepatitis delta: Need for novel therapeutic Options. *World J Gastroenterol* 28 tháng 8 năm 2015; 21(32): 9461-9465).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo quan điểm ở trên, mục đích của sáng chế là đề xuất sản phẩm trên cơ sở kháng thể, mà có khả năng trung hòa cả hai virus viêm gan B (HBV) và virus viêm gan delta (HDV). Điều đó cho phép việc phòng ngừa và điều trị viêm gan B được cải thiện. Hơn nữa, không có việc điều trị hiện có cho viêm gan D và, do đó, mục đích của sáng chế còn đề xuất sản phẩm trên cơ sở kháng thể để ngăn ngừa và điều trị viêm gan D.

Mục đích khác của sáng chế để đề xuất sản phẩm trên cơ sở kháng thể, mà làm cho có thể điều trị tốt hơn viêm gan B mạn tính. Với mục đích này, có lợi nếu một sản phẩm trên cơ sở kháng thể duy nhất hoạt động theo nhiều cách khác nhau bằng cách (i) trung hòa mạnh HBV, (ii) thúc đẩy sự thanh thải của HBsAg và HBV và (iii) gây ra sự đảo ngược huyết thanh, tức là đáp ứng miễn dịch đối với virus. Hơn nữa, các kháng thể có thể có lợi cũng thúc đẩy sự trình diện kháng nguyên được cải thiện, nhờ đó tạo điều kiện thuận lợi phục hồi đáp ứng tế bào T kháng HBV.

Ngoài ra, mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết các kiểu gen khác nhau - tốt hơn là tất cả đã biết của kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B và các đột biến lây nhiễm khác nhau - tốt hơn là đã biết của kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B. Tóm lại, mục đích của sáng chế là đề xuất các kháng thể được cải thiện, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó, cũng như các phân tử axit nucleic, các vectơ và các tế bào và các dược phẩm liên quan, mà khắc phục các nhược điểm được thảo luận ở trên của lĩnh vực kỹ thuật trước đó.

Mục đích theo sáng chế được giải quyết bởi đối tượng được đề cập bên dưới và theo các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Theo sự mô tả vắn tắt dưới đây của các hình vẽ kèm theo sẽ được trình bày. Các hình vẽ có mục đích để minh họa sáng chế chi tiết hơn. Tuy nhiên, chúng không nhằm giới hạn sáng chế theo cách bất kỳ.

Fig. 1 thể hiện ví dụ 1 sự gắn kết của kháng thể đơn dòng HBC34 với ba kiểu huyết thanh HBsAg khác nhau (adw, ady, và ayw) khi được đo bởi ELISA.

Fig. 2 thể hiện ví dụ 2 khả năng của các kháng thể kháng HB khác nhau, cụ thể các globulin miễn dịch HBV (HBIG), HBC34 và các kháng thể đơn dòng khác chống PreS1 (18/7) hoặc HBsAg để trung hòa sự lây nhiễm HBV của tế bào HepaRG in vitro.

Mỗi kháng thể được thử nghiệm ở ba nồng độ khác nhau, cụ thể là 5 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ và 0,05 $\mu\text{g/ml}$, ngoại trừ HBIG, mà được thử nghiệm ở 5.000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ và 50 $\mu\text{g/ml}$.

Fig. 3 thể ví dụ 2 việc nhuộm của HBcAg trong các tế bào HepaRG bị nhiễm với sự có mặt của ba nồng độ khác nhau (5 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ hoặc 0,05 $\mu\text{g/ml}$) của kháng thể đơn dòng HBC34 và, như viện dẫn, việc nhuộm nhân.

Fig. 4 thể hiện ví dụ 2 hoạt tính trung hòa của các nồng độ khác nhau của HBC34 trên HDV lây nhiễm. Ở nồng độ là 0,12 $\mu\text{g/ml}$ HBC34 không có các tế bào dương tính với HDV có thể phát hiện, thể hiện sự trung hòa mạnh của HDV. Ngược lại, HBIC không trung hòa HDV (được thử nghiệm trong mức pha loãng 1:1.000, tức là 50 $\mu\text{g/ml}$).

Fig. 5 thể hiện ví dụ 3 các trình tự axit amin của vòng lặp kháng nguyên của HBsAg của 10 kiểu gen HBV A, B, C, D, E, F, G, H, I và J. Các trình tự này chứa quyết định kháng nguyên được nhận biết bởi kháng thể HBC 34 (được đánh dấu màu xám). Trình tự trên đầu ((HBV-D J02203) được sử dụng để thiết kế thư viện peptit ở ví dụ 5, Fig. 7.

Fig. 6 thể hiện ví dụ 3 liên kết, khi được xác định bởi phân tích xác định hàm lượng flo tế bào, của kháng thể đơn dòng người HBC34 và kháng thể đối chứng (cả hai đều ở 5 $\mu\text{g/ml}$) với các tế bào Hep2 được thấm được chuyển nạp tạm thời bằng các plasmid biểu hiện các kiểu gen HBsAg khác nhau A, B, C, D, E, F, G, H, I và J như được thể hiện trên hình vẽ.

Fig. 7 thể hiện ví dụ 4 các trình tự axit amin của vòng lặp kháng nguyên của 19 đột biến HBsAg được thử nghiệm. Được khoanh tròn là các gốc của các đột biến HBsAg không liên kết hoặc liên kết yếu (chấm tròn) bởi kháng thể HBC34.

Fig. 8 thể hiện ví dụ 4 sự liên kết của kháng thể đơn dòng người HBC34 và hai kháng thể đặc hiệu HBsAg khác (Ab5 và Ab6) tất cả được thử nghiệm ở 5 $\mu\text{g/ml}$ trên các tế bào Hep2 được chuyển nạp bằng các plasmid biểu hiện các đột biến kiểu gen HBsAg D khác nhau như được thể hiện trên hình vẽ (“WT”: kiểu gen HBsAg D, số truy cập ngân hàng gen FJ899792).

Fig. 9 thể hiện ví dụ 5 sự liên kết của HBC34 với thư viện của 650 peptit vòng và tuyến tính khi được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật Pepscan cũng như các trình tự của bốn peptit được liên kết bởi HBC34. Các gốc biểu thị 1 là các xystein được đưa vào cho phép liên kết hóa học với các khung để xây dựng lại các quyết định kháng

nguyên đa hình. Nếu các xystein khác ngoài các xystein mới đưa vào có mặt, thì chúng có thể được thay thế bằng alanin (các gốc alanin được gạch chân).

Fig. 10 thể hiện ví dụ 5 việc nhuộm thâm tách Western bởi Ab4 và HBC34 trên các hạt virus HBV trong các điều kiện khử. Ab4 là kháng thể so sánh, mà cũng phản ứng chống lại vòng lặp kháng nguyên.

Fig. 11 thể hiện ví dụ 6 của các lượng virus huyết HBV ở chuột nhắt uPA/SCID được làm giống người được ủ với 5×10^7 bản sao của các đương lượng hệ gen HBV (kiểu gen D), mà được tiếp nhận từ việc điều trị sau khi lây nhiễm ba tuần với HBC34 (ở 1mg/kg được dùng i.p hai lần mỗi tuần), kháng thể đối chứng (AB đối chứng) hoặc entecavir (ETV: được dùng theo đường uống với 11 $\mu\text{g/ml}$) trong 6 tuần. Pha lây lan của sự lây nhiễm HBV (từ tuần 3 đến tuần 6 i.p (sau lây nhiễm)) virus huyết tăng lên $>2\log$ ở nhóm nhận kháng thể đối chứng, trong khi các hiệu giá HBV giảm ở chuột nhắt được điều trị bằng HBC34 hoặc entecavir.

Fig. 12 thể hiện ví dụ 6 việc nhuộm các tế bào gan có mặt HBsAg (phân tích trong gan) ở chuột nhắt của ví dụ 6 ở cuối thử nghiệm (tuần 9). Gần như tất cả các tế bào gan được nhuộm HBsAg dương tính ở chuột nhắt nhận kháng thể đối chứng, trong khi sự lây lan bị phong bế hiệu quả bởi cả hai, điều trị bằng entecavir và điều trị bằng HBC34 (khoảng từ 1 đến 5% các tế bào dương tính với HBcAg).

Fig. 13 thể hiện ví dụ 6 các phương pháp đo cccADN, mà không khác đáng kể với chuột nhắt bị diệt 3 tuần sau khi lây nhiễm HBV (“hcv 3 tuần; tức là không điều trị) và chuột nhắt được điều trị từ tuần 3 đến tuần 9 sau khi lây nhiễm bằng HBC34 hoặc entecavir. Trái lại, lượng ước tính của tế bào/cccADN đã tăng lên tới 2 logs ở nhóm tiếp nhận kháng thể đối chứng khi bị diệt 9 tuần sau khi lây nhiễm.

Fig. 14 thể hiện ví dụ 6 các mức HBsAG tuần hoàn ở đường chuẩn (BL), tuần 3 khi điều trị (tuần 6 sau lây nhiễm) và tuần 6 khi điều trị (tuần 9 sau lây nhiễm). Các mức HBsAg tuần hoàn giảm $>1 \log$ (và dưới giới hạn phát hiện) ở chuột nhắt nhận HBC34, nhưng không có ở chuột nhắt được điều trị bằng entecavir, trong khi các mức HBsAg tăng $>2 \log$ (đạt đến các mức nằm trong khoảng từ 5.000 đến 10.000 Iu/ml) ở nhóm đối chứng.

Fig. 15 thể hiện ví dụ 7 hiệu giá HBV (tám trái) và các mức HBsAG tuần hoàn (tám phải) khi viêm gan B mạn tính thiết lập tại đường chuẩn (BL), tuần 3 khi điều trị

(tuần 15 sau lây nhiễm, “tuần 3”) và tuần 6 khi điều trị (tuần 18 sau lây nhiễm, “tuần 6”). Hiệu giá HBV và các mức HBsAg tuần hoàn bị giảm ở chuột nhất tiếp nhận HBC34 khi điều trị ở tuần 3 và tuần 6. Các đường cong riêng lẻ thể hiện các con vật riêng lẻ. Kháng thể đối chứng: các đường chấm, HBC34: các đường liền.

Fig. 16 thể hiện ví dụ 8 hiệu giá HBV (tám trái) và hiệu giá HDV (tám phải) ở chuột nhất uPA/SCID đã phục hồi quần thể tế bào gan của người sơ cấp và được đồng nhiễm bằng huyết thanh có nguồn gốc từ bệnh nhân chứa HDV-ARN và HBV-ADN. Năm tuần sau khi điều trị sự lây nhiễm với HBC34 hoặc kháng thể đối chứng (“đối chứng”) được bắt đầu. Hiệu giá HBV (tám trái) và hiệu giá HDV (tám phải) được thể hiện ở đường chuẩn (BL tuần 3, tuần 5), ở tuần 3 khi điều trị (tuần 8 sau lây nhiễm, “tuần 8”) và ở tuần 6 khi điều trị (tuần 11 sau lây nhiễm, “tuần 11”). Các đường cong riêng lẻ thể hiện các con vật riêng lẻ. Kháng thể đối chứng: các đường chấm, HBC34: các đường liền.

Fig. 17 (phần 1) thể hiện ví dụ 9 các hình chiếu phối cảnh của vòng lặp kháng nguyên của kháng nguyên HBV-s, quyết định kháng nguyên của HBC34 được đánh dấu màu xám. Để ánh xạ quyết định kháng nguyên của HBC34, thư viện gồm 1520 peptit khác nhau được thử nghiệm khi được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật Pepscan. Fig. 17 (các phần 2-5) thể hiện ví dụ 9 cường độ liên kết (các cường độ ELISA) của HBC34 với 16 tập hợp peptit khác nhau. HBC34 đang liên kết với quyết định kháng nguyên đa hình như được chứng minh bởi sự liên kết với các peptit của các tập hợp 13-16 được cấu thành từ các cấu trúc CLIPS tổ hợp, thể hiện hai phần của quyết định kháng nguyên không liên tục (phần 2) và với các peptit của các tập hợp 9-12 được cấu thành từ các peptit vòng (phần 3). Không có liên kết HBC34 được quan sát với các tập hợp peptit tuyến tính 1-4 (phần 4) và 5-8 (phần 5) hỗ trợ thêm quan niệm mà HBC34 liên kết với quyết định kháng nguyên đa hình không liên tục.

Fig. 18 thể hiện ví dụ 9 sự liên kết của HBC34 với thư viện peptit được cấu thành từ 812 peptit CLIPS T3 vòng hoặc không liên tục. Để tinh chỉnh bản đồ quyết định kháng nguyên được mô tả trong Fig. 17, ba tập hợp peptit (RN1, RN2 và RN3 được làm phẳng) được tạo ra trên cơ sở các tập hợp trước đó (Fig. 17) bằng các phân tích thay thế toàn bộ. Fig. 18 thể hiện sự liên kết của HBC34 với các tập hợp 1-3 trong trường hợp các gốc ở các vị trí đóng hộp được thể bởi một trong 13 axit amin được chọn từ dãy AEFQGHKLPRQSVY_, trong đó “_” đại diện cho sự làm mất gốc. Gốc ban đầu ở vị trí

hoán vị được biểu thị ở bên trái của mỗi tấm cũng như hoặc (i) ở trình tự đóng hộp ngang (khi axit amin ban đầu là một phần của các dãy hoán vị) hoặc (ii) bên dưới trình tự (khi axit amin ban đầu không là một phần của các dãy hoán vị).

Fig. 19 thể hiện ví dụ 10 tác dụng của liệu pháp kết hợp với HBC 34 (1mg/kg hai lần một tuần) và Lamivudin (được bổ sung ở 0,4 mg/ml trong nước uống) trong việc giảm các mức virus huyết HBV (tấm A) và kháng nguyên HBV-s tuần hoàn (tấm B) ở chuột nhất uPA/SCID được làm giống người được ủ với 2×10^9 bản sao của đương lượng hệ gen HBV (kiểu gen D), mà tiếp nhận trong khoảng thời gian 4 tuần bắt đầu từ 8 tuần sau khi lây nhiễm, điều trị với kháng thể đối chứng (đối chứng), HBC34 đơn lẻ (HBC34), lamivudin đơn lẻ (Lamivudin) hoặc điều trị kết hợp (HBC34 và lamivudin). Liệu pháp kết hợp đã gây ra sự giảm cao hơn của virus huyết so với các dược chất đơn lẻ.

Fig. 20 thể hiện các ví dụ 11 và 12 sự sắp xếp của hai tập hợp của các trình tự VH (tấm A) và VL (tấm B) được tạo ra để thu được được các biến thể kháng thể 1-32. Các CDR (được xác định theo IMGT) được đánh dấu màu xám.

Fig. 21 thể hiện ví dụ 11 sự liên kết của 18 biến thể HBC34 được thao tác di truyền (thu được bằng cách kết hợp các trình tự VH và VL bị đột biến như được biểu thị ở các cột 2 và 3) với HBsAg (phân lớp adw) khi được xác định bởi ELISA. Ở cột 4, sự mất liên kết được biểu thị bằng “-”, liên kết giảm mạnh được biểu thị bằng “+/-”, liên kết giảm được biểu thị bằng “+/-”, liên kết tương tự hoặc tương đương với kháng thể ban đầu được biểu thị bằng “+”.

Fig. 22 thể hiện ví dụ 11 sự liên kết của 8 biến thể được thao tác di truyền khác nhau của HBC34 với HBsAg (adw) khi xác định trong thử nghiệm ELISA trên cơ sở kháng nguyên trực tiếp. 8 biến thể này được chọn trong số 18 đột biến HBC34 được mô tả trong Fig. 21; để mô tả đặc điểm ái lực tốt hơn đối với HBsAg thì 8 kháng thể được chuẩn độ và so với trình tự kháng thể gốc.

Fig. 23 thể hiện ví dụ 11 tóm tắt các đặc tính của 8 kháng thể được mô tả trong Fig.22. EC50 được xác định bằng cách khớp các đường cong trên Fig. 22 bằng cách sử dụng Graphpad prism. Hiệu suất được xác định bằng quá trình định lượng (ELISA) của IgG được tiết ra trong dịch nổi 300ml chuyển nạp của 293 tế bào Expi với mỗi biến thể trong số 8 biến thể cũng như kháng thể gốc.

Fig. 24 thể hiện các ví dụ 11 và 12 bằng tóm tắt các đặc tính của 15 biến thể, trong số 12 biến thể được thao tác di truyền bổ sung của HBC34, được thiết kế trên cơ sở các kết quả của tập hợp trước đó bằng cách đưa các đột biến bổ sung vào các khung (tấm A). Các đường cong liên kết thu được bởi việc chuẩn độ các kháng thể trong thử nghiệm ELISA trên cơ sở kháng nguyên và EC50 được tính bằng cách khớp đường cong với Graphpad prism. Hiệu suất được xác định dựa vào quá trình định lượng (ELISA) của IgG được tiết ra trong dịch nổi 30ml chuyển nạp của 293 tế bào Expi với mỗi biến thể trong số 15 biến thể cũng như kháng thể gốc. Sự thay đổi nếp gấp được vẽ đồ thị và được thể hiện trên tấm B.

Fig. 25 thể hiện các ví dụ 11 và 12 sự liên kết, khi được xác định bởi phân tích xác định hàm lượng flo tế bào, của HBC34 và các biến thể 6,7, 19, 23 và 24. Tất cả kháng thể được chuẩn độ bắt đầu từ 5 μ g/ml và được liên kết với các tế bào Hep2 được thấm được chuyển nạp tạm thời bằng các plasmit biểu hiện các kiểu gen HBsAg khác nhau A, B, C, D, E, F, G, H, I và J.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, các chi tiết của sáng chế sẽ được mô tả. Các chi tiết này được liệt kê theo các phương án cụ thể, tuy nhiên, cần hiểu rằng chúng có thể được kết hợp theo cách bất kỳ và số bất kỳ để tạo ra các phương án bổ sung. Phần mô tả này cần được hiểu là để hỗ trợ và bao hàm các phương án mà kết hợp các phương án được mô tả rõ ràng với số chi tiết được ưu tiên và/hoặc được bộc lộ bất kỳ. Hơn nữa, sự đổi trật tự hoặc các kết hợp của tất cả các chi tiết được mô tả trong đơn này cần được xem xét bộc lộ bằng cách mô tả sáng chế trừ khi ngữ cảnh chỉ ra khác.

Trừ khi được quy định khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa như được hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Xuyên suốt bản mô tả và các điểm yêu cầu bảo hộ tiếp theo, trừ khi ngữ cảnh yêu cầu khác, thuật ngữ “chứa”, và các biến thể như “gồm” và “bao gồm”, sẽ được hiểu có nghĩa là bao gồm phần tử, số hoặc bước được nêu nhưng không ngoại trừ phần tử, số hoặc bước không được nêu khác bất kỳ. Thuật ngữ “bao gồm” là một phương án cụ thể của thuật ngữ “chứa”, trong đó phần tử, số, hoặc bước không được nêu khác bất kỳ được loại trừ. Trong bối cảnh của sáng chế, thuật ngữ “chứa” bao hàm thuật ngữ “bao gồm”.

Do đó, thuật ngữ “chứa” bao hàm “gồm” cũng như “bao gồm”, ví dụ, chế phẩm “chứa” X có thể bao gồm chỉ X hoặc có thể bao gồm một thứ bổ sung ví dụ, X+Y.

Các thuật ngữ dạng số ít và tham chiếu tương tự được dùng trong bối cảnh mô tả sáng chế (cụ thể là trong bối cảnh của các điểm yêu cầu bảo hộ) được hiểu là bao hàm cả số ít và số nhiều, trừ khi có quy định khác được chỉ ra trong bản mô tả này hoặc mâu thuẫn một cách rõ ràng bởi bối cảnh. Việc trích dẫn các khoảng giá trị trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích đóng vai trò làm phương pháp viết tắt đề cập riêng rẽ đối với mỗi giá trị riêng nằm trong khoảng đó. Trừ khi được chỉ ra khác ở trong bản mô tả này, mỗi giá trị riêng lẻ được kết hợp vào bản mô tả như thể nó được trích dẫn riêng trong bản mô tả này. Không có ngôn ngữ trong bản mô tả cần được hiểu như biểu thị các chi tiết không được bảo hộ bất kỳ cần thiết cho việc thực hành sáng chế.

Thuật ngữ “gần như” không loại trừ “hoàn toàn” ví dụ, chế phẩm mà “gần như không chứa” Y có thể hoàn toàn không chứa Y. Nếu cần, thuật ngữ “gần như” có thể được bỏ qua khỏi định nghĩa của sáng chế.

Thuật ngữ “khoảng” liên quan đến giá trị bằng số x nghĩa là $x \pm 10\%$.

Thuật ngữ “bệnh” được sử dụng trong bản mô tả này có mục đích thường là các từ đồng nghĩa, được sử dụng thay thế cho, các thuật ngữ “rối loạn” và “tình trạng” (chỉ tình trạng bệnh lý), ở chỗ tất cả phản ánh tình trạng bất thường ở cơ thể người hoặc động vật hoặc một bộ phận cơ thể mà thiếu hụt chức năng thông thường, thường được biểu thị bởi các dấu hiệu và các triệu chứng phân biệt, và khiến cho người hoặc động vật có khoảng thời gian sống và chất lượng sống giảm.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến thuật ngữ “điều trị” đối tượng hoặc bệnh nhân có mục đích bao gồm ngăn ngừa, phòng ngừa, làm suy yếu, làm thuyên giảm, và trị liệu. Các thuật ngữ “đối tượng” hoặc “bệnh nhân” được dùng thay thế ở trong bản mô tả này có nghĩa là tất cả các động vật có vú bao gồm cả con người. Các ví dụ về các đối tượng bao gồm người, bò, chó, mèo, ngựa, dê, cừu, lợn, và thỏ. Theo một phương án, bệnh nhân là con người.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “peptit”, “polypeptit”, và “protein” và các biến thể của các thuật ngữ này để chỉ phân tử, cụ thể là peptit, oligopeptit, polypeptit hoặc protein bao gồm protein dung hợp, tương ứng, chứa ít nhất hai axit amin liên kết với nhau bằng liên kết peptit thông thường, hoặc liên kết peptit

biến đổi, như ví dụ trong trường hợp của các peptit đồng vị trí. Ví dụ, peptit, polypeptit hoặc protein tốt hơn là được cấu thành từ các axit amin được chọn từ 20 axit amin được xác định bởi mã di truyền, được liên kết nhau bởi liên kết peptit thông thường (polypeptit “cổ điển”). Peptit, polypeptit hoặc protein có thể được cấu thành từ các axit amin L và/hoặc axit amin D. Cụ thể là, các thuật ngữ “peptit”, “polypeptit”, “protein” cũng bao gồm “peptidomimetic” mà được xác định dưới dạng các chất tương tự peptit chứa các phần tử cấu trúc không peptit, mà các peptit có khả năng bắt chước hoặc đối kháng (các) hoạt động sinh học của peptit gốc tự nhiên. Peptidomimetic thiếu các đặc tính peptit cổ điển chẳng hạn như các liên kết peptit có thể cắt bằng enzyme. Cụ thể là, peptit, polypeptit hoặc protein trong ngữ cảnh theo sáng chế đều có thể chứa các axit amin khác với 20 axit amin được xác định bởi mã di truyền ngoài các axit amin này, hoặc nó có thể được cấu thành từ các axit amin khác với 20 axit amin được xác định bởi mã di truyền. Cụ thể là, peptit, polypeptit hoặc protein trong bối cảnh của sáng chế đều có thể được cấu thành từ các axit amin bị biến đổi bằng các quá trình tự nhiên, chẳng hạn các quá trình trưởng thành sau dịch mã hoặc bằng các quá trình hóa học, mà được biết nhiều đối với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các biến đổi này được mô tả đầy đủ trong bản mô tả này. Các biến đổi này có thể xuất hiện bất cứ đâu trong polypeptit: trong khung peptit, trong chuỗi axit amin hoặc thậm chí ở các đầu cuối amino hoặc carboxy. Cụ thể là, peptit hoặc polypeptit có thể được phân nhánh theo sự ubiquitin hóa hoặc được tạo vòng có hoặc không có sự phân nhánh. Kiểu này của sự biến đổi có thể là kết quả của quá trình sau dịch mã tổng hợp hoặc tự nhiên mà đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Cụ thể, các thuật ngữ “peptit”, “polypeptit”, “protein” trong bối cảnh của sáng chế cũng bao gồm các peptit, polypeptit, và protein biến đổi. Ví dụ, các biến đổi peptit, polypeptit hoặc protein có thể bao gồm sự axetyl hóa, sự axyl hóa, sự ADP-ribosyl hóa, sự amit hóa, sự cố định cộng hóa trị của nucleotit hoặc dẫn xuất nucleotit, sự cố định cộng hóa trị của lipid hoặc dẫn xuất lipid, sự cố định cộng hóa trị của phosphatidylinositol, liên kết chéo cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị, sự tạo vòng, sự tạo thành liên kết disulfid, sự khử metyl hóa, sự glycosyl hóa bao gồm sự pegyl hóa, sự hydroxyl hóa, sự iot hóa, sự metyl hóa, sự myristoyl hóa, sự oxy hóa, quá trình phân giải protein, sự phospho hóa, sự prenyl hóa, sự raxemic hóa, sự seneloyl hóa, sự sulfat hóa, sự bổ sung axit amin chẳng hạn như sự arginyl hóa hoặc sự ubiquitin hóa. Các biến đổi này được mô tả đầy đủ trong bản mô tả sáng chế (Proteins

Structure and Molecular Properties (1993) xuất bản lần thứ 2, T. E. Creighton, New York; Post-translational Covalent Modifications of Proteins (1983) B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York; Seifter và cộng sự (1990) Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors, Meth. Enzymol. 182: 626-646 và Rattan và cộng sự, (1992) Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging, Ann NY Acad Sci, 663: 48-62). Theo đó, các thuật ngữ “peptit”, “polypeptit”, “protein” tốt hơn là bao gồm ví dụ các lipopeptit, lipoprotein, glycopeptit, glycoprotein và các dạng tương tự.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “(poly)peptit” chứa chuỗi đơn của các monome axit amin được liên kết bởi các liên kết peptit như được giải thích ở trên. “Protein” như được sử dụng trong bản mô tả này, chứa một hoặc nhiều, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 (poly)peptit, tức là một hoặc nhiều chuỗi của các monome axit amin được liên kết các liên kết peptit như được giải thích ở trên. Tốt hơn là, protein theo sáng chế chứa 1, 2, 3, hoặc 4 polypeptit.

Thuật ngữ “tái tổ hợp”, như được sử dụng trong bản mô tả này (ví dụ, kháng thể tái tổ hợp, protein tái tổ hợp, axit tái tổ hợp, v.v.) để chỉ phân tử bất kỳ (kháng thể, protein, axit nucleic, v.v.) mà được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng các phương tiện tái tổ hợp, và không có trong tự nhiên.

Như được sử dụng bản mô tả này, các thuật ngữ “axit nucleic”, “phân tử axit nucleic” và “polynucleotit” được sử dụng thay thế và có mục đích bao gồm các phân tử ADN và các phân tử ARN. Phân tử axit nucleic có thể có dạng sợi đơn hoặc sợi kép, nhưng tốt hơn là and sợi kép.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “tế bào”, “dòng tế bào”, và “nuôi cấy tế bào” được dùng thay thế cho nhau và tất cả các ký hiệu này bao gồm con cháu. Do đó, các thuật ngữ “các thể biến nạp” và “các tế bào biến nạp” bao gồm các tế bào chủ thể chính và các dạng nuôi cấy có nguồn gốc từ đó mà không quan tâm đến số lần chuyển. Cần được hiểu rằng tất cả con cháu có thể là không giống nhau chính xác về thành phần ADN, do các đột biến vô tình hoặc có chủ ý. Con cháu biến thể có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học khi được sàng lọc đối với các tế bào được biến nạp ban đầu được bao gồm. Trong trường hợp các ký hiệu riêng biệt được dự định, nó sẽ là rõ ràng với bối cảnh.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “mảnh liên kết kháng nguyên”, “mảnh” và “mảnh kháng thể” được sử dụng thay thế cho nhau để chỉ mảnh bất kỳ của một kháng thể theo sáng chế mà duy trì hoạt tính liên kết kháng nguyên của kháng thể. Các ví dụ về các mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể chuỗi đơn, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv hoặc scFv. Hơn nữa, thuật ngữ “kháng thể” như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm cả các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “kháng thể trung hòa” là kháng thể có thể trung hòa, tức là, ngăn chặn, ức chế, làm giảm, ngăn cản hoặc gây cản trở khả năng mầm bệnh khởi phát và/hoặc duy trì sự lây nhiễm ở vật chủ. Thuật ngữ “kháng thể trung hòa” và “kháng thể làm trung hòa” hoặc “các kháng thể làm trung hòa” có thể sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này. Các kháng thể này có thể được sử dụng đơn lẻ, hoặc kết hợp, dưới dạng chất trị liệu hoặc phòng ngừa theo chế phẩm thích hợp, kết hợp với vaccin hoạt tính, làm công cụ chẩn đoán, hoặc làm công cụ sản xuất như được mô tả ở trong bản mô tả này.

Các liều lượng thường được biểu hiện liên quan đến thể trọng. Do đó, liều lượng được biểu hiện dưới dạng [g, mg, hoặc đơn vị khác]/kg (hoặc g, mg, v.v.) thường để chỉ [g, mg, hoặc đơn vị khác] “trên kg (hoặc g, mg, v.v) thể trọng”, thậm chí nếu thuật ngữ “thể trọng” không được đề cập một cách rõ ràng.

Các thuật ngữ “liên kết” và “liên kết đặc hiệu” và các tham chiếu tương tự không bao hàm sự bám dính không đặc hiệu.

Thuật ngữ “vaccin” như được sử dụng trong bản mô tả này thường được hiểu là chất trị liệu hoặc phòng ngừa cung cấp ít nhất một kháng nguyên, tốt hơn là chất sinh miễn dịch. Kháng nguyên hoặc chất sinh miễn dịch có thể có nguồn gốc từ chất bất kỳ phù hợp với chủng ngừa vaccin. Ví dụ, kháng nguyên và chất sinh miễn dịch có thể có nguồn gốc từ mầm bệnh, chẳng hạn như từ các hạt virus hoặc vi khuẩn, v.v., hoặc từ khối u hoặc mô ung thư. Kháng nguyên và chất sinh miễn dịch kích thích hệ miễn dịch tương thích với cơ thể để tạo ra đáp ứng miễn dịch tương thích. Cụ thể, “kháng nguyên” hoặc “chất sinh miễn dịch” thường chỉ chất mà có thể được nhận biết bằng hệ miễn dịch, tốt hơn là bằng hệ miễn dịch tương thích, và mà có khả năng kích hoạt đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với kháng nguyên, ví dụ, bởi sự tạo ra các kháng thể hoặc các tế bào T đặc hiệu

với kháng nguyên là một phần của đáp ứng miễn dịch tương thích. Thông thường, kháng nguyên có thể là hoặc có thể chứa peptit hoặc protein mà có thể được biểu hiện bởi MHC đến các tế bào T.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “biến thể trình tự” để chỉ trình tự bất kỳ có một hoặc nhiều thay đổi so với trình tự tham chiếu, nhờ đó trình tự tham chiếu là trình tự bất kỳ trong số các trình tự được liệt kê trong “Bảng trình tự và các số SEQ ID” (danh mục trình tự), tức là từ SEQ ID NO: 1 đến SEQ NO ID: 88. Do đó, thuật ngữ “biến thể trình tự” bao gồm các biến thể trình tự nucleotit và các biến thể trình tự axit amin. Đối với biến thể trình tự trong bối cảnh của trình tự nucleotit, trình tự tham chiếu cũng là trình tự nucleotit, trong khi với biến thể trình tự trong bối cảnh của trình tự axit amin, trình tự tham chiếu cũng là trình tự axit amin. “Biến thể trình tự” như được sử dụng trong bản mô tả này có độ tương đồng ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là 98% hoặc 99% với trình tự tham chiếu. Độ tương đồng trình tự thường được tính toán liên quan đến chiều dài đầy đủ trình tự tham chiếu (tức là trình tự được trích dẫn trong đơn). Phần trăm độ tương đồng, như được đề cập đến trong bản mô tả này, có thể được xác định, ví dụ, bằng cách sử dụng BLAST sử dụng các thông số mặc định được quy định bởi NCBI (Trung tâm quốc gia về công nghệ sinh học (National Center for Biotechnology Information); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [ma trận Blosum 62; điểm phạt khoảng trống mở=11 và điểm phạt khoảng trống kéo dài=1].

“Biến thể trình tự” trong bối cảnh của trình tự axit nucleic (nucleotit) có trình tự được thay đổi trong đó một hoặc nhiều nucleotit trong trình tự tham chiếu được làm mất, hoặc thay thế, hoặc một hoặc nhiều nucleotit được chèn vào trình tự của trình tự nucleotit tham chiếu. Các nucleotit được đề cập trong bản mô tả này bằng ký hiệu một chữ tiêu chuẩn (A, C, G, hoặc T). Do sự thoái hóa của mã di truyền, “biến thể trình tự” của trình tự nucleotit có thể hoặc dẫn đến sự thay đổi trong trình tự axit amin tham chiếu tương ứng, tức là trong “biến thể trình tự” axit amin hoặc không. Các biến thể trình tự nucleotit, mà không dẫn đến các biến thể trình tự axit amin được ưu tiên (các đột biến câm). Tuy nhiên, các biến thể trình tự nucleotit dẫn đến các đột biến “không câm” cũng nằm trong phạm vi, cụ thể là các biến thể trình tự nucleotit này, dẫn đến trình tự axit amin, mà có độ tương đồng ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với

trình tự axit amin tham chiếu.

“Biến thể trình tự” trong bối cảnh của trình tự axit amin có trình tự được thay đổi trong đó một hoặc nhiều axit amin được làm mất, thay thế hoặc chèn so với trình tự axit amin tham chiếu. Là kết quả của các thay đổi, biến thể trình tự này có trình tự axit amin mà có độ tương đồng ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là 98% hoặc 99% với trình tự axit amin tham chiếu. Ví dụ, trên mỗi 100 axit amin của trình tự tham chiếu, thì biến thể trình tự có không lớn hơn 10 thay đổi, tức là dạng kết hợp bất kỳ của sự làm mất, sự chèn hoặc thay thế, có “độ tương đồng ít nhất 90%” với trình tự tham chiếu.

Trong khi có thể có các sự thể axit amin không bảo toàn, được ưu tiên là các sự thể axit amin bảo toàn, trong đó axit amin được thể có đặc tính hóa học hoặc cấu trúc tương tự với axit amin tương ứng trong trình tự tham chiếu. Bằng cách ví dụ, sự thể axit amin bảo toàn bao gồm sự thể của một axit amin béo hoặc axit amin kỵ nước, ví dụ, alanin, valin, leuxin và isoleuxin, với các gốc khác; sự thể của một axit amin chứa hydroxyl, ví dụ, serin và threonin, với các gốc khác; sự thể của một gốc có tính axit, ví dụ, axit glutamic hoặc axit aspartic, với các gốc khác; sự thể của một gốc chứa amit, ví dụ, asparagin và glutamin, với các gốc khác; sự thể của một gốc thơm, ví dụ, phenylalanin và tyrosin, với các gốc khác; sự thể của một gốc bazơ, ví dụ, lysin, arginin và histidin, với các gốc khác; và sự thể của một axit amin nhỏ, ví dụ, alanin, serin, theonin, metionin, và glyxin, với các gốc khác.

Các đoạn chèn trình tự axit amin bao gồm các thể dung hợp đầu cuối carboxy và/hoặc amino trong khoảng chiều dài từ một gốc đến polypeptit chứa một trăm gốc hoặc lớn hơn, cũng như các đoạn chèn trong trình tự của các gốc axit amin đơn hoặc đa. Các ví dụ về các đoạn chèn đầu cuối bao gồm sự dung hợp với các đầu C hoặc N của trình tự axit amin với phân tử thông báo hoặc enzym.

Quan trọng hơn là, các thay đổi trong các biến thể trình tự không thủ tiêu chức năng của trình tự tham chiếu tương ứng, trong trường hợp này, ví dụ chức năng trình tự của kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với quyết định kháng nguyên giống nhau và/hoặc đủ dung hòa sự lây nhiễm của HBV và HDV. Hướng dẫn xác định các gốc axit amin và các nucleotit, tương ứng, có thể được thể, được chèn, được làm mất mà không thủ tiêu các chức năng có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng các

chương trình máy tính đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, trình tự axit nucleic hoặc trình tự axit amin “có nguồn gốc từ” axit nucleic, peptit, polypeptit hoặc protein chỉ định để chỉ nguồn gốc của axit nucleic, peptit, polypeptit hoặc protein. Tốt hơn là, trình tự axit nucleic hoặc trình tự axit amin mà có nguồn gốc từ trình tự cụ thể có trình tự axit amin mà gần như tương đồng với trình tự đó hoặc một phần của nó, nơi mà nó có nguồn gốc từ đó, sao cho “gần như tương đồng” bao gồm các biến thể trình tự được xác định ở trên. Tốt hơn là, trình tự axit nucleic hoặc trình tự axit amin mà có nguồn gốc từ protein hoặc peptit cụ thể, có nguồn gốc từ miền tương ứng trong protein peptit cụ thể. Nhờ đó, “tương ứng” để chỉ cụ thể đến cùng một chức năng. Ví dụ, “miền ngoại bào” này tương ứng với “miền ngoại bào” khác (của protein khác, hoặc “miền xuyên màng” này tương ứng với “miền xuyên màng” khác (của protein khác). Do đó, các phần “tương ứng” của các peptit, các protein và các axit nucleic có thể nhận biết dễ dàng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tương tự, các trình tự “có nguồn gốc” từ các trình tự khác thường được nhận biết dễ dàng bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này khi có nguồn gốc của nó trong trình tự.

Tốt hơn là, trình tự axit nucleic hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ axit nucleic, peptit, polypeptit hoặc protein có thể tương đồng với các axit nucleic, peptit, polypeptit hoặc protein ban đầu (nơi mà nó có nguồn gốc). Tuy nhiên, trình tự axit nucleic hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ axit nucleic, peptit, polypeptit hoặc protein khác có thể cũng có một hoặc nhiều đột biến tương đối với axit nucleic, peptit, polypeptit hoặc protein ban đầu (nơi mà nó có nguồn gốc), cụ thể là trình tự axit nucleic hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ axit nucleic, peptit, polypeptit hoặc protein khác có thể là biến thể trình tự chức năng như được mô tả ở trên của axit nucleic, peptit, polypeptit hoặc protein ban đầu (nơi mà nó có nguồn gốc). Ví dụ, trong peptit/protein thì một hoặc hơn gốc axit amin có thể được thế bằng các gốc axit amin khác hoặc một hoặc nhiều đoạn chèn hoặc làm mất gốc axit amin có thể xảy ra.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “đột biến” đề cập đến sự thay đổi trong trình tự axit nucleic và/hoặc trình tự axit amin so với trình tự tham chiếu, ví dụ, trình tự hệ gen tương ứng. Đột biến, ví dụ, so sánh với trình tự hệ gen, có thể là ví dụ, đột biến soma (có trong tự nhiên), đột biến tự phát, đột biến được gây ra, ví dụ, được gây ra bởi các enzym, các hóa chất hoặc bức xạ, hoặc đột biến thu được bằng cách gây

đột biến được định hướng vị trí (các phương pháp sinh học phân tử để tạo ra các thay đổi có chủ ý và cụ thể trong trình tự axit nucleic và/hoặc trong trình tự axit amin). Do đó, các thuật ngữ “đột biến” hoặc “gây đột biến” sẽ được hiểu cũng bao gồm bước tạo ra đột biến về mặt vật lý, ví dụ, trong trình tự axit nucleic hoặc trong trình tự axit amin. Đột biến bao gồm sự thế, làm mất, và chèn một hoặc nhiều nucleotit hoặc axit amin cũng như sự đảo ngược một vài nucleotit hoặc axit amin liên tiếp. Để đạt được sự đột biến trong trình tự axit amin, tốt hơn là đột biến có thể được đưa vào trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin nêu trên để biểu hiện polypeptit đột biến (tái tổ hợp). Đột biến có thể đạt được ví dụ bằng cách thay đổi, ví dụ bằng cách gây đột biến được định hướng vị trí, mã bộ ba của phân tử axit nucleic mã hóa một axit amin dẫn đến mã bộ ba mã hóa axit amin khác, hoặc bằng cách tổng hợp biến thể trình tự, ví dụ, bằng cách nhận biết trình tự nucleotit của phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit và bằng cách thiết kế sự tổng hợp phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa biến thể của polypeptit mà không cần gây đột biến một hoặc nhiều nucleotit của phân tử axit nucleic.

Sáng chế được dựa trên, trong số các phát hiện khác, sự khám phá và sự phân lập các kháng thể có hiệu nghiệm cao trong việc trung hòa các virus viêm gan B và virus viêm gan delta, cũng như các quyết định kháng nguyên mà các kháng thể theo sáng chế liên kết với. Các kháng thể này được mong muốn, vì chỉ số lượng nhỏ của các kháng thể được yêu cầu để trung hòa virus viêm gan B. Hơn nữa, không có phương pháp điều trị hiện có sẵn cho viêm gan D. Các kháng thể theo sáng chế có hiệu quả cao trong việc ngăn ngừa cũng như điều trị hoặc làm suy yếu HBV và HDV. Hơn nữa, các kháng thể theo sáng chế liên kết với kiểu gen khác nhau - tốt hơn là tất cả đã biết của kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B và với các đột biến lây nhiễm khác nhau - tốt hơn là đã biết của kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B.

Các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với khu vực vòng kháng nguyên của HBsAg và trung hòa sự lây nhiễm virus viêm gan B và virus viêm gan delta.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể” bao hàm các dạng khác nhau của các kháng thể bao gồm, mà không bị giới hạn ở, toàn bộ các kháng thể, các mảnh kháng thể, cụ thể là các mảnh liên kết kháng nguyên, kháng thể người, kháng

thể khảm, kháng thể được làm giống người, kháng thể tái tổ hợp và kháng thể được thao tác di truyền (các kháng thể biến thể hoặc kháng thể đột biến) miễn là các đặc tính điển hình theo sáng chế được giữ lại. Các kháng thể người và các kháng thể đơn dòng được ưu tiên và đặc biệt được ưu tiên là các kháng thể đơn dòng người, cụ thể là các kháng thể đơn dòng người tái tổ hợp.

Các kháng thể người đã biết trong tình trạng của lĩnh vực kỹ thuật này (van Dijk, M. A., và van de Winkel, J. G., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2001, 368:-374-313). Các kháng thể người cũng được sản xuất ở các động vật chuyển gen (ví dụ, chuột nhắt) mà có khả năng, khi gây miễn dịch, sản xuất danh mục hoặc sự lựa chọn đầy đủ của các kháng thể người khi không có sự sản xuất globulin miễn dịch nội sinh. Việc chuyển mảng gen globulin miễn dịch dòng mầm của người ở chuột nhắt đột biến dòng mầm này sẽ dẫn đến sự sản xuất các kháng thể người khi thử thách kháng nguyên (xem, ví dụ, Jakobovits, A., và cộng sự, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., và cộng sự, *Nature* 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., và cộng sự, *Year Immunol.* 7 (1993) 3340). Các kháng thể người có thể cũng được sản xuất trong các thư viện hiển thị thể thực khuẩn (Hoogenboom, H. R., và Winter, G., *J. Biol.* 227 (1992) 381-388; Marks, J. D., và cộng sự, *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597). Các kỹ thuật của Cole và cộng sự và Boerner và cộng sự cũng có sẵn cho việc tạo ra của các kháng thể đơn dòng người (Cole và cộng sự, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); và Boerner, P., và cộng sự, *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). Tốt hơn là, các kháng thể đơn dòng người được tạo ra bằng cách sử dụng việc cố định tế bào EBV-B được cải thiện như được mô tả trong Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A. (2004): An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med.* 10(8):871-5. Thuật ngữ “kháng thể người” như được sử dụng trong bản mô tả này còn bao gồm các kháng thể mà được biến đổi, ví dụ trong vùng biến đổi, để tạo ra các đặc tính theo sáng chế như được mô tả trong bản mô tả này. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vùng biến đổi” (vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L), vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H)) biểu thị mỗi cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bao gồm trực tiếp trong việc liên kết kháng thể với kháng nguyên.

Các kháng thể theo sáng chế có thể là kiểu tương đương bất kỳ (ví dụ, IgA, IgG,

IgM, tức là chuỗi nặng α , γ hoặc μ), nhưng sẽ tốt hơn là IgG. Trong kiểu tương đương IgG, các kháng thể có thể là phân lớp IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4, theo đó IgG1 được ưu tiên. Các kháng thể theo sáng chế có thể có chuỗi nhẹ κ hoặc λ . Các kháng thể đặc hiệu với HBsAg của loại IgG có thể cũng có lợi phong bế sự giải phóng của HBV và HBsAg từ các tế bào bị lây nhiễm- trên cơ sở sự hấp thu độc lập với kháng nguyên của IgG thông qua các thụ thể FcRN-IgG vào các tế bào gan. Do đó, các kháng thể đặc hiệu với HBsAg của loại IgG có thể liên kết trong nội bào và nhờ đó phong bế sự giải phóng các virion HBV và HBsAg.

Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể được tinh chế, kháng thể chuỗi đơn, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv hoặc scFv.

Do đó, tốt hơn là, các kháng thể theo sáng chế có thể là các kháng thể người, các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đơn dòng người, các kháng thể tái tổ hợp hoặc các kháng thể được tinh chế. Sáng chế cũng đề xuất các mảnh của kháng thể theo sáng chế, cụ thể là các mảnh mà giữ lại hoạt tính liên kết kháng nguyên của các kháng thể. Các mảnh này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể chuỗi đơn, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv hoặc scFv. Mặc dù bản mô tả sáng chế bao gồm các điểm yêu cầu bảo hộ có thể ở một số vị trí để chỉ rõ ràng (các) mảnh liên kết kháng nguyên, (các) mảnh kháng thể, (các) biến thể và/hoặc (các) dẫn xuất của các kháng thể, cần được hiểu rằng thuật ngữ “kháng thể” hoặc “kháng thể theo sáng chế” bao gồm tất cả các loại kháng thể, cụ thể là, (các) mảnh liên kết kháng nguyên, (các) mảnh kháng thể, (các) biến thể và (các) dẫn xuất của các kháng thể.

Các mảnh của các kháng thể theo sáng chế có thể thu được từ các kháng thể bằng các phương pháp bao gồm phân cắt bằng các enzym, chẳng hạn như pepsin hoặc papain, và/hoặc bằng việc cắt các liên kết disulfit bằng cách khử hóa học. Theo cách khác, các mảnh của kháng thể có thể thu được bằng cách tách dòng và biểu hiện một phần các trình tự của các chuỗi nặng hoặc nhẹ. “Các mảnh” kháng thể bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂ và các mảnh Fv. Sáng chế cũng bao gồm các mảnh Fv chuỗi đơn (scFv) có nguồn gốc từ các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể theo sáng chế. Ví dụ, sáng chế bao gồm scFv chứa các CDR từ kháng thể theo sáng chế. Cũng được bao gồm là các dime và monome chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, kháng thể chuỗi nặng miền đơn, kháng thể chuỗi nhẹ miền đơn, cũng như các kháng thể chuỗi đơn, ví dụ, Fv chuỗi đơn trong đó, các miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được liên kết bằng các mối liên kết peptit.

Các mảnh kháng thể theo sáng chế có thể truyền các tương tác đa hóa trị hoặc đơn hóa trị và được chứa trong nhiều cấu trúc như được mô tả ở trên. Ví dụ, các phân tử scFv có thể được tổng hợp để tạo ra “thể ba” hóa trị ba hoặc “thể bốn” hóa trị bốn. Các phân tử scFv có thể bao gồm một miền của vùng Fc dẫn đến thể nhỏ hóa trị hai. Thêm vào đó, các trình tự theo sáng chế có thể là thành phần của các phân tử đa đặc hiệu trong đó các trình tự theo sáng chế nhắm trúng đích các quyết định kháng nguyên theo sáng chế và các vùng khác của phân tử liên kết với các đích khác. Các phân tử ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Fab2 đặc hiệu kép, Fab3 đặc hiệu ba, scFv đặc hiệu kép, và các thể hai (Holliger và Hudson, 2005, *Nature Biotechnology* 9: 1126-1136).

Các kháng thể theo sáng chế có thể được tạo ra ở dạng được tinh sạch. Thông thường, kháng thể sẽ có mặt trong chế phẩm mà gần như không chứa các polypeptit khác, ví dụ, nếu nhỏ hơn 90% (trọng lượng), thường nhỏ hơn 60% và thông thường hơn nhỏ hơn 50% của chế phẩm được tạo nên từ các polypeptit khác.

Các kháng thể theo sáng chế có thể có tính sinh miễn dịch ở các vật chủ người và/hoặc các vật chủ không phải người (hoặc khác loại), ví dụ, ở chuột nhắt. Ví dụ, các kháng thể có thể có idiotop mà là có tính sinh miễn dịch ở các vật chủ không phải người, nhưng không ở vật chủ người. Các kháng thể theo sáng chế để sử dụng ở người bao gồm các kháng thể mà không thể được phân lập dễ dàng từ các vật chủ như chuột nhắt, dê, thỏ, chuột cống, các động vật có vú không phải linh trưởng, v.v. và thường không thể thu được bởi việc làm giống người hoặc từ chuột ngoại lai.

Kháng thể, và mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế liên kết với khu vực vòng kháng nguyên của HBsAg. Vỏ bọc của virus viêm gan B chứa ba “protein vỏ bọc HBV” (còn được gọi là “HBsAg”, “kháng nguyên bề mặt viêm gan B”: Protein S (chỉ “nhỏ”, còn được gọi là S-HBsAg), protein M (chỉ “trung bình”, còn được gọi là M-HBsAg) và protein L (chỉ “lớn”, còn được gọi là L-HBsAg). S-HBsAg, M-HBsAg và L-HBsAg có chung đầu cuối C (còn được gọi là “miền S”, 226 axit amin), mà tương ứng với protein S (S-HBsAg) và quan trọng đối với sự tập hợp và tính lây nhiễm virus. S-HBsAg, M-HBsAg và L-HBsAg được tổng hợp trong lưới nội bào (ER), được tập hợp, và được tiết ra dưới dạng các hạt thông qua thiết bị Golgi. Miền S bao gồm bốn miền xuyên màng được dự đoán trước (TM), nhờ đó cả đầu cuối N cũng như đầu cuối C của miền S được tiếp xúc với xoang. Cả miền xuyên màng TM1 và TM2 đều cần thiết

đối với sự hợp nhất protein đồng dịch mã vào màng ER và các miền xuyên màng TM3 và TM4 được đặt trong phần ba đầu cuối C của miền S. “Khu vực vòng kháng nguyên” của HBsAg được đặt giữa các miền xuyên màng TM3 và TM4 được dự đoán trước của miền S của HBsAg, nhờ đó khu vực vòng kháng nguyên bao gồm các axit amin 101 - 172 của miền S, chứa tổng số 226 axit amin (Salisse J. và Sureau C., 2009, Journal of Virology 83: 9321-9328). Điều quan trọng lưu ý là yếu tố quyết định của tính lây nhiễm nằm trong khu vực vòng kháng nguyên của các protein vỏ bọc HBV. Cụ thể, các gốc giữa 119 và 125 của HBsAg được chứa mô típ CXXC, mà đã được chứng minh là trình tự quan trọng nhất được yêu cầu đối với tính lây nhiễm của HBV và HDV (Jaoude GA, Sureau C, Journal of Virology, 2005;79:10460–6).

Khi nó được đề cập trong bản mô tả này đến các vị trí trong trình tự axit amin của miền S của HBsAg, nó được đề cập đến trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 3 (được thể hiện bên dưới) hoặc các biến thể trình tự nhân tạo hoặc tự nhiên của nó.

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLG
QNSQSPTSNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLIFLLCLIFLLVLLDYQGMLP
VCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWA
FGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSP
FLPLLPIFFCLWVYI

(SEQ ID NO: 3; các axit amin 101-172 được thể hiện gạch chân bên dưới)

Ví dụ, sự biểu hiện “các axit amin 101-172 của miền S” để chỉ các gốc axit amin từ các vị trí 101-172 của polypeptit theo SEQ ID NO: 3. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng các đột biến hoặc biến thể (bao gồm nhưng không giới hạn ở, sự thế, sự làm mất và/hoặc sự thêm, ví dụ, HBsAg của kiểu gen khác hoặc đột biến HBsAg khác như được mô tả trong bản mô tả này) có thể xuất hiện trong tự nhiên trong trình tự axit amin của miền S của HBsAg hoặc được đưa bằng cách nhân tạo vào trình tự axit amin của miền S của HBsAg mà không ảnh hưởng các đặc tính sinh học của nó. Do đó, theo sáng chế, “miền S của HBsAg” có mục đích bao gồm tất cả các polypeptit này, ví dụ, bao gồm polypeptit theo SEQ ID NO: 3 và các đột biến nhân tạo hoặc tự nhiên của nó. Ngoài ra, khi các mảnh trình tự của miền S của HBsAg được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, các axit amin 101-172 hoặc các axit

amin 120-130 của miền S của HBsAg), chúng bao gồm không chỉ các mảnh trình tự tương ứng nêu trong SEQ ID NO: 3, mà còn bao gồm các mảnh trình tự tương ứng của các đột biến nhân tạo hoặc tự nhiên. Ví dụ, sự biểu hiện “các gốc axit amin từ các vị trí 101-172 của miền S của HBsAg” bao gồm các gốc axit amin từ các vị trí 101-172 nêu trong SEQ ID NO: 3 và các mảnh tương ứng của các đột biến của nó (các đột biến nhân tạo hoặc tự nhiên). Theo sáng chế, sự biểu hiện “các mảnh trình tự tương ứng” hoặc “các mảnh tương ứng” để chỉ các mảnh được đặt ở các vị trí bằng nhau của các trình tự khi các trình tự được đưa vào sắp thẳng hàng tối ưu hóa, cụ thể, các trình tự được sắp thẳng hàng để đạt được tỷ lệ phần trăm cao nhất của độ tương đồng.

Protein M (M-HBsAg) tương ứng với protein S được kéo dài bởi miền đầu cuối N gồm 55 axit amin được gọi là “pre-S2”. Protein L (L-HBsAg) tương ứng với protein M được kéo dài bởi miền đầu cuối N gồm 108 axit amin được gọi là “pre-S1” (kiểu gen D). Các miền pre-S1 và pre-S2 của protein L có thể có mặt hoặc ở mặt trong của các hạt virus (trên mặt bào tương của ER), đóng vai trò quan trọng trong việc ghép virus, hoặc trên mặt ngoài (trên mặt xoang của ER), có sẵn để tương tác với các tế bào đích và cần thiết đối với tính lây nhiễm virus. Hơn nữa, các protein bề mặt HBV (HBsAg) không chỉ được kết hợp vào các vỏ bọc virion mà còn được nảy chồi tự phát từ các màng ngăn trung gian ER-Golgi để tạo ra “các hạt virus con” chống (SVPs) được giải phóng từ tế bào bởi sự tiết ra.

Vì tất cả ba protein vỏ bọc HBV S-HBsAg, M-HBsAg và L-HBsAg bao gồm miền S, tất cả ba protein vỏ bọc HBV S-HBsAg, M-HBsAg và L-HBsAg cũng bao gồm “khu vực vòng kháng nguyên”. Theo đó, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, mà trung hòa HBV và liên kết với khu vực vòng kháng nguyên của HBsAg, liên kết với tất cả ba protein vỏ bọc HBV S-HBsAg, M-HBsAg và L-HBsAg.

Ngoài ra, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, trung hòa sự lây nhiễm virus viêm gan B và virus viêm gan delta. Ngoài ra, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, làm giảm tính lây nhiễm virus của virus viêm gan B và virus viêm gan delta.

Để nghiên cứu và định lượng tính lây nhiễm virus (hoặc “sự trung hòa”) trong phòng thử nghiệm thì người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết “các

thử nghiệm trung hòa” tiêu chuẩn khác nhau. Đối với các virus động vật thử nghiệm trung hòa thường được nhân giống trong các tế bào và/hoặc các dòng tế bào. Trong bối cảnh của sáng chế, thử nghiệm trung hòa được ưu tiên, trong đó các tế bào được nuôi cấy được ủ với lượng cố định của HBV hoặc HDV với sự có mặt (hoặc không có mặt) của kháng thể được thử nghiệm. Làm kết quả đọc các mức kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg) hoặc kháng nguyên e viêm gan B (HBeAg) được tiết vào dịch nổi nuôi cấy tế bào có thể được sử dụng và/hoặc việc nhuộm HBcAg có thể được đánh giá. Đối với HDV, ví dụ việc nhuộm miễn dịch huỳnh quang kháng nguyên delta có thể được đánh giá.

Theo phương án được ưu tiên của thử nghiệm trung hòa HBV, các tế bào được nuôi cấy, ví dụ các tế bào HepaRG, cụ thể các tế bào HepaRG được biệt hóa, được ủ với lượng cố định của HBV với sự có mặt hoặc không có mặt kháng thể được thử nghiệm, ví dụ, trong khoảng thời gian 16 giờ ở nhiệt độ 37°C. Tốt hơn là, việc ủ được thực hiện trong môi trường (ví dụ, được bổ sung thêm PEG 8000 4%). Sau khi ủ, các tế bào được rửa và được nuôi cấy tiếp. Để đo lường tính lây nhiễm virus, các mức kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg) và kháng nguyên e viêm gan B (HBeAg) được tiết vào dịch nổi nuôi cấy, ví dụ, từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 11 sau khi lây nhiễm, có thể được xác định bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA). Ngoài ra, việc nhuộm HBcAg có thể được đánh giá trong thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang. Theo một phương án được ưu tiên của thử nghiệm trung hòa HDV có thể sử dụng về cơ bản giống như thử nghiệm đối với HBV, với sự khác biệt là huyết thanh từ các chất mang HDV có thể được sử dụng làm chất cấy nhiễm HDV trên các tế bào HepaRg được biệt hóa (thay vì HBV). Để làm mất, việc nhuộm miễn dịch huỳnh quang kháng nguyên delta có thể được sử dụng dưới dạng kết quả đọc.

Kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế có độ hiệu nghiệm trung hòa cao. Nồng độ của kháng thể theo sáng chế cần để trung hòa 50% virus viêm gan B (HBV) và virus viêm gan delta (HDV), ví dụ, là khoảng 10 µg/ml hoặc nhỏ hơn. Tốt hơn là, nồng độ của kháng thể theo sáng chế cần để trung hòa 50% HBV và HDV là khoảng 5 µg/ml, tốt hơn nữa là nồng độ của kháng thể theo sáng chế cần để trung hòa 50% HBV và HDV là khoảng 1 µg/ml, thậm chí tốt hơn nữa là nồng độ của kháng thể theo sáng chế được yêu cầu khoảng 50% sự trung hòa của HBV và HDV là khoảng 750 ng/ml. Tốt nhất là, nồng độ của kháng thể theo sáng chế cần để trung hòa 50% của HBV

và HDV là 500 ng/ml hoặc nhỏ hơn, ví dụ, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60 hoặc khoảng 50 ng/ml hoặc nhỏ hơn. Điều này nghĩa là chỉ các nồng độ thấp của kháng thể cần để trung hòa 50% của HBV và HDV. Độ đặc hiệu và độ hiệu nghiệm có thể được đo bằng cách sử dụng các thử nghiệm tiêu chuẩn như đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, mà trung hòa mạnh cả HBV và HDV là hữu ích trong việc ngăn ngừa và điều trị viêm gan B và viêm gan D. Trong bối cảnh sáng chế này, lưu ý rằng sự lây nhiễm HDV thường xảy ra đồng thời hoặc theo trình tự với sự lây nhiễm HBV (việc ủ với HDV khi không có mặt của HBV không gây ra viêm gan D vì HDV cần sự hỗ trợ của HBV với sự sao chép riêng của nó) và viêm gan D thường được quan sát thấy trong chất mang HBV mạn tính.

Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó thúc đẩy sự thanh thải của HBsAg và HBV. Cụ thể là, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó thúc đẩy sự thanh thải của cả HBV và các hạt virus con của virus viêm gan B (SVP's). Sự thanh thải của HBsAg hoặc các hạt virus con có thể được đánh giá bằng cách đo mức HBsAg ví dụ trong mẫu máu, ví dụ, từ bệnh nhân viêm gan B. Tương tự, sự thanh thải của HBV có thể được đánh giá bằng cách đo mức của HBV ví dụ trong mẫu máu, ví dụ, từ bệnh nhân viêm gan B.

Trong huyết thanh của các bệnh nhân bị lây nhiễm HBV, ngoài các hạt lây nhiễm (HBV), thường có lượng quá mức (thường gấp từ 1.000 đến 100.000 lần) của các hạt virus con rỗng (SVP) chỉ được cấu thành từ các protein vỏ bọc HBV (HBsAg) ở dạng các khối cầu tương đối nhỏ hơn và các sợi có chiều dài thay đổi. Các hạt nhỏ virus đã chứng minh là có khả năng tăng cường mạnh sự sao chép virus trong nội bào và sự biểu hiện gen của HBV (Bruns M. và cộng sự 1998 J Virol 72(2): 1462–1468). Điều này cũng quan trọng trong bối cảnh tính lây nhiễm của huyết thanh chứa HBV, vì tính lây nhiễm không chỉ phụ thuộc vào số virus mà còn phụ thuộc vào số SVP's (Bruns M. và cộng sự 1998 J Virol 72(2): 1462–1468). Hơn nữa, lượng quá mức của các hạt virus con có thể đóng vai trò làm bất bằng cách hấp thụ các kháng thể trung hòa và do đó làm chậm sự thanh thải lây nhiễm. Thông thường, việc đạt được tổn hao kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg) do đó được xem là điểm cuối lý tưởng của điều trị và hiệu quả gần nhất để chữa khỏi viêm gan B mạn tính (CHB).

Theo đó, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà tốt hơn là thúc đẩy sự thanh thải của HBsAg, cụ thể là sự thanh thải của các hạt virus con của virus viêm gan B, và HBV cho phép cải thiện việc điều trị viêm gan B, cụ thể là trong bối cảnh viêm gan B mạn tính. Do đó, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có thể gây ra các đặc tính trung hòa của nó thậm chí mạnh hơn nữa vì ít kháng thể được hấp phụ bởi SVP's đóng vai trò làm bẫy. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà tốt hơn là thúc đẩy sự thanh thải của các hạt virus con của virus viêm gan B, làm giảm tính lây nhiễm của huyết thanh chứa HBV.

Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa gốc Fc. Tốt hơn nữa là, gốc Fc có nguồn gốc từ người, ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3 và/hoặc IgG4 của người, nhờ đó IgG1 của người được đặc biệt ưu tiên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “gốc Fc” để chỉ trình tự có nguồn gốc từ phần của chuỗi nặng globulin miễn dịch bắt đầu trong vùng bản lề ngay đầu dòng của vị trí cắt papain (ví dụ, gốc 216 trong IgG tự nhiên, lấy gốc thứ nhất của vùng hằng định chuỗi nặng là 114 và kết thúc tại đầu cuối C của chuỗi nặng globulin miễn dịch). Do đó, gốc Fc có thể là gốc Fc hoàn chỉnh hoặc một phần (ví dụ, miền) của nó. Gốc Fc hoàn chỉnh bao gồm ít nhất miền bản lề, miền CH2, và miền CH3 (ví dụ, các vị trí axit amin EU 216-446). Gốc lysin bổ sung (K) đôi khi có mặt ở đầu cuối C xa nhất của gốc Fc, nhưng thường bị cắt khỏi kháng thể trưởng thành. Mỗi vị trí trong số các vị trí axit amin trong gốc Fc được đánh số theo hệ thống đánh số EU được công nhận trong lĩnh vực kỹ thuật này của Kabat, ví dụ, theo Kabat và cộng sự, trong “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, U.S. Dept. Health and Human Services, 1983 và 1987.

Tốt hơn là, trong bối cảnh của sáng chế, gốc Fc bao gồm ít nhất một trong số: miền bản lề (ví dụ, miền bản lề trên, giữa, và/hoặc dưới), miền CH2, miền CH3, hoặc biến thể, phần, hoặc mảnh của nó. Theo các phương án được ưu tiên, gốc Fc bao gồm ít nhất miền bản lề, miền CH2 hoặc miền CH3. Tốt hơn nữa là, gốc Fc là gốc Fc hoàn chỉnh. Gốc Fc có thể còn bao gồm một hoặc nhiều sự chèn, làm mất, hoặc thế axit amin tương ứng với gốc Fc có trong tự nhiên. Ví dụ, ít nhất một trong số miền bản lề, miền CH2 hoặc miền CH3 (hoặc phần của nó) có thể được làm mất. Ví dụ, gốc Fc có thể chứa hoặc bao gồm: (i) miền bản lề (hoặc phần của nó) được dung hợp với miền CH2 (hoặc

phần của chúng), (ii) miền bản lề (hoặc phần của nó) được dung hợp với miền CH3 (hoặc phần của nó), (iii) miền CH2 (hoặc phần của nó) dung hợp với vùng CH3 (hoặc phần của nó), (iv) miền bản lề (hoặc phần của nó), (v) miền CH2 (hoặc phần của nó), hoặc (vi) vùng CH3 hoặc phần của nó.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu là gốc Fc có thể bị biến đổi sao cho nó thay đổi trình tự axit amin từ gốc Fc hoàn chỉnh của phân tử globulin miễn dịch có trong tự nhiên, trong khi giữ lại ít nhất một chức năng mong muốn được đưa vào bởi gốc Fc có trong tự nhiên. Các chức năng này bao gồm liên kết thụ thể Fc (FcR), điều biến chu kỳ bán hủy kháng thể, chức năng ADCC, liên kết protein A, liên kết protein G, và liên kết bổ sung. Các phần của các gốc Fc có trong tự nhiên, mà chịu trách nhiệm và/hoặc cần thiết đối với các chức năng này đã được biết đến bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Ví dụ, để kích hoạt tăng bổ thể C1q liên kết với ít nhất hai phân tử của IgG1 hoặc một phân tử IgM, được gắn vào đích kháng nguyên (Ward, E. S., và Ghetie, V., *Ther. Immunol.* 2 (1995) 77-94). Burton, D. R., đã mô tả (*Mol. Immunol.* 22 (1985) 161-206) mà vùng chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin từ 318 đến 337 được bao gồm trong sự cố định bổ thể. Duncan, A. R., và Winter, G. (*Nature* 332 (1988) 738-740), bằng cách sử dụng gây đột biến được định hướng vị trí, cho thấy rằng Glu318, Lys320 và Lys322 tạo ra vị trí liên kết với C1q. Vai trò của các gốc Glu318, Lys320 và Lys322 trong liên kết của C1q được xác nhận bởi khả năng peptit tổng hợp ngắn chứa các gốc này ức chế sự ly giải qua trung gian bổ thể.

Ví dụ, liên kết FcR có thể được qua trung gian bởi sự tương tác của gốc Fc (của kháng thể) với các thụ thể Fc (các FcR), mà là các thụ thể bề mặt tế bào có đặc hiệu trên các tế bào tạo máu. Các thụ thể Fc thuộc liên họ globulin miễn dịch, và đã được thể hiện làm trung gian cả việc loại bỏ của các mầm bệnh được phủ kháng thể bởi sự thực bào của các phức hợp miễn dịch, và sự ly giải của hồng cầu và các đích tế bào khác nhau (ví dụ, các tế bào khối u) được phủ bằng kháng thể tương ứng, nhờ việc gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC; Van de Winkel, J. G., và Anderson, C. L., *J. Leukoc. Biol.* 49 (1991) 511-524). Các FcR được xác định bởi độ đặc hiệu của chúng đối với các lớp globulin miễn dịch: các thụ thể Fc đối với các kháng thể IgG còn được gọi là FcγR, với IgE là FcεR, với IgA là FcαR và v.v, và các thụ thể Fc sơ sinh được còn được gọi là FcRn. Liên kết thụ thể Fc được mô tả ví dụ trong Ravetch, J. V.,

và Kinet, J. P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492; Capel, P. J., và cộng sự, *Immunomethods* 4 (1994) 25-34; de Haas, M., và cộng sự, *J Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341; và Gessner, J. E., và cộng sự, *Ann. Hematol.* 76 (1998) 231-248.

Liên kết chéo của các thụ thể bởi miền Fc của các kháng thể IgG tự nhiên (FcγR) kích hoạt một loạt các chức năng phản ứng lại kích thích bao gồm sự thực bào, gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể, và giải phóng chất trung gian gây viêm, cũng như sự thanh thải phức hợp miễn dịch và điều hòa sản phẩm kháng thể. Do đó, các gốc Fc tạo ra liên kết chéo của các thụ thể (FcγR) được ưu tiên. Ở người, ba lớp của FcγR đã được mô tả đặc điểm, mà là: (i) FcγRI (CD64), mà liên kết IgG monome với ái lực cao và được biểu hiện trên đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính và bạch cầu ái toan; (ii) FcγRII (CD32), mà liên kết IgG được phức hợp với môi trường có ái lực thấp, được biểu hiện rộng, cụ thể là các bạch cầu, được biết đến là bộ đọc trung tâm trong miễn dịch qua trung gian kháng thể, mà có thể được chia thành FcγRIIA, FcγRIIB và FcγRIIC, mà thực hiện các chức năng khác nhau trong hệ miễn dịch, nhưng liên kết với ái lực thấp tương tự với IgG-Fc, và miền ngoại bào của các thụ thể này có tính tương đồng cao; và (iii) FcγRIII (CD16), mà liên kết IgG với môi trường có ái lực thấp và tồn tại dưới dạng hai kiểu: FcγRIIIA được tìm thấy trên các tế bào NK, đại thực bào, bạch cầu ái toan và một số bạch cầu đơn nhân và các tế bào T và ADCC và FcγRIIIB trung gian, mà được biểu hiện cao trên bạch cầu trung tính. FcγRIIIA được tìm thấy trên nhiều tế bào liên quan đến việc tiêu diệt (ví dụ, các đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính) và dường như có khả năng kích hoạt quá trình tiêu diệt. FcγRIIIB dường như đóng một vai trò trong các quá trình ức chế và được tìm thấy trên các tế bào B, các đại thực bào, và trên các dưỡng bào và bạch cầu ái toan. Quan trọng là, 75% của tất cả FcγRIIIB được tìm thấy ở gan (Ganesan, L. P. và cộng sự, 2012: FcγRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes. *Journal of Virology* 189: 4981–4988). FcγRIIIB được biểu hiện nhiều trên nội mô dạng hình sin ở gan được gọi là LSEC, và ở các tế bào Kupffer trong gan và LSEC là vị trí chính của sự thanh thải các phức hợp miễn dịch nhỏ (Ganesan, L. P. và cộng sự, 2012: FcγRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes. *Journal of Immunology* 189: 4981–4988).

Do đó, theo sáng chế các kháng thể, và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó, được ưu tiên, mà có thể liên kết với FcγRIIb, ví dụ các kháng thể bao gồm gốc Fc để liên kết với FcγRIIb, cụ thể là vùng Fc, chẳng hạn, ví dụ các kháng thể kiểu IgG. Ngoài

ra, có thể thiết kế gốc Fc để tăng cường liên kết Fc γ RIIB bằng cách đưa vào các đột biến S267E và L328F như được mô tả bởi Chu, S. Y. và cộng sự, 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and Fc γ RIIB with Fc-engineered antibodies. *Molecular Immunology* 45, 3926–3933. Theo đó, sự thanh thải của các phức hợp miễn dịch có thể được nâng cao (Chu, S., và cộng sự, 2014: Accelerated Clearance of IgE In Chimpanzees Is Mediated By Xmab7195, An Fc-Engineered Antibody With Enhanced Affinity For Inhibitory Receptor Fc γ RIIB. *Am J Respir Crit, American Thoracic Society International Conference Abstracts*). Do đó, trong bối cảnh của sáng chế, các kháng thể hoặc các mảnh kháng nguyên của nó được ưu tiên mà bao gồm gốc Fc được thiết kế với các đột biến S267E và L328, cụ thể như được mô tả bởi Chu, S. Y. và cộng sự, 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and Fc γ RIIB with Fc-engineered antibodies. *Molecular Immunology* 45, 3926–3933..

Trên các tế bào B, dường như có chức năng ngăn chặn sự sản xuất globulin miễn dịch hơn nữa và chuyển đổi kiểu tương đương với ví dụ loại IgE. Trên các đại thực bào, Fc γ RIIB hoạt động để ức chế sự thực bào khi được trung gian nhờ Fc γ RIIA. Trên các dưỡng bào và tế bào bạch cầu ái toan thì dạng b có thể giúp ngăn chặn sự hoạt hóa của các tế bào này thông qua sự liên kết IgR với thụ thể riêng của nó.

Về liên kết Fc γ RI, sự biến đổi về IgG tự nhiên của ít nhất một trong số E233-G236, P238, D265, N297, A327 và P329 làm giảm liên kết với Fc γ RI. Các gốc IgG2 ở các vị trí 233-236, được thế vào IgG1 và IgG4, làm giảm liên kết với Fc γ RI bởi 10^3 lần và loại bỏ đáp ứng bạch cầu đơn nhân của người với các tế bào máu đỏ miễn cảm kháng thể (Armour, K. L., và cộng sự *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2613-2624). Về liên kết Fc γ RII, liên kết giảm đối với Fc γ RIIA được tìm thấy ví dụ, đối với đột biến IgG của ít nhất một trong số E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 và K414. Về liên kết Fc γ RIII, liên kết giảm đối với Fc γ RIIA được tìm thấy ví dụ, đối với đột biến IgG của ít nhất một trong số E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 và D376. Việc lập bản đồ các vị trí liên kết trên IgG1 của người đối với các thụ thể Fc, các vị trí đột biến được đề cập ở trên và phương pháp để đo liên kết với Fc γ RI và Fc γ RIIA được mô tả trong Shields, R. L., và cộng sự, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604.

Về liên kết với Fc γ RII quan trọng, hai vùng của Fc IgG tự nhiên dường như là quan trọng đối với các tương tác của Fc γ RII và IgG, cụ thể (i) vị trí bản lề dưới của Fc IgG, cụ thể là các gốc axit amin L, L, G, G (việc đánh số EU, 234-237), và (ii) vùng liền kề của miền CH2 của Fc IgG, cụ thể là vòng hoặc các sợi trong miền CH2 trên liền kề với vùng bản lề dưới, ví dụ, trong vùng của P331 (Wines, B.D., và cộng sự, J. Immunol. 2000;164: 5313 – 5318). Hơn nữa, Fc γ RI dường như liên kết với cùng một vị trí trên Fc IgG, trong khi FcRn và protein A liên kết với vị trí khác trên Fc IgG, mà dường như ở mặt phân cách CH2-CH3 (Wines, B.D., và cộng sự, J. Immunol. 2000; 164: 5313 – 5318).

Ví dụ, gốc Fc có thể chứa hoặc bao gồm ít nhất phần của gốc Fc mà đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này được yêu cầu để liên kết FcRn hoặc chu kỳ bán hủy được kéo dài. Ngoài ra hoặc theo cách khác, gốc Fc của kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất một phần đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này được yêu cầu đối với sự liên kết Protein A và/hoặc gốc Fc của kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất phần của phân tử Fc đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này được yêu cầu để liên kết protein G. Tốt hơn là, chức năng được giữ lại là sự thanh thải của HBsAg và HBV, mà được giả sử là qua trung gian bởi liên kết Fc γ R. Theo đó, gốc Fc được ưu tiên chứa ít nhất phần đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này được yêu cầu để liên kết Fc γ R. Như được đề cập ở trên, do đó gốc Fc được ưu tiên có thể chứa ít nhất (i) vị trí bản lề dưới của Fc IgG tự nhiên, cụ thể là các gốc axit amin L, L, G, G (việc đánh số EU, 234-237), và (ii) vùng liền kề của miền CH2 của Fc IgG tự nhiên, cụ thể là vòng và các sợi ở miền CH2 trên liền kề với vùng bản lề dưới, ví dụ ở vùng P331, ví dụ vùng có ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 axit amin liên tiếp ở miền CH2 trên của Fc IgG tự nhiên xung quanh P331, ví dụ, giữa các axit amin 320 và 340 (cách đánh số EU) của Fc IgG.

Tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế bao gồm vùng Fc. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vùng Fc” để chỉ phần của globulin miễn dịch được tạo ra bởi hai hoặc nhiều gốc Fc của các chuỗi nặng kháng thể. Ví dụ, vùng Fc có thể là vùng Fc “chuỗi đơn” hoặc vùng Fc monome (tức là, vùng scFc). Các vùng Fc chuỗi đơn được cấu thành từ các gốc Fc được liên kết trong chuỗi polypeptit đơn (ví dụ, được mã hóa trong trình tự axit nucleic liền kề đơn). Các vùng scFc ví dụ được bộc lộ trong WO 2008/143954 A2. Tốt hơn là, vùng Fc là vùng Fc dime. “Vùng Fc dime” hoặc “dcFc” để chỉ dime được tạo ra bởi các gốc Fc của hai

chuỗi nặng globulin miễn dịch riêng biệt. Vùng Fc dime có thể là homodime của hai gốc Fc giống nhau (ví dụ, vùng Fc của globulin miễn dịch có trong tự nhiên) hoặc dị dime của hai gốc Fc không giống nhau.

Các gốc Fc của vùng Fc có thể là phân lớp và/hoặc lớp giống hoặc khác nhau. Ví dụ, các gốc Fc có thể có nguồn gốc từ globulin miễn dịch (ví dụ, globulin miễn dịch của người) của phân lớp IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4. Tốt hơn là, các gốc Fc của vùng Fc thuộc cùng một phân lớp và/hoặc lớp. Tuy nhiên, vùng Fc (hoặc một hoặc nhiều gốc Fc của vùng Fc) có thể là khảm, nhờ đó vùng Fc khảm có thể chứa các gốc Fc có nguồn gốc từ các lớp hoặc các phân lớp globulin miễn dịch khác nhau. Ví dụ, ít nhất hai gốc Fc của vùng Fc chuỗi đơn hoặc dime có thể từ các lớp hoặc các phân lớp globulin miễn dịch khác nhau. Ngoài ra hoặc theo cách khác, các vùng Fc khảm có thể chứa một hoặc nhiều gốc Fc khảm. Ví dụ, gốc hoặc vùng Fc khảm có thể chứa một hoặc nhiều phần có nguồn gốc từ globulin miễn dịch của phân lớp thứ nhất (ví dụ, phân lớp IgG1, IgG2 hoặc IgG3) trong khi phần còn lại của vùng hoặc gốc Fc thuộc phân lớp khác nhau. Ví dụ, vùng hoặc gốc Fc của polypeptit Fc có thể chứa miền CH2 và/hoặc CH3 có nguồn gốc từ gốc của phân lớp thứ nhất (ví dụ, phân lớp IgG1, Ig G2 hoặc IgG4) và vùng bản lề từ globulin miễn dịch của phân lớp thứ hai (ví dụ, phân lớp IgG3). Ví dụ, vùng hoặc gốc Fc có thể chứa miền bản lề và/hoặc CH2 có nguồn gốc từ globulin miễn dịch của phân lớp thứ nhất (ví dụ, phân lớp IgG4) và miền CH3 từ globulin miễn dịch của phân lớp thứ hai (ví dụ, phân lớp IgG1, IgG2 hoặc IgG3). Ví dụ, vùng Fc khảm có thể chứa gốc Fc (ví dụ, gốc Fc hoàn chỉnh) từ globulin miễn dịch của phân lớp thứ nhất (ví dụ, phân lớp IgG4) và gốc Fc từ globulin miễn dịch của phân lớp thứ hai (ví dụ, phân lớp IgG1, IgG2 hoặc IgG3). Ví dụ, vùng hoặc gốc Fc có thể chứa miền CH2 từ globulin miễn dịch IgG4 và miền CH3 từ globulin miễn dịch IgG1. Ví dụ, vùng hoặc gốc Fc có thể chứa miền CH1 và miền CH2 từ phân tử IgG4 và miền CH3 từ phân tử IgG1. Ví dụ, vùng hoặc gốc Fc có thể bao gồm một phần của miền CH2 từ phân lớp cụ thể của kháng thể, ví dụ, các vị trí EU 292-340 của miền CH2. Ví dụ, vùng hoặc gốc Fc có thể chứa các vị trí axit amin 292-340 của CH2 có nguồn gốc từ gốc IgG4 và phần còn lại CH2 có nguồn gốc từ gốc IgG1 (theo cách khác, 292-340 của CH2 có thể có nguồn gốc từ gốc IgG1 và phần còn lại của CH2 có nguồn gốc từ gốc IgG4).

Hơn nữa, vùng hoặc gốc Fc có thể (bổ sung hoặc thay thế) ví dụ chứa vùng bản lề khảm. Ví dụ, vùng bản lề khảm có thể có nguồn gốc một phần từ phân tử IgG1, IgG2

hoặc IgG4 (ví dụ, trình tự bản lề giữa, dưới và trên), và một phần từ phân tử IgG3 (ví dụ, trình tự bản lề giữa). Theo ví dụ khác, vùng hoặc gốc Fc có thể bao gồm vùng bản lề khảm có nguồn gốc một phần từ gốc IgG1 và, một phần từ phân tử IgG4. Theo ví dụ khác, miền bản lề khảm có thể bao gồm các miền bản lề dưới và trên từ phân tử IgG4 và miền bản lề giữa từ phân tử IgG1. Ví dụ, miền bản lề khảm có thể được tạo ra bằng cách đưa vào phần tử thế prolin (Ser228Pro) ở vị trí EU 228 ở miền bản lề giữa của miền bản lề IgG4. Theo phương án khác, miền bản lề khảm có thể bao gồm các axit amin ở các vị trí EU 233-236 từ kháng thể IgG2 và/hoặc đột biến Ser228Pro, trong đó các axit amin còn lại của miền bản lề từ kháng thể IgG4 (ví dụ, miền bản lề khảm của trình tự ESKYGPPCPPCPAPPVAGP). Các miền bản lề khảm, mà có thể được sử dụng trong gốc Fc của kháng thể theo sáng chế được mô tả trong US 2005/0163783 A1.

Theo sáng chế, được ưu tiên là gốc Fc, hoặc vùng Fc, chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch của người (ví dụ, từ vùng Fc hoặc gốc Fc từ phân tử IgG ở người). Tuy nhiên, các polypeptit có thể chứa một hoặc nhiều axit amin từ các loài động vật có vú khác. Ví dụ, gốc Fc ở động vật linh trưởng hoặc vị trí liên kết ở động vật linh trưởng có thể được chứa trong các polypeptit chủ thể. Theo cách khác, một hoặc nhiều axit amin của chuột có thể có mặt trong gốc Fc hoặc trong vùng Fc.

Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế bao gồm, cụ thể là ngoài gốc Fc như được mô tả ở trên, các phần khác có nguồn gốc từ vùng hằng định, cụ thể từ vùng hằng định của IgG, tốt hơn là từ vùng hằng định của IgG1, tốt hơn nữa là từ vùng hằng định của IgG1 của người. Tốt hơn nữa là, kháng thể theo sáng chế bao gồm, cụ thể là ngoài gốc Fc như được mô tả ở trên, tất cả các phần khác của các vùng hằng định, cụ thể tất cả các phần khác của các vùng hằng định của IgG, tốt hơn là tất cả các phần khác của các vùng hằng định của IgG1, tốt hơn nữa là tất cả các phần khác của các vùng hằng định của IgG1 của người.

Như được đưa ra ở trên, kháng thể theo sáng chế đặc biệt được ưu tiên chứa vùng Fc (hoàn chỉnh) có nguồn gốc từ IgG1 của người. Tốt hơn nữa là, kháng thể theo sáng chế bao gồm, cụ thể là ngoài gốc Fc (hoàn chỉnh) có nguồn gốc từ IgG1 của người, còn bao gồm tất cả các phần khác của các vùng hằng định của IgG, tốt hơn là tất cả các phần khác của các vùng hằng định của IgG1, tốt hơn nữa là tất cả các phần khác của các vùng hằng định của IgG1 của người.

Kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được ưu tiên liên kết với 1,2,3,4,5,6,7,8,9 hoặc 10 kiểu gen HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I, và J. Các ví dụ về các kiểu gen khác nhau của HBsAg bao gồm sau đây: Số truy cập ngân hàng gen J02203 (HBV-D, ayw3), Số truy cập ngân hàng gen FJ899792.1 (HBV-D, adw2), Số truy cập ngân hàng gen AM282986 (HBV-A), Số truy cập ngân hàng gen D23678 (HBV-B1 Japan), Số truy cập ngân hàng gen AB117758 (HBV-C1 Cambodia), Số truy cập ngân hàng gen AB205192 (HBV-E Ghana), Số truy cập ngân hàng gen X69798 (HBV-F4 Brazil), Số truy cập ngân hàng gen AF160501 (HBV-G USA), Số truy cập ngân hàng gen AY090454 (HBV-H Nicaragua), Số truy cập ngân hàng gen AF241409 (HBV-I Vietnam) và Số truy cập ngân hàng gen AB486012 (HBV-J Borneo). Các trình tự axit amin của khu vực vòng kháng nguyên của miền S của HBsAg của các kiểu gen khác được thể hiện trong bảng 1 (các SEQ ID NO: 5 – 15).

Tốt hơn nữa là, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với ít nhất với 6, thậm chí tốt hơn là ít nhất 8, và cụ thể tốt hơn là tất cả 10 kiểu gen HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I, và J. HBV được biệt hóa thành nhiều kiểu gen, theo trình tự hệ gen. Cho đến nay, tám kiểu gen đã biết (A-H) của hệ gen HBV đã được xác định. Ngoài ra, hai kiểu gen mới, I và J, cũng đã được xác định (Sunbul M., 2014, World J Gastroenterol 20(18): 5427-5434). Kiểu gen được biết có tác động đến sự tiến triển của bệnh và sự khác biệt giữa các kiểu gen đáp ứng việc điều trị kháng virus đã được xác định. Ví dụ, kiểu gen A có xu hướng mạn tính, trong khi các đột biến virus thường được gặp trong kiểu gen C. Cả mạn tính và tần suất đột biến thường có trong kiểu gen D. Hơn nữa, các kiểu gen HBV được phân bố theo kiểu biệt hóa trên thế giới (Sunbul M., 2014, World J Gastroenterol 20(18): 5427-5434). Bằng cách tạo ra kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà tốt hơn là liên kết với ít nhất là 6, tốt hơn là ít nhất 8, tốt hơn nữa là tất cả 10 kiểu gen HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I, và J, kháng thể được tạo ra, mà liên kết rất rộng với các kiểu gen khác nhau.

Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 hoặc 18 của các đột biến HBsAg có các đột biến trong khu vực vòng kháng nguyên: HBsAg Y100C/P120T, HBsAg P120T, HBsAg P120T/S143L, HBsAg C121S, HBsAg R122D, HBsAg R122I, HBsAg T123N, HBsAg Q129H, HBsAg Q129L, HBsAg M133H, HBsAg M133L, HBsAg M133T, HBsAg K141E, HBsAg P142S, HBsAg S143K, HBsAg D144A,

HBsAg G145R và HBsAg N146A. Các đột biến này là các đột biến có trong tự nhiên trên cơ sở miền S của kiểu gen D HBsAg, số truy cập ngân hàng gen FJ899792 (SEQ ID NO: 4), nhờ đó (các) gốc axit amin bị đột biến được biểu thị bằng tên.

SEQ ID NO: 4:

MENVTSGLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSNLFLGGTTVCL
GQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLLFILLCLIFLLVLLDYQGM
L
PVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFG
KFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSTLS
PFLPLLPIFFCLWVYI

(khu vực vòng kháng nguyên, tức là các axit amin 101-172 được thể hiện bằng gạch chân bên dưới)

Các trình tự axit amin của khu vực vòng kháng nguyên của miền S của HBsAg của các đột biến khác được thể hiện trong Bảng 1 (các SEQ ID NO: 16 – 33).

Tốt hơn nữa là, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với ít nhất với 12, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 15, và cụ thể tốt hơn là tất cả 18 đột biến HBsAg lây nhiễm có các đột biến trong khu vực vòng kháng nguyên: HBsAg Y100C/P120T, HBsAg P120T, HBsAg P120T/S143L, HBsAg C121S, HBsAg R122D, HBsAg R122I, HBsAg T123N, HBsAg Q129H, HBsAg Q129L, HBsAg M133H, HBsAg M133L, HBsAg M133T, HBsAg K141E, HBsAg P142S, HBsAg S143K, HBsAg D144A, HBsAg G145R và HBsAg N146A.

Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với quyết định kháng nguyên chứa ít nhất một, tốt hơn là ít nhất hai, tốt hơn nữa là ít nhất ba, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất bốn axit amin của khu vực vòng kháng nguyên của HBsAg, trong đó ít nhất một, tốt hơn là ít nhất hai, tốt hơn nữa là ít nhất ba, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất bốn axit amin được chọn từ các axit amin 115-133 của miền S của HBsAg, tốt hơn là từ các axit amin 120-133 của miền S của HBsAg, tốt hơn nữa là từ các axit amin 120-130 của miền S của HBsAg. Chú ý, vị trí của các axit amin (ví dụ, 115-133, 120-133, 120-130) để chỉ miền S của HBsAg như được mô tả ở trên mà có mặt trong tất cả ba protein vỏ bọc HBV S-HBsAg, M-HBsAg, và L-HBsAg, nhờ đó S-HBsAg thường tương ứng với miền S HBsAg.

Cụ thể là, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với quyết định kháng nguyên trong khu vực vòng kháng nguyên của HBsAg, nhờ đó quyết định kháng nguyên thường được tạo ra bởi một hoặc nhiều axit amin được đặt tại các vị trí được chọn từ các vị trí axit amin 115-133, tốt hơn là các vị trí axit amin 120-133, tốt hơn nữa là được chọn từ các vị trí axit amin 120-130 của miền S của HBsAg.

Thuật ngữ “được tạo ra bởi” như được sử dụng trong bản mô tả này trong ngữ cảnh của quyết định kháng nguyên nghĩa là, quyết định kháng nguyên mà kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với quyết định kháng nguyên này có thể là tuyến tính (liên tục) hoặc đa hình (không liên tục). Quyết định kháng nguyên tuyến tính hoặc tuần tự là quyết định kháng nguyên được nhận biết bởi các kháng thể bởi trình tự tuyến tính của nó của các axit amin, hoặc cấu trúc chính. Ngược lại, quyết định kháng nguyên đa hình có hình dạng và cấu trúc protein ba chiều cụ thể. Theo đó, nếu quyết định kháng nguyên là quyết định kháng nguyên tuyến tính và bao gồm nhiều hơn một axit amin được đặt ở các vị trí được chọn từ các vị trí axit amin 115-133, tốt hơn là được chọn từ các vị trí axit amin 120-133 của miền S của HBsAg, các axit amin được cấu thành bởi các quyết định kháng nguyên thường được đặt ở các vị trí liên kề của cấu trúc chính (tức là, các axit amin liên tiếp trong trình tự axit amin). Trong trường hợp của quyết định kháng nguyên đa hình (cấu trúc 3D), ngược lại, trình tự axit amin thường tạo ra cấu trúc 3D dưới dạng quyết định kháng nguyên và, do đó các axit amin tạo ra quyết định kháng nguyên (hoặc các axit amin “được cấu thành bởi” quyết định kháng nguyên) có thể được đặt hoặc có thể không được đặt ở các vị trí liên kề của cấu trúc chính (tức là, có thể hoặc có thể không phải là các axit amin liên tiếp trong trình tự axit amin).

Tốt hơn là, quyết định kháng nguyên mà kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với quyết định kháng nguyên này, chỉ được tạo ra bởi (các) axit amin được chọn từ các vị trí axit amin 115-133, tốt hơn là được chọn từ các vị trí axit amin 120-133, tốt hơn nữa là được chọn từ các vị trí axit amin 120-130 của miền S của HBsAg. Mặt khác, được ưu tiên là không (thêm) các axit amin mà được đặt bên ngoài các vị trí 115-133, tốt hơn là các vị trí 120-133, tốt hơn nữa là các vị trí 120-130 được yêu cầu để tạo ra quyết định kháng nguyên mà kháng thể của sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với quyết định kháng nguyên này.

Tốt hơn là, quyết định kháng nguyên trong khu vực vòng kháng nguyên của

HBsAg mà kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với quyết định kháng nguyên này được tạo ra bởi hai axit amin hoặc hoặc nhiều hơn nằm ở các vị trí được chọn từ các vị trí axit amin 115-133, tốt hơn là được chọn từ các vị trí axit amin 120-133, tốt hơn nữa là được chọn từ các vị trí axit amin 120-130 của miền S của HBsAg. Tốt hơn nữa là, quyết định kháng nguyên trong khu vực vòng kháng nguyên của HBsAg mà kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với quyết định kháng nguyên này được tạo ra bởi ba axit amin hoặc nhiều hơn nằm ở các vị trí được chọn từ các vị trí axit amin 115-133, tốt hơn là được chọn từ các vị trí axit amin 120-133, tốt hơn nữa là được chọn từ các vị trí axit amin 120-130 của miền S của HBsAg. Thậm chí tốt hơn nữa là, quyết định kháng nguyên trong khu vực vòng kháng nguyên của HBsAg mà kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với quyết định kháng nguyên này được tạo ra bởi bốn axit amin hoặc nhiều hơn được chọn từ các vị trí axit amin 115-133, tốt hơn là các vị trí axit amin 120-133, tốt hơn nữa là được chọn từ các vị trí axit amin 120-130 của miền S của HBsAg. Mặt khác, được ưu tiên là kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với ít nhất một, tốt hơn là ít nhất hai, tốt hơn nữa là ít nhất ba, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất bốn axit amin của khu vực vòng kháng nguyên của HBsAg được chọn từ các axit amin 115-133 của miền S của HBsAg, tốt hơn là từ các axit amin 120-133 của miền S của HBsAg, tốt hơn nữa là từ các axit amin 120-130 của miền S của HBsAg.

Tốt hơn nữa là, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với quyết định kháng nguyên chứa ít nhất hai, tốt hơn là ít nhất ba, tốt hơn nữa là ít nhất bốn axit amin của khu vực vòng kháng nguyên của HBsAg, trong đó ít nhất hai, tốt hơn là ít nhất ba, tốt hơn nữa là ít nhất bốn axit amin được chọn từ các axit amin 120-133, tốt hơn nữa là từ các axit amin 120-130 của miền S của HBsAg và trong đó ít nhất hai, tốt hơn là ít nhất ba, tốt hơn nữa là ít nhất bốn axit amin được đặt ở các vị trí liên kề (tức là, các axit amin liên tiếp trong trình tự axit amin/cấu trúc chính).

Quyết định kháng nguyên mà kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với quyết định kháng nguyên này, tốt hơn là quyết định kháng nguyên đa hình. Theo đó, được ưu tiên là kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với quyết định kháng nguyên chứa ít nhất hai, tốt hơn là ít nhất ba, tốt hơn nữa là ít nhất bốn axit amin của khu vực vòng kháng nguyên của

HBsAg, trong đó ít nhất hai, tốt hơn là ít nhất ba, tốt hơn nữa là bốn axit amin được chọn từ các axit amin 120-133, tốt hơn nữa là từ các axit amin 120 -130 của miền S của HBsAg và trong đó ít nhất hai, tốt hơn là ít nhất ba, tốt hơn nữa là ít nhất bốn axit amin không được đặt ở các vị trí liền kề (hoặc cấu trúc chính).

Mặt khác, (i) hoặc không có các axit amin mà kháng thể liên kết với các axit amin này (tức là, các axit amin tạo ra quyết định kháng nguyên) được đặt ở các vị trí liền kề của cấu trúc chính hoặc (ii) một số, ví dụ hai hoặc ba, của các axit amin mà kháng thể liên kết với các axit amin này (tức là, các axit amin tạo ra quyết định kháng nguyên) được đặt ở vị trí liền kề (của cấu trúc chính) trong khi đó các axit amin khác mà kháng thể liên kết với các axit amin này (tức là, các axit amin tạo ra quyết định kháng nguyên) không được đặt ở các vị trí liền kề (của cấu trúc chính).

Các axit amin mà kháng thể liên kết với các axit amin này (tức là, các axit amin tạo ra quyết định kháng nguyên), mà không được đặt ở các vị trí liền kề của cấu trúc chính, thường được đặt cách nhau một khoảng bằng một hoặc nhiều axit amin, mà kháng thể không liên kết với. Tốt hơn là, ít nhất một, tốt hơn nữa là ít nhất hai, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất ba, tốt nhất là ít nhất bốn, đặc biệt tốt hơn là ít nhất năm axit amin được đặt giữa ít nhất hai, tốt hơn là ít nhất ba axit amin mà được cấu thành bởi quyết định kháng nguyên và không được đặt ở các vị trí liền kề.

Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với quyết định kháng nguyên chứa ít nhất các axit amin P120, C121, R122 và C124 của miền S của HBsAg. Tốt hơn nữa là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với quyết định kháng nguyên chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 88:

PCRXC

trong đó X là axit amin bất kỳ hoặc không phải axit amin; tốt hơn là X là axit amin bất kỳ; tốt hơn nữa là X là T, Y, R, S, hoặc F; thậm chí tốt hơn nữa là X là T, Y, hoặc R; tốt nhất là X là T hoặc R.

Thậm chí tốt hơn nữa là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với quyết định kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin theo SEQ ID NO:80:

TGPCRTC

hoặc trình tự axit amin có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% với SEQ ID NO: 80.

Tốt nhất là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với quyết định kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 85:

STTSTGPCRTC

hoặc trình tự axit amin có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95% với SEQ ID NO: 85.

Cũng được ưu tiên là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với quyết định kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin chứa ít nhất các axit amin 145-151 của miền S của HBsAg.

GNCTCIP

(SEQ ID NO: 81).

Tốt hơn nữa là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với quyết định kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 80 và trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 81.

Tốt hơn nữa là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với quyết định kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 85 và/hoặc trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 87.

Như được mô tả ở trên, quyết định kháng nguyên mà kháng thể theo sáng chế liên kết với quyết định kháng nguyên này có thể là tuyến tính (liên tục) hoặc đa hình (không liên tục). Tốt hơn là, kháng thể và mảnh kháng thể theo sáng chế liên kết với quyết định kháng nguyên đa hình, tốt hơn nữa là quyết định kháng nguyên đa hình chỉ có mặt trong các điều kiện không khử.

Tuy nhiên, cũng được ưu tiên là kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh kháng thể của nó, liên kết với quyết định kháng nguyên tuyến tính, tốt hơn nữa là quyết định kháng nguyên tuyến tính có mặt trong cả điều kiện khử và điều kiện không khử.

Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với quyết định kháng nguyên trong vòng kháng nguyên của HBsAg được tạo ra bởi trình tự axit amin theo SEQ ID NO:1:

$X_1 X_2 X_3 TC X_4 X_5 X_6A X_7G$

trong đó $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6$ và X_7 có thể là axit amin bất kỳ (SEQ ID NO: 1).

Tốt hơn là, $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6$ và X_7 là các axit amin, mà được thể theo kiểu bảo thủ so với các axit amin 120 – 130 nêu trong SEQ ID NO: 3. Cũng được ưu tiên là $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6$ và X_7 là các axit amin, mà được thể theo kiểu bảo thủ so với các axit amin 20-30 của SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 5-33 (cf. Bảng 1: đề cập đến các trình tự khu vực vòng kháng nguyên, tức là 101-172 của miền S của các biến thể của HBsAg).

Tốt hơn là, trong SEQ ID NO: 1, X_1 là axit amin nhỏ. Axit amin “nhỏ”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm alanin, axit aspartic, asparagin, xystein, glyxin, prolin, serin, threonin và valin. Tốt hơn nữa là, X_1 là prolin, serin hoặc threonin.

Tốt hơn là, trong SEQ ID NO: 1, X_2 là axit amin nhỏ. Tốt hơn nữa là, X_2 là xystein hoặc threonin.

Tốt hơn là, trong SEQ ID NO: 1, X_3 là axit amin có điện tích hoặc axit amin béo. Axit amin “có điện tích”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm arginin, lysin, axit aspartic, axit glutamic và histidin. Axit amin “béo”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm alanin, glyxin, isoleuxin, leuxin, và valin. Tốt hơn nữa là, X_3 là arginin, lysin, axit aspartic hoặc isoleuxin.

Tốt hơn là, trong SEQ ID NO: 1, X_4 là axit amin nhỏ và/hoặc axit amin kỵ nước. Axit amin “kỵ nước”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm alanin, isoleuxin, leuxin, phenylalanin, valin, tryptophan, tyrosin, methionin, prolin và glyxin. Tốt hơn nữa là, X_4 là methionin hoặc threonin.

Tốt hơn là, trong SEQ ID NO: 1, X_5 là axit amin nhỏ và/hoặc axit amin kỵ nước. Tốt hơn nữa là, X_5 là threonin, alanin hoặc isoleuxin.

Tốt hơn là, trong SEQ ID NO: 1, X_6 là axit amin nhỏ và /hoặc axit amin kỵ nước. Tốt hơn nữa là, X_6 là threonin, prolin hoặc leuxin.

Tốt hơn là, trong SEQ ID NO: 1, X_7 là axit amin phân cực hoặc axit amin béo.

Axit amin “phân cực”, như được sử dụng trong bản mô tả này, để chỉ axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm axit aspartic, asparagin, arginin, axit glutamic, histidin, lysin, glutamin, tryptophan, tyrosin, serin, và threonin. Tốt hơn nữa là, X₇ là glutamin, histidin hoặc leuxin.

Do đó, được ưu tiên hơn nữa là kháng thể theo theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với quyết định kháng nguyên trong vòng kháng nguyên của HBsAg được tạo ra bởi trình tự axit amin theo SEQ ID NO:2:

X₁ X₂ X₃ TC X₄ X₅ X₆A X₇G

trong đó X₁ là P, T hoặc S,

X₂ là C hoặc S,

X₃ là R, K, D hoặc I,

X₄ là M hoặc T,

X₅ là T, A hoặc I,

X₆ là T, P hoặc L, và

X₇ là Q, H hoặc L.

(SEQ ID NO: 2).

Liên quan đến các quyết định kháng nguyên được ưu tiên tạo ra bởi các trình tự axit amin theo SEQ ID NO:1 hoặc 2, lưu ý rằng thuật ngữ “được tạo ra bởi” được sử dụng trong bản mô tả này không có mục đích ngụ ý là kháng thể cần thiết liên kết với mỗi và mọi axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc 2. Cụ thể là trong trường hợp của quyết định kháng nguyên đa hình được ưu tiên, kháng thể có thể chỉ liên kết với một số axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc 2, nhờ đó các gốc axit amin khác có thể hoạt động đơn thuần dưới dạng “vùng đệm”, sao cho tạo ra cấu trúc 3D của quyết định kháng nguyên.

Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với quyết định kháng nguyên trong vòng kháng nguyên của HBsAg được tạo ra bởi một hoặc nhiều hơn, tốt hơn là hai hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là ba hoặc nhiều hơn và thậm chí tốt hơn nữa là bốn hoặc nhiều axit amin của trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 5-33 được thể hiện trên Bảng 1 phía dưới.

Tốt hơn nữa là, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với vùng vòng lặp kháng nguyên của HBsAg có trình tự axit amin theo SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 5-33 được thể hiện dưới bảng 1 hoặc biến thể trình tự của nó. Thậm chí tốt hơn nữa là, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với tất cả các biến thể vòng kháng nguyên của HBsAg có trình tự axit amin theo SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 5-33 được thể hiện Bảng 1 bên dưới. Mặt khác, đặc biệt được ưu tiên là kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có khả năng liên kết với tất cả các khu vực vòng kháng nguyên khác nhau của HBsAg có trình tự axit amin theo SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 5-33.

Bảng 1: Các trình tự axit amin minh họa của khu vực vòng kháng nguyên của miền S của HBsAg (các gốc 101-172 của miền S của HBsAg- ngoại trừ SEQ ID NO: 16 mà đề cập đến các gốc 100-172 của miền S để bao gồm đột biến có liên quan) của các kiểu gen khác nhau như các đột biến như được sử dụng trong bản mô tả này.

Tên	SEQ ID NO.	Trình tự axit amin
J02203 (D, ayw3)	5	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMY PSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASAR FSW
FJ899792 (D, adw2)	6	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMP SCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARF SW
AM282986 (A)	7	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFP SCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFAYLWEWASVR FSW
D23678 (B1)	8	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGTSMP SCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFAYLWEWASVR FSW
AB117758 (C1)	9	QGMLPVCPLLPGTSTTSTGPCKTCTIPAQGTSMP SCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVR

		SW
AB205192 (E)	10	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTLAQGTSMFP SCCCSKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARF SW
X69798 (F4)	11	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTLAQGTSMF PSCCCSKPSDGNCTCIPIPSSWALGKYLWEWASA RFSW
AF160501 (G)	12	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTPAQGNSMYP SCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFKYLWEWASVR FSW
AY090454 (H)	13	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTLAQGTSMF PSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKYLWEWASA RFSW
AF241409 (I)	14	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTPAQGNSMYP SCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFKYLWEWASAR FSW
AB486012 (J)	15	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTAAQGTSMFP SCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFKFLWEWASVRF SW
HBsAg Y100C/P120T	16	CQGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSM YPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWAS ARFSW
HBsAg P120T	17	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYP SCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARF SW
HBsAg P120T/S143L	18	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTSMYP SCCCTKPLDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASAR FSW
HBsAg C121S	19	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPSRTCTTPAQGTSMYP SCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARF SW
HBsAg R122D	20	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCDTCTTPAQGTSMYP

		SCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARF SW
HBsAg R122I	21	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCITCTTPAQGTSMYP SCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARF SW
HBsAg T123N	22	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRNCTTPAQGTSMY PSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASAR FSW
HBsAg Q129H	23	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAHGTSMYP SCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARF SW
HBsAg Q129L	24	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPALGTSMYP SCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARF SW
HBsAg M133H	25	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSHYP SCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARF SW
HBsAg M133L	26	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSLYP SCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARF SW
HBsAg M133T	27	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSTYP SCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARF SW
HBsAg K141E	28	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYP SCCCTEPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARF SW
HBsAg P142S	29	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYP SCCCTKSSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARF SW
HBsAg S143K	30	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYP SCCCTKPKDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASAR FSW

HBsAg D144A	31	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPS SCCCTKPSAGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARF SW
HBsAg G145R	32	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPS SCCCTKPSDRNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARF SW
HBsAg N146A	33	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPS SCCCTKPSDGACTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARF SW

Thông thường, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, tốt hơn là chứa (ít nhất) ba vùng xác định bổ sung (các CDR) trên chuỗi nặng và (ít nhất) ba CDR trên chuỗi nhẹ. Thông thường, các vùng xác định bổ sung (các CDR) là các vùng siêu biến có mặt trong các miền biến đổi chuỗi nặng và các miền biến đổi chuỗi nhẹ. Thông thường, các CDR của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được nối của kháng thể cùng nhau tạo ra thụ thể kháng nguyên. Thông thường, ba CDR (CDR1, CDR2, và CDR3) được sắp xếp không liên tiếp trong miền biến đổi. Vì các thụ thể kháng nguyên thường được cấu thành từ hai miền biến đổi (trên hai chuỗi polypeptit khác nhau, tức là chuỗi nặng và chuỗi nhẹ), có sáu CDR cho mỗi thụ thể kháng nguyên (chuỗi nặng: CDRH1, CDRH2, và CDRH3; chuỗi nhẹ: CDRL1, CDRL2, và CDRL3). Phân tử kháng thể đơn thường có hai thụ thể kháng nguyên và do đó có mười hai CDR. Các CDR trên chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có thể được tách riêng bởi các vùng khung, nhờ đó vùng khung (FR) là vùng ở miền biến đổi mà ít “biến đổi” hơn CDR. Ví dụ, chuỗi (hoặc mỗi chuỗi, tương ứng) có thể được cấu thành từ bốn vùng khung, được tách riêng bởi ba CDR.

Các trình tự của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể ví dụ theo sáng chế, bao gồm ba CDR khác nhau trên chuỗi nặng và ba CDR khác nhau trên chuỗi nhẹ được xác định. Vị trí của các axit amin CDR được xác định theo hệ thống đánh số IMGT (IMGT: <http://www.imgt.org/>; cf. Lefranc, M.-P. và cộng sự (2009) *Nucleic Acids Res.* 37, D1006-D1012).

Bảng 2 thể hiện các trình tự axit amin của các CDR và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể ví dụ theo sáng chế (“HBC34”):

HBC34	SEQ ID NO.	Trình tự axit amin
CDRH1	34	GRIFRSFY
CDRH2	35	NQDGSEK
CDRH2 dài	66	INQDGSEK
CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
CDRL1	37	KLGNKN
CDRL2	38	EVK
CDRL2 dài	39	VIYEVKYRP
CDRL3	40	QTWDSTTVV
VH	41	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSWVRQ APGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNKNS LFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTV SVSS
VL	42	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVCWFQHKPG QSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMD EAAYFCQTWDSTTVVFGGGTRLTVL

Do đó, được ưu tiên là kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế bao gồm các trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 88%, ít nhất 90%, ít nhất 92%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với ít nhất một trong số các trình tự CDR, trình tự VH và/hoặc trình tự VL được thể hiện trên Bảng 2.

Bảng 3 thể hiện các trình tự axit amin của các CDR và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể ví dụ khác theo sáng chế (“HBC34v7”):

HBC34v7	SEQ ID	Trình tự axit amin
---------	-----------	--------------------

	NO.	
CDRH1	34	GRIFRSFY
CDRH2	35	NQDGSEK
CDRH2 dài	66	INQDGSEK
CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
CDRL1	37	KLGNKN
CDRL2	38	EVK
CDRL2 dài	39	VIYEVKYRP
CDRL3	58	QTFDSTTVV
VH	41	ELQLVESGGGWVQPGGSQLSCAASGRIFRSFYMSWVR QAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNK NSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQG TTVSVSS
VL	59	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVCWFQHKP GQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEAAYFCQTFDSTTVVFVGGGTRLTVL

Do đó, được ưu tiên là kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế bao gồm các trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 88%, ít nhất 90%, ít nhất 92%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với ít nhất một trong số các trình tự CDR, trình tự VH và/hoặc trình tự VL được thể hiện trên Bảng 3.

Bảng 4 thể hiện các trình tự axit amin của các CDR và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể ví dụ khác theo sáng chế (“HBC34v23”):

HBC34v23	SEQ ID NO.	Trình tự axit amin
CDRH1	34	GRIFRSFY

CDRH2	35	NQDGSEK
CDRH2 dài	66	INQDGSEK
CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
CDRL1	37	KLGNKN
CDRL2	38	EVK
CDRL2 dài	39	VIYEVKYRP
CDRL3	58	QTFDSTTVV
VH	41	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFYMSWVR QAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNAL NSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQ GTTVSVSS
VL	65	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNACWYQQK PGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQ AMDEADYYCQTFDSTTVVFSGGKLTVL

Do đó, được ưu tiên là kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế bao gồm các trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 88%, ít nhất 90%, ít nhất 92%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với ít nhất một trong số các trình tự CDR, trình tự VH và/hoặc trình tự VL được thể hiện trên Bảng 4.

Bảng 5 thể hiện các trình tự axit amin của các CDR và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể ví dụ khác theo sáng chế (“HBC34v31”):

HBC34v31	SEQ ID NO.	Trình tự axit amin
CDRH1	34	GRIFRSFY
CDRH2	35	NQDGSEK
CDRH2 dài	66	INQDGSEK

CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
CDRL1	37	KLGNKN
CDRL2	38	EVK
CDRL2 dài	39	VIYEVKYRP
CDRL3	40	QTWDSTTVV
VH	67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFRSFYMSWVR QAPGKGLEWVANINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDN KNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWG QGTTVTVSS
VL	42	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNVCWFQHKP GQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEAAYFCQTWDSTTVVFGGGTRLTVL

Do đó, được ưu tiên là kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế bao gồm các trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 88%, ít nhất 90%, ít nhất 92%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với ít nhất một trong số các trình tự CDR, trình tự VH và/hoặc trình tự VL được thể hiện trên Bảng 5.

Bảng 6 thể hiện các trình tự axit amin của các CDR và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể ví dụ khác theo sáng chế (“HBC34v32”):

HBC34v32	SEQ ID NO.	Trình tự axit amin
CDRH1	34	GRIFRSFY
CDRH2	35	NQDGSEK
CDRH2 dài	66	INQDGSEK
CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
CDRL1	37	KLGNKN
CDRL2	38	EVK

CDRL2 dài	39	VIYEVKYRP
CDRL3	58	QTFDSTTVV
VH	67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFRSFYMSWVR QAPGKGLEWVANINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDN KNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWG QGTTVTVSS
VL	59	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNVCWFQHKP GQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTVL

Do đó, được ưu tiên là kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế bao gồm các trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 88%, ít nhất 90%, ít nhất 92%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với ít nhất một trong số các trình tự CDR, trình tự VH và/hoặc trình tự VL được thể hiện trên Bảng 6.

Bảng 7 thể hiện các trình tự axit amin của các CDR và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể minh họa khác theo sáng chế (“HBC34v33”):

HBC34v33	SEQ ID NO.	Trình tự axit amin
CDRH1	34	GRIFRSFY
CDRH2	35	NQDGSEK
CDRH2 dài	66	INQDGSEK
CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
CDRL1	37	KLGKN
CDRL2	38	EVK
CDRL2 dài	39	VIYEVKYRP
CDRL3	58	QTFDSTTVV
VH	67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFRSFYMSWVR

		QAPGKGLEWVANINQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDN KNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWG QGTTVTVSS
VL	65	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGKNACWYQQK PGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQ AMDEADYYCQTFDSTTVVFGGGTKLTVL

Do đó, được ưu tiên là kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế bao gồm các trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 88%, ít nhất 90%, ít nhất 92%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với ít nhất một trong số các trình tự CDR, trình tự VH và/hoặc trình tự VL được thể hiện trên Bảng 7.

Bảng 8 trình bày tổng quan về các biến đổi VH và VL của các biến thể kháng thể ví dụ "HBC34v7", "HBC34v23", "HBC34v31", "HBC34v32" và "HBC34v33" của kháng thể kiểu dại (WT) "HBC34" và về các SEQ ID NO tương ứng của các trình tự axit amin VH/VL và CDR tương ứng:

Tên biến thể	Biến đổi VH	Biến đổi VL	CDR						VL	VH
			H1	H2	H3	L1	L2	L3		
HBC34	WT	WT	34	35/ 66	36	37	38/ 39	40	41	42
HBC34-V7	WT	W107F	34	35/ 66	36	37	38/ 39	58	41	59
HBC34-V23	WT	W07F/FR1234G L/CDR2Y66	34	35/ 66	36	37	38/ 39	58	41	65
HBC34-V31	FR124GL	WT	34	35/ 66	36	37	38/ 39	40	67	42
HBC34-V32	FR124GL	W107F	34	35/ 66	36	37	38/ 39	58	67	59
HBC34-V33	FR124GL	W07F/FR1234G L/CDR2Y66	34	35/ 66	36	37	38/ 39	58	67	65

Tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất một CDRH1, ít nhất một CDRH2 và ít nhất một CDRH3 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất một CDRL1, ít nhất một CDRL2 và ít nhất một CDRL3 trong đó ít nhất một CDRL1, ít nhất một CDRL2 và ít nhất một CDRL3, trong đó ít nhất một CDR, tốt hơn là ít nhất một chuỗi nặng CDRH3 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 36 hoặc biến thể trình tự chức năng của chúng như được mô tả trong bản mô tả này. Do đó, được ưu tiên là ít nhất một chuỗi nặng CDRH3 chứa trình tự axit amin có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với SEQ ID NO: 36. Tốt hơn nữa là, ít nhất một chuỗi nặng CDRH3 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 36.

Được ưu tiên là kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa chuỗi nặng chứa ít nhất một CDRH1, ít nhất một CDRH2 và ít nhất một CDRH3 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất một CDRL1, ít nhất một CDRL2 và ít nhất một CDRL3, trong đó ít nhất một chuỗi nhẹ CDRL3 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 40 hoặc SEQ ID NO: 58, hoặc biến thể trình tự chức năng của nó. Theo đó, được ưu tiên là ít nhất một CDRL3 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với SEQ ID NO: 40 hoặc SEQ ID NO: 58. Tốt hơn nữa là, ít nhất một CDRL3 chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 40 hoặc SEQ ID NO: 58.

Tốt hơn nữa là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất một CDRH1, ít nhất một CDRH2 và ít nhất một CDRH3 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất một CDRL1, ít nhất một CDRL2 và ít nhất một CDRL3, trong đó ít nhất một chuỗi nặng CDRH1 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 34 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó, ít nhất một CDRH2 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 35 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó và/hoặc ít nhất một chuỗi nặng CDRH3 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 36 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó. Tốt hơn nữa là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất một CDRH1, ít nhất một CDRH2 và ít nhất một CDRH3 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất một CDRL1, ít nhất một CDRL2 và ít nhất một CDRL3, trong đó ít nhất một chuỗi nặng CDRH1 chứa trình tự axit amin theo SEQ

ID NO: 34 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó, ít nhất một CDRH2 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:35 hoặc 66 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó và/hoặc ít nhất một chuỗi nặng CDRH3 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 36 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó. Do đó, được ưu tiên là, ít nhất một chuỗi nặng CDRH1 chứa trình tự axit amin có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với SEQ ID NO: 34; ít nhất một chuỗi nặng CDRH2 chứa trình tự axit amin có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với SEQ ID NO: 35 hoặc 66; và/hoặc ít nhất một chuỗi nặng CDRH3 chứa trình tự axit amin có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với SEQ ID NO: 36. Tốt hơn là, ít nhất một chuỗi nặng CDRH1 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 34; ít nhất một chuỗi nặng CDRH2 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 35 hoặc 66; và/hoặc ít nhất một chuỗi nặng CDRH3 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 36.

Tốt hơn nữa là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất một CDRH1, ít nhất một CDRH2 và ít nhất một CDRH3 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất một CDRL1, ít nhất một CDRL2 và ít nhất một CDRL3, trong đó ít nhất một CDRL1 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 37 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó, ít nhất một CDRL2 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 38 hoặc 39 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó, và/hoặc ít nhất một amino CDRL3 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 40 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó. Được ưu tiên là kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế bao gồm chuỗi nặng chứa ít nhất một CDRH1, ít nhất một CDRH2 và ít nhất một CDRH3 và chuỗi nhẹ chứa ít nhất một CDRL1, ít nhất một CDRL2 và ít nhất một CDRL3, trong đó ít nhất một chuỗi nhẹ CDRL1 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 37 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó, ít nhất một chuỗi nhẹ CDRL2 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 38 hoặc 39 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó, và/hoặc ít nhất một chuỗi nhẹ amino CDRL3 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 58 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó. Theo đó, được ưu tiên là, ít nhất một chuỗi nhẹ CDRL1 chứa trình tự axit amin có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt

hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với SEQ ID NO: 37; ít nhất một chuỗi nhẹ CDRL2 chứa trình tự axit amin có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với SEQ ID NO: 38 hoặc 39; và/hoặc ít nhất một chuỗi nhẹ CDRL3 chứa trình tự axit amin có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với SEQ ID NO: 40 hoặc 58. Tốt hơn nữa là, ít nhất một chuỗi nhẹ CDRL1 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 37; ít nhất một chuỗi nhẹ CDRL2 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 38 hoặc 39; và/hoặc ít nhất một chuỗi nhẹ CDRL3 chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 40 hoặc 58.

Theo đó, cũng được ưu tiên là kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2, và CDRH3 và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2, và CDRL3 theo các SEQ ID NO: 34-38 và 40 hoặc các biến thể trình tự chức năng của chúng hoặc theo các SEQ ID NO: 34-37 và 39-40 hoặc các biến thể trình tự chức năng của nó, tương ứng. Cũng được ưu tiên là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2, và CDRH3 và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2, và CDRL3 theo các SEQ ID NO: 34, 36-38, 40 và 66 hoặc các biến thể trình tự chức năng của chúng hoặc theo các SEQ ID NO: 34, 36-37, 39-40 và 66 hoặc các biến thể trình tự chức năng của nó, tương ứng. Cũng được ưu tiên là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2, và CDRH3 và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2, và CDRL3 theo các SEQ ID NO: 34-38 và 58 hoặc các biến thể trình tự chức năng của chúng hoặc theo các SEQ ID NO: 34-37, 39 và 58 hoặc các biến thể trình tự chức năng của nó, tương ứng. Cũng được ưu tiên là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2, và CDRH3 và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2, và CDRL3 theo các SEQ ID NO: 34, 36-38, 58 và 66 hoặc các biến thể trình tự chức năng của chúng hoặc theo các SEQ ID NO: 34, 36-37, 39, 58 và 66 hoặc các biến thể trình tự chức năng của nó, tương ứng.

Theo đó, cũng được ưu tiên là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2, CDRH3 và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2, và CDRL3 (i) có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất

85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với mỗi SEQ ID NO trong số các SEQ ID NO: 34-38 và 40, tương ứng; hoặc (ii) có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với mỗi SEQ ID NO trong số các SEQ ID NO: 34-37, 39 và 40, tương ứng; hoặc (iii) có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với mỗi SEQ ID NO trong số các SEQ ID NO: 34-38 và 58, tương ứng; hoặc (iv) có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với mỗi SEQ ID NO trong số các SEQ ID NO: 34-37, 39 và 58, tương ứng; hoặc (v) có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với mỗi SEQ ID NO trong số các SEQ ID NO: 34, 36-38, 40 và 66 tương ứng; hoặc (vi) có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với mỗi SEQ ID NO trong số các SEQ ID NO: 34, 36-37, 39, 40 và 66, tương ứng; hoặc (vii) có chung độ tương đồng trình tự có chung ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với mỗi SEQ ID NO trong số các SEQ ID NO: 34, 36-38, 58 và 66, tương ứng; hoặc (viii) có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với mỗi SEQ ID NO trong số các SEQ ID NO: 34, 36-37, 39, 58 và 66, tương ứng.

Tốt hơn nữa là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2, và CDRH3 và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2, và CDRL3 (i) theo các SEQ ID NO: 34-38 và 40, tương ứng; hoặc (ii) theo các SEQ ID NO: 34-37, 39 và 40, tương ứng; hoặc (iii) theo các SEQ ID NO: 34-38 và 58, tương ứng; hoặc (iv) theo các SEQ ID NO: 34-37, 39 và 58, tương ứng; hoặc (v) theo các SEQ ID NO: 34, 36-38, 40 và 66, tương ứng; hoặc (vi) theo các SEQ ID NO: 34, 36-37, 39, 40 và 66, tương ứng; hoặc (vii) theo các SEQ ID NO: 34, 36-38, 58 và 66, tương ứng; hoặc (viii) theo các SEQ ID NO: 34, 36-37, 39, 58 và 66, tương ứng.

Hơn nữa, cũng được ưu tiên là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của

nó, theo sáng chế chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) theo SEQ ID NO: 41 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó và/hoặc trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) theo SEQ ID NO: 42 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó. Theo đó, được ưu tiên là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với SEQ ID NO: 41; và trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với SEQ ID NO: 42. Tốt hơn nữa là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) theo SEQ ID NO: 41 và trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) theo SEQ ID NO: 42.

Hơn nữa, cũng được ưu tiên là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) theo SEQ ID NO: 41 hoặc 67 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó và/hoặc trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) theo SEQ ID NO: 42 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó. Theo đó, được ưu tiên là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với SEQ ID NO: 41 hoặc 67 và trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với SEQ ID NO: 42. Tốt hơn nữa là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) theo SEQ ID NO: 41 hoặc 67 và trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) theo SEQ ID NO: 42.

Tốt hơn là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) theo SEQ ID NO: 41 hoặc 67 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó và trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) theo SEQ ID NO: 59 hoặc 65 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó. Theo đó, được ưu tiên là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa (i) trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa

là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với SEQ ID NO: 41 hoặc 67; và (ii) trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với SEQ ID NO: 59 hoặc 65. Tốt hơn nữa là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) theo SEQ ID NO: 41 hoặc 67 và trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) theo SEQ ID NO: 59 hoặc 65.

Tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế chứa ít nhất một chuỗi nặng CDRH1, CDRH2, và CDRH3 và các trình tự axit amin chuỗi nhẹ CDRL1, CDRL2, và CDRL3 mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với các trình tự axit amin nêu trong các SEQ ID NO: 34 – 38 và 40 hoặc với trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 34 – 37 và 39 – 40, tương ứng.

Tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế chứa ít nhất một chuỗi nặng CDRH1, CDRH2 và CDRH3 và các trình tự axit amin chuỗi nhẹ CDRL1, CDRL2, và CDRL3 mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với các trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 34 – 38 và 58, tương ứng, hoặc với các trình tự axit amin nêu trong các SEQ ID NO: 34 – 37, 39 và 58, tương ứng. Tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế chứa ít nhất một chuỗi nặng CDRH1, CDRH2 và CDRH3 và các trình tự axit amin chuỗi nhẹ CDRL1, CDRL2, và CDRL3 mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với các trình tự axit amin của nêu trong các SEQ ID NO: 34, 36 – 38, 40 và 66, tương ứng, hoặc với trình tự axit amin nêu trong các SEQ ID NO: 34, 36 – 37 và 39 – 40 và 66, tương ứng. Tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế chứa ít nhất một chuỗi nặng CDRH1, CDRH2 và CDRH3 và các trình tự axit amin chuỗi nhẹ CDRL1, CDRL2, và CDRL3 mà có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với các trình tự axit amin nêu trong các SEQ ID NO: 34, 36 – 38, 58 và 66,

tương ứng, hoặc với các trình tự axit amin nêu trong các SEQ ID NO: 34, 36 – 37, 39, 58 và 66, tương ứng.

Cũng được ưu tiên là kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế chứa ít nhất một vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và ít nhất một trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) mà có độ tương đồng ít nhất 80%, ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với các trình tự axit amin nêu trong các SEQ ID NO: 41 – 42.

Cũng được ưu tiên là kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế chứa ít nhất một vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và ít nhất một trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) mà có độ tương đồng ít nhất 80%, ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với các trình tự axit amin nêu trong các SEQ ID NO: 41 và 59.

Cũng được ưu tiên là kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế chứa ít nhất một vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và ít nhất một trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) mà có độ tương đồng ít nhất 80%, ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với các trình tự axit amin nêu trong các SEQ ID NO: 41 và 65.

Cụ thể tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế là gHBC34, cụ thể, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế là HBC34.

Các tác giả sáng chế đã phân lập kháng thể đơn dòng (mAb) theo sáng chế, mà được gọi trong bản mô tả này là HBC34 (cf. ví dụ 1). Trên cơ sở kháng thể HBC34, cụ thể trên các gen VH và VL của HBC 34, thuật ngữ “gHBC34”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến kháng thể “gen” tương ứng, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Cụ thể, “gHBC34” đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có trình tự axit amin CDRH1 theo SEQ ID NO: 34, trình tự axit amin CDRH2 theo SEQ ID NO: 35, trình tự axit amin CDRH3 theo SEQ ID NO: 36, trình tự axit amin CDRL1 theo SEQ ID NO: 37, trình tự axit amin CDRL2 theo SEQ ID NO: 38

hoặc 39, và trình tự axit amin CDRL3 theo SEQ ID NO:40. Cụ thể, “gHBC34” đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có trình tự axit amin CDRH1 theo SEQ ID NO: 34, trình tự axit amin CDRH2 theo SEQ ID NO: 35 hoặc 66, trình tự axit amin CDRH3 theo SEQ ID NO: 36, trình tự axit amin CDRL1 theo SEQ ID NO: 37, trình tự axit amin CDRL2 theo SEQ ID NO: 38 hoặc 39, và trình tự axit amin CDRL3 theo SEQ ID NO:40. Vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) của “gHBC34” có trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 41, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) của “gHBC34” có trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 42.

Cụ thể tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế là gHBC34v7, cụ thể, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế là HBC34v7.

Các tác giả sáng chế đã xác định kháng thể đơn dòng (mAb) khác theo sáng chế, mà được gọi trong bản mô tả này là HBC34v7 (cf. ví dụ 11). Trên cơ sở kháng thể HBC34v7, cụ thể trên các gen V_H và V_L của HBC34v7, thuật ngữ “gHBC34v7”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến kháng thể “gen” tương ứng, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Cụ thể, “gHBC34v7” đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có trình tự axit amin CDRH1 theo SEQ ID NO: 34, trình tự axit amin CDRH2 theo SEQ ID NO: 35 hoặc 66, trình tự axit amin CDRH3 theo SEQ ID NO: 36, trình tự axit amin CDRL1 theo SEQ ID NO: 37, trình tự axit amin CDRL2 theo SEQ ID NO: 38 hoặc 39, và trình tự axit amin CDRL3 theo SEQ ID NO: 58. Vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) của “gHBC34v7” có trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 41, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) của “gHBC34v7” có trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 59.

Cụ thể tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế là gHBC34v23, cụ thể, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế là HBC34v23.

Các tác giả sáng chế đã xác định kháng thể đơn dòng (mAb) khác theo sáng chế, mà được gọi trong bản mô tả này là HBC34v23 (cf. ví dụ 12). Trên cơ sở kháng thể HBC34v23, cụ thể trên các gen V_H và V_L của HBC34v23, thuật ngữ “gHBC34v23”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến kháng thể “gen” tương ứng, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Cụ thể, “gHBC34v23” đề cập đến kháng thể, hoặc

mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có trình tự axit amin CDRH1 theo SEQ ID NO: 34, trình tự axit amin CDRH2 theo SEQ ID NO: 35 hoặc 66, trình tự axit amin CDRH3 theo SEQ ID NO: 36, trình tự axit amin CDRL1 theo SEQ ID NO: 37, trình tự axit amin CDRL2 theo SEQ ID NO: 38 hoặc 39, và trình tự axit amin CDRL3 theo SEQ ID NO: 58. Vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) của “gHBC34v23” có trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 41, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) của “gHBC34v23” có trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 59.

Cụ thể tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế là gHBC34v31, cụ thể, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế là HBC34v31.

Các tác giả sáng chế đã xác định kháng thể đơn dòng (mAb) khác theo sáng chế, mà được gọi trong bản mô tả này là HBC34v31 (cf. ví dụ 12). Trên cơ sở kháng thể HBC34v31, cụ thể trên các gen V_H và V_L của HBC34v31, thuật ngữ “gHBC34v31”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến kháng thể “gen” tương ứng, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Cụ thể, “gHBC34v31” đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có trình tự axit amin CDRH1 theo SEQ ID NO: 34, trình tự axit amin CDRH2 theo SEQ ID NO: 35 hoặc 66, trình tự axit amin CDRH3 theo SEQ ID NO: 36, trình tự axit amin CDRL1 theo SEQ ID NO: 37, trình tự axit amin CDRL2 theo SEQ ID NO: 38 hoặc 39, và trình tự axit amin CDRL3 theo SEQ ID NO: 40. Vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) của “gHBC34v31” có trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 67, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) của “gHBC34v31” có trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 42.

Cụ thể tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế là gHBC34v32, cụ thể, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế là HBC34v32.

Các tác giả sáng chế đã xác định kháng thể đơn dòng (mAb) khác theo sáng chế, mà được gọi trong bản mô tả này là HBC34v32 (cf. ví dụ 12). Trên cơ sở kháng thể HBC34v32, cụ thể trên các gen V_H và V_L của HBC34v32, thuật ngữ “gHBC34v32”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến kháng thể “gen” tương ứng, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Cụ thể, “gHBC34v32” đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có trình tự axit amin CDRH1 theo SEQ ID NO: 34,

trình tự axit amin CDRH2 theo SEQ ID NO: 35 hoặc 66, trình tự axit amin CDRH3 theo SEQ ID NO: 36, trình tự axit amin CDRL1 theo SEQ ID NO: 37, trình tự axit amin CDRL2 theo SEQ ID NO: 38 hoặc 39, và trình tự axit amin CDRL3 theo SEQ ID NO: 40. Vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) của “gHBC34v32” có trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 67, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) của “gHBC34v32” có trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 59.

Cụ thể tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế là gHBC34v33, cụ thể, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế là HBC34v33.

Các tác giả sáng chế đã xác định kháng thể đơn dòng (mAb) khác theo sáng chế, mà được gọi trong bản mô tả này là HBC34v33 (cf. ví dụ 12). Trên cơ sở kháng thể HBC34v33, cụ thể trên các gen V_H và V_L của HBC34v33, thuật ngữ “gHBC34v33”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến kháng thể “gen” tương ứng, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Cụ thể, “gHBC34v33” đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có trình tự axit amin CDRH1 theo SEQ ID NO: 34, trình tự axit amin CDRH2 theo SEQ ID NO: 35 hoặc 66, trình tự axit amin CDRH3 theo SEQ ID NO: 36, trình tự axit amin CDRL1 theo SEQ ID NO: 37, trình tự axit amin CDRL2 theo SEQ ID NO: 38 hoặc 39, và trình tự axit amin CDRL3 theo SEQ ID NO: 40. Vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) của “gHBC34v33” có trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 67, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) của “gHBC34v33” có trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 65.

Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể người, kháng thể đơn dòng, kháng thể đơn dòng người, kháng thể được tinh chế, kháng thể chuỗi đơn, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv hoặc scFv.

Do đó, các kháng thể theo sáng chế có thể là các kháng thể người, các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đơn dòng người, các kháng thể tái tổ hợp hoặc các kháng thể được tinh chế. Sáng chế cũng đề xuất các mảnh của kháng thể theo sáng chế, cụ thể là các mảnh mà giữ lại hoạt tính liên kết kháng nguyên của các kháng thể. Các mảnh này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể chuỗi đơn, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv hoặc scFv.

Các mảnh của các kháng thể theo sáng chế có thể thu được từ các kháng thể bằng

các phương pháp bao gồm phân cắt bằng các enzym, chẳng hạn như pepsin hoặc papain, và/hoặc bằng việc cắt các liên kết disulfit bằng cách khử hóa học. Theo cách khác, các mảnh của kháng thể có thể thu được bằng cách tách dòng hoặc biểu hiện một phần các trình tự của các chuỗi nặng hoặc nhẹ. “Các mảnh” kháng thể bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂ và các mảnh Fv. Sáng chế còn bao hàm các mảnh Fv chuỗi đơn (scFv) có nguồn gốc từ các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể theo sáng chế. Ví dụ, sáng chế bao gồm scFv chứa các CDR từ kháng thể theo sáng chế. Cũng được bao gồm là các dime và monome chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, kháng thể chuỗi nặng miền đơn, kháng thể chuỗi nhẹ miền đơn, cũng như các kháng thể chuỗi đơn, ví dụ, Fv chuỗi đơn trong đó, các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được liên kết bằng các mối liên kết peptit.

Các mảnh kháng thể theo sáng chế có thể truyền các tương tác đa hóa trị hoặc đơn hóa trị và có thể được chứa nhiều cấu trúc như được mô tả ở trên. Ví dụ, các phân tử scFv có thể được tổng hợp để tạo ra “thể ba” hóa trị ba hoặc “thể bốn” hóa trị bốn. Các phân tử scFv có thể bao gồm một miền của vùng Fc thu được trong thể nhỏ hóa trị hai. Ngoài ra, các trình tự theo sáng chế có thể là thành phần của các phân tử đa đặc hiệu trong đó các trình tự theo sáng chế nhắm trúng đích các quyết định kháng nguyên theo sáng chế và các vùng khác của phân tử liên kết với các đích khác. Các phân tử ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Fab₂ đặc hiệu kép, Fab₃ đặc hiệu ba, scFv đặc hiệu kép, và các thể hai (Holliger và Hudson, 2005, *Nature Biotechnology* 9: 1126-1136).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế như được mô tả ở trong bản mô tả này để sử dụng làm dược chất. Tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế như được mô tả trong bản mô tả này để sử dụng trong phòng ngừa, điều trị hoặc việc làm suy yếu viêm gan B và/hoặc viêm gan D. Phần mô tả chi tiết về khía cạnh đó được đề xuất dưới đây theo “cách sử dụng và điều trị y khoa” và trong bối cảnh của dược phẩm theo sáng chế.

Phân tử axit nucleic

Theo khía cạnh khác, sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic bao gồm polynucleotit mã hóa kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế như được mô tả ở trên. Các ví dụ về các phân tử axit nucleic và/hoặc các polynucleotit bao gồm, ví dụ, polynucleotit tái tổ hợp, vector, oligonucleotit, phân tử ARN như rARN,

mARN, miARN, siARN, hoặc tARN, hoặc phân tử ADN như cADN. Các trình tự axit nucleic mã hóa một phần hoặc tất cả các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và các CDR của các kháng thể theo sáng chế được ưu tiên. Các Bảng 2-8 đề xuất các số SEQ ID đối với các trình tự axit amin của các CDR và VH và VL của các kháng thể ví dụ theo sáng chế, mà tốt hơn là được mã hóa bởi các trình tự axit nucleic/polynucleotit như được mô tả trong bản mô tả này. Do đó, tốt hơn là được đề xuất trong bản mô tả này là trình tự axit nucleic mã hóa một phần hoặc tất cả các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, cụ thể là các trình tự VH và VL của các CDR của các kháng thể ví dụ theo sáng chế. Bảng 9 dưới đây trình bày các số SEQ ID đối với các trình tự axit nucleic mã hóa các CDR và VH và VL kháng thể ví dụ theo sáng chế. Do sự dư thừa của mã di truyền, sáng chế cũng bao gồm các biến thể trình tự của các trình tự axit nucleic này và cụ thể là các biến thể trình tự này mã hóa các trình tự axit amin.

Phân tử axit nucleic là phân tử bao gồm, tốt hơn là bao gồm các thành phần axit nucleic. Tốt hơn là, thuật ngữ phân tử axit nucleic để chỉ các phân tử ADN hoặc phân tử ARN. Cụ thể, nó được sử dụng đồng nghĩa với thuật ngữ “polynucleotit”. Tốt hơn là, phân tử axit nucleic là polyme chứa hoặc bao gồm các monome nucleotit mà được liên kết cộng hóa trị với nhau bằng các liên kết phosphodiester của mạch chính đường/phosphat. Thuật ngữ “phân tử axit nucleic” cũng bao hàm các phân tử axit nucleic được biến đổi, chẳng hạn như các phân tử ARN hoặc ADN được biến đổi bazơ, được biến đổi đường hoặc được biến đổi mạch hính, v.v..

Bảng 9 thể hiện các trình tự axit nucleic của các CDR và vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của các kháng thể ví dụ theo sáng chế (“HBC34”, “HBC34v7”, “HBC34v23”, “HBC34v31”, “HBC34v32” và “HBC34v33”):

Tên	SEQ ID NO.	Trình tự axit nucleic
HBC34		
CDRH1	43	GGACGCATCTTTAGAAGTTTTTAC
CDRH2	44	ATAAACCAAGATGGAAGTGAGAAA
CDRH3	45	GCGGCTTGGAGCGGCAATAGTGGGGGTATGG ACGTC
CDRL1	46	AAATTGGGGAATAAAAAT

CDRL2	47	GAGGTTAAA
CDRL2 dài	48	gtcatctatGAGGTTAAAtaccgcccc
CDRL3	49	CAGACGTGGGACAGCACCACTGTGGTG
VH	50	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCT GGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCAGAGACTGTC CTGTGCAGCCTCTGGACGCATCTTTAGAAG TTTTTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCACTATA AACCAAGATGGAAGTGAGAAATTATATGTG GACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCA GAGACAACGCCAAGAAGTCACTATTTCTGCA AATGAACAACCTGAGAGTCGAGGACACGGC CGTTTATTACTGCGCGGCTTGGAGCGGCAA TAGTGGGGGTATGGACGTCTGGGGCCAGG GGACCACGGTCTCCGTCTCCTCA
VL	51	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGT CCGTGTCCCCAGGACAGACAGTCAGCATCCC CTGCTCTGGAGATAAATTGGGGAATAAAAA TGTTTGCTGGTTTCAGCATAAGCCAGGCCAG TCCCCTGTGTTGGTCATCTATGAGGTTAAAT ACCGCCCCCTCGGGGATTCCTGAGCGATTCTC TGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACTCTG ACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGG CTGCCTATTTCTGTCAGACGTGGGACAGCA CCACTGTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAGGC TGACCGTCCTA
Mã bộ ba VH được tối ưu	70	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCAGGAGGAGGG TGGGTCCAGCCCGGAGGGAGCCAGAGACTGT CTTGTGCCGCATCAGGGAGGATCTTCAGGA GCTTCTACATGTCCTGGGTGCGCCAGGCACC AGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGCGCCACCAT CAACCAGGACGGATCTGAAAAGCTGTATGT

		GGATAGTGTCAAAGGCCGGTTCACAATTAGC AGAGACAACGCTAAAAATTCTCTGTTTCTGC AGATGAACAATCTGCGAGTGGAGGATACCGC CGTCTACTATTGCGCCGCTTGGTCTGGCAA CAGCGGCGGGATGGATGTCTGGGGGCAGG GCACAACAGTGAGCGTCTCTTCC
Mã bộ ba VL được tối ưu	71	TCATACGAACTGACTCAGCCTCCCTCCGTCTC CGTCTCACCTGGACAGACCGTCTCAATCCCC TGCTCCGGCGAT AAACTGGGCAACAAGAACGTGTGCTGGTTC CAGCACAAACCCGGACAGAGTCCTGTGCTGG TCATCTACGAGGTCAAGTATCGGCCAAGCG GCATTCCCGAAAGATTCAGCGGCTCCAACTC TGGGAATACCGCAACACTGACTATCTCTGGA ACCCAGGCAATGGACGAGGCAGCTTACTTTT GCCAGACTTGGGATTCAACTACTGTCGTGT TCGGCGGCGGAACTAGACTGACTGTCCTG
Mã bộ ba CRDH1 được tối ưu	72	GGGAGGATCTTCAGGAGCTTCTAC
Mã bộ ba CDRH2 được tối ưu	73	ATCAACCAGGACGGATCTGAAAAG
Mã bộ ba CDRH3 được tối ưu	74	GCCGCTTGGTCTGGCAACAGCGGCGGGATGG ATGTC
Mã bộ ba CDRL1 được tối ưu	75	AAACTGGGCAACAAGAAC
Mã bộ ba CDRL2 được tối ưu	76	GAGGTCAAG

Mã bộ ba CDRL2 dài được tối ưu	77	GTCATCTACGAGGTCAAGTATCGGCCA
Mã bộ ba CDRL3 được tối ưu	78	CAGACTTGGGATTCAACTACTGTCGTG
HBC34v7, HBC34v23, HBC34 v31, HBC34 v32 và HBC34 v33		
CDRL1v7 và CDRL1 v23	60	AAGCTGGGGAACAAAAAT
CDRL2 v7 và CDRL2v23,	61	GAGGTGAAA
CDRL2v7 dài và CDRL2v23 dài	62	GTCATCTACGAGGTGAAATATCGGCCT
CDRL3 v7 và CDRL2v23	63	CAGACATTGATTCCACCACAGTGGTC
VL v7	64	TCTTACGAGCTGACACAGCCACCTAGCGTGT CCGTCTCTCCAGGACAGACCGTGTCCATCCC TTGCTCTGGCGACAAGCTGGGGAACAAAAAT GTCTGTTGGTTCCAGCACAAGCCAGGGCAGA GTCCCGTGCTGGTCATCTACGAGGTGAAATA TCGGCCTTCAGGAATTCCAGAACGGTTCAGC GGATCAAACAGCGGCAATACTGCAACCCTGA CAATTAGCGGGACCCAGGCCATGGACGAAG CCGCTTATTTCTGCCAGACATTGATTCCACC ACAGTGGTCTTTGGCGGGGGAAGTAGGCTGA CCGTGCTG
HBC34v31, HBC34v32, và HBC34v33 VH	68	GAGGTGCAGCTGGTGAATCCGGCGGGGGA CTGGTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGA GCTGTGCAGCTTCTGGAAGAATCTTCAGATC TTTTTACATGAGTTGGGTGAGACAGGCTCCT

		GGGAAGGGACTGGAGTGGGTCGCAAACATC AATCAGGACGGATCAGAAAAGCTGTATGTGG ATAGCGTCAAAGGCAGGTTCACTATTTCCCG CGACAACGCCAAAAATTCTCTGTTTCTGCAG ATGAACAATCTGCGGGTGGAGGATACCGCTG TCTACTATTGTGCAGCCTGGTCTGGCAACAG TGGAGGCATGGACGTGTGGGGACAGGGAAC CACAGTGACAGTCAGCTCC
VL v23	69	TCTTACGAGCTGACACAGCCCCCTAGCGTGT CCGTCTCTCCAGGCCAGACAGCATCCATCAC TTGCTCTGGCGACAAGCTGGGGAACAAAAAT GCCTGTTGGTATCAGCAGAAGCCAGGGCAGA GTCCCGTGCTGGTCATCTACGAGGTGAAATA TCGGCCTTCAGGAATTCCAGAAAGATTCACT GGATCAAACAGCGGCAATACTGCTACCCTGA CAATTAGCGGGACCCAGGCCATGGACGAAG CTGATTACTATTGCCAGACATTTCGATTCCACC ACAGTGGTCTTTGGCGGGGGAACTAAGCTGA CCGTGCTG

Tốt hơn là, trình tự của phân tử axit nucleic theo sáng chế chứa hoặc bao gồm trình tự axit nucleic theo SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 43-51 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó. Cũng được ưu tiên là trình tự của phân tử axit nucleic theo sáng chế chứa hoặc bao gồm trình tự axit nucleic theo SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 43 – 51, 60 – 64 và 68 – 78.

Do đó, cũng được ưu tiên là các trình tự axit nucleic theo sáng chế bao gồm các trình tự axit nucleic có độ tương đồng ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 88%, ít nhất 90%, ít nhất 92%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với axit nucleic mã hóa CDR, trình tự VH và/hoặc trình tự VL được sử dụng trong kháng thể (ví dụ) theo sáng chế, ví dụ với các trình tự được thể hiện trong Bảng 9. Do đó, phân tử axit nucleic được ưu tiên, trong đó trình tự polynucleotit chứa hoặc bao gồm trình tự axit nucleic theo SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO:

43-51 hoặc biến thể trình tự chức năng của nó. Phân tử axit nucleic, trong đó trình tự polynucleotit chứa hoặc bao gồm trình tự axit nucleic có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 43 – 51, 60 – 64 và 68 – 78 cũng được ưu tiên. Tốt hơn nữa là, trình tự polynucleotit chứa hoặc bao gồm trình tự axit nucleic theo SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 43-51, 60-64 và 68-78.

Tốt hơn nữa là, trình tự polynucleotit chứa hoặc bao gồm trình tự axit nucleic có chung độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% với SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 70 – 78. Các SEQ ID NO: 70 – 78 là các trình tự axit nucleic được tối ưu mã bộ ba (cf. Bảng 9). Cụ thể tốt hơn là, trình tự polynucleotit chứa hoặc bao gồm trình tự axit nucleic theo SEQ ID NO bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 70-78.

Thông thường, phân tử axit nucleic có thể được thao tác để chèn, làm mất hoặc thay đổi một số trình tự axit nucleic. Các thay đổi từ sự thao tác này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các thay đổi để đưa vào các vị trí giới hạn, thay đổi cách sử dụng mã bộ ba, bổ sung hoặc tối ưu hóa các trình tự điều hòa phiên mã hoặc dịch mã, v.v.. Điều này cũng có thể thay đổi axit nucleic để thay thế các axit amin được mã hóa. Ví dụ, nó có thể hữu ích để đưa vào một hoặc nhiều (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, v.v) sự thể, làm mất và/hoặc chèn axit amin vào trình tự axit amin của kháng thể. Các đột biến điểm này có thể biến đổi các chức năng phản ứng lại kích thích, ái lực liên kết kháng nguyên, các biến đổi sau dịch mã, tính sinh miễn dịch, v.v., có thể đưa vào các axit amin để gắn kết các nhóm hóa trị (ví dụ, các nhân) hoặc có thể đưa vào các thể (ví dụ, với mục đích tinh sạch). Các đột biến có thể được đưa vào ở các vị trí đặc hiệu hoặc có thể được đưa vào ngẫu nhiên, được tuân theo bởi sự lựa chọn (ví dụ, sự tiến hóa phân tử). Ví dụ, một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa vùng bất kỳ trong số các vùng CDR, trình tự VH và/hoặc trình tự VL của kháng thể (ví dụ) theo sáng chế có thể được đột biến trực tiếp hoặc ngẫu nhiên để đưa vào các đặc tính khác nhau trong các axit amin được mã hóa. Các thay đổi này có thể là kết quả của quy trình lặp trong đó các thay đổi ban đầu được giữ lại và các thay đổi mới ở các vị trí nucleotit khác được đưa vào. Hơn nữa, các thay đổi đạt được ở các bước độc lập có thể được kết hợp. Các đặc tính khác được đưa vào các axit amin

được mã hóa có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ái lực được tăng cường.

Vector

Hơn nữa, các vector được chứa trong phạm vi của sáng chế, ví dụ, các vector biểu hiện, bao gồm phân tử axit nucleic theo sáng chế. Tốt hơn là, vector chứa các phân tử axit nucleic như được mô tả ở trên.

Thuật ngữ “vector” để chỉ phân tử axit nucleic, tốt hơn là phân tử axit nucleic tái tổ hợp, tức là phân tử axit nucleic mà không có trong tự nhiên. Vector trong bối cảnh của sáng chế thích hợp để kết hợp hoặc bao gồm trình tự axit nucleic mong muốn. Các vector này có thể là các vector lưu trữ, vector biểu hiện, vector tách dòng, vector chuyển, v.v.. Vector lưu trữ là vector mà cho phép việc lưu trữ thuận tiện của phân tử axit nucleic. Do đó, vector có thể bao gồm trình tự tương ứng, ví dụ, với kháng thể mong muốn hoặc mảnh kháng thể của nó theo sáng chế. Vector biểu hiện có thể được sử dụng để sản xuất của các sản phẩm biểu hiện như ARN, ví dụ mARN, hoặc các peptit, polypeptit hoặc protein. Ví dụ, vector biểu hiện có thể chứa các trình tự cần thiết để phiên mã kéo căng trình tự của vector, chẳng hạn như trình tự khởi đầu phiên mã. Vector tách dòng thường là vector chứa vị trí tách dòng, mà có thể được sử dụng để kết hợp các trình tự axit nucleic vào vector. Vector tách dòng có thể là, ví dụ, vector plasmid hoặc vector thể thực khuẩn. Vector chuyển có thể là vector mà phù hợp để chuyển các phân tử axit nucleic vào các tế bào hoặc các sinh vật, ví dụ, các vector virus. Vector trong bối cảnh sáng chế có thể là, ví dụ, vector ARN hoặc vector ADN. Tốt hơn là, vector là phân tử ADN. Ví dụ, vector trong đơn sáng chế bao gồm vị trí tách dòng, chất đánh dấu chọn lọc, chẳng hạn thành phần kháng kháng sinh, và trình tự thích hợp để nhân vector, chẳng hạn như nguồn gốc của sự sao chép. Tốt hơn là, vector trong bối cảnh của đơn sáng chế này là vector plasmid.

Tế bào

Theo khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất tế bào biểu hiện kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế; và/hoặc bao gồm vector theo sáng chế.

Các ví dụ về các tế bào này bao gồm nhưng không giới hạn ở, các tế bào nhân thực, ví dụ, các tế bào nấm men, các tế bào động vật hoặc các tế bào thực vật. Tốt hơn là, các tế bào là các tế bào động vật có vú, tốt hơn nữa là dòng tế bào động vật có vú. Các ví dụ được ưu tiên bao gồm các tế bào của người, các tế bào CHO, các tế bào HEK293T, các tế bào PER.C6, các tế bào NS0, các tế bào gan của người, ví dụ, các tế

bào Hepa RG, các tế bào u tủy hoặc các tế bào lai.

Cụ thể là, tế bào có thể được chuyển nạp bằng vector theo sáng chế, tốt hơn là với vector biểu hiện. Thuật ngữ “sự chuyển nạp” đề cập đến sự đưa v các phân tử axit nucleic, chẳng hạn như các phân tử ADN hoặc ARN (ví dụ, mRNA), vào tế bào, tốt hơn là vào các tế bào nhân thực. Trong bối cảnh của sáng chế, thuật ngữ “sự chuyển nạp” bao gồm phương pháp bất kỳ đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để đưa các phân tử axit nucleic vào các tế bào, tốt hơn là vào các tế bào nhân thực, chẳng hạn như vào các tế bào động vật có vú. Ví dụ, các phương pháp này bao gồm điện di, chuyển nhiễm lipo, ví dụ, trên cơ sở lipit cation và/hoặc liposom, sự kết tủa canxi phosphat, sự chuyển nạp trên cơ sở hạt nano, sự chuyển nạp trên cơ sở virus, hoặc sự chuyển nạp trên cơ sở các polyme cation, chẳng hạn như DEAE-dextran hoặc polyetylenimin, v.v.. Tốt hơn là, sự đưa vào không phải là virus.

Hơn nữa, các tế bào của sáng chế có thể được chuyển nạp ổn định hoặc tạm thời bằng vector theo sáng chế, ví dụ để biểu hiện kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Tốt hơn là, các tế bào được chuyển nạp ổn định bằng vector theo sáng chế mã hóa kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Theo cách khác, cũng được ưu tiên là các tế bào được chuyển nạp tạm thời bằng vector theo sáng chế mã hóa kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Các đặc tính bổ sung tùy ý của các kháng thể

Các kháng thể theo sáng chế có thể được ghép, ví dụ, với dược chất để phân phối vị trí điều trị hoặc được ghép với nhãn có thể phát hiện để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tạo ảnh vị trí bao gồm các tế bào được đề cập. Các phương pháp để ghép các kháng thể với dược chất và các nhãn có thể phát hiện đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, là các phương pháp tạo ảnh bằng cách sử dụng các nhãn có thể phát hiện. Các kháng thể được dán nhãn có thể được sử dụng rộng rãi ở nhiều thử nghiệm, sử dụng rộng rãi nhiều nhãn. Sự phát hiện tạo ra phức hợp kháng nguyên-kháng thể giữa kháng thể theo sáng chế và quyết định kháng nguyên được đề cập trên HBsAg, cụ thể trên khu vực vòng kháng nguyên của HBsAg, có thể được tạo điều kiện thuận lợi bằng cách gắn các chất có thể phát hiện với kháng thể. Các phương tiện phát hiện thích hợp bao gồm việc sử dụng các nhãn như các nuclit phóng xạ, enzym, coenzym, chất huỳnh quang, chất phát

quang hóa học, thể nhiễm sắc, các chất nền hoặc các đồng thành phần enzym, các chất ức chế enzym, các phức hợp nhóm kiểu giả, các gốc tự do, các hạt, các dược chất nhuộm, và các dạng tương tự. Các ví dụ về các enzym thích hợp bao gồm peroxidaza củ cải ngựa, phosphataza kiềm, β -galactosidaza, hoặc axetylcholinesteraza; các ví dụ về các phức hợp nhóm kiểu giả bao gồm streptavidin/biotin và avidin/biotin; các ví dụ về chất huỳnh quang thích hợp bao gồm umbelliferon, floresxein, floresxein isothioxyanat, rhodamin, diclotriazinylamin floresxein, dansyl clorua hoặc phycoerythrin; ví dụ về chất phát huỳnh quang là luminol; các ví dụ về các chất phát quang sinh học bao gồm luxiferaza, luxiferin, và aequorin; và các ví dụ về chất phóng xạ thích hợp bao gồm ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , hoặc ^3H . Các chất phản ứng được dán nhãn này có thể được sử dụng trong nhiều thử nghiệm đã biết, chẳng hạn như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, thử nghiệm miễn dịch enzym, ví dụ, ELISA, các thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, và các dạng tương tự. Do đó, các kháng thể được dán nhãn theo sáng chế có thể được sử dụng trong các thử nghiệm này ví dụ được mô tả trong US 3,766,162; US 3,791,932; US 3,817,837; và US 4,233,402.

Kháng thể theo sáng chế có thể được liên hợp với gốc trị liệu như chất gây độc tế bào, tác nhân trị liệu, hoặc ion kim loại phóng xạ hoặc đồng vị phóng xạ. Các ví dụ của các đồng vị phóng xạ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111, và các dạng tương tự. Các thể liên hợp kháng thể này có thể được sử dụng để biến đổi đáp ứng sinh học nhất định; gốc dược chất không được hiểu là bị giới hạn ở các tác nhân trị liệu hóa chất cổ điển. Ví dụ, gốc dược chất có thể là polypeptit hoặc protein có hoạt tính sinh học mong muốn. Ví dụ, các protein này có thể bao gồm, ví dụ, độc tố như abrin, rixin A, ngoại độc tố pseudomonas, hoặc độc tố bệnh bạch hầu.

Các kỹ thuật liên hợp gốc trị liệu này với các kháng thể đã biết. Xem, ví dụ, Arnon và cộng sự (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, ed. Reisfeld và cộng sự (Alan R. Liss, Inc.), pp. 243-256; ed. Hellstrom và cộng sự (1987) "Antibodies for Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery*, ed. Robinson và cộng sự (2d ed; Marcel Dekker, Inc.), pp. 623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, ed. Pinchera và cộng sự pp. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985);

“Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy,” in *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, ed. Baldwin và cộng sự (Academic Press, New York, 1985), pp. 303-316; và Thorpe và cộng sự (1982) *Immunol. Rev.* 62:119-158.

Theo cách khác, kháng thể, hoặc mảnh kháng thể của nó, có thể được liên hợp với kháng thể thứ hai, hoặc mảnh kháng thể của nó, để tạo ra thể liên hợp khác loại kháng thể như được mô tả trong US 4,676,980. Ngoài ra, các mối liên kết có thể được sử dụng giữa các nhãn và kháng thể theo sáng chế, ví dụ, như được mô tả trong US 4,831,175. Các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể được dán nhãn trực tiếp với iot, indi, yttri phóng xạ, hoặc hạt phóng xạ khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, như được mô tả trong US 5,595,721. Điều trị có thể bao gồm sự kết hợp điều trị với các kháng thể được liên hợp và các kháng thể không được liên hợp được dùng đồng thời hoặc theo trình tự, ví dụ, như được mô tả trong WO00/52031; WO00/52473.

Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được gắn vào giá thể rắn. Ngoài ra, các kháng thể theo sáng chế, các mảnh kháng thể chức năng của nó, có thể được biến đổi hóa học bằng cách liên hợp cộng hóa trị với polyme, ví dụ để làm tăng chu kỳ bán hủy tuần hoàn của chúng. Các ví dụ về các polyme, và các phương pháp gắn chúng vào các peptit, được thể hiện trong US 4,766,106; US 4,179,337; US 4,495,285 và US 4,609,546. Theo một số phương án, các polyme có thể được chọn từ polyol được polyoxyetyl hóa và glycol polyetylen (PEG). PEG hòa tan trong nước ở nhiệt độ phòng và có công thức chung: $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, trong đó R có thể là hydro, hoặc nhóm bảo vệ như nhóm alkyl hoặc nhóm alkanol. Tốt hơn là, nhóm bảo vệ có thể có từ 1 đến 8 cacbon. Ví dụ, nhóm bảo vệ là metyl. Ký hiệu n là số nguyên dương. Theo một phương án, n nằm trong khoảng từ 1 đến 1.000. Theo một phương án khác, n nằm trong khoảng từ 2 đến 500. Tốt hơn là, PEG có trọng lượng phân tử trung bình nằm trong khoảng từ 1.000 đến 40.000, tốt hơn nữa là PEG có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 2.000 đến 20.000, thậm chí tốt hơn nữa là PEG có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 3.000 đến 12.000. Ngoài ra, PEG có thể có ít nhất một nhóm hydroxy, ví dụ PEG có thể có nhóm hydroxy đầu cuối. Ví dụ, đó là nhóm hydroxy đầu cuối được hoạt hóa để phản ứng với nhóm amino tự do trên chất ức chế. Tuy nhiên, cần được hiểu là loại và lượng các nhóm phản ứng có thể được thay đổi để thu được PEG được liên hợp cộng hóa

trị/kháng thể theo sáng chế.

Các polyol được polyoxyetyl hóa hòa tan trong nước cũng hữu ích theo sáng chế. Chúng bao gồm sorbitol được polyoxyetyl hóa, glucoza được polyoxyetyl hóa, glyxerol được polyoxyetyl hóa (POG), và các dạng tương tự. Theo một phương án, POG được sử dụng. Nếu không có sự ràng buộc bởi lý thuyết, bởi vì mạch chính glyxerol của glyxerol được polyoxyetyl hóa là giống với mạch chính có trong tự nhiên, ví dụ, các động vật và con người trong mono-, di-, triglyxerit, mạch nhánh này sẽ không nhất thiết được xem là chất lạ trong cơ thể. POG có thể có trọng lượng phân tử trong khoảng giống như với PEG. Hệ thống phân phối được chất khác có thể được sử dụng để làm tăng chu kỳ bán hủy tuần hoàn là liposom. Các phương pháp điều chế các hệ thống phân phối liposom đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các hệ thống phân phối được chất khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này được mô tả trong, ví dụ, được viện dẫn theo Poznansky và cộng sự (1980) và Poznansky (1984).

Các kháng thể theo sáng chế có thể được đề xuất ở dạng được tinh sạch. Thông thường, kháng thể sẽ có mặt trong chế phẩm mà gần như không chứa các polypeptit khác ví dụ, nếu nhỏ hơn 90% (trọng lượng), thường nhỏ hơn 60% và thông thường hơn nhỏ hơn 50% của chế phẩm được tạo nên từ các polypeptit khác.

Các kháng thể theo sáng chế có thể có tính sinh miễn dịch ở các vật chủ không phải người (hoặc khác loại), ví dụ, chuột nhắt. Cụ thể là, các kháng thể có thể có idiotop mà có tính sinh miễn dịch ở các vật chủ không phải người, nhưng không có ở vật chủ là người. Cụ thể là, các kháng thể theo sáng chế để sử dụng ở người bao gồm các chất mà không thể được phân lập dễ dàng từ các vật chủ như chuột nhắt, dê, thỏ, chuột, các động vật có vú không phải linh trưởng, v.v. và thông thường không thể thu được bằng cách làm giống người hoặc từ chuột ngoại lai.

Sản xuất các kháng thể

Các kháng thể theo sáng chế có thể được thực hiện theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, hệ phương pháp tổng quát để tạo ra các kháng thể đơn dòng bằng cách sử dụng kỹ thuật tế bào lai đã biết (Kohler, G. và Milstein, C., 1975; Kozbar và cộng sự 1983). Theo một phương án, phương pháp cổ định EBV thay thế được mô tả trong WO2004/076677 được sử dụng.

Phương pháp được ưu tiên được mô tả trong WO 2004/076677. Theo phương pháp này, các tế bào B sản xuất kháng thể theo sáng chế được biến nạp bằng EBV và chất hoạt hóa tế bào B đa dòng. Các chất kích thích bổ sung của sự sinh trưởng và biệt hóa tế bào tùy ý có thể được thêm vào trong bước biến nạp để tăng thêm hiệu suất. Các chất kích thích này có thể là các xytokin như IL-2 và IL-15. Theo một khía cạnh, IL-2 được bổ sung trong bước cố định để cải thiện thêm hiệu suất cố định, nhưng cách sử dụng của nó là không cần thiết. Các tế bào B được cố định được sản xuất bằng cách sử dụng các phương pháp này sau đó có thể được nuôi cấy bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và các kháng thể được phân lập từ đó.

Phương pháp được ưu tiên khác được mô tả trong WO 2010/046775. Theo phương pháp này, các tế bào huyết tương được nuôi cấy với số lượng giới hạn, hoặc dưới dạng các tế bào huyết tương đơn lẻ trong các đĩa nuôi cấy vi giếng. Các kháng thể có thể được phân lập khỏi các môi trường nuôi cấy tế bào huyết tương. Hơn nữa, từ các môi trường nuôi cấy tế bào huyết tương, ARN có thể được tách và PCR có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vùng VH và VL của các kháng thể có thể được khuếch đại bởi RT-PCR (PCR phiên mã ngược), được lập trình tự và tách dòng thành vector biểu hiện sau đó được chuyển nạp vào tế bào HEK293T hoặc các tế bào chủ khác. Việc tách dòng axit nucleic trong các vector biểu hiện, sự chuyển nạp các tế bào chủ, môi trường nuôi cấy của các tế bào chủ được chuyển nạp và sự phân lập của kháng thể được sản xuất có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp bất kỳ đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các kháng thể có thể được tinh sạch thêm, nếu mong muốn, bằng cách lọc, ly tâm và các phương pháp sắc ký khác nhau chẳng hạn như phương pháp sắc ký ái lực hoặc HPLC. Các kỹ thuật tinh sạch các kháng thể, ví dụ, các kháng thể đơn dòng, bao gồm các kỹ thuật sản xuất các kháng thể loại được phẩm đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các mảnh của các kháng thể theo sáng chế có thể thu được từ các kháng thể bằng các phương pháp bao gồm sự phân cắt bằng các enzym, chẳng hạn như pepsin hoặc papain, và/hoặc bằng việc cắt các liên kết disulfit bằng cách khử hóa học. Theo cách khác, các mảnh của kháng thể có thể thu được bằng cách tách dòng và biểu hiện một phần các trình tự của các chuỗi nặng hoặc nhẹ. “Các mảnh” kháng thể bao gồm Fab,

Fab', F(ab')₂ và các mảnh Fv. Sáng chế còn bao hàm các mảnh Fv chuỗi đơn (scFv) có nguồn gốc từ các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể theo sáng chế. Ví dụ sáng chế bao gồm scFv chứa các CDR từ kháng thể theo sáng chế. Cũng được bao gồm là các dime và monome chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, kháng thể chuỗi nặng miền đơn, kháng thể chuỗi nhẹ miền đơn, cũng như các kháng thể chuỗi đơn, ví dụ, Fv chuỗi đơn trong đó, các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được liên kết bằng các mối liên kết peptit.

Các mảnh kháng thể theo sáng chế có thể truyền các tương tác đa hóa trị hoặc đơn hóa trị và có thể được chứa trong nhiều cấu trúc như được mô tả ở trên. Ví dụ, các phân tử scFv có thể được tổng hợp để tạo ra “thể ba” hóa trị ba hoặc “thể bốn” hóa trị bốn. Các phân tử scFv có thể bao gồm một miền của vùng Fc thu được trong thể nhỏ hóa trị hai. Thêm vào đó, các trình tự theo sáng chế có thể là thành phần của các phân tử đa đặc hiệu trong đó các trình tự của thể sáng chế nhắm trúng đích các quyết định kháng nguyên theo sáng chế và các vùng khác của phân tử liên kết với các đích khác. Các phân tử ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Fab₂ đặc hiệu kép, Fab₃ đặc hiệu ba, scFv đặc hiệu kép, và các thể hai (Holliger và Hudson, 2005, *Nature Biotechnology* 9: 1126-1136).

Các kỹ thuật tiêu chuẩn của sinh học phân tử có thể được sử dụng để tạo ra các trình tự ADN mã hóa các kháng thể hoặc các mảnh kháng thể theo sáng chế. Các trình tự ADN mong muốn có thể được tổng hợp toàn bộ hoặc một phần bằng cách sử dụng các kỹ thuật tổng hợp oligonucleotit. Các kỹ thuật gây đột biến được định hướng vị trí và phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) có thể được sử dụng khi thích hợp.

Hệ vector/tế bào chủ thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng để biểu hiện các trình tự ADN mã hóa các phân tử kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh của chúng. Vi khuẩn, ví dụ E.coli, và các hệ vi khuẩn khác có thể được sử dụng một phần để biểu hiện các mảnh kháng thể chẳng hạn như các mảnh Fab và F(ab')₂, và đặc biệt là các mảnh Fv và các mảnh kháng thể chuỗi đơn, ví dụ, Fvs chuỗi đơn. Các hệ biểu hiện tế bào chủ, nhân thực ví dụ ở động vật có vú, có thể được sử dụng để sản xuất các phân tử kháng thể lớn hơn, bao gồm các phân tử kháng thể hoàn chỉnh. Các tế bào chủ động vật có vú thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, các tế bào u tủy hoặc các tế bào lai.

Sáng chế còn đề xuất quy trình sản xuất phân tử kháng thể theo sáng chế bao gồm

bước nuôi cấy tế bào chủ chứa vector mã hóa axit nucleic theo sáng chế trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện protein từ ADN mã hóa phân tử kháng thể theo sáng chế, và phân lập phân tử kháng thể.

Phân tử kháng thể có thể chỉ chứa polypeptit chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, mà trong trường hợp chỉ polypeptit chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ mã hóa trình tự cần được sử dụng để chuyển nạp các tế bào chủ. Đối với việc sản xuất các sản phẩm bao gồm cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, dòng tế bào có thể được chuyển nạp bằng hai vector, vector thứ nhất mã hóa polypeptit chuỗi nhẹ và vector thứ hai mã hóa polypeptit chuỗi nặng. Theo cách khác, vector đơn có thể được sử dụng, vector bao gồm các trình tự mã hóa các polypeptit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ.

Theo cách khác, các kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất bằng (i) biểu hiện trình tự axit nucleic theo sáng chế trong tế bào chủ, ví dụ, bằng cách sử dụng vector theo sáng chế, và (ii) phân lập sản phẩm kháng thể được biểu hiện. Theo cách khác, phương pháp có thể bao gồm (iii) tinh sạch kháng thể được phân lập. Các tế bào B được biến nạp và các tế bào huyết tương được nuôi cấy có thể được sàng lọc đối với các kháng thể sản xuất này có độ đặc hiệu hoặc chức năng mong muốn.

Bước sàng lọc có thể được thực hiện bằng thử nghiệm miễn dịch bất kỳ, ví dụ, ELISA, bằng cách nhuộm các mô hoặc các tế bào (bao gồm các tế bào được chuyển nạp), bằng thử nghiệm trung hòa hoặc bằng một trong một số các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để xác định các đặc tính hoặc chức năng mong đợi. Thử nghiệm có thể chọn trên cơ sở việc nhận biết đơn giản của một hoặc nhiều kháng nguyên, hoặc có thể chọn trên cơ sở bổ sung chức năng mong muốn, ví dụ để chọn các kháng thể trung hòa thay vì chỉ các kháng thể liên kết kháng nguyên, để chọn các kháng thể mà có thể thay đổi các đặc tính của các tế bào được nhắm trúng đích, chẳng hạn như các đợt truyền tín hiệu của chúng, hình dạng của chúng, tốc độ sinh trưởng của chúng, khả năng ảnh hưởng đến các tế bào khác của chúng, đáp ứng của chúng với sự ảnh hưởng bởi các tế bào khác hoặc bằng các chất phản ứng khác hoặc bởi sự thay đổi các điều kiện, tình trạng biệt hóa của chúng, v.v..

Các dòng tế bào B được biến nạp riêng lẻ có thể sau đó được sản xuất từ môi trường nuôi cấy tế bào B được biến nạp dương tính. Bước tách dòng để tách các dòng riêng lẻ từ hỗn hợp các tế bào dương tính có thể được thực hiện bằng cách pha loãng

giới hạn, thao tác nhỏ, lắng đọng tế bào đơn lẻ bằng cách phân loại tế bào hoặc phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Axit nucleic từ các tế bào huyết tương được nuôi cấy có thể được phân lập, được tách dòng và biểu hiện trong các tế bào HEK293T hoặc các tế bào chủ đã biết khác bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các dòng tế bào B được cố định hoặc các tế bào chủ được chuyển nạp theo sáng chế có thể được sử dụng theo nhiều cách khác nhau, ví dụ, như nguồn của các kháng thể đơn dòng, như nguồn của axit nucleic (ADN hoặc mRNA) mã hóa kháng thể đơn dòng được đề cập, để nghiên cứu, v.v..

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm bao gồm các tế bào nhớ B được cố định hoặc các tế bào chủ được chuyển nạp sản xuất các kháng thể theo sáng chế.

Dòng tế bào B được cố định hoặc các tế bào huyết tương được nuôi cấy theo sáng chế có thể được sử dụng làm nguồn của axit nucleic để tách dòng của các gen kháng thể đối với việc biểu hiện tái tổ hợp tiếp theo. Việc biểu hiện từ các nguồn tái tổ hợp là thông thường hơn đối với các mục đích được phẩm hơn biểu hiện từ các tế bào B hoặc các tế bào lai, ví dụ, cho các lý do ổn định, khả năng tái sinh, dễ dàng nuôi cấy, v.v..

Do đó, sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra tế bào tái tổ hợp, bao gồm các bước: (i) thu hoặc nhiều axit nucleic (ví dụ, mRNA chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ) từ dòng tế bào B hoặc các tế bào huyết tương được nuôi cấy mã hóa kháng thể được đề cập; (ii) chèn axit nucleic vào vector biểu hiện và (iii) chuyển nạp vector vào tế bào chủ để cho phép biểu hiện kháng thể được đề cập trong tế bào chủ đó.

Tương tự, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra tế bào tái tổ hợp, bao gồm các bước: (i) lập trình tự (các) axit nucleic từ dòng tế bào B hoặc các tế bào huyết tương được nuôi cấy mã hóa kháng thể được đề cập; và (ii) sử dụng thông tin trình tự từ bước (i) để tạo ra (các) axit nucleic để chèn vào tế bào chủ để cho phép biểu hiện của kháng thể được đề cập trong tế bào chủ đó. Axit nucleic có thể nhưng không cần được thao tác giữa các bước (i) và (ii) để đưa các vị trí giới hạn, để thay đổi cách sử dụng mã bộ ba, và/hoặc để tối ưu các trình tự điều hòa dịch mã và/hoặc phiên mã.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra tế bào chủ được chuyển nạp, bao gồm bước chuyển nạp tế bào chủ với một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa kháng thể

được đề cập, trong đó các axit nucleic là các axit nucleic có nguồn gốc từ dòng tế bào B được cố định hoặc tế bào huyết tương được nuôi cấy theo sáng chế. Do đó, các quy trình cho điều chế đầu tiên (các) axit nucleic và sau đó sử dụng nó để chuyển nạp tế bào chủ có thể được thực hiện tại các thời gian khác nhau bởi người khác nhau ở các địa điểm khác nhau (ví dụ, ở các nước khác nhau).

Sau đó, các tế bào tái tổ hợp này theo sáng chế có thể được sử dụng cho các mục đích nuôi cấy và biểu hiện. Chúng đặc biệt hữu ích đối với việc biểu hiện của các kháng thể đối với việc sản xuất dược phẩm quy mô lớn. Chúng cũng có thể được sử dụng làm thành phần hoạt tính của dược phẩm. Kỹ thuật nuôi cấy thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng, bao gồm nhưng không giới hạn ở môi trường nuôi cấy tĩnh, môi trường nuôi cấy lơ lửng trên con lăn, dịch lỏng cổ trứng, bình phản ứng kiểu sori rộng, thiết bị lên men nhỏ dạng môđun, bình khuấy, môi trường nuôi cấy chất vi mang, dịch truyền lõi xeramic, v.v..

Các phương pháp thu được và lập trình tự các gen globulin miễn dịch từ các tế bào B hoặc các tế bào huyết tương đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem chương 4 của Kuby Immunology, xuất bản lần thứ 4, 2000).

Tế bào chủ được chuyển nạp có thể là tế bào nhân thực, bao gồm các tế bào nấm men và tế bào động vật, cụ thể là các tế bào động vật có vú (ví dụ, các tế bào CHO, các tế bào NS0, các tế bào người chẳng hạn như các tế bào PER.C6 hoặc HKB-11, các tế bào u tủy, hoặc tế bào gan của người, chẳng hạn như Hepa RG), cũng như các tế bào thực vật, do đó các tế bào động vật có vú được ưu tiên. Các vật chủ biểu hiện được ưu tiên có thể glycosyl hóa kháng thể theo sáng chế, cụ thể với các cấu trúc carbonhydrat mà không phải tự sinh miễn dịch ở người. Theo một phương án, tế bào chủ được chuyển nạp có thể có khả năng sinh trưởng trong môi trường không chứa huyết thanh. Theo phương án khác, tế bào chủ được chuyển nạp có thể có khả năng sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy mà không có mặt các sản phẩm có nguồn gốc từ động vật. Tế bào chủ được chuyển nạp cũng có thể được nuôi cấy để tạo ra dòng tế bào.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra một hoặc nhiều phân tử axit nucleic (ví dụ, các gen chuỗi nhẹ và chuỗi nặng) mà mã hóa kháng thể được đề cập, bao gồm các bước: (i) tạo ra dòng tế bào B được cố định hoặc nuôi cấy các tế bào huyết tương theo sáng chế; (ii) thu được từ dòng tế bào B hoặc các tế bào huyết tương được nuôi cấy axit

nucleic mà mã hóa kháng thể được đề cập. Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp thu được trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể được đề cập, bao gồm các bước: (i) tạo ra dòng tế bào B được cố định hoặc nuôi cấy các tế bào huyết tương theo sáng chế; (ii) lập trình tự axit nucleic từ dòng tế bào B hoặc các tế bào huyết tương được nuôi cấy mã hóa kháng thể được đề cập.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra (các) phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể được đề cập, bao gồm bước thu được axit nucleic mà thu được từ dòng tế bào B được biến nạp hoặc các tế bào huyết tương được nuôi cấy theo sáng chế. Do đó, các quy trình thu được đầu tiên dòng tế bào B hoặc các tế bào huyết tương được nuôi cấy, và sau đó thu được (các) axit nucleic từ dòng tế bào B hoặc các tế bào huyết tương được nuôi cấy có thể được thực hiện ở các thời gian khác nhau bởi nhiều người khác nhau ở các địa điểm khác nhau (ví dụ, ở các quốc gia khác nhau).

Sáng chế còn bao gồm phương pháp tạo ra kháng thể (ví dụ, để sử dụng được phẩm) theo sáng chế, bao gồm các bước: (i) thu được và/hoặc lập trình tự một hoặc nhiều các axit nucleic (ví dụ, các gen chuỗi nhẹ và chuỗi nặng) từ dòng tế bào B được chọn hoặc các tế bào huyết tương được nuôi cấy biểu hiện kháng thể được đề cập; (ii) chèn (các) axit nucleic vào hoặc sử dụng (các) trình tự (các) axit nucleic để tạo ra vector biểu hiện; (iii) chuyển nạp tế bào chủ mà có thể biểu hiện kháng thể được đề cập; (iv) nuôi cấy hoặc nuôi cấy phụ các tế bào chủ được chuyển nạp trong các điều kiện mà kháng thể được đề cập được biểu hiện; và, tùy ý, (v) tinh sạch kháng thể được đề cập.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể bao gồm các bước: nuôi cấy hoặc nuôi cấy phụ quần thể tế bào chủ được chuyển nạp, ví dụ, quần thể tế bào chủ được chuyển nạp ổn định, trong các điều kiện mà kháng thể được đề cập được biểu hiện và, tùy ý, tinh sạch kháng thể được đề cập, trong đó quần thể tế bào chủ được chuyển nạp nêu trên đã được tạo ra bằng cách (i) tạo ra (các) axit nucleic mã hóa kháng thể đã chọn được đề cập mà được tạo ra bởi dòng tế bào B hoặc các tế bào huyết tương được nuôi cấy được tạo ra như được mô tả ở trên, (ii) chèn (các) axit nucleic vào vector biểu hiện, (iii) chuyển nạp vector trong tế bào chủ mà có thể biểu hiện kháng thể được đề cập, và (iv) nuôi cấy hoặc nuôi cấy phụ tế bào chủ được chuyển nạp bao gồm các axit nucleic được chèn để tạo ra kháng thể được đề cập. Do đó, các quy trình tạo ra đầu tiên tế bào chủ tái tổ hợp và sau đó nuôi cấy nó để biểu hiện kháng thể có thể được thực hiện tại các thời gian rất khác nhau bởi người khác nhau ở các địa điểm khác nhau (ví dụ, ở các

nước khác nhau).

Dược phẩm

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa một hoặc nhiều trong số:

- (i) kháng thể, hoặc mảnh kháng thể của nó theo sáng chế;
- (ii) axit nucleic mã hóa kháng thể, hoặc các mảnh kháng thể theo sáng chế;
- (iii) vectơ chứa axit nucleic theo sáng chế; hoặc
- (iv) tế bào biểu hiện kháng thể theo sáng chế hoặc chứa vectơ theo sáng chế.

Mặt khác, sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế và/hoặc tế bào theo sáng chế.

Tốt hơn là, dược phẩm có thể chứa chất mang dược dụng, chất pha loãng và/hoặc tá dược. Mặc dù, chất mang hoặc tá dược có thể tạo điều kiện thuận lợi cho việc dùng, nó không nên tự gây ra việc sản xuất kháng thể có hại cho cá thể tiếp nhận chế phẩm. Hoặc nó không nên có độc tính. Các chất mang thích hợp có thể là các đại phân tử lớn được chuyển hóa chậm chẳng hạn như các protein, polypeptit, liposom, polysacarit, axit polylactic, axit polyglycolic, axit amin polyme, copolyme axit amin và các hạt virus không hoạt tính. Thông thường, các chất mang dược dụng trong dược phẩm theo sáng chế có thể là các thành phần hoạt tính hoặc các thành phần không hoạt tính. Tốt hơn là, chất mang dược dụng trong dược phẩm theo sáng chế không phải là thành phần hoạt tính đối với viêm gan B hoặc D.

Các muối dược dụng có thể được sử dụng, ví dụ các muối axit khoáng, chẳng hạn như hydroclorua, hydrobromua, phosphat và sulphat, hoặc các muối của các axit hữu cơ, chẳng hạn như các axetat, propionat, malonat và benzoat.

Các chất mang dược dụng trong dược phẩm có thể chứa thêm các chất lỏng như nước, nước muối, glyxerol và etanol. Ngoài ra, các chất bổ trợ, như chất nhũ tương hóa hoặc chất làm ướt hoặc các chất đệm pH, có thể có mặt trong các chế phẩm này. Các chất mang này cho phép các dược phẩm được bào chế dưới dạng viên nén, viên tròn, viên bao đường, viên nang, lỏng, gel, xi-rô, huyền phù đặc, và huyền phù, để bệnh nhân dễ tiêu hóa.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được điều chế ở nhiều dạng khác nhau. Ví dụ, các chế phẩm có thể được điều chế như các chất tiêm, hoặc dưới dạng các dung dịch lỏng hoặc các huyền phù. Các dạng rắn thích hợp đối với dung dịch trong, hoặc huyền phù trong, các chất dẫn thuốc lỏng trước khi tiêm có thể được điều chế (ví dụ, chế phẩm đông khô, tương tự Synagis™ và Herceptin™, để hoàn nguyên với nước vô trùng chứa chất bảo quản). Chế phẩm có thể được điều chế để dùng tại chỗ, ví dụ, như thuốc mỡ, kem hoặc bột. Chế phẩm có thể được điều chế để dùng theo đường miệng, ví dụ, dưới dạng viên nén hoặc viên nang, dưới dạng xit, hoặc dưới dạng xi-rô (tùy ý có hương vị). Chế phẩm có thể được điều chế để dùng theo đường phổi, ví dụ, như ống hít, bằng cách sử dụng bột mịn hoặc dạng xit. Chế phẩm có thể được điều chế dưới dạng thuốc đạn hoặc thuốc đạn phụ khoa. Chế phẩm có thể được điều chế để dùng theo đường mũi, tai hoặc mắt, ví dụ, dưới dạng nhỏ giọt. Chế phẩm có thể ở dạng kit, được thiết kế sao cho chế phẩm kết hợp chỉ được hoàn nguyên trước khi dùng cho đối tượng. Ví dụ, kháng thể đông khô có thể được tạo ra ở dạng kit với nước vô trùng hoặc dung dịch đệm vô trùng.

Được ưu tiên là thành phần hoạt tính trong chế phẩm là phân tử kháng thể, hoặc mảnh kháng thể hoặc biến thể và các dẫn xuất của nó, cụ thể là thành phần hoạt tính trong chế phẩm là kháng thể, mảnh kháng thể hoặc các biến thể hoặc các dẫn xuất của nó, theo sáng chế. Như vậy, nó có thể dễ bị giảm bớt trong đường tiêu hóa dạ dày ruột. Do đó, nếu chế phẩm được dùng theo đường bằng cách sử dụng đường tiêu hóa dạ dày ruột, thì chế phẩm có thể chứa các chất mà bảo vệ kháng thể khỏi sự giảm bớt nhưng giải phóng kháng thể khi nó được hấp thụ từ đường tiêu hóa dạ dày ruột.

Một cuộc thảo luận kỹ lưỡng về các chất mang dược dụng có sẵn trong tài liệu Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, xuất bản lần thứ 20, ISBN: 0683306472.

Các chế phẩm theo sáng chế thường có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 8,5, theo một số phương án độ pH này nằm trong khoảng từ 6 đến 8, và theo các phương án khác độ pH là khoảng 7. Độ pH có thể được duy trì bằng cách sử dụng dung dịch đệm. Chế phẩm có thể là vô trùng và/hoặc không chứa chất gây sốt. Chế phẩm có thể là đẳng trương đối với người. Theo một phương án, các dược phẩm theo sáng chế được cung cấp trong các hộp chứa được hàn kín.

Trong phạm vi của sáng chế là các chế phẩm có mặt ở một số dạng dùng; các

dạng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các dạng này thích hợp cho việc dùng theo ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, bằng cách tiêm hoặc truyền, ví dụ bằng việc tiêm nhanh một liều thuốc hoặc truyền liên tục. Trong trường hợp sản phẩm để tiêm hoặc truyền, nó có thể được lấy ở dạng huyền phù, dung dịch hoặc nhũ tương trong dầu hoặc chất dẫn thuốc chứa nước và nó có thể chứa các chất bào chế như chất tạo huyền phù, chất bảo quản, chất ổn định và/hoặc chất phân tán. Theo cách khác, phân tử kháng thể có thể ở dạng khô, để hoàn nguyên trước khi sử dụng với chất lỏng vô trùng thích hợp. Chất dẫn thuốc thường được hiểu là chất mà thích hợp để lưu trữ, vận chuyển, và/hoặc dùng hợp chất, chẳng hạn như hợp chất có hoạt tính dược, cụ thể là các kháng thể theo sáng chế. Ví dụ, chất dẫn thuốc có thể là chất lỏng được dùng mà thích hợp để lưu trữ, vận chuyển, và/hoặc dùng hợp chất có hoạt tính dược, cụ thể là các kháng thể theo sáng chế. Khi được bào chế, các chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng trực tiếp cho đối tượng. Theo một phương án, các chế phẩm được làm thích hợp để dùng cho động vật có vú, ví dụ, các đối tượng người.

Các dược phẩm của sáng chế có thể được dùng theo một số đường bất kỳ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, theo các đường miệng, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong động mạch, nội tủy mạc, trong tử cung, trong tâm thất, trong tĩnh mạch, qua da, tại chỗ, dưới da, trong mũi, trong ruột, dưới lưỡi, âm đạo hoặc hậu môn. Các hypospray cũng có thể được sử dụng để đưa vào các dược phẩm theo sáng chế. Tốt hơn là, dược phẩm có thể được điều chế để dùng theo đường miệng, ví dụ, dưới dạng các viên nén, các viên nang và các dạng tương tự, để dùng tại chỗ, hoặc dưới dạng tiêm được, ví dụ, các dung dịch lỏng hoặc các huyền phù, nhờ đó được ưu tiên cụ thể là dược phẩm có thể tiêm được. Các dạng rắn thích hợp cho dung dịch trong, hoặc trong, chất dẫn thuốc lỏng trước khi tiêm cũng được ưu tiên, ví dụ, dược phẩm ở dạng đông khô.

Đối với việc tiêm, ví dụ, tiêm trong tĩnh mạch, qua da hoặc dưới da, hoặc tiêm ở vị trí của bệnh, thành phần hoạt tính sẽ tốt hơn là ở dạng dung dịch chứa nước chấp nhận ngoài đường tiêu hóa mà không có chất gây sốt và có độ ổn định, tính đẳng trương, và độ pH thích hợp. Các đường này liên quan đến lĩnh vực kỹ thuật mà có thể điều chế các dung dịch thích hợp sử dụng, ví dụ, các chất dẫn thuốc đẳng trương chẳng hạn như dung dịch tiêm natri clorua, dung dịch tiêm Ringer, dung dịch tiêm Lactat Ringer. Các chất bảo quản, chất ổn định, dung dịch đệm, chất chống oxy hóa và/hoặc các chất phụ gia có thể được bao gồm, nếu cần. Liệu nó là polypeptit, peptit, hoặc phân tử axit nucleic, hợp

chất hữu hiệu được khác theo sáng chế được quy định cho cá thể, việc dùng tốt hơn là với “lượng có hiệu quả phòng ngừa” hoặc “lượng có hiệu quả trị liệu” (trong trường hợp có thể), điều này đủ để thể hiện lợi ích cho cá thể. Lượng thực tế được dùng, và tỷ lệ và tiến trình thời gian dùng sẽ phụ thuộc vào bản chất và mức độ nghiêm trọng của những gì đang được điều trị. Với việc tiêm, được phẩm theo sáng chế có thể được đề xuất ví dụ ở dạng ống tiêm được làm đầy trước.

Dược phẩm theo sáng chế như được xác định ở trên cũng có thể được dùng theo đường miệng ở dạng liều chấp nhận được theo đường uống bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các viên nang, viên nén, các dung dịch hoặc huyền phù chứa nước. Trong trường hợp các viên nén dùng để sử dụng theo đường miệng, các chất mang thường được dùng bao gồm lactoza và tinh bột ngô. Các chất bôi trơn, như magie stearat cũng thường được thêm vào. Đối với việc dùng theo đường miệng ở dạng viên nang, chất pha loãng hữu hiệu bao gồm lactoza và tinh bột ngô khô. Khi các huyền phù chứa nước được yêu cầu để dùng theo đường miệng, thì thành phần hoạt tính, tức là phân tử liên hợp tải trọng vận chuyển theo sáng chế như được xác định ở trên, được kết hợp với các chất tạo huyền phù và chất nhũ hóa. Nếu muốn, một số chất tạo ngọt, tạo hương vị hoặc tạo màu cũng có thể được thêm vào.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng tại chỗ, cụ thể là khi đích điều trị bao gồm các khu vực hoặc các cơ quan có thể sẵn sàng được tiếp cận bởi việc dùng tại chỗ, ví dụ bao gồm các bệnh về da hoặc biểu mô có thể tiếp cận được khác. Các chế phẩm tại chỗ thích hợp được điều chế dễ dàng cho mỗi khu vực hoặc cơ quan trong số các khu vực hoặc cơ quan này. Đối với việc dùng tại chỗ, dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng thuốc mỡ thích hợp, chứa dược phẩm theo sáng chế, cụ thể là các thành phần của nó như được xác định ở trên, được tạo huyền phù hoặc được hòa tan ở một hoặc nhiều chất mang. Các chất mang để dùng tại chỗ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dầu khoáng, mỡ khoáng dạng lỏng, mỡ khoáng trắng, glycol propylen, polyoxyetylen, hợp chất polyoxypropylen, sáp nhũ tương và nước. Theo cách khác, dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở dạng kem hoặc thuốc xức ngoài da thích hợp. Trong bối cảnh của sáng chế, các chất mang thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dầu khoáng, sorbitan monostearat, polysorbat 60, sáp este xetyl, rượu xetearyl, 2-octyldodecanol, rượu benzylic và nước.

Liều lượng điều trị có thể là lịch trình đơn liều hoặc lịch trình đa liều, do đó trong

bối cảnh của sáng chế, lịch trình đa liều được ưu tiên. Các dược phẩm trên cơ sở kháng thể đã biết, cụ thể là các dược phẩm trên cơ sở kháng HBV, ví dụ, Hepatect® CP, cung cấp sự hướng dẫn liên quan đến tần suất dùng cụ thể với các chỉ định khác nhau, ví dụ, xem dược phẩm nên được phân phối theo ngày, theo tuần, theo tháng, v.v. hay không. Tần suất và liều lượng cũng có thể phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng.

Ví dụ, dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng hàng ngày, ví dụ, một hoặc vài lần mỗi ngày, ví dụ, một, hai, ba lần hoặc bốn lần mỗi ngày, tốt hơn là một hoặc hai lần mỗi ngày, tốt hơn nữa là một lần mỗi ngày, trong khoảng thời gian 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc 21 ngày hoặc nhiều hơn, ví dụ hàng ngày trong khoảng thời gian 1, 2, 3, 4, 5, 6 tháng. Tốt hơn là, dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng theo tuần, ví dụ, một hoặc hai lần mỗi tuần, trong khoảng thời gian 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc 21 tuần hoặc nhiều hơn, ví dụ hàng tuần trong khoảng thời gian 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, hoặc 12 tháng hoặc hàng tuần trong khoảng thời gian 2, 3, 4, hoặc 5 năm. Hơn nữa, dược phẩm theo sáng chế có thể được ưu tiên dùng hàng tháng, ví dụ, một lần mỗi tháng hoặc, tốt hơn nữa là, hai lần mỗi tháng trong khoảng thời gian 1, 2, 3, 4, hoặc 5 năm hoặc nhiều. Điểm cuối của việc dùng được ưu tiên là khi đảo ngược huyết thanh đạt đến, tốt hơn là điểm cuối của liệu pháp là sự vắng mặt kéo dài của HBsAg khỏi huyết thanh, được kèm theo bởi sự đảo ngược huyết thanh với các kháng thể kháng HBV. Cũng được ưu tiên là việc dùng tiếp tục đối với thời hạn sử dụng. Ngoài ra, một lần dùng duy nhất cũng được dự kiến, cụ thể là liên quan đến các chỉ định cụ thể, ví dụ để ngăn ngừa viêm gan B trong trường hợp bất ngờ tiếp xúc với các đối tượng không được miễn dịch.

Cụ thể, được ưu tiên là, đối với liều đơn, ví dụ liều hàng ngày, hàng tuần, hoặc hàng tháng, tốt hơn là đối với liều hàng tuần, số lượng kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó trong chế phẩm theo sáng chế không vượt quá 1g, tốt hơn là không vượt quá 500mg, tốt hơn nữa là không vượt quá 250mg, thậm chí tốt hơn nữa là không vượt quá 100mg, và cụ thể tốt hơn là không vượt quá 50mg.

Các dược phẩm thường bao gồm lượng “có hiệu quả” của một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế, tức là lượng đủ để điều trị, làm thuyên giảm, làm suy yếu hoặc ngăn ngừa các tình trạng hoặc bệnh mong muốn, hoặc để biểu hiện tác dụng trị liệu có thể phát hiện được. Các tác dụng trị liệu cũng bao gồm việc giảm và việc làm suy yếu độ

mạnh mẽ bệnh hoặc các triệu chứng thể chất. Lượng có hiệu quả chính xác đối đối tượng cụ thể bất kỳ sẽ phụ thuộc vào kích thước, cân nặng, và sức khỏe, và bản chất và sự kéo dài tình trạng của họ, các trị liệu hoặc dạng kết hợp các trị liệu được chọn để dùng. Lượng có hiệu quả cho tình huống cụ thể được xác định bởi thử nghiệm thông thường và nằm trong việc chỉ dẫn của bác sĩ. Đối với các mục đích của sáng chế, liều có hiệu quả sẽ thường nằm trong khoảng từ 0,005 đến 100 mg/kg, tốt hơn là từ 0,0075 đến 50 mg/kg, tốt hơn nữa là từ 0,01 đến 10 mg/kg, thậm chí tốt hơn nữa là từ 0,02 đến 5 mg/kg của kháng thể theo sáng chế (ví dụ, lượng kháng thể trong dược phẩm) liên quan đến trọng lượng cơ thể (ví dụ, đơn vị kg) của cá thể được dùng.

Ví dụ, trong bối cảnh của sự ghép gan, ví dụ, do suy gan gây ra bởi viêm gan B, lượng kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của chúng trong dược phẩm theo sáng chế, có thể tốt hơn là không vượt quá 50mg, tốt hơn nữa là không lớn hơn 10mg, đối với liều đơn trong ngày ghép, sau đó hoạt động không lớn hơn từ 10 đến 50mg, tốt hơn là không lớn hơn 2 đến 10mg, trên mỗi ngày trong khoảng thời gian 7 ngày và không lớn hơn từ 10 đến 50mg, tốt hơn là không lớn hơn từ 2 đến 10mg, trên mỗi liều đơn được dùng mỗi từ 1 đến 3 tháng để duy trì các mức huyết thanh kháng HBkháng Hbs khoảng 100IU/L.

Đối với việc điều trị viêm gan B mạn tính, ví dụ, kháng thể, hoặc mảnh kháng nguyên của nó, hoặc dược phẩm theo sáng chế, tốt hơn là được dùng dưới da, với liều đơn lên đến 500mg, tốt hơn là lên đến 250mg, tốt hơn nữa là lên đến 100mg của kháng thể theo sáng chế. Liều đơn này có thể được dùng hàng ngày, hàng tuần hoặc hàng tháng như được mô tả ở trên.

Hơn nữa, dược phẩm theo sáng chế cũng có thể bao gồm thành phần hoạt tính bổ sung, mà có thể là kháng thể hoặc thành phần, mà không phải là kháng thể. Tốt hơn là, thành phần hoạt tính bổ sung được chọn từ các chất ức chế polymeraza, interferon và/hoặc các chất ức chế điểm kiểm tra. Các chất ức chế polymeraza được ưu tiên bao gồm bao gồm Lamivudin, Adefovir, Entecavir, Telbivudin và Tenofovir. Các chất ức chế polymeraza ngăn chặn phiên mã ngược và tổng hợp của chuỗi ADN-plus. Các chất ức chế polymeraza không ngăn sự lây lan virus, sự tạo ra cccADN và không ảnh hưởng đến sự giải phóng HBsAg. Interferon bao gồm IFNalpha và IFNbeta, nhờ đó IFNbeta được ưu tiên. Các chất ức chế điểm kiểm tra được ưu tiên đề cập đến sự phong bế của PD-1/PD-L1 và/hoặc của CTLA4 và, do đó, bao gồm các kháng thể kháng PD-1, các

kháng thể kháng PD-L1 và các kháng thể kháng CTLA4. Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều thành phần hoạt tính bổ sung.

Kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế có thể có mặt hoặc trong cùng một dược phẩm làm thành phần hoạt tính bổ sung hoặc, tốt hơn là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế được chứa bởi dược phẩm thứ nhất và thành phần hoạt tính bổ sung được chứa bởi dược phẩm thứ hai khác với dược phẩm thứ nhất. Theo đó, nếu nhiều hơn một thành phần hoạt tính bổ sung được dự kiến, thì mỗi thành phần hoạt tính bổ sung và kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế tốt hơn là được chứa bởi dược phẩm khác nhau. Các dược phẩm khác nhau này có thể được dùng hoặc kết hợp/đồng thời hoặc ở các thời điểm riêng hoặc các địa điểm riêng (ví dụ, các bộ phận riêng của cơ thể).

Tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế và thành phần hoạt tính bổ sung tạo ra tác dụng trị liệu bổ sung, hoặc tốt hơn là, tác dụng trị liệu hiệp đồng. Thuật ngữ “hiệp đồng” được sử dụng để mô tả tác dụng kết hợp của hai hoặc nhiều chất có hoạt tính mà lớn hơn tổng tác dụng riêng lẻ của mỗi chất có hoạt tính tương ứng. Do đó, trường hợp tác dụng kết hợp của hai hoặc nhiều chất dẫn đến “sự ức chế hiệp đồng” của hoạt tính hoặc quy trình, có mục đích là sự ức chế hoạt tính hoặc quy trình lớn hơn tổng tác dụng ức chế của mỗi chất có hoạt tính tương ứng. Thuật ngữ “tác dụng trị liệu hiệp đồng” đề cập đến tác dụng trị liệu được quan sát với sự kết hợp của hai hoặc nhiều liệu pháp trong đó tác dụng trị liệu (khi được đo bởi thông số bất kỳ trong một số thông số) lớn hơn tổng tác dụng trị liệu riêng lẻ được quan sát với các liệu pháp riêng tương ứng.

Dược phẩm chứa kháng thể theo gHCB34 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, và chất mang dược dụng được ưu tiên.

Theo một phương án, chế phẩm theo sáng chế có thể chứa các kháng thể theo sáng chế, trong đó các kháng thể có thể chiếm ít nhất 50% theo trọng lượng (ví dụ, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn) của tổng số protein trong chế phẩm. Trong chế phẩm này, tốt hơn là các kháng thể ở dạng được tinh sạch.

Do đó, sáng chế còn đề xuất phương pháp điều chế dược phẩm, bao gồm các bước: (i) điều chế kháng thể của sáng chế; và (ii) trộn kháng thể được tinh sạch với một

hoặc nhiều các chất mang được dụng.

Theo phương án khác, phương pháp điều chế được phẩm bao gồm bước: trộn kháng thể với một hoặc nhiều chất mang được dụng, trong đó kháng thể là kháng thể đơn dòng thu được từ tế bào B được biến nạp hoặc tế bào huyết tương được nuôi cấy theo sáng chế.

Là cách thay thế để phân phối các kháng thể hoặc các tế bào B cho các mục đích trị liệu, có thể phân phối axit nucleic (thường là ADN) mà mã hóa kháng thể đơn dòng (hoặc mảnh có hoạt tính của nó) được đề cập có nguồn gốc từ tế bào B hoặc các tế bào huyết tương được nuôi cấy cho đối tượng, sao cho axit nucleic có thể được biểu hiện ở đối tượng tại chỗ để cung cấp tác dụng trị liệu mong muốn. Liệu pháp gen và các vectơ phân phối axit nucleic thích hợp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các được phẩm có thể bao gồm chất kháng vi sinh vật, cụ thể nếu được đóng gói ở dạng đa liều. Chúng có thể bao gồm chất tẩy rửa ví dụ, Tween (polysorbat), chẳng hạn như Tween 80. Các chất tẩy rửa thường có mặt ở các mức thấp, ví dụ, nhỏ hơn 0,01%. Các chế phẩm cũng có thể bao gồm các muối natri (ví dụ, natri clorua) để tạo ra trương lực. Ví dụ, thông thường nồng độ là $10 \pm 2 \text{ mg/ml NaCl}$.

Hơn nữa, các được phẩm có thể chứa rượu đường (ví dụ, manitol) hoặc disacarit (ví dụ, sucroza hoặc trehaloza) ví dụ, ở khoảng 15 đến 30 mg/ml (ví dụ, 25mg/ml), cụ thể là nếu chúng được đông khô hoặc nếu chúng bao gồm chất mà được hoàn nguyên từ chất đông khô. Độ pH của chế phẩm đối với quá trình làm đông khô có thể được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 5 đến 8, hoặc nằm trong khoảng từ 5,5 đến 7, hoặc khoảng 6,1 trước quá trình làm đông khô.

Các chế phẩm theo sáng chế cũng có thể chứa một hoặc nhiều chất điều hòa miễn dịch. Theo một phương án, một hoặc nhiều chất điều hòa miễn dịch bao gồm chất bổ trợ.

Các cách sử dụng và điều trị y khoa

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sử dụng kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế trong (i) phòng ngừa, điều trị hoặc làm suy yếu viêm gan B và/hoặc viêm gan D; hoặc trong (ii) chẩn đoán viêm gan B và/hoặc

viêm gan D.

Trong phạm vi của sáng chế có một số dạng và một số đường dùng kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, axit nucleic, vectơ, tế bào hoặc dược phẩm, như được mô tả ở trên đối với dược phẩm. Điều này áp dụng trong bối cảnh của việc sử dụng kháng thể, mảnh liên kết kháng nguyên của nó, axit nucleic, vectơ, tế bào như được mô tả ở trên, cụ thể về các dạng và các đường dùng được ưu tiên.

Các phương pháp chẩn đoán có thể bao gồm bước cho kháng thể hoặc mảnh kháng thể tiếp xúc với mẫu. Các mẫu này có thể được phân lập từ đối tượng, ví dụ mẫu mô được phân lập được lấy từ, ví dụ, đường mũi, các khoang mũi, các tuyến nước bọt, phổi, gan, thận, tai, mắt, nhau thai, đường tiêu hóa, tim, buồng trứng, thận trên, tuyến giáp, não, da hoặc máu, ưu tiên là huyết thanh. Các phương pháp chẩn đoán có thể bao gồm bước phát hiện phức hợp kháng thể/kháng nguyên, cụ thể là việc tiếp xúc tiếp của kháng thể hoặc mảnh kháng thể với mẫu. Bước phát hiện này thường được thực hiện ở bàn thí nghiệm, tức là mà không có sự tiếp xúc bất kỳ với cơ thể người hoặc cơ thể động vật. Các ví dụ về các phương pháp phát hiện đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, ví dụ, ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym).

Sáng chế còn đề xuất sử dụng (i) kháng thể, mảnh kháng thể, hoặc các biến thể hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế, (ii) dòng tế bào B được cố định theo sáng chế, (iii) axit nucleic hoặc vectơ theo sáng chế hoặc (iv) dược phẩm theo sáng chế trong (a) sản xuất thuốc để ngăn ngừa, điều trị hoặc làm suy yếu viêm gan B và/hoặc viêm gan D hoặc để (b) chẩn đoán viêm gan B và/hoặc viêm gan D.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế để sử dụng làm thuốc, cụ thể là để ngăn ngừa hoặc điều trị viêm gan B và/hoặc viêm gan D. sáng chế còn đề xuất sử dụng kháng thể theo sáng chế trong việc sản xuất thuốc để điều trị đối tượng và/hoặc chẩn đoán ở đối tượng. Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng dùng chế phẩm theo sáng chế. Theo một số phương án, đối tượng là người. Một cách để kiểm tra độ hiệu quả việc điều trị trị liệu bao gồm việc theo dõi các triệu chứng bệnh sau khi dùng chế phẩm theo sáng chế. Điều trị có thể là lịch trình đơn liều hoặc lịch trình đa

liều.

Theo một phương án, kháng thể, mảnh kháng thể, dòng tế bào B được cố định, hoặc được phẩm theo sáng chế được dùng cho đối tượng cần việc điều trị này. Đối tượng này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, người đặc biệt có nguy cơ hoặc nhạy cảm với viêm gan B và/hoặc viêm gan D.

Các kháng thể, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế này cũng có thể được sử dụng trong bộ kit để chẩn đoán viêm gan B và/hoặc viêm gan D. Hơn nữa, các quyết định kháng nguyên trong khu vực vòng kháng nguyên của HBsAg, có khả năng liên kết kháng thể theo sáng chế như được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong kit để theo dõi độ hiệu quả của các quy trình ứng dụng bằng cách phát hiện sự có mặt hoặc xác định hiệu giá của các kháng thể kháng HBV bảo vệ.

Tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế được sử dụng trong việc điều trị hoặc làm thuyên giảm viêm gan B mạn tính.

Đáng chú ý là, kháng thể theo sáng chế (i) trung hòa mạnh sự lây nhiễm HBV, (ii) liên kết với L-HBsAg (protein vỏ bọc HBV lớn, mà có mặt trong các hạt HBV lây nhiễm), do đó ngăn chặn sự lây lan của HBV, (iii) liên kết với S-HBsAg, do đó thúc đẩy sự thanh thải các hạt virus con (SVP) và (iv) có thể gây ra sự đảo ngược huyết thanh, tức là đáp ứng miễn dịch hoạt tính với virus.

Tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế được sử dụng trong việc ngăn ngừa sự lây nhiễm (lại) viêm gan B sau khi ghép gan cụ thể đối với suy gan do viêm gan B gây ra.

Với mục đích này, tốt hơn là liều cao có thể được dùng cho bệnh nhân tiếp nhận việc ghép gan trong ngày ghép và các liều hàng ngày có thể đưa ra hoạt động trong khoảng thời gian một tuần. Sau đó, tốt hơn là các liều khác có thể được đưa ra mỗi từ 1 đến 3 tháng để duy trì các mức huyết thanh kháng thể kháng HBV cao hơn 100 IU/ml.

Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng

chế hoặc được phẩm theo sáng chế được sử dụng trong việc ngăn ngừa/phòng ngừa viêm gan B ở các đối tượng không được miễn dịch. Điều này là ví dụ trong trường hợp (được giả định) tiếp xúc ngẫu nhiên với HBV (phòng ngừa sau phơi nhiễm). Thuật ngữ “các đối tượng không được miễn dịch” bao gồm các đối tượng, những người không bao giờ tiếp nhận được chủng ngừa vaccin, và do đó không được miễn dịch, và các đối tượng không thể hiện đáp ứng miễn dịch (không có kháng thể chống viêm gan B có thể đo được) sau khi chủng ngừa vaccin. Cụ thể là trong các nhóm sau, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế được sử dụng ngăn ngừa (tiếp tục) viêm gan B, tức là trái với phòng ngừa (tiếp tục) “phòng ngừa sau phơi nhiễm” tốt hơn là cho các đối tượng ở trên, người không thể hiện đáp ứng miễn dịch (không có kháng thể chống viêm gan B có thể đo được) sau khi chủng ngừa vaccin đối với người tiếp tục phòng ngừa là cần thiết.

Tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế được sử dụng trong việc phòng ngừa viêm gan B ở các bệnh nhân chạy thận nhân tạo.

Tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế được sử dụng trong việc ngăn ngừa viêm gan B ở trẻ sơ sinh. Theo đó, cụ thể là các trẻ sơ sinh của người mang virus viêm gan B/người mẹ không được miễn dịch được ưu tiên. Hơn nữa, được ưu tiên là kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế được dùng khi sinh hoặc sau khi sinh càng sớm càng tốt. Tốt hơn là, việc dùng có thể được lặp lại cho tới khi chủng ngừa vaccin sau khi đảo ngược huyết thanh.

Tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế được sử dụng trong việc điều trị hoặc làm thuyên giảm viêm gan D, tốt hơn là viêm gan B và viêm gan D, mà cụ thể là sự xuất hiện đồng thời viêm gan B và viêm gan D. Đáng chú ý là, kháng thể theo sáng chế không chỉ trung hòa mạnh virus viêm gan B mà còn trung hòa mạnh virus viêm gan delta. Do đó, kháng thể theo sáng

chế có thể cung cấp việc điều trị thứ nhất của viêm gan D.

Liệu pháp kết hợp

Việc dùng kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế trong các phương pháp và sử dụng theo sáng chế có thể được thực hiện đơn lẻ hoặc kết hợp với đồng chất (còn được gọi là “thành phần hoạt tính bổ sung” trong bản mô tả này) hữu ích trong việc điều trị và/hoặc ổn định bệnh hoặc các rối loạn cần được điều trị hoặc ngăn chặn.

Sáng chế bao hàm việc dùng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế, trong đó nó được dùng cho đối tượng trước, đồng thời hoặc theo trình tự với các phác đồ trị liệu hoặc các đồng chất hữu ích để điều trị, và/hoặc phòng ngừa viêm gan B. Kháng thể, axit nucleic, vectơ, tế bào hoặc được phẩm nêu trên mà được dùng đồng thời với các đồng chất có thể được dùng trong các chế phẩm giống nhau hoặc khác nhau bằng các đường dùng giống nhau hoặc khác nhau.

Các phác đồ trị liệu hoặc các đồng chất khác nêu trên có thể được chọn từ nhóm bao gồm các chất ức chế polymeraza, interferon và/hoặc các chất ức chế điểm kiểm tra.

Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế được dùng kết hợp với chất ức chế polymeraza, interferon và/hoặc chất ức chế điểm kiểm tra đối với việc sử dụng (y tế) được mô tả ở trên.

Các chất ức chế polymeraza được ưu tiên bao gồm bao gồm Lamivudin, Adefovir, Entecavir, Telbivudin và Tenofovir. Lamivudin là chất ức chế polymeraza được ưu tiên nhất. Các chất ức chế polymeraza ngăn chặn phiên mã ngược và tổng hợp của chuỗi ADN-plus. Các chất ức chế polymeraza không ngăn chặn sự lây lan virus, sự tạo ra cccADN và không ảnh hưởng đến sự giải phóng HBsAg.

Interferon bao gồm IFNalpha và IFNbeta, nhờ đó IFNbeta được ưu tiên.

Các chất ức chế điểm kiểm tra được ưu tiên đề cập đến sự phong bế của PD-1/PD-L1 và/hoặc của CTLA4 và, do đó, bao gồm các kháng thể kháng PD-1, các kháng

thể kháng PD-L1 và các kháng thể kháng CTLA4. Do đó, được phẩm theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều các thành phần hoạt tính bổ sung.

Đồng chất (các thành phần hoạt tính bổ sung) được ưu tiên khác được dùng kết hợp với kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vector theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế bao gồm các chất chủ vận LT β R.

Tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vector theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế được dùng kết hợp với chất ức chế polymeraza. Cụ thể, điều này áp dụng để sử dụng kết hợp trong việc phòng ngừa, điều trị hoặc làm suy yếu viêm gan B và/hoặc viêm gan D. Trong bối cảnh này, Các chất ức chế polymeraza được ưu tiên bao gồm bao gồm Lamivudin, Adefovir, Entecavir, Telbivudin và Tenofovir. Chất ức chế polymeraza được ưu tiên nhất là lamivudin.

Tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, axit nucleic, vector, tế bào hoặc được phẩm được dùng qua các đường dùng giống nhau hoặc khác nhau như chất ức chế polymeraza, interferon và/hoặc chất ức chế điểm kiểm tra.

Do đó, theo khía cạnh khác còn đề xuất dạng kết hợp của

(i) kht hợp ể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sể, hoặc, axit nucleic theo sáng chế, vector theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế; và

(ii) chất ức chế polymeraza, interferon và/hoặc chất ức chế điểm kiểm tra.

Dạng kết hợp này tốt hơn là được dùng trong việc phòng ngừa, điều trị hoặc làm suy yếu viêm gan B và/hoặc viêm gan D, cụ thể sử dụng trong việc điều trị viêm gan B mạn tính và/hoặc viêm gan D mạn tính. Tốt hơn nữa là, dạng kết hợp được sử dụng ở các bệnh nhân đơn nhiễm HBV hoặc ở các bệnh nhân đồng nhiễm HBV/HDV.

Tốt hơn là, dạng kết hợp này làm tăng tốc sự thanh thải HBsAg.

Với mục đích này, sáng chế còn đề xuất kit bao gồm

(i) kh) xuất ể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sể, hoặc, axit nucleic theo sáng chế, vector theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế; và

(ii) chất ức chế polymeraza, interferon và/hoặc chất ức chế điểm kiểm tra.

Ngoài ra, kit có thể bao gồm các phương tiện dùng kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vector theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế, chẳng hạn như ống tiêm hoặc bình và/hoặc tờ quảng cáo rời, ví dụ với các chỉ dẫn sử dụng kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vector theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế, và/hoặc chất ức chế polymeraza, interferon và/hoặc chất ức chế điểm kiểm tra.

Kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể có mặt hoặc trong cùng một dược phẩm làm thành phần hoạt tính bổ sung (đồng chất) hoặc, tốt hơn là, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế được chứa bởi dược phẩm thứ nhất và thành phần hoạt tính bổ sung (đồng chất) được chứa bởi dược phẩm thứ hai khác với dược phẩm thứ nhất. Do đó, nếu nhiều hơn một thành phần hoạt tính bổ sung (đồng chất) được quan tâm, thì mỗi thành phần hoạt tính bổ sung (đồng chất) và kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế tốt hơn là được chứa bởi dược phẩm khác nhau. Các dược phẩm khác nhau này có thể được dùng hoặc kết hợp/đồng thời hoặc ở các thời điểm riêng hoặc các địa điểm riêng (ví dụ, các bộ phận riêng của cơ thể).

Tốt hơn là, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế và thành phần hoạt tính bổ sung (đồng chất) tạo ra tác dụng trị liệu bổ sung, hoặc tốt hơn là, tác dụng trị liệu hiệp đồng. Như được mô tả ở trên, thuật ngữ “hiệp đồng” được sử dụng để mô tả tác dụng kết hợp của hai hoặc nhiều chất có hoạt tính mà lớn hơn tổng các tác dụng riêng lẻ của mỗi chất có hoạt tính tương ứng. Do đó, trường hợp tác dụng kết hợp của hai hoặc nhiều chất dẫn đến “sự ức chế hiệp đồng” của hoạt tính hoặc quy trình, có mục đích là sự ức chế hoạt tính hoặc quy trình lớn hơn tổng tác dụng ức chế của mỗi chất có hoạt tính. Thuật ngữ “tác dụng trị liệu hiệp đồng” đề cập đến tác dụng trị liệu được quan sát với sự kết hợp của hai hoặc nhiều liệu pháp trong đó tác dụng trị liệu (khi được đo bởi thông số bất kỳ trong một số thông số) lớn hơn tổng tác dụng trị liệu riêng lẻ được quan sát với các liệu pháp riêng tương ứng.

Cách sử dụng và các phương pháp

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sử dụng kháng thể, hoặc mảnh liên kết

kháng nguyên của nó theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế để theo dõi chất lượng của các vaccin kháng viêm gan B hoặc vaccin kháng viêm gan D bằng cách kiểm tra kháng nguyên của vaccin này chứa quyết định kháng nguyên đặc hiệu ở cấu dạng đúng.

Hơn nữa, sáng chế còn đề xuất sử dụng kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế trong việc chẩn đoán viêm gan B và/hoặc viêm gan D.

Ngoài ra, còn sử dụng kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế trong việc xác định xem liệu rằng mẫu máu được tách có nhiễm virus viêm gan B và/hoặc virus viêm gan delta được đề xuất.

Như được mô tả ở trên, các phương pháp chẩn đoán có thể bao gồm bước cho kháng thể hoặc mảnh kháng thể tiếp xúc với mẫu. Các mẫu này có thể được phân lập từ đối tượng, ví dụ mẫu mô được phân lập được lấy từ, ví dụ, đường mũi, các khoang mũi, các tuyến nước bọt, phổi, gan, thận, tai, mắt, nhau thai, đường tiêu hóa, tim, buồng trứng, thận trên, tuyến giáp, não, da hoặc máu, ưu tiên là huyết thanh. Các phương pháp chẩn đoán có thể bao gồm bước phát hiện phức hợp kháng thể/kháng nguyên, cụ thể là sự tiếp xúc của kháng thể hoặc mảnh kháng thể với mẫu. Bước phát hiện này thường được thực hiện ở bàn thí nghiệm, tức là mà không có sự tiếp xúc bất kỳ với cơ thể người hoặc cơ thể động vật. Các ví dụ về các phương pháp phát hiện đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, ví dụ, ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym).

Sáng chế còn đề xuất phương pháp ngăn ngừa và/hoặc điều trị viêm gan B và/hoặc viêm gan D ở đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần phương pháp này dùng kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế, hoặc được phẩm theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị đối tượng đã tiếp nhận việc ghép gan bao gồm bước cho đối tượng đã tiếp nhận việc ghép gan dùng một lượng có hiệu quả của kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, axit nucleic theo

sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế.

Trong phương pháp nêu trên, đối tượng bị bệnh viêm gan B mạn tính được ưu tiên.

Hơn nữa, các chi tiết được mô tả trước đó, cụ thể là trong bối cảnh của được phẩm và sử dụng y tế, cũng được áp dụng đối với các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, trong các phương pháp được mô tả ở trên, kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc được phẩm theo sáng chế tốt hơn là được dùng kết hợp với chất ức chế polymeraza, interferon và/hoặc chất ức chế điểm kiểm tra như được mô tả ở trên.

Các ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, các ví dụ cụ thể minh họa theo các phương án và các khía cạnh khác nhau của sáng chế sẽ được mô tả. Tuy nhiên, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn bởi các phương án cụ thể được mô tả trong phần này. Các ví dụ và sự chuẩn bị sau đây được đưa ra để cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rõ hơn và có thể thực hiện sáng chế. Tuy nhiên, phạm vi bảo hộ của sáng chế không bị giới hạn bởi các phương án minh họa này, mà chỉ với mục đích minh họa từng khía cạnh của sáng chế, và các phương pháp thực hiện tương ứng đều nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế. Thực vậy, các cải biến khác nhau theo sáng chế cùng với các sửa đổi được mô tả ở đây có thể trở nên rõ ràng với những người có chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật từ bản mô tả đã nêu và các hình vẽ kèm theo và các ví dụ dưới đây. Tất cả các cải biến này đều nằm trong phạm vi bảo hộ của bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1: Xác định và mô tả đặc điểm kháng thể đơn dòng HBC34

Kháng thể đơn dòng ở người được phân lập theo các tương tự như được mô tả trong Traggiai E. và cộng sự, 2004, Nat Med 10(8): 871-5 từ người bệnh. Kháng thể được mô tả bằng cách xác định các trình tự nucleotit và amino axit của các vùng biến đổi của nó (bảng 2 và bảng 3) và các vùng xác định bổ sung (CRD) trong đó và gọi là “HBC34”. Theo đó, HBC34 là kháng thể đơn dòng hoàn toàn ở người loại IgG1 có các trình tự CDR, VH và VL như được minh họa trong bảng 2 và bảng 3.

Tiếp theo, người ta xác định định được ba kiểu huyết thanh HBsAG là adw, ady,

và ayw mà kháng thể đơn dòng ở người HBC34 liên kết. Ngạc nhiên là, HBC34 liên kết có ái lực cao với ba kiểu huyết thanh HBsAg (adw, ady và ayw) với các giá trị EC50 tương tự và thấp hơn, như được đo bằng phương pháp ELISA (Fig. 1).

Các hiệu giá bảo vệ của các kháng thể HBV được biểu diễn theo đơn vị quốc tế (IU) cho phép chuẩn hóa theo các thử nghiệm khác nhau. Năm 1997, mẫu tham khảo quốc tế về globulin miễn dịch kháng HB (W1042) được thành lập. Huyết tương sử dụng trong mẫu của chuẩn này có nguồn gốc từ người mà bị nhiễm virus viêm gan B tự nhiên (Barker, L. F., D. Lorenz, S. C. Rastogi, J. S. Finlayson, và E. B. Seligmann. 1977. Study of a proposed international reference preparation for antihepatitis B immunoglobulin. WHO Expert Committee on Biological Standardization technical report series. WHO Expert Committee on Biological Standardisation 29th Report BS 77.1 164. Geneva, Switzerland, World Health Organization, 1977; World Health Organization: Anti-hepatitis B immunoglobulin. WHO Tech Rep Ser 1978; 626:18). Hoạt tính của HBC34, khi được đo chẩn đoán bằng xét nghiệm miễn dịch (xét nghiệm miễn dịch chẩn đoán của kiến trúc sư Abbott), là 5.000 IU/mg. Khi so sánh với hoạt tính của HBIG là ~ 1 IU/mg.

Ví dụ 2: Kháng thể HBC34 trung hòa mạnh HBV và HDV lây nhiễm.

Mục đích thứ nhất của ví dụ 2 là xác định liệu HBC34 trung hòa HBV lây nhiễm và so sánh hoạt tính trung hòa của HBC34 với hoạt tính trung hòa của các kháng thể kháng HB khác. Với mục đích này, các tế bào HepaRG đã biệt hóa được ủ ấm với lượng cố định của HBV trong sự có mặt hoặc vắng mặt của các kháng thể (HBC34, 18/7, Ab2, Ab3 và HBIG) trong môi trường bổ sung 4% PEG 8000 (Sigma-Aldrich) trong 16 giờ ở 37°C. Vào cuối giai đoạn ủ ấm, các tế bào được rửa và sau đây được nuôi cấy. Thay đổi môi trường sau 3 ngày. Sự lây nhiễm được phát hiện bằng cách đo bằng phương pháp xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA), các mức độ của kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg) và kháng nguyên e viêm gan B (HBeAg) được tiết vào trong môi trường nuôi cấy dịch nổi từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 11 sau khi lây nhiễm và bằng cách phát hiện HBcAg nhuộm trong thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang.

Như được minh họa trong các Fig. 2 và Fig. 3, HBC34 trung hòa hoàn toàn sự lây nhiễm HBV khi kiểm tra ở 5 và 0,5 µg/ml, trong khi các kháng thể kháng HB đơn

dòng của người so sánh Ab2 và Ab3, mà cũng liên kết với HBsAg, nhưng không dẫn đến trung hòa hoàn toàn. Điều đó cho thấy rằng không phải tất cả các kháng thể liên kết với HBsAg có thể trung hòa lây nhiễm HBV (ví dụ, Ab2 và Ab3). Lưu ý, HBIG trung hòa lây nhiễm HBV chỉ khi thử nghiệm ở 5.000 và 500 µg/ml, với độ hiệu nghiệm thấp gấp 1.000 lần so với HBC34. 18/7 là kháng thể đơn dòng chuột kháng vùng Pre-S1 của HBsAg.

Mục đích thứ hai của ví dụ 2 là xác định hoạt tính trung hòa của HBC34 kháng HDV trên các tế bào HepaRg đã biệt hóa. Huyết thanh từ các chất mang HDV được sử dụng như là chất nhiễm truyền HDV. Nhuộm huỳnh quang miễn dịch kháng nguyên delta được sử dụng như là chỉ báo. Như được minh họa trong Fig. 4, HBC34 đã phong bế hoàn toàn sự lây nhiễm HDV khi được thử nghiệm ở 0,12 µg/ml. Khi so sánh, HBIG cũng được thử nghiệm và không hiệu quả (được thử nghiệm ở 1/1.000, tức là 50 µg/ml).

Ví dụ 3: Kháng thể HBC34 nhận biết tất cả 10 kiểu gen HBV là A, B, C, D, E, F, G, H, I và J.

HBC34 được thử nghiệm khả năng để nhận biết 10 kiểu gen HBV là A, B, C, D, E, F, G, H, I và J (như được minh họa trong Fig. 5) bằng phân tích và đo tế bào theo dòng chảy. Cụ thể, các tế bào biểu mô người (các tế bào Hep2) được chuyển nạp bằng plasmit biểu hiện với mỗi HBsAg của 10 kiểu gen HBV A, B, C, D, E, F, G, H, I, và J (như được minh họa trong Fig. 5). Kháng thể đơn dòng của người HBC34 (5 µg/ml) và kháng thể đối chứng (5 µg/ml) được sử dụng để nhuộm các tế bào được thâm được chuyển nạp tạm thời. Hai ngày sau khi chuyển nạp, các tế bào Hep2 được thu thập, cố định và nhuộm với saponin để nhuộm miễn dịch với HBC34 hoặc đối chứng Ab. Liên kết của các kháng thể với các tế bào chuyển nạp được phân tích bằng Becton Dickinson FACSCanto2 (BD Biosciences) với phần mềm FlowJo (TreeStar). Như được minh họa trong Fig. 6, HBC34 đã nhận biết tất cả 10 kiểu gen HBsAg với các mẫu nhuộm tương tự.

Ví dụ 4: Kháng thể HBC34 nhận biết tất cả đột biến HBsAg chức năng.

HBC34 được thử nghiệm về khả năng liên kết với các đột biến 19 kiểu gen HBsAg D khác nhau (trên cơ sở kiểu gen HBsAg D, số đăng ký ngân hàng gen FJ899792, như được minh họa trong Fig.7) HBsAg Y100C/P120T, HBsAg P120T, HBsAg P120T/S143L, HBsAg C121S, HBsAg R122D, HBsAg R122I, HBsAg T123N,

HBsAg T123N/C124R, HBsAg Q129H, HBsAg Q129L, HBsAg M133H, HBsAg M133L, HBsAg M133T, HBsAg K141E, HBsAg P142S, HBsAg S143K, HBsAg D144A, HBsAg G145R và HBsAg N146A (xem SEQ ID NO số 16 – 33 đối với các trình tự amino axit của vùng vòng lặp kháng nguyên của những đột biến này) bằng phân tích và đo tế bào theo dòng chảy. Cụ thể, các tế bào biểu mô người (các tế bào Hep2) được chuyển nạp bằng các plasmid biểu hiện các đột biến HBsAg khác nhau và phân tích như là trong ví dụ 3. 5 µg/ml của kháng thể đơn dòng người HBC34 và hai kháng thể đơn dòng HBsAg đặc hiệu khác (Ab5 và Ab6) được sử dụng để thử nghiệm liên kết HBC34 với các tế bào Hep2 được chuyển nạp.

Như được minh họa trong Fig. 8, HBC34 được phát hiện liên kết với 18 trong số 19 đột biến HBsAg. Liên kết HBC34, nhưng không phải là liên kết Ab5 và Ab6, hoàn toàn bị hủy bỏ chỉ trong đột biến HBsAg T123N/C124R, tức là khi cả hai gốc 123 và 124 bị đột biến. Lưu ý, đột biến của hai gốc này (tức là, T123 và C124) thành alanin được minh họa liên quan đến sự thiếu hụt tính lây nhiễm HBV, mà có khả năng nhiều nhất do thiếu cầu disulphua tạo ra bởi C124 mà dẫn đến sự thay đổi cấu hình trong vòng lặp kháng nguyên (Salisse J. và Sureau C., 2009, Journal of Virology 83: 9321-9328). Do vậy, kháng thể đơn dòng người HBC34 liên kết với các đột biến 18 HBsAg.

Ví dụ 5: Kháng thể HBC34 liên kết với quyết định kháng nguyên đa hình được bảo tồn trong vòng lặp kháng nguyên.

Quyết định kháng nguyên được nhận diện bằng HBC34 được xác định bằng cách sử dụng thư viện các peptit 650 tuyến tính và peptit vòng lặp (kỹ thuật “bản đồ quyết định kháng nguyên không liên tục CLIPS” từ Pepscan, Lelystad, Hà Lan) được thiết kế để chồng phủ toàn bộ vùng vòng lặp kháng nguyên của HBsAg. Các peptit tuyến tính được tổng hợp dựa trên Fmoc-hóa học tiêu chuẩn. Các peptit vòng lặp được tổng hợp trên khung hóa học để xây dựng lại các quyết định kháng nguyên đa hình, bằng cách sử dụng các peptit liên kết hóa học trên khung (Chemically Linked Peptides on Scaffolds-CLIPS), kỹ thuật này như được mô tả trong Timmerman và cộng sự, 2007, Journal of Molecular Recognition 20: 283-99. Ví dụ, các peptit vòng lặp đơn được tổng hợp có hai cysteine và kích thước vòng lặp là khác nhau bằng cách đưa các gốc cysteine ở khoảng cách khác nhau. Nếu các gốc cysteine khác ngoài các gốc cysteine mới đưa vào có mặt, chúng có thể được thay thế bằng alanin. Các mạch bên của nhiều cysteine trong peptit được liên kết với khuôn CLIPS bằng cách phản ứng trên các thẻ PEPSCAN

polypropylen định dạng thẻ tín dụng (thẻ/các khuôn peptit 455) với 0,5mM dung dịch khung CLIPS như là 1,3-bis (brommetyl)benzen trong amoni bicacbonat. Liên kết của kháng thể với mỗi peptit được kiểm tra bằng kỹ thuật ELISA trên cơ sở PEPSCAN. Các thẻ polypropylen định dạng thẻ tín dụng 455 giếng chứa các peptit liên kết cộng hóa trị được ủ ấm bằng kháng thể thử nghiệm (tại 1 µg/ml) trong dung dịch chặn. Sau khi rửa cơ chất peroxidaza 2,2'-azino-di-3-etylbenzthiazolin sulfonat (ABTS) và 2µl của 3% H₂O₂ được bổ sung vào. Sau một giờ, sự mở rộng màu sắc được đo bằng máy ảnh - thiết bị tích điện kép (charge coupled device - CCD) và hệ thống xử lý hình ảnh. Dữ liệu chưa xử lý là các giá trị quang học và nằm trong khoảng từ 0 đến 3.000 (thang loga tương tự từ 1 đến 3 của bộ đọc ELISA tấm 96 giếng chuẩn).

Như được minh họa trong Fig. 9, HBC34 được phát hiện để nhận diện peptit vòng lặp đôi có trình tự amino axit theo SEQ ID NO 52:

XGSSTTSTGPCRTCMTXPSDGNATAIPIPSWX

trong đó các các gốc được mã hóa là X được thế bằng xystein và các gốc gạch dưới được thế từ C đến A (SEQ ID NO 52).

Ba pepit bổ sung được nhận dạng bằng tín hiệu thấp hơn:

(a) peptit 15-mer tuyến tính có trình tự amino axit theo SEQ ID NO 53:

TSTGPCRTCMTTAQG

(SEQ ID NO 53),

(b) peptit tuyến tính khác có trình tự amino axit theo SEQ ID NO 54:

GMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTT

(SEQ ID NO 54),

và (c) peptit vòng lặp đôi có trình tự amino axit theo SEQ ID NO 55:

XSMYPSASATKPSDGNXTGPCRTCMTTAQGTSX

trong đó các các gốc được mã hóa dưới dạng X được thế bằng xystein và các gốc gạch dưới được thế từ C đến A (SEQ ID NO 55).

Phân tích này biểu thị quyết định kháng nguyên chính của HBC34 được tạo ra bởi quyết định kháng nguyên đa hình được tạo ra bởi trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 56:

PCRTCMTTAQG

(SEQ ID NO 56; các amino axit 120-130 của miền S của HBsAg (HBV-D

J02203).

Cụ thể hơn, như được minh họa trong Fig. 10, kháng thể đơn dòng người HBC34 không phản ứng ở trong tất cả các thử nghiệm của kỹ thuật western blot trên các hạt virus HBV trong các điều kiện giảm.

Các kết quả này xác nhận rằng quyết định kháng nguyên của HBsAg, đối với cái mà HBC34 liên kết, là quyết định kháng nguyên đa hình.

Kết quả này phù hợp với kết quả quan sát trong Fig. 4 vị trí tại đó liên kết HBC34 bị mất khi xuất hiện các đột biến T123N/C124R.

Vùng của HBsAg, bao gồm quyết định kháng nguyên đa hình, là phần mà HBC34 liên kết, là đa hình trong các kiểu gen HBV khác nhau. Trong trình tự chung dưới đây của vùng quyết định kháng nguyên của HBsAg, các gốc đột biến trong các kiểu gen khác nhau được minh họa là X:

PCX₁TCX₂X₃X₄AQG,

trong đó X₁ tốt hơn là R hoặc K,

X₂ tốt hơn là M hoặc T,

X₃ tốt hơn là T hoặc I, và

X₄ tốt hơn là T, P hoặc L

(SEQ ID NO: 57).

Ngoài ra, sự so sánh bổ sung cả các trình tự ở trên so với 18 đột biến HBsAg, phần mà kháng thể đơn dòng người HBC34 liên kết vào, chỉ ra rằng HBC34 liên kết với quyết định kháng nguyên được tạo thành bởi trình tự amino axit theo SEQ ID NO: 2:

X₁ X₂ X₃ TC X₄ X₅ X₆A X₇G

trong đó X₁ là P, T hoặc S,

X₂ là C hoặc S,

X₃ là R, K, D hoặc I,

X₄ là M hoặc T,

X₅ là T, A hoặc I,

X₆ là T, P hoặc L, và

X₇ là Q, H hoặc L.

Ví dụ 6: Sử dụng HBC34 bắt đầu 3 tuần sau khi lây nhiễm HBV ngăn ngừa

sự lây lan virus ở chuột nhắt uPA được làm giống người.

Mục đích của ví dụ 6 là khảo sát liệu kháng thể đơn dòng người HBC34 có thể ngăn ngừa sự lây lan của HBV. Nói cách khác, với mục đích là khảo sát khả năng của chất ức chế xâm nhiễm là kháng thể HBC34 ức chế sự lây nhiễm của tế bào gan người *in vivo* bằng cách xử lý chuột nhắt sau khi hoàn thành lây nhiễm ban đầu. Với mục đích này, chuột nhắt uPA/SCID non đã phục hồi quần thể tế bào gan người sơ cấp (xem Petersen và cộng sự Nature Biotechnology, 2008, 26:335-341) được sử dụng. Các con chuột nhắt này được ghép với các tế bào gan người bảo quản lạnh bằng cách tiêm trong lách. Tám tuần sau khi sự phục hồi quần thể của các tế bào gan người thành công trong gan vật chủ được xác định bằng cách đo anbumin huyết thanh người, mà được biểu hiện riêng biệt bởi các tế bào gan người được cấy ghép. Chuột nhắt có các mức anbumin người thích hợp được tiêm truyền trong màng bụng với 5×10^7 bản sao đương lượng của hệ gen HBV (kiểu gen D, HBeAg dương tính) cho phép xâm nhiễm virus. Ba tuần sau khi lây nhiễm, quy trình chuẩn điều trị bắt đầu nhờ đó chuột nhắt nhận sự điều trị HBC34 (1 mg/kg tiêm trong màng bụng hai lần một tuần), kháng thể đối chứng hoặc entecavir (1 µg/ml ETV trong nước sử dụng theo đường miệng, dung dịch Baraclude, Bristol-Myers Squibb) trong sáu tuần. Mẫu gan được lấy khi chết được làm đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng để phân tích miễn dịch huỳnh quang.

ADN HBV được tách từ các mẫu huyết thanh bằng cách sử dụng kit ly tâm virus QiAmp MinElute (Qiagen, Hilden, Germany). Các môi đặc hiệu với HBV và đầu dò lai hóa được sử dụng để xác định ADN HBV virus huyết và cccAND tải định lượng như được mô tả trước đó (Volz T và cộng sự, Gastroenterology 2007;133: 843–852). ADN và ARN được tách từ các mẫu gan sử dụng kit tinh sạch ADN tinh khiết gốc (Epicentre, Biozym, Germany) và kit tinh sạch ARN RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany). Các giá trị ADN HBV trong gan được chuẩn hóa cho các lượng ADN tế bào sử dụng kit gen beta-globin (kit đối chứng ADN Roche, chẩn đoán Roche). Các mức rcADN được tính toán bằng cách sử dụng các lượng cccADN từ tổng số ADN HBV. Các ARN virus và ARN hệ gen được sao chép ngược bằng cách sử dụng các môi oligo-dT và Kit sao chép (Roche Applied Science) và xác định số lượng bằng cách sử dụng các môi đặc hiệu cho các ARN virus tổng số. Các mức ARN HBV được chuẩn hóa với ARN GAPDH đặc hiệu người. Quá trình định lượng ABsAg từ các mẫu máu được thực hiện bằng cách sử dụng nền tảng kiến trúc sư Abbott (kit định lượng HBsAg, Abbott, Ireland, phòng chẩn

đoán), như được giới thiệu bởi nhà sản xuất. Các phần điều nhiệt của gan chuột khảm được nhuộm miễn dịch sử dụng cytokeratin-18 đơn dòng đặc hiệu người (Dako, Glostrup, Đan Mạch) để nhuộm tế bào gan người. Để phát hiện kháng nguyên lõi HBV (BHcAg), HBcAg kháng ở thô đa dòng được sử dụng. Các tín hiệu đặc hiệu được quan sát bằng cách sử dụng các kháng thể thứ cấp được đánh dấu Alexa (Invitrogen, Darmstadt, Đức) hoặc hệ thống (HBcAg) TSA-Florescein (Perkin Elmer, Jügesheim, Đức), trong khi nhuộm nhân được thu nhận bằng Hoechst 33342 (Invitrogen). Các phần được nhuộm được phân tích bằng kính hiển vi huỳnh quang.

Mức cơ sở trung bình của ADN HBV tại lúc bắt đầu điều trị là 2×10^6 bản sao ADN/ml. Pha truyền nhiễm của sự lây nhiễm HBV (từ tuần 3 đến tuần 6 sau lây nhiễm) virus huyết tăng $>2\log$ trong nhóm nhận kháng thể đối chứng, trong khi hiệu giá HBV giảm ở chuột nhất được điều trị bằng HBC34 hoặc entecavir (Fig. 11).

Chuột nhất cũng được phân tích bên trong gan vào cuối quá trình thí nghiệm (tức là, tuần 9) bằng cách nhuộm các tế bào gan với sự có mặt của HBcAg. Gần như tất cả các tế bào gan nhuộm HBcAg dương trong chuột nhận kháng thể đối chứng, trong khi sự lây lan bị ngăn chặn hiệu quả bởi cả hai, sự điều trị bằng entecavir và sự điều trị bằng HBC34 (khoảng từ 1-5% các tế bào tính với HBcAg). Các kết quả này chỉ ra rằng HBC34 có thể ngăn chặn hiệu quả sự lây lan virus trong pha tăng nhanh của sự lây nhiễm HBV (Fig. 12).

Phù hợp với dữ liệu mô học và huyết thanh học, các phương pháp đo cccADN cho thấy rằng các tải cccADN trong gan không khác biệt đáng kể giữa chuột nhất bị chết 3 tuần sau khi lây nhiễm HBV và chuột nhất được điều trị từ tuần 3 đến tuần 9 sau khi lây nhiễm. Theo sự so sánh, lượng ước lượng của cccADN/tế bào tăng lên đến 2 log trong nhóm đối chứng chết 9 tuần sau lây nhiễm, cho thấy rằng các rcADN mới tạo thành có thể bị chuyển hiệu quả thành cccADN trong chuột điều trị (Fig. 13). Xu hướng giống vậy cũng được phát hiện bằng cách đo các thông số virus trong gan khác, như là các mức của bản sao ADN vòng tròn giãn (rcADN) và ARN HBV.

Hơn nữa, các mức HBsAg tuần hoàn máu được đo ở đường chuẩn (BL), tuần 3 khi điều trị (tuần 6 sau lây nhiễm) và tuần 6 khi điều trị (tuần 9 sau lây nhiễm). Cần lưu ý rằng các mức HBsAg tuần hoàn giảm $>1 \log$ (và dưới giới hạn phát hiện) trong chuột nhất nhận HBC34, nhưng không có ở chuột nhất được điều trị bằng entecavir, trong chi

các mức HBsAg tăng >2 log (đạt đến các mức từ 5.000-10.000 Iu/ml) trong nhóm đối chứng (Fig. 14). Phương pháp đo HBsAg không bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của kháng thể HBC34 như được xác định trong thí nghiệm tăng trong tại đó sự bổ sung kháng thể HBC34 vào trong huyết thanh chuột HBsAg dương không làm thay đổi phương pháp đo mong đợi sử dụng xét nghiệm miễn dịch chẩn đoán của kỹ sư Abbott.

Các kết quả này chỉ ra rằng HBC34 có thể ngăn chặn sự lây lan virus HBV và thúc đẩy sự thanh thải của HBsAg.

Ví dụ 7: Sử dụng HBC34 trong chuột nhắt uPA được làm giống người nhiễm HBV mạn tính được thúc đẩy sự thanh thải HBV và HBsAg.

Để bắt trước thiết lập viêm gan B mạn tính, chuột nhắt uPA/SCID non được làm giống người được lây nhiễm HBV và sau 12 tuần sau khi lây nhiễm, các mức trung bình của ADN HBV là 2×10^9 bản sao/ml và các mức HBsAg 10.000 IU/ml đạt được. Các mức này là cao bằng các mức mà thường được quan sát ở người bệnh bị lây nhiễm HBV mạn tính.

Sau đó, chuột nhắt được điều trị bắt đầu từ tuần 12 sau khi lây nhiễm với HBC34 hoặc với kháng thể đối chứng trong 6 tuần (1 mg/kg tiêm qua màng bụng hai lần mỗi tuần). Như được minh họa trong Fig. 15, hiệu giá HBV và các mức HBsAg tuần hoàn máu giảm xuống trong chuột nhắt nhận HBC34 trong 3 tuần (tuần thứ 15 sau khi lây nhiễm) và tuần 6 (tuần 18 sau khi lây nhiễm). Do đó, HBC34 thúc đẩy sự giảm rõ ràng virus huyết BMV và các mức HBsAg rõ rệt sau 6 tuần điều trị. Các nồng độ albumin người và HBeAg không bị thay đổi trong chuột điều trị HBC34 cho thấy không gây độc tính gan.

Ví dụ 8: Sử dụng HBC34 ngăn chặn sự lây nhiễm HDV *in vivo*

Chuột nhắt uPA/SCID non được làm giống người được đồng nhiễm với huyết thanh từ người bệnh chứa ARN-HDV và ADN-HBV. Năm tuần sau khi lây nhiễm (khi các hiệu giá HBV đạt đến các mức nằm trong khoảng từ 10^7 đến 10^9 , ARN HDV đạt đến các mức nằm trong khoảng từ 10^3 đến 10^6 bản sao/ml), chuột nhắt được điều trị bằng HBC34 hoặc kháng thể đối chứng trong 6 tuần (1 mg/kg tiêm dưới màng bụng hai lần trên tuần).

Virus huyết ADN HBV được đo như được mô tả trong các ví dụ 6 và ví dụ 7.

Virut huyết HDV được xác định thông qua sao chép ngược của ARN virut (được tách từ mẫu huyết thanh sử dụng kit ly tâm virut MinElute QiAmp, Qiagen, Venlo, Hà Lan) và RT-PCR định lượng sử dụng ABI Fast 1-Step Virus Master (Applied Biosystems, Carlsbad, Mỹ), các đầu dò và môi đặc hiệu HDV trên ABI Vii7 (Applied Biosystems, Carlsbad, Mỹ).

Như được minh họa trong Fig. 16, HBC34 ngăn chặn hiệu quả sự lây lan virut HDV cả 3 tuần và 6 tuần sau khi điều trị (tuần 8 và tuần 11 tương ứng). Tương tự với kết quả quan sát trên chuột bị nhiễm mạn tính HBV, HBC34 thúc đẩy sự giảm hiệu giá ADN virut HBV 2 log (Fig. 13).

Ví dụ 9: Tinh chỉnh bản đồ quyết định kháng nguyên của quyết định kháng nguyên không liên tục HBC34.

Để tiếp tục tinh chỉnh lại quyết định kháng nguyên được nhận biết bởi các kháng thể HBC34 được mô tả trong ví dụ 5, thư viện peptit 1520 mới bao gồm 16 tập hợp khác nhau được tạo ra:

- Tập hợp 1 (gọi là LIN15): Các peptit 15-mer tuyến tính có nguồn gốc từ trình tự

	địch	(SEQ	ID	NO:	5:
QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTS					
MYPSCCCTKPSDGNC					
TCIP					

IPSSWAFGKFLWEWASARFSW; J02203 (D, ayw3)) có độ lệch là một gốc. Các gốc Cys tự nhiên được bảo vệ bởi các nhóm axetamidometyl (cũng được gọi là “Acm”, ký hiệu là “2” trong các trình tự amino axit tương ứng).

- Tập hợp 2 (gọi là LIN22): Các peptit 22-mer tuyến tính có nguồn gốc từ trình tự

	địch	(SEQ	ID	NO:	5:
QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTS					
MYPSCCCTKPSDGNC					
TCIP					
- IPSSWAFGKFLWEWASARFSW; J02203 (D, ayw3)) có độ lệch là một gốc. Các gốc Cys tự nhiên được bảo vệ bằng Acm (ký hiệu là “2”).
- Tập hợp 3 (gọi là LIN30): Các peptit 30-mer tuyến tính có nguồn gốc từ trình tự

	địch	(SEQ	ID	NO:	5:
QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTS					
MYPSCCCTKPSDGNC					
TCIP					

- IPSSWAFGKFLWEWASARFSW; J02203 (D, ayw3)) có độ lệch là một gốc. Các gốc Cys tự nhiên được bảo vệ bằng Acm (ký hiệu là “2”).
- Tập hợp 4 (gọi là LIN15.AA): Các peptit của tập hợp 1, nhưng có các gốc ở các vị trí thứ 9 và 10 được thay thế bằng Ala. Trong khi Ala tự nhiên có thể có mặt trong mỗi vị trí, được thay thế bằng Gly.
- Tập hợp 5 (gọi là LIN22.AA): Các peptit của tập hợp 2, nhưng có các gốc ở các vị trí thứ 12 và 13 được thay thế bằng Ala. Trong khi Ala tự nhiên có thể có mặt trong mỗi vị trí, được thay thế bằng Gly.
- Tập hợp 6 (gọi là LIN30.AA): Các peptit của tập hợp 3, nhưng có các gốc ở các vị trí thứ 16 và 17 được thay thế bằng Ala. Trong khi Ala tự nhiên có thể có mặt trong mỗi vị trí, được thay thế bằng Gly.
- Tập hợp 7 (gọi là CYS.A): Các peptit tổ hợp của chiều dài 27. Tại các vị trí 1-11 và 17-27 tương tự trình tự tuyến tính, mà chứa cặp gốc Cys. Các trình tự 11-mer liên kết thông qua cầu nối “GGSGG” (SEQ ID NO: 79). Các gốc Cys, không tham gia vào cấu trúc cầu nối disulphua được bảo vệ bởi Acm (ký hiệu là “2”).
- Tập hợp 8 (gọi là CYS.B): Các trình tự 22-mer tuyến tính, chứa hai Cys tạo thành cầu disulphua. Các gốc Cys, không tham gia vào cấu trúc cầu nối disulphua được bảo vệ bởi Acm (ký hiệu là “2”).
- Tập hợp 9 (gọi là LOOP12): Các peptit ràng buộc của chiều dài 12. Tại các vị trí 2-11 và các trình tự 10-mer có nguồn gốc từ trình tự đích của vòng lặp kháng nguyên của HBV-S-Ag. Tại các vị trí 1 và 12 là các gốc Cys, mà được liên kết bằng mP2 CLIPS. Các gốc Cys tự nhiên được bảo vệ bằng Acm (ký hiệu là “2”).
- Tập hợp 10 (gọi là LOOP15): Các peptit ràng buộc của chiều dài 15. Tại các vị trí 2-14 và các trình tự 13-mer có nguồn gốc từ trình tự đích của vòng lặp kháng nguyên của HBV-S-Ag. Tại các vị trí 1 và 15 là các gốc Cys, mà được liên kết bằng mP2 CLIPS. Các gốc Cys tự nhiên được bảo vệ bằng Acm (ký hiệu là “2”).
- Tập hợp 11 (gọi là LOOP21): Các peptit ràng buộc của chiều dài 21. Tại các vị trí 2-20 và các trình tự 19-mer có nguồn gốc từ trình tự đích của vòng lặp kháng nguyên của HBV-S-Ag. Tại các vị trí 1 và 21 là các gốc Cys, mà được

liên kết bền mP2 CLIPS. Các gốc Cys tự nhiên được bảo vệ bằng Acm (ký hiệu là “2”).

- Tập hợp 12 (gọi là LOOP31): Các peptit ràng buộc của chiều dài 31. Tại các vị trí 2-30 và các trình tự 29-mer có nguồn gốc từ trình tự đích của vòng lặp kháng nguyên của HBV-S-Ag. Tại các vị trí 1 và 31 là các gốc Cys, mà được liên kết bền mP2 CLIPS. Các gốc Cys tự nhiên được bảo vệ bằng Acm (ký hiệu là “2”).
- Tập hợp 13 (gọi là MAT.A): Các peptit tổ hợp của chiều dài 25. Tại các vị trí 2-12 và 14-24 là các peptit 11-mer có nguồn gốc từ trình tự đích của vòng lặp kháng nguyên của HBV-S-Ag. Tại các vị trí 1, 13 và 25 là các gốc Cys, mà được liên kết bằng T3 CLIPS. Các gốc Cys tự nhiên được bảo vệ bằng Acm (ký hiệu là “2”).
- Tập hợp 14 (gọi là MAT.B): Các peptit tổ hợp của chiều dài 28. Tại các vị trí 1-12 và 14-27 là các peptit 11-mer và 14-mer tương ứng. Tại các vị trí 1, 13 và 28 là các gốc Cys, mà được liên kết bằng T3 CLIPS. Các gốc Cys tự nhiên được bảo vệ bằng Acm (ký hiệu là “2”).
- Tập hợp 15 (gọi là MAT.C): Các peptit tổ hợp của chiều dài 28. Tại các vị trí 2-15 và 17-27 là các peptit 14-mer và 11-mer tương ứng. Tại các vị trí 1, 16 và 28 là các gốc Cys, mà được liên kết bằng T3 CLIPS. Các gốc Cys tự nhiên được bảo vệ bằng Acm (ký hiệu là “2”).
- Tập hợp 16 (gọi là MAT.D): Các peptit tổ hợp của chiều dài 31. Tại các vị trí 2-15 và 17-30 là các peptit 14-mer có nguồn gốc từ trình tự đích của vòng lặp kháng nguyên của HBV-S-Ag. Tại các vị trí 1, 16 và 31 là các gốc Cys, mà được liên kết bằng T3 CLIPS. Các gốc Cys tự nhiên được bảo vệ bằng Acm (ký hiệu là “2”).

Khi được thử nghiệm trong các điều kiện tính chính xác cao, kháng thể HBC34 không liên kết với peptit bất kỳ có mặt trong các chuỗi. Khi thử nghiệm trong các điều kiện tính chính xác thấp (5 µg/ml trong dung dịch đệm pepscan 0,1% và điều kiện tiên quyết trước chứa tổ hợp của huyết thanh ngựa và ovalumin), kháng thể liên kết với các peptit tổ hợp và ép buộc - liên kết với các peptit từ tập hợp 14 đến tập hợp 16 hơi thấp hơn so với tập hợp 13 và tập hợp 15. Không có liên kết được ghi nhận trên các quyết định kháng nguyên tương tự tuyến tính. Dữ liệu được thể hiện trong Fig. 17. Các dữ liệu

này cho thấy rằng kháng thể HBC34 nhận biết quyết định kháng nguyên không liên tục đa hình được cấu thành từ các đoạn peptit $_{18}\text{TGPCRTC}_{24}$ (SEQ ID NO: 80) và $_{45}\text{GNCTCIP}_{51}$ (SEQ ID NO: 81), tại đó đoạn peptit $_{18}\text{TGPCRTC}_{24}$ (SEQ ID NO: 80) là phần trội hơn của quyết định kháng nguyên (Fig. 17).

Để tinh chỉnh bản đồ quyết định kháng nguyên của kháng thể HBC34 bằng các phương pháp phân tích sự thể hoàn toàn dựa trên các kết quả được mô tả ở trên, 812 peptit T3 CLIPS vòng lặp hoặc không liên lục được cấu thành từ ba tập khộp khác nhau được tổng hợp:

- Tập hợp 1 (gọi là RN1; T3 CLIPS không liên tục): Một loạt các đột biến của quyết định kháng nguyên có nguồn gốc từ dạng bắt trước không liên tục $\text{C2IIPSSWAFGCSTTSTGP2RT2C}$ (SEQ ID NO: 82). Đối với mỗi vị trí của trình tự này, phân tích sự thay thế được thực hiện. Nói cách khác, đối với mỗi vị trí của trình tự peptit, các đột biến được thực hiện trong đó các amino axit gốc tại vị trí này được thay thế bằng một trong 13 amino axit được chọn từ nhóm bao gồm alanin (A), axit glutamic (E), phenylalanin (F), glyxin (G), histidine(H), lysin (K), leuxin (L), prolin (P), glutamin (Q), arginin (R), serin (S), valin (V), tyrosin (Y), và “_”; mà “_” minh họa cho gốc bị làm mất. Các gốc Cys tự nhiên được bảo vệ bằng Acm (ký hiệu là “2”).
- Tập hợp 2 (gọi là RN2; T3 CLIPS không liên tục): Một loạt các đột biến quyết định kháng nguyên có nguồn gốc từ dạng bắt trước không liên tục $\text{CGN2T2IIPSSWAF}\underline{\text{C}}\text{STTSTGP2RT2}\underline{\text{C}}$ (SEQ ID NO: 83). Đối với mỗi vị trí của trình tự này, phân tích sự thay thế được thực hiện theo cách tương tự như đối với tập hợp 1 (tức là các gốc GN2T không bị đột biến). Các gốc Cys tự nhiên được bảo vệ bằng Acm (ký hiệu là “2”).
- Tập hợp 3 (gọi là RN3; T3 CLIPS vòng lặp): Một loạt các đột biến của quyết định kháng nguyên có nguồn gốc từ dạng bắt trước vòng lặp CGGGCSTTSTGP2RT2C (SEQ ID NO: 84). Đối với các vị trí 6-16 của trình tự này, phân tích sự thay thế được thực hiện theo cách tương tự như đối với tập hợp 1. Các gốc Cys tự nhiên được bảo vệ bằng Acm (ký hiệu là “2”).

Kháng thể HBC34 được kiểm tra bằng phương pháp ELISA nền PEPSCAN ở 20 $\mu\text{g/ml}$ trên các chuỗi peptit có điều kiện tiên quyết với 0,1% SQ (dung dịch đậm pepscan chứa 0,1% của hỗn hợp huyết thanh nhạ và anbumin trứng). Các chuỗi peptit được ủ

ấm với dung dịch kháng thể HBC34 (qua đêm ở nhiệt độ 4°C). Sau khi rửa, các chuỗi peptit được ủ ấm với dung dịch pha loãng 1/1.000 của thể liên hợp liên hợp peroxidaza kháng thể (antibody peroxidase conjugate-SBA) thích hợp trong 1 giờ ở 25°C. Sau khi rửa, bổ sung cơ chất peroxidaza 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazolin sulfonat (ABTS) và 20 µl/ml của 3% H₂O₂. Sau một giờ, sự hiện màu được đo. Sự hiện màu được định lượng bằng thiết bị tích điện kép (CCD) - máy ảnh và hệ thống xử lý hình ảnh.

Như được mong đợi, khi thử nghiệm trong các điều kiện tính chính xác thấp, kháng thể HBC34 liên kết với các peptit từ tất cả các tập hợp. Các kết quả của thí nghiệm cho thấy các gốc ₁₂₀PCR₁₂₂ và C₁₂₄ là có tính quyết định đối với liên kết, trong khi các thay thế nhất định của các gốc I150, I152, W156 và F158 làm giảm đáng kể liên kết (Fig. 18). Ví dụ, các dữ liệu ghi nhận trên cả ba chuỗi minh họa nhất quán rằng các thay thế của gốc bất kỳ trong vùng ₁₁₄STTSTGPCRTC₁₂₄ (SEQ ID NO:85) bằng E sẽ làm giảm khả năng liên kết, trong khi sự thay thế ngược bằng R hoặc Y làm tăng khả năng liên kết. Tuy nhiên, không quan sát được điều tương tự đối với vùng ₁₄₅GNCTCIIPSSWAF₁₅₉ (SEQ ID NO: 86).

Kết hợp các kết quả này cho thấy rằng kháng thể HBC34 nhận ra quyết định kháng nguyên không liên tục có các gốc ₁₂₀PCR₁₂₂ có C₁₂₄ quyết định đến sự liên kết. Sự có mặt của các gốc ₁₄₅GNCTCIIPSSWAF₁₅₈ (SEQ ID NO: 87) được minh họa cung cấp phạm vi cấu trúc để tạo thành và ổn định tương tác quyết định kháng nguyên - vị trí nhận diện kháng nguyên. Kết luận này đưa ra sau khi quan sát các dạng bắt trước của quyết định kháng nguyên không liên tục (khi ₁₄₅GNCTCIIPSSWAF₁₅₈ (SEQ ID NO: 87) và ₁₁₄STTSTGPCRTC₁₂₄ (SEQ ID NO: 85) có mặt trong một dạng bắt trước) là khả dụng đối với các thay thế hơn là các trình tự ₁₁₄STTSTGPCRTC₁₂₄ (SEQ ID NO: 85) đơn (tập hợp 3, RN3). Ngoài ra, P151 cố định các góc xoắn nhờ đó tạo ra độ cứng cấu hình được minh họa tác động lên sự liên kết đặc biệt khi được thay thế bằng G đã biết đối với các đặt tính đảo ngược. Sự thay thế G145P tác động tương tự lên liên kết của HBC34. Người ta đã lặp lại sự quan sát rằng các thay thế R/Y tăng sự liên kết với vị trí bất kỳ trong mô típ ₁₁₄STTSTGPCRTC₁₂₄ (SEQ ID NO: 85), nhưng không trong mô típ ₁₄₅GNCTCIIPSSWAF₁₅₈ (SEQ ID NO: 87), trong khi E biểu diễn sự giảm liên kết. Sự quan sát này có thể cho thấy rằng các gốc ₁₁₄STTSTGPCRTC₁₂₄ (SEQ ID NO: 85) liên kết với vị trí nhận diện kháng nguyên mang điện tích âm trong kháng thể HBC34 (hoặc gần với cụm điện tích âm) và cải thiện sự liên kết cũng như kết quả giảm từ lực tĩnh điện

và định rõ đặc điểm vị trí nhận diện kháng nguyên hơn là đặc điểm của quyết định kháng nguyên.

Ví dụ 10: Sử dụng giảm tăng lên của HBsAg ở chuột nhất uPA được làm giống người lây nhiễm HBV mạn tính được điều trị bằng tổ hợp của HBC34 và lamivudin.

Theo nghiên cứu khác, hiệu quả của liệu pháp kết hợp chứa kháng thể HBC34 được đánh giá. Đối với sự kết hợp với HBC34, chất ức chế polymeraza, cụ thể là lamivudin, được chọn lọc.

Để bắt trước thiết lập viêm gan B mạn tính, chuột nhất uPA/SCID non được làm giống người bị lây nhiễm HBV và sau 8 tuần sau khi lây nhiễm, mức trung bình của ADN HBV là 2×10^9 bản sao/ml và mức HBsAg 9.000 IU/ml đạt được. Các mức này là cao bằng các mức mà thường được quan sát ở người bệnh bị nhiễm HBV mạn tính.

Sau đó, chuột được điều trị bắt đầu từ tuần 8 sau khi lây nhiễm với kháng thể HBC34 đơn, với các chất ức chế polymeraza là lamivudin đơn, với tổ hợp của HBC34 và lamivudin, hoặc với kháng thể đối chứng trong 4 tuần (1 mg/kg HBC34 được tiêm dưới màng bụng 2 lần mỗi tuần; 0,4 mg/ml lamivudin được bổ sung vào trong nước uống).

Các mức virus huyết HBV và HBsAg trong huyết thanh được đánh giá trong điều trị tuần 0 (trước khi điều trị), điều trị tuần 2, điều trị tuần 4 và điều trị tuần 6, hoặc điều trị tuần 0 (trước khi điều trị), điều trị tuần 3 và điều trị tuần 6. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 19A (virus huyết HBV) và B (HBsAg).

Như được minh họa trong Fig. 19, việc điều trị bằng HBC34, lamivudin hoặc cả các dược chất ở dạng kết hợp dẫn đến sự giảm virus huyết (A) trung bình là 0,7log, 1,3log và 2,4log tương ứng. Đáng chú ý là, HBsAg (B) giảm 1,3log (BL trung bình = 15.600IU/ml) ở chuột nhất nhận HBC34 đơn lẻ và 2,6log (BL trung bình = 2.600Iu/ml) ở nhóm kết hợp, trong khi không có sự giảm HBsAg đáng kể (0,2log, BL trung bình = 9.000Iu/ml) được phát hiện ở chuột điều trị bằng lamivudin đơn lẻ.

Tóm lại, sự kết hợp của HBC34 và lamivudin rõ ràng đạt được hiệu quả tốt nhất. Ngạc nhiên là, chính hiệu tốt của sự kết hợp của HBC34 và lamivudin được quan sát ngay cả khi lamivudin đơn không có hiệu quả. Với mục đích của nó, hiệu quả tốt được quan sát của sự kết hợp HBC34 và lamivudin rõ ràng là hiệu quả phối hợp bất ngờ.

Tóm lại, sự giảm HBsAg rõ ràng đáng ngạc nhiên đạt được với liệu pháp kết hợp chứng tỏ rằng kháng thể HBC34 có thể được sử dụng, ví dụ, trong các thiết lập mạn tính, trong sự kết hợp với các chất ức chế polymeraza để thúc đẩy sự làm sạch HBsAg cả trong bệnh nhân đồng nhiễm HBV/HDV và bệnh nhân chỉ nhiễm HBV.

Ví dụ 11: Thao tác di truyền trình tự của kháng thể HBC34: CDR3 của VH và VL

Dãy thứ nhất của các đột biến HBC34 được tạo ra với các đột biến trong CDR3 của VH và VL bằng cách gây đột biến (i) gốc W107 của VH CDR3 thành A hoặc F, (ii) gốc M115 của VH CDR3 thành I hoặc L, và/hoặc (iii) gốc W107 của VL CDR3 thành A hoặc F. Tổng số 18 biến thể HBC34 được tạo ra bởi việc kết hợp VH hoặc VL không đột biến của HBC34 (sau đây gọi là WT, kiểu đại hoặc kháng thể ban đầu) với các tổ hợp khác nhau của đột biến VH và VL như được minh họa trong Fig. 20 và Fig. 21.

Các biến thể kháng thể HBC34 được tạo ra được kiểm tra bằng phương pháp ELISA về liên kết với kháng nguyên HBsAg adw, tương tự như trong ví dụ 1. Các kết quả được thể hiện trong Fig. 21.

Lưu ý, đột biến của W107 của VH CDR3 thành A (trong các biến thể HBC34-V5, HBC34-V8, HBC34-V9, HBC34-V10, HBC34-V12 và HBC34-V17, Fig. 21) đã loại bỏ hoàn toàn HBC34 liên kết với HBsAg. Điều này chỉ ra rằng W107 là gốc quan trọng trong vị trí nhận diện kháng nguyên HBC34 đối với sự nhận diện kháng nguyên. Đột biến của W107 của VH CDR3 thành F (amino axit có các đặc tính thơm tương tự như là W) một phần tác động lên liên kết HBC34 (HBC34-V1), cho thấy rằng W không thể bị đột biến mà không ảnh hưởng đến ái lực liên kết HBC34 với HBsAg.

Đột biến M115 của VH CDR3 thành L không ảnh hưởng đến liên kết HBC34 (HBC34-V13), trong khi đột biến thành I (HBC34-V11) làm giảm một phần liên kết HBC34, cho thấy rằng M115 có thể được thế bằng L, nhưng không thể thế bằng I, mà không ảnh hưởng đến liên kết HBC34. Phù hợp với các kết quả thu được từ đột biến W107A đơn, đột biến đôi W107A và M115A (HBC34-V10) loại bỏ hoàn toàn liên kết HBC34.

Đột biến W107 của VL CDR3 thành F không ảnh hưởng đến liên kết HBC34 (HBC34-V7), trong khi đột biến thành A (HBC34-V15) làm giảm một phần liên kết HBC34, cho thấy rằng W107 của VL CDR3 có thể được thế bằng F, nhưng không thể

thể bằng A, mà không ảnh hưởng đến liên kết HBC34. Như mong đợi, tổ hợp các đột biến W107F trong CDR3 của VH và W107A trong CDR3 của VL hoàn toàn loại bỏ liên kết (HBC34-v2). Tổ hợp các đột biến M115L trong VH CDR3 và W107F trong VL CDR3s (HBC34-V6), tổ hợp các đột biến M115I trong VH CDR3 với W107F trong VL CDR3 (HBC34-v4) và tổ hợp các đột biến W107F trong VH CDR3 và W107F trong VL CDR3, tác động một phần lên liên kết HBC34 với HBsAg, cho thấy rằng tổ hợp của hai đột biến như vậy, nhưng không phải là đột biến đơn, không thể duy trì ái lực liên kết của kháng thể HBC34 gốc.

Trong bước tiếp theo, sáu trong 18 biến thể HBC34 được mô tả ở trên được chọn để mô tả thêm (HBC34-V1, V3, V4, V6, V7, V11 và V13) để (i) xác nhận các kết quả ban đầu; (ii) đo ái lực liên kết bằng phương pháp ELISA (tức là, xác định EC50 của liên kết); và (iii) đánh giá hiệu suất của các biến thể HBC34 từ các tế bào 293-Expi chuyển nạp tạm thời (Fig. 22 và Fig. 23).

Như được mô tả trong thí nghiệm thứ nhất, biến thể HBC34-V3 (mang đột biến đôi W107F của VH CDR3 và W107F của VL CD4R3) liên kết với HBsAg (kiểu huyết thanh adw) có EC50 cao gấp 9 lần so với kháng thể HBC34 ban đầu. Ngoài ra, HBC34-V3 được tạo ra ở nồng độ gần thấp hơn 5 lần so với HBC34. Biến thể HBC34-V11 và HBC34-V13 mang đột biến M115I đơn và M115L tương ứng, liên kết với HBsAg với EC50 tương đồng hoặc hơi cao hơn EC50 của HBC34. Tuy nhiên, cả hai biến thể được sinh ra ít hiệu quả hơn HBC34 (hiệu suất thấp hơn 0,6 lần và 0,3 lần khi so với HBC34). Các kết quả này cho thấy rằng HBC34-V11, và mặc dù nhiều biến thể HBC34-V13 hơn, liên kết có ái lực cao với HBsAg nhưng được sản sinh ít hiệu quả hơn ở các tế bào động vật có vú. Tương tự vậy, biến thể HBC34-V1 mang đột biến đơn W107F trong VH CDR3 liên kết với HBsAg so với HBC34 (EC50 cao gấp 1,6 lần), không được tạo ra hiệu quả thấp hơn 4 lần (tức là 0,25 lần) so với HBC34. Tổ hợp của W107 của VL CDR3 với W107, M115I hoặc M115L của VH CDR3 (HBC34-V3, HBC34-V4 và HBC34-V6) giảm cả ái lực liên kết (EC50 cao hơn 1,6 đến 9,0 lần) và hiệu suất (nồng độ kháng thể thấp hơn từ 0,20 đến 0,35 lần trong dịch nổi môi trường). Ngạc nhiên là, đột biến W107F đơn của VL CDR3 (HBC34-V7) liên kết với HBsAg tương tự như HBC34 và được tạo ra thậm chí hiệu quả (lên đến 1,7 lần) hơn HBC34, đạt đến nồng độ cao rõ rệt trong 533 µg/ml môi trường dịch nổi (Fig. 23).

Ví dụ 12: Thao tác di truyền trình tự của kháng thể HBC34: các vùng khung

Mười hai biến thể HBC34 bổ sung được tạo ra (HBC34-V19 đến HBC34-V30; Fig. 24A) trong đó một vài đột biến được đưa vào trong vùng khung (FR) của cả VH và VL mà tương ứng với các gốc được phát hiện trong tổ tiên chung không đột biến HBC34 (HBC34-UCA) (Fig. 20) và kết hợp với VH CDR3 đột biến M115L và với VL CDR3 đột biến W107F.

Các kết quả được thể hiện trong Fig. 24. Sự đưa vào 9 đột biến trong các FR của VL (HBC34-27, HBC34-V28, HBC34-V29 và HBC34-V30) trong sự có mặt của đột biến W107 trong VL CDR3, kết hợp với WT, M115L giảm đáng kể sự liên kết của HBC34 với HBsAg, do đó cho thấy vai trò quan trọng đối với các đuôi bị đột biến trong VL (Fig. 24A và Fig. 24B). Các biến thể HBC34, trong đó biến thể VL giống nhau được mô tả ở trên (tức là W107F/FR1234-GL) được kết hợp với VH mang đột biến M115L và 9 đột biến bổ sung trong FR, không liên kết với HBsAg, cho thấy rằng các đột biến cả VH và VL góp phần đáng kể vào liên kết HBsAg.

Quan trọng là, sự loại bỏ chỉ một trong 9 đột biến đưa vào trong các FR của VL (tức là K66Y) trong HBC34-V23 và HBC34-V24 tăng đáng kể liên kết (EC50 thấp hơn 100 lần) với HBsAg so với các biến thể tương ứng mang đột biến Y66K (HBC34-V27 và HBC34-V28). Tương tự vậy, sự loại bỏ của đột biến K66Y trong HBC34-V25 và HBC34-V26 khôi phục liên kết HBsAg so với các biến thể không liên kết tương ứng mang đột biến Y66K (HBC34-V27 và HBC34-V28).

Vì vậy, các biến thể HBC34-V23 giữ liên kết ái lực cao (EC50 cao hơn 1,5 lần so với HBC34) và được tạo ra tương tự như kháng thể HBC34 gốc. Lưu ý, biến thể HBC34-V24 khác chỉ một amino axit với biến thể HBC34-V23 (tức là M115L trong VH), liên kết với HBsAg có EC50 tương tự như EC50 của HBC34-V23 nhưng không được tạo ra hiệu quả (hiệu suất chỉ là 0,14 lần so với HBC34). Các kết quả này cho thấy rằng, trong khi không ảnh hưởng đáng kể đến liên kết của các biến thể HBC34 với HBsAg, sự có mặt của L ở vị trí 115 có tác động tiêu cực lên hiệu suất của các biến thể HBC34 mang đột biến này. Thực vậy, theo trung bình tất cả các biến thể HBC34 mang đột biến M115L (HBC34-V6, HBC34-V13, HBC34-V19, HBC34-V20, HBC34-V21, HBC34-V22, HBC34-V24, HBC34-V25, HBC34-V26, HBC34-V28, HBC34-V29 và HBC34-V30) có hiệu suất trung bình là bằng 0,3 lần so với kháng thể HBC34 gốc.

Đáng chú ý là, sự đưa vào từ 5 trong 9 đột biến trong các FR của VH với sự có

mặt của đột biến M115L trong VH CDR3 (các biến thể HBC34-V19 và HBC34-V20 tương ứng) không làm giảm rõ nét sự liên kết với HBsAg, cho thấy rằng các gốc đột biến không đóng vai trò quan trọng trong sự nhận dạng kháng nguyên ái lực cao bởi kháng thể HBC34. Sự đưa vào các đột biến W107F trên mạch chính của các biến thể HBC34-V19 và HBC34-V20 trong HBC34-V21 và HBC34-V22 làm giảm liên kết với HBsAg từ 20 đến 30 lần. Đáng chú ý là, đột biến tương tự (tức là W107 trong VL CDR3) không ảnh hưởng đến liên kết của các biến thể khác không mang cùng 5 hoặc 9 đột biến trong các FR của VH, kết quả có thể cho thấy rằng các gốc trong các FR VH có vai trò tương hợp (ví dụ, bằng cách làm ổn định cấu hình nhất định của khuôn vùng biến đổi) trong liên kết với HBsAg với gốc 107 của VH.

Cuối cùng và phù hợp với các kết quả của ví dụ 11 minh họa trong Fig. 23, kháng thể HBC34-V7 mang đột biến đơn W107 trong VL CDR3 cho thấy rằng liên kết có thể so sánh với HBsAg (tức là 1,4 lần) so với HBC34 và được tạo ra hiệu quả (1,2 lần) hơn HBC34 (trung bình trong hai thí nghiệm thực hiện với HBC34-V7 được sinh ra 1,5 lần, tức là 50%, hiệu quả hơn kháng thể HBC34. Kết quả này cho thấy rằng đột biến W107F trong VL CDR3, trong khi không ảnh hưởng rõ rệt đến ái lực liên kết với HBsAg, có ảnh hưởng tích cực lên hiệu suất kháng thể HBC34.

Cuối cùng, HBC34 và các biến thể HBC34-V6, HBC34-V7, HBC34-V19, HBC34-V23 và HBC34-V24 được kiểm tra đối với khả năng nhận diện 10 kiểu gen HBV là A, B, C, D, E, F, G, H, I và J (như được thể hiện trong Fig. 25) bằng phân tích và đo tế bào theo dòng chảy. Cụ thể, các tế bào biểu mô người (các tế bào Hep2) được chuyển nạp với các plasmit biểu hiện, mỗi HBsAg của 10 kiểu gen HBC A, B, C, D, E, F, G, H, I và J. Tất cả các kháng thể được kiểm tra tại nhiều nồng độ (8 dung dịch pha loãng theo loạt từ 5.000 ng/ml đến 7 ng/ml) để nhuộm các tế bào có thể thâm chuyển nạp tạm thời. Hai ngày sau khi chuyển nạp, các tế bào Hep2 được thu, cố định và nhuộm bằng saponin để nhuộm miễn dịch với HBC34 và năm biến thể được chọn. Liên kết của các kháng thể với các tế bào chuyển nạp được phân tích bằng Becton Dickinson FACSCanto2 (BD Biosciences) với phần mềm FlowJo (TreeStar). Như được minh họa trong Fig. 25, HBC34 và tất cả 5 biến thể thử nghiệm nhận ra 10 kiểu gen HBsAg của HBV tại các mức giống nhau.

Bảng trình tự và các số SEQ ID NO (danh mục trình tự):

SEQ ID NO	Trình tự	Ghi chú
1	X ₁ X ₂ X ₃ TC X ₄ X ₅ X ₆ A X ₇ G trong đó X ₁ , X ₂ , X ₃ , X ₄ , X ₅ , X ₆ và X ₇ có thể là axit amin bất kỳ.	Quyết định kháng nguyên
2	X ₁ X ₂ X ₃ TC X ₄ X ₅ X ₆ A X ₇ G trong đó X ₁ là P, T hoặc S, X ₂ là C hoặc S, X ₃ là R, K, D hoặc I, X ₄ là M hoặc T, X ₅ là T, A hoặc I, X ₆ là T, P hoặc L, và X ₇ là Q, H hoặc L.	E
3	MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLD SWWTSNLNGLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTS CPPTCPGYRWMCLRRFIIFLLCLIFLLVLL DYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQ GTSMYPPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKF LWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVW LSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIFFCLW VYI	Miền S của HBsAg (Số đăng ký ngân hàng Gen J02203)
4	MENVTSGLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSL DSWWTSNLNGLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPT SCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLLCLIFLLVL LDYQGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQ GTSMYPPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKF LWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVW LSVIWMMWYWGPSLYSTLSPFLPLLPIFFCL WVYI	Miền S của HBsAg (Số đăng ký ngân hàng Gen FJ899792)

5	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	J02203 (D, ayw3)
6	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	FJ899792 (D, adw2)
7	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQGNS MFPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFAKYLWE WASVRFSW	AM282986 (A)
8	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGTS MFPSCCCTKPTDGNCTCIPISSWAFAKYLWE WASVRFSW	D23678 (B1)
9	QGMLPVCPLLPGTSTTSTGPCKTCTIPAQGTS MFPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFARFLWE WASVRFSW	AB117758 (C1)
10	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTLAQGTS MFPSCCCSKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	AB205192 (E)
11	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTS MFPSCCCSKPSDGNCTCIPISSWALGKYLWE WASARFSW	X69798 (F4)
12	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFAKYLW EWASVRFSW	AF160501 (G)

13	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTS MFPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKYLWE WASARFSW	AY090454 (H)
14	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFKYLW EWASARFSW	AF241409 (I)
15	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCRTCTITAQGTS MFPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFKFLWE WASVRFSW	AB486012 (J)
16	CQGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGT SMYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLW EWASARFSW	HBsAg Y100C/P120T
17	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg P120T
18	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPLDGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg P120T/S143L
19	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPSRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg C121S
20	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCDTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg R122D
21	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCITCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg R122I

22	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRNCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg T123N
23	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAHGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg Q129H
24	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPALGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg Q129L
25	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS HYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg M133H
26	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS LYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg M133L
27	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS TYPSCCCTKPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg M133T
28	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTEPSDGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg K141E
29	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKSSDGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg P142S

30	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPKDGNCTCIPISSWAFGKFLW EWASARFSW	HBsAg S143K
31	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSAGNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg D144A
32	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDRNCTCIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg G145R
33	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGA CT CIPISSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg N146A
34	GRIFRSFY	CDRH1 aa
35	NQDGSEK	CDRH2 aa
36	AAWSGNSGGMDV	CDRH3 aa
37	KLGNKN	CDRL1 aa
38	EVK	CDRL2 aa
39	VIYEVKYRP	CDRL2 aa dài
40	QTWDSTTVV	CDRL3 aa
41	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRS FYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYV DSVKGRFTISRDN AKNSLFLQMNNLRVEDTA VYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVSVSS	VH aa

42	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKNKV CWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAAYFCQTDSTT VVFGGGTRLTVL	VL aa
43	GGACGCATCTTTAGAAAGTTTTTAC	CDRH1 nuc
44	ATAAACCAAGATGGAAGTGAGAAA	CDRH2 nuc
45	GCGGCTTGGAGCGGCAATAGTGGGGGTAT GGACGTC	CDRH3 nuc
46	AAATTGGGGAATAAAAAT	CDRL1 nuc
47	GAGGTTAAA	CDRL2 nuc
48	gtcatctatGAGGTTAAAtaccgcccc	CDRL2 nuc dài
49	CAGACGTGGGACAGCACCACTGTGGTG	CDRL3 nuc
50	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG CTGGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCAGAGAC TGTCCTGTGCAGCCTCT GGACGCATCTTTA GAAGTTTTTAC ATGAGCTGGGTCCGCCAG GCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC CACTATAAACCAAGAT GGAAGTGAGAAA TTATATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTC ACTATTTCTGCAAATGAACAACCTGAGAGT CGAGGACACGGCCGTTTATTACTGCGCGG	VH nuc

51	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTG TCCGTGTCCCCAGGACAGACAGTCAGCATC CCCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGAATAA AAATGTTTGCTGGTTTCAGCATAAGCCAGG CCAGTCCCCTGTGTTGGTCATCTATGAGGT TAAATACCGCCCCTCGGGGATTCCTGAGCG ATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGC CACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTAT GGATGAGGCTGCCTATTTCTGTCTCAGACGT GGGACAGCACCACTGTGGTGTTCGGCGG AGGGACCAGGCTGACCGTCCTA	VL nuc
52	XGSSTTSTGPCRTCMTXPSDGNATAIPISSW X trong đó các gốc mã hóa X là được thể bằng	peptit
53	TSTGPCRTCMTTAQG	peptit
54	GMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTT	peptit
55	XSMYPSASATKPSDGNXTGPCRTCMTTAQG TSX trong đó các gốc mã hóa X là được thể bằng Xystein.	peptit
56	PCRTCMTTAQG	các amino axit 120- 130 của miền S của HBV-D J02203
57	PCX ₁ TCX ₂ X ₃ X ₄ AQG, trong đó X ₁ tốt hơn là R hoặc K, X ₂ tốt hơn là M hoặc T, X ₃ tốt hơn là T hoặc I, và X ₄ tốt hơn là T, P hoặc L	quyết định kháng nguyên
58	QTFDSTTVV	CDRL3 v7 và CDRL3 v23 (aa)
59	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGKN VCWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFS GSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDST TVVFGGGTRLTVL	VLv7

60	AAGCTGGGGAACAAAAAT	CDRL1 v7 và CDRL1 v23 (nuc)
61	GAGGTGAAA	CDRL2 v7 và CDRL2 v23 nuc
62	GTCATCTACGAGGTGAAATATCGGCCT	CDRL2 v7 dài và CDRL2 v23 nuc dài
63	CAGACATTCGATTCCACCACAGTGGTC	CDRL3 v7 và CDRL3 v23 nuc
64	TCTTACGAGCTGACACAGCCACCTAGCGTG TCCGTCTCTCCAGGACAGACCGTGTCCATC CCTTGCTCTGGCGACAAGCTGGGGAACAA AAATGTCTGTTGGTTCCAGCACAAGCCAGG GCAGAGTCCCGTGCTGGTCATCTACGAGG TGAAATATCGGCCTTCAGGAATTCCAGAAC GGTTCAGCGGATCAAACAGCGGCAATACT GCAACCCTGACAATTAGCGGGACCCAGGC CATGGACGAAGCCGCTTATTTCTGCCAGAC ATTCGATTCCACCACAGTGGTCTTTGGCG GGGGAAGTAGGCTGACCGTGCTG	VL v7 nuc
65	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKN ACWYQQKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFS GSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQTFDST TVVFGGGTKLTVL	VL v23 aa
66	INQDGSEK	HBC34wt CDRH2 aa

67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFRSF YMSWVRQAPGKGLEWVANINQDGSEKLYV DSVKGRFTISRDNANKNSLFLQMNNLRVEDTA VYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVTVSS	HBC34v31, HBC34v32, và HBC34v33 VH
68	GAGGTGCAGCTGGTGAATCCGGCGGGGG ACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACT GAGCTGTGCAGCTTCTGGAAGAATCTTCAG ATCTTTTACATGAGTTGGGTGAGACAGGC TCCTGGGAAGGGACTGGAGTGGGTCGCAA ACATCAATCAGGACGGATCAGAAAAGCTG TATGTGGATAGCGTCAAAGGCAGGTTCCT ATTTCCCGCGACAACGCCAAAAATTCTCTG TTTCTGCAGATGAACAATCTGCGGGTGGAG GATACCGCTGTCTACTATTGTGCAGCCTGG TCTGGCAACAGTGGAGGCATGGACGTGTG GGGACAGGGAACCACAGTGACAGTCAGCT CC	HBC34 v31, HBC34 v32 và HBC34 v33 VH (nuc)
69	TCTTACGAGCTGACACAGCCCCCTAGCGTG TCCGTCTCTCCAGGCCAGACAGCATCCATC ACTTGCTCTGGCGACAAGCTGGGGAACAA AAATGCCTGTTGGTATCAGCAGAAGCCAG GGCAGAGTCCCGTGCTGGTCATCTACGAG GTGAAATATCGGCCTTCAGGAATTCCAGA AAGATTCAGTGGATCAAACAGCGGCAATA CTGCTACCCTGACAATTAGCGGGACCCAGG CCATGGACGAAGCTGATTACTATTGCCAGA CATTTCGATTCCACCACAGTGGTCTTTGGC GGGGGAACATAAGCTGACCGTGCTG	VL v23 nuc

70	GAAGTGCAGCTGGTCTGAATCAGGAGGAGG GTGGGTCCAGCCCGGAGGGAGCCAGAGAC TGTCTTGTGCCGCATCAGGGAGGATCTTC AGGAGCTTCTACATGTCCTGGGTGCGCCA GGCACCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTCTG CCACCATCAACCAGGACGGATCTGAAAA GCTGTATGTGGATAGTGTCAAAGGCCGGTT CACAATTAGCAGAGACAACGCTAAAAATT CTCTGTTTCTGCAGATGAACAATCTGCGAG	HBC34 wt VH mã bộ ba tối ưu hóa
71	TCATACGAACTGACTCAGCCTCCCTCCGTC TCCGTCTCACCTGGACAGACCGTCTCAATC CCCTGCTCCGGCGAT AAACTGGGCAACAAGAACGTGTGCTGGTT CCAGCACAAACCCGGACAGAGTCCTGTGCT GGTCATCTAC GAGGTCAAGTATCGGCCAA GCGGCATTCCCGAAAGATT CAGCGGCTCCA ACTCTGGGAATACCGCAACACTGACTATCT CTGGAACCCAGGCAATGGACGAGGCAGCT TACTTTTGCCAG ACTTGGGATTCAACTAC TGTCGTGTT CGGCGGCGGA ACTAGACTGA CTGTCCTG	HBC34 wt VL mã bộ ba tối ưu hóa
72	GGGAGGATCTTCAGGAGCTTCTAC	HBC34 wt CDRH1 mã bộ ba tối ưu hóa
73	ATCAACCAGGACGGATCTGAAAAG	HBC34 wt CDRH2 mã bộ ba được tối ưu hóa
74	GCCGCTTGGTCTGGCAACAGCGGCGGGAT GGATGTC	HBC34 wt CDRH3 mã bộ ba được tối ưu hóa
75	AAACTGGGCAACAAGAAC	HBC34 wt CDRL1 mã bộ ba được tối
76	GAGGTCAAG	HBC34 wt CDRL2 mã bộ ba được tối
77	GTCATCTACGAGGTCAAGTATCGGCCA	HBC34 wt CDRL2 mã bộ ba dài tối ưu hóa
78	CAGACTTGGGATTCAACTACTGTCGTG	HBC34 wt CDRL3 mã bộ ba được tối

79	GGSGG	cầu nối
80	TGPCRTC	quyết định kháng nguyên
81	GNCTCIP	quyết định kháng nguyên
82	CCIPSSWAFGCSTTSTGPCRTCC trong đó, cụ thể là thy xystein ở các vị trí 2, 21 và 24 được liên kết với axetamidometyl.	dạng quyết định kháng nguyên bất trước không liên tục
83	<u>CGNCTCIIPSSWAF</u> <u>CSTTSTGPCRTCC</u> trong đó, cụ thể là thy xystein ở các vị trí 4, 6, 24 và 27 được liên kết với axetamidometyl.	dạng quyết định kháng nguyên bất trước không liên tục
84	CGGGCSTTSTGPCRTCC trong đó, cụ thể là thy xystein ở các vị trí 13 và 16 được liên kết với axetamidometyl.	dạng quyết định kháng nguyên bất trước vòng lặp
85	STTSTGPCRTC	quyết định kháng nguyên
86	GNCTCIIPSSWAF	quyết định kháng
87	GNCTCIIPSSWAF	quyết định kháng nguyên
88	PCRXC	quyết định kháng nguyên

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với vùng vòng kháng nguyên của HBsAg và trung hòa sự lây nhiễm virus viêm gan B và virus viêm gan delta, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa các trình tự axit amin CDRH1, CDRH2 và CDRH3 và các trình tự axit amin CDRL1, CDRL2 và CDRL3 (i) theo các SEQ ID NO: 34-38 và 40, tương ứng; hoặc (ii) theo các SEQ ID NO: 34-37, 39 và 40, tương ứng; hoặc (iii) theo SEQ ID NO: 34-38 và 58, tương ứng; hoặc (iv) theo các SEQ ID NO: 34-37, 39 và 58, tương ứng; hoặc (v) theo các SEQ ID NO: 34, 66, 36-38 và 40, tương ứng; hoặc (vi) theo các SEQ ID NO: 34, 66, 36-37, 39, và 40 tương ứng; hoặc (vii) theo các SEQ ID NO: 34, 66, 36-38 và 58, tương ứng; hoặc (viii) theo các SEQ ID NO: 34, 66, 36-37, 39, 58 tương ứng.
2. Kháng thể theo điểm 1, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa gốc Fc, tốt hơn là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, là loại IgG, tốt hơn là loại IgG1.
3. Kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên là kháng thể đơn dòng hoặc mảnh liên kết kháng nguyên đơn dòng của chúng và/hoặc kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên người của nó.
4. Kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, khác biệt ở chỗ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa (i) trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) có chung ít nhất 95% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 41 hoặc 67; và (ii) trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có chung ít nhất 95% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 42, 59 hoặc 65.
5. Kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo điểm 4, khác biệt ở chỗ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) theo SEQ ID NO: 41 hoặc 67 và trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) theo SEQ ID NO: 42, 59 hoặc 65.
6. Kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, là kháng thể được tinh chế, kháng thể chuỗi đơn, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv hoặc scFv.

7. Phân tử axit nucleic chứa polynucleotit mã hóa kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên.

8. Phân tử axit nucleic theo điểm 7, trong đó trình tự polynucleotit chứa hoặc bao gồm trình tự axit nucleic có chung ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn nữa là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95% và cụ thể tốt hơn là ít nhất 98% hoặc 99% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO trong số các SEQ ID NO: 43-51, 60-64 và 68-78.

9. Vector bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm 7 hoặc 8.

10. Tế bào biểu hiện kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6; hoặc bao gồm vector theo điểm 9.

11. Chế phẩm chứa kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, axit nucleic theo điểm 7 hoặc 8, vector theo điểm 9 và/hoặc tế bào theo điểm 10, và, tùy ý là tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

12. Hỗn hợp của

- (i) kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, axit nucleic theo điểm 7 hoặc 8, vector theo điểm 9, tế bào theo điểm 10 hoặc chế phẩm theo điểm 11; và
- (ii) chất ức chế polymeraza, interferon và/hoặc chất ức chế điểm kiểm tra;

tốt hơn là để sử dụng trong việc phòng ngừa, điều trị hoặc làm suy yếu viêm gan B và/hoặc viêm gan D, cụ thể là sử dụng trong điều trị hoặc làm suy yếu viêm gan B mạn tính và/hoặc viêm gan D mạn tính.

13. Kit chứa:

- (i) kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, axit nucleic theo điểm 7 hoặc 8, vector theo điểm 9, tế bào theo điểm 10 hoặc chế phẩm theo 11; và
- (ii) chất ức chế polymeraza, interferon và/hoặc chất ức chế điểm kiểm tra.

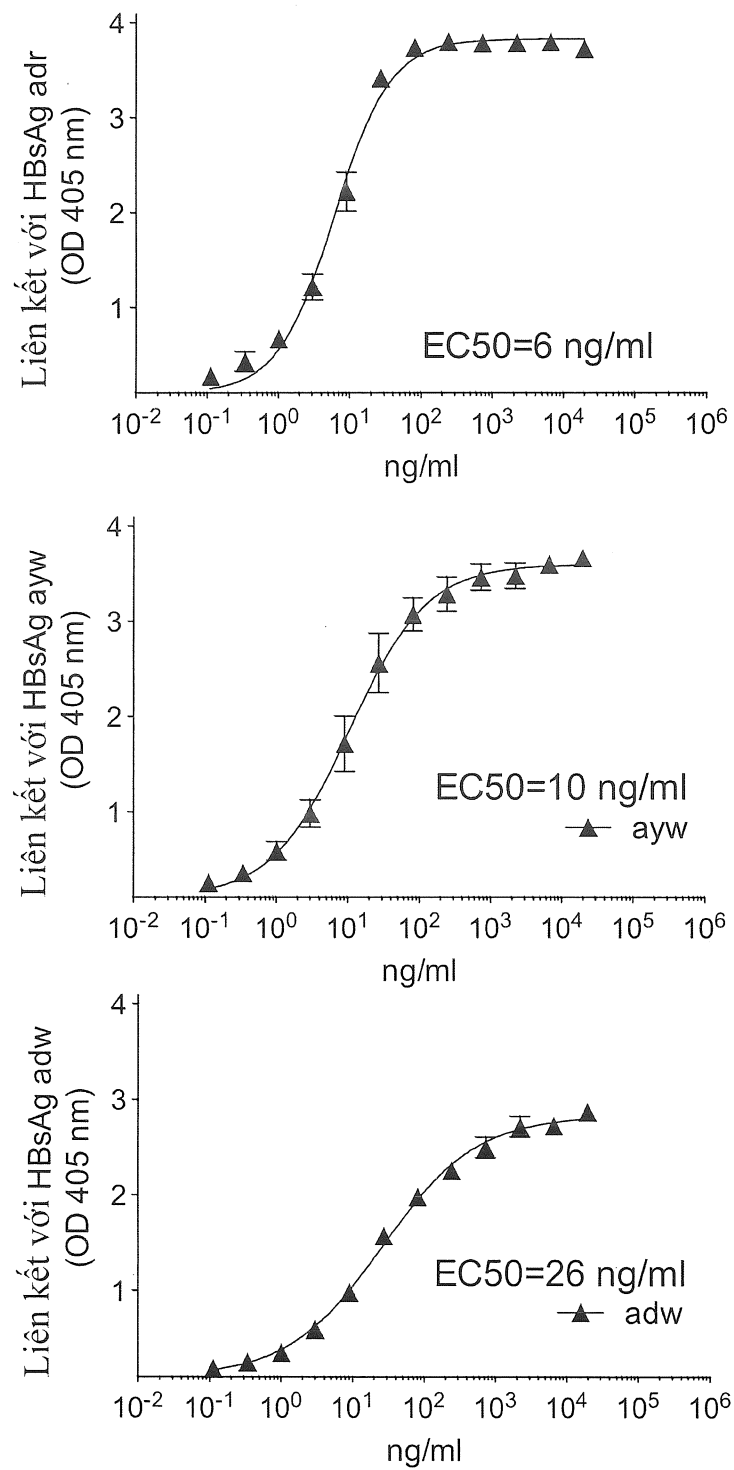
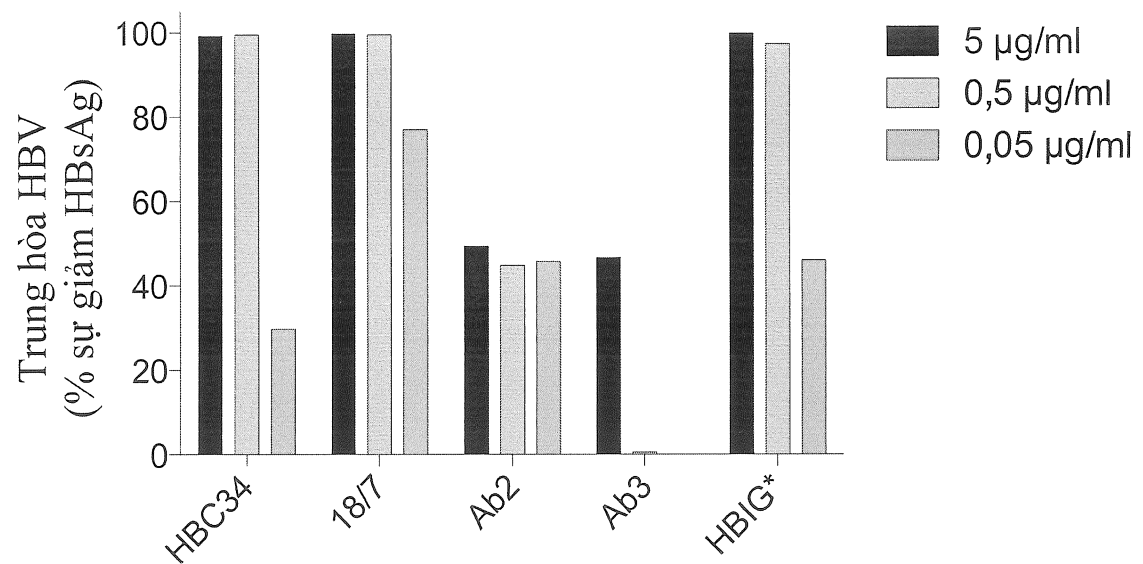


FIG. 1



*HBIG thử nghiệm ở 5000, 500 và 50 µg/ml

FIG. 2

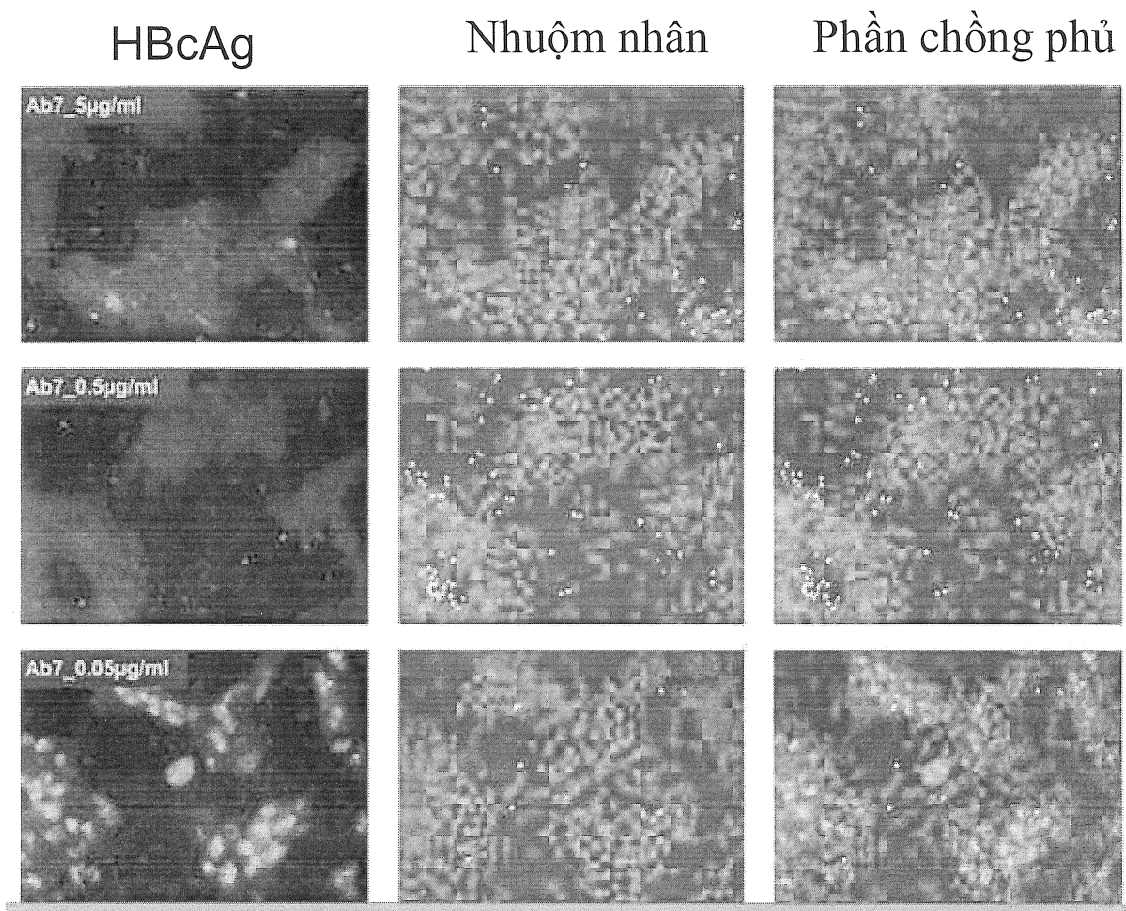


FIG. 3

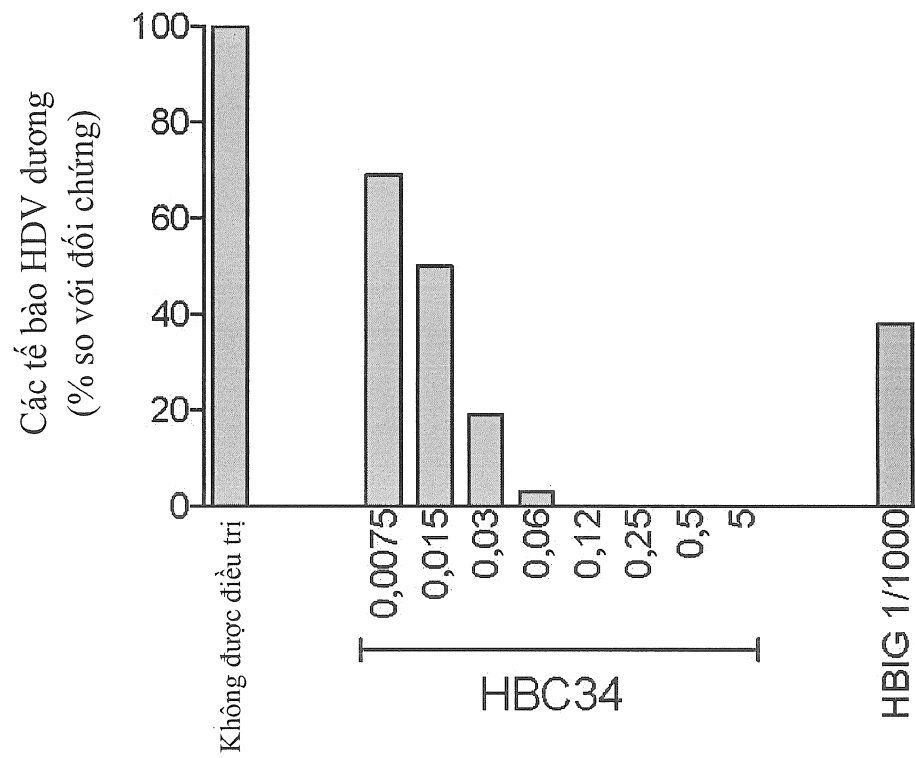


FIG. 4

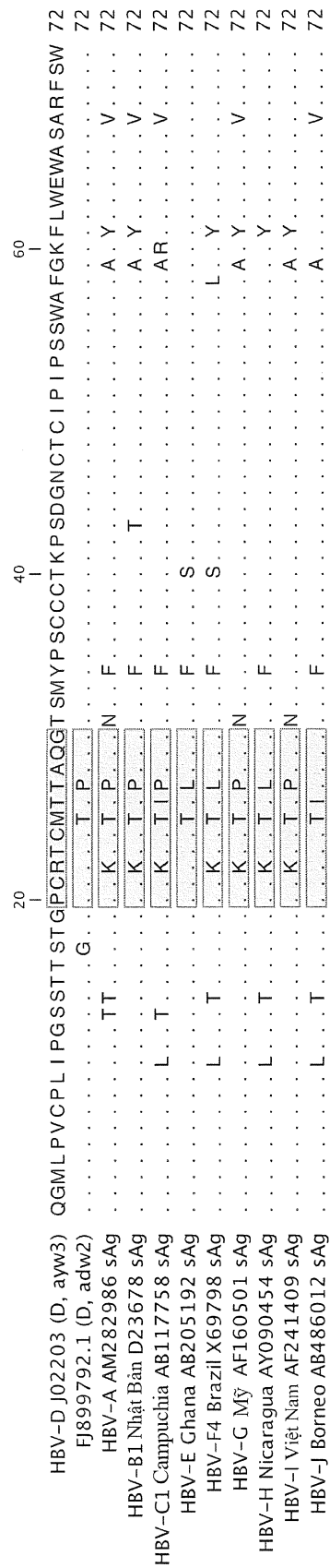


FIG. 5

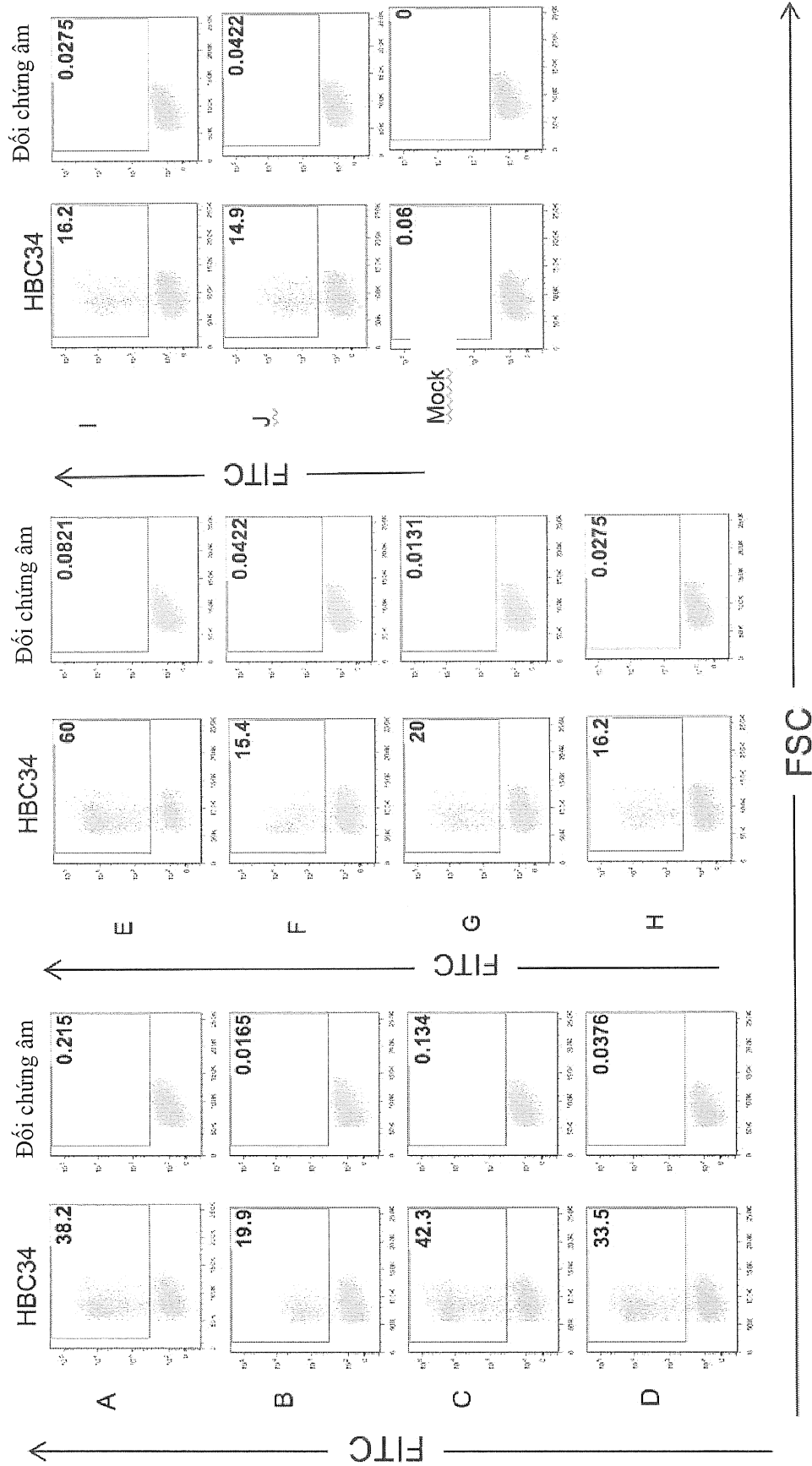


FIG. 6

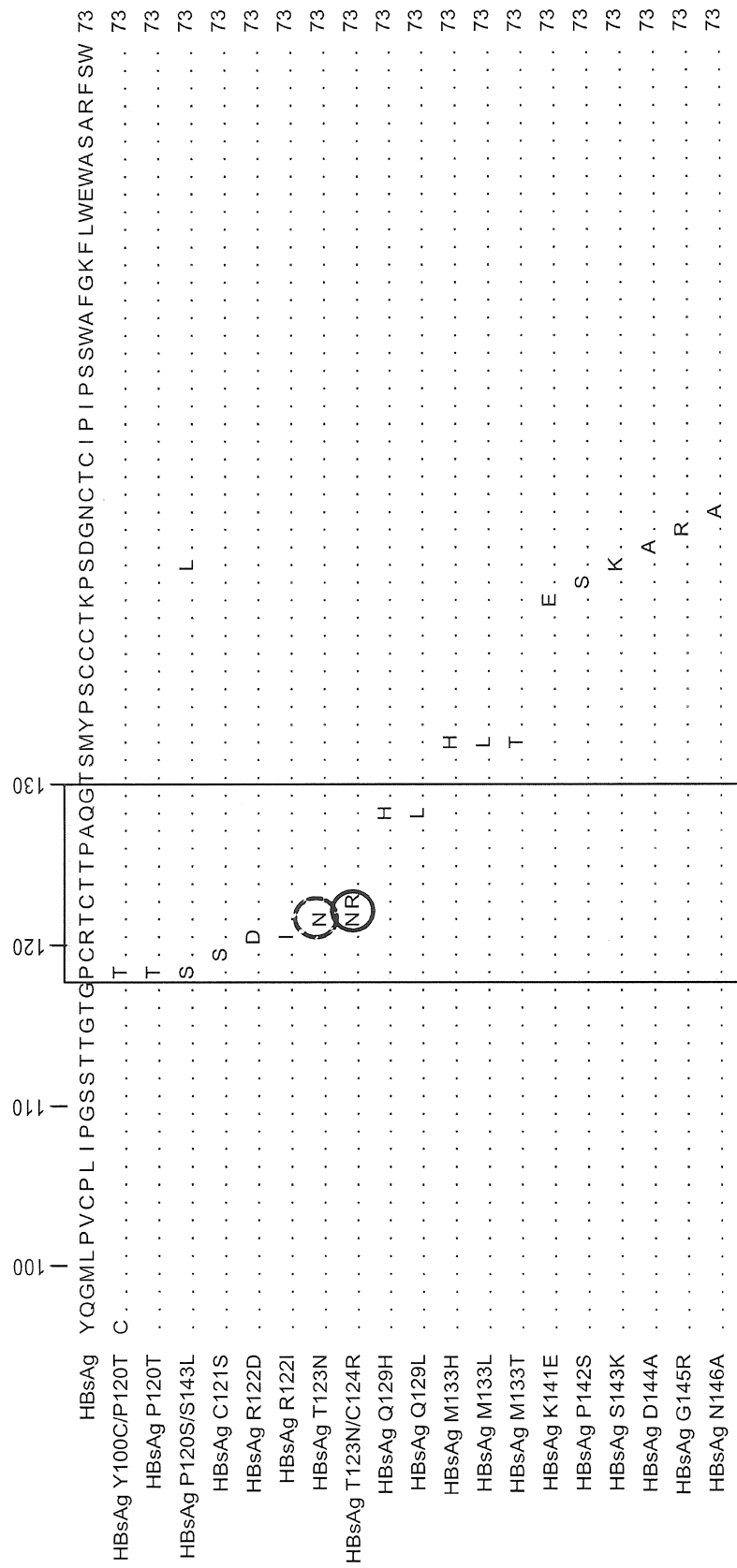
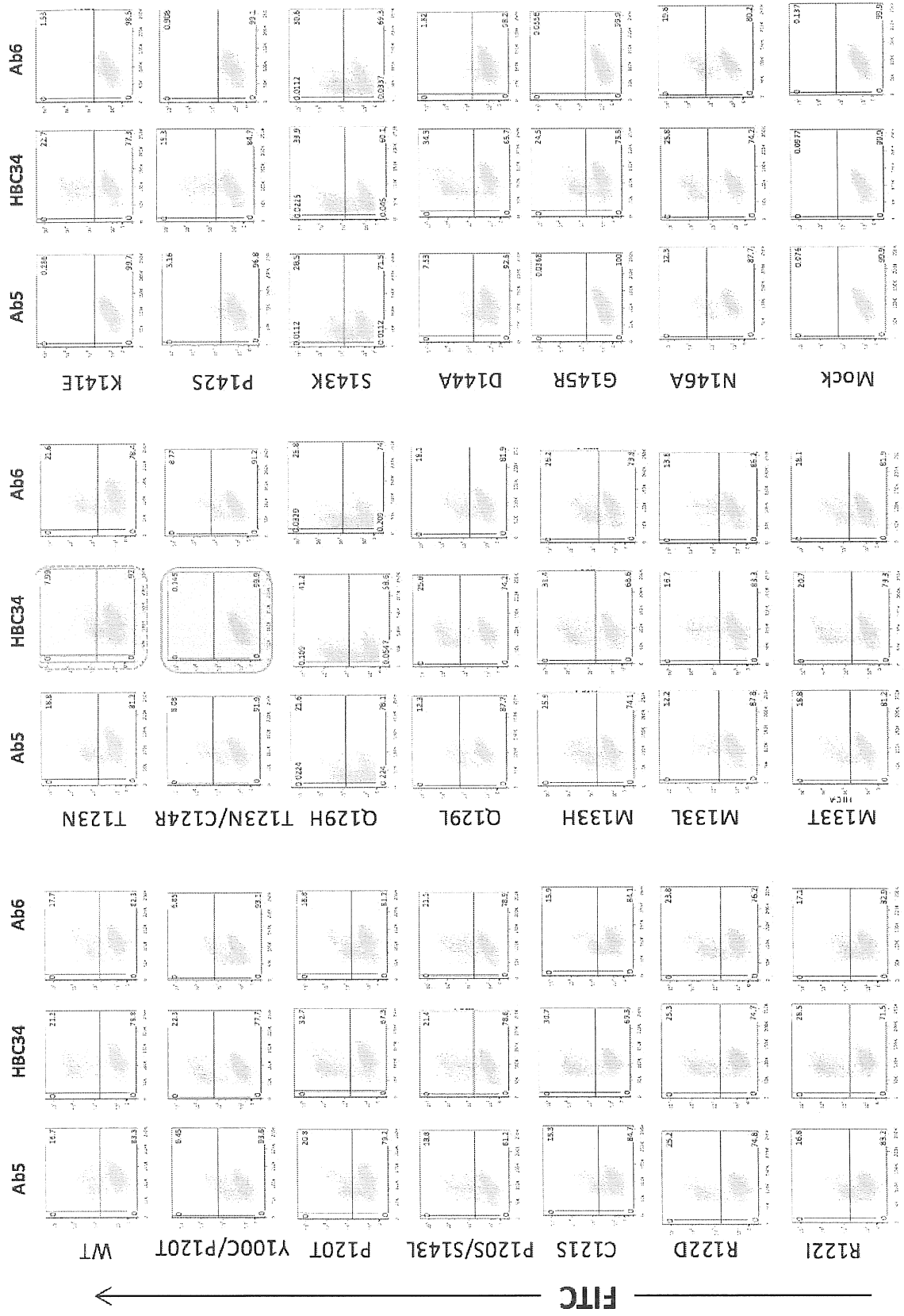


FIG. 7



FSC

FIG. 8

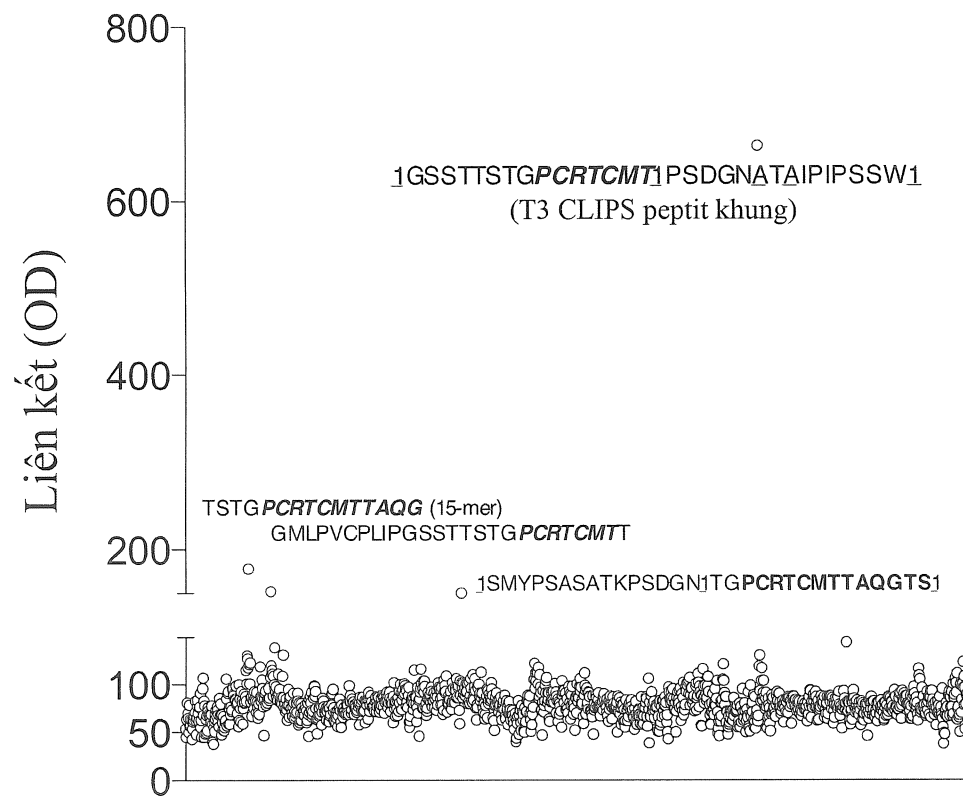


FIG. 9

mab 8 7

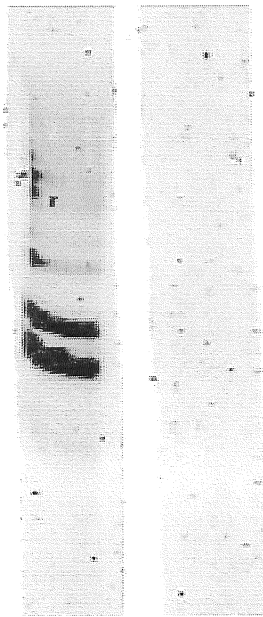


FIG. 10

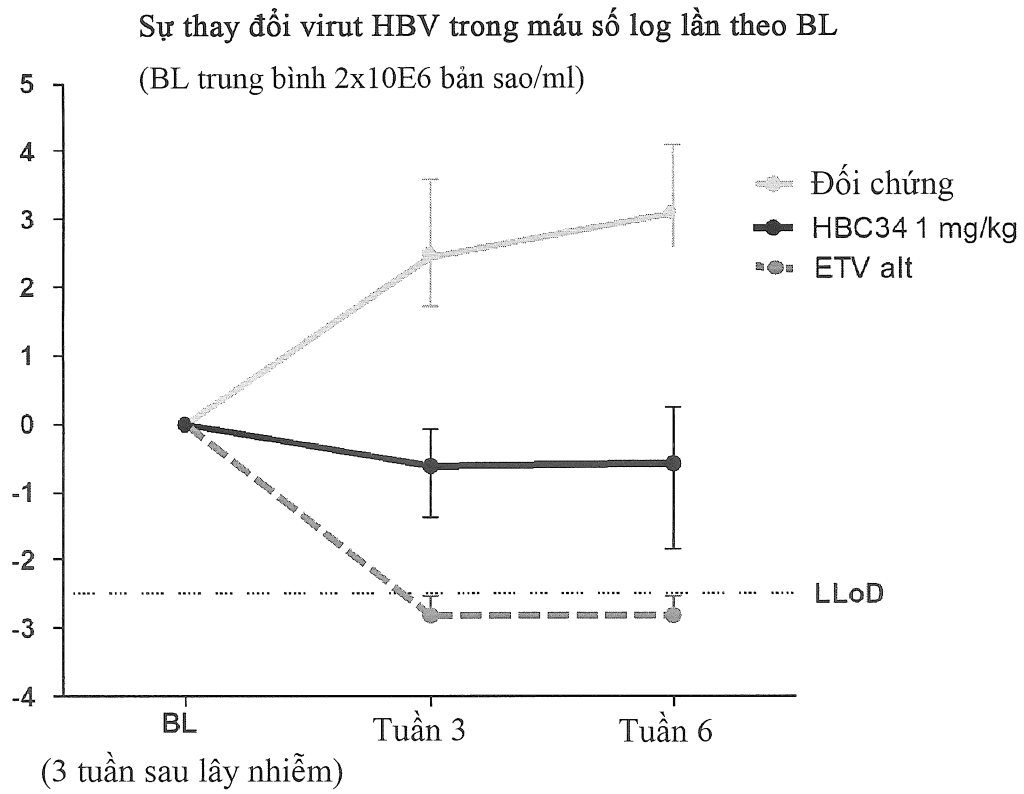


FIG. 11

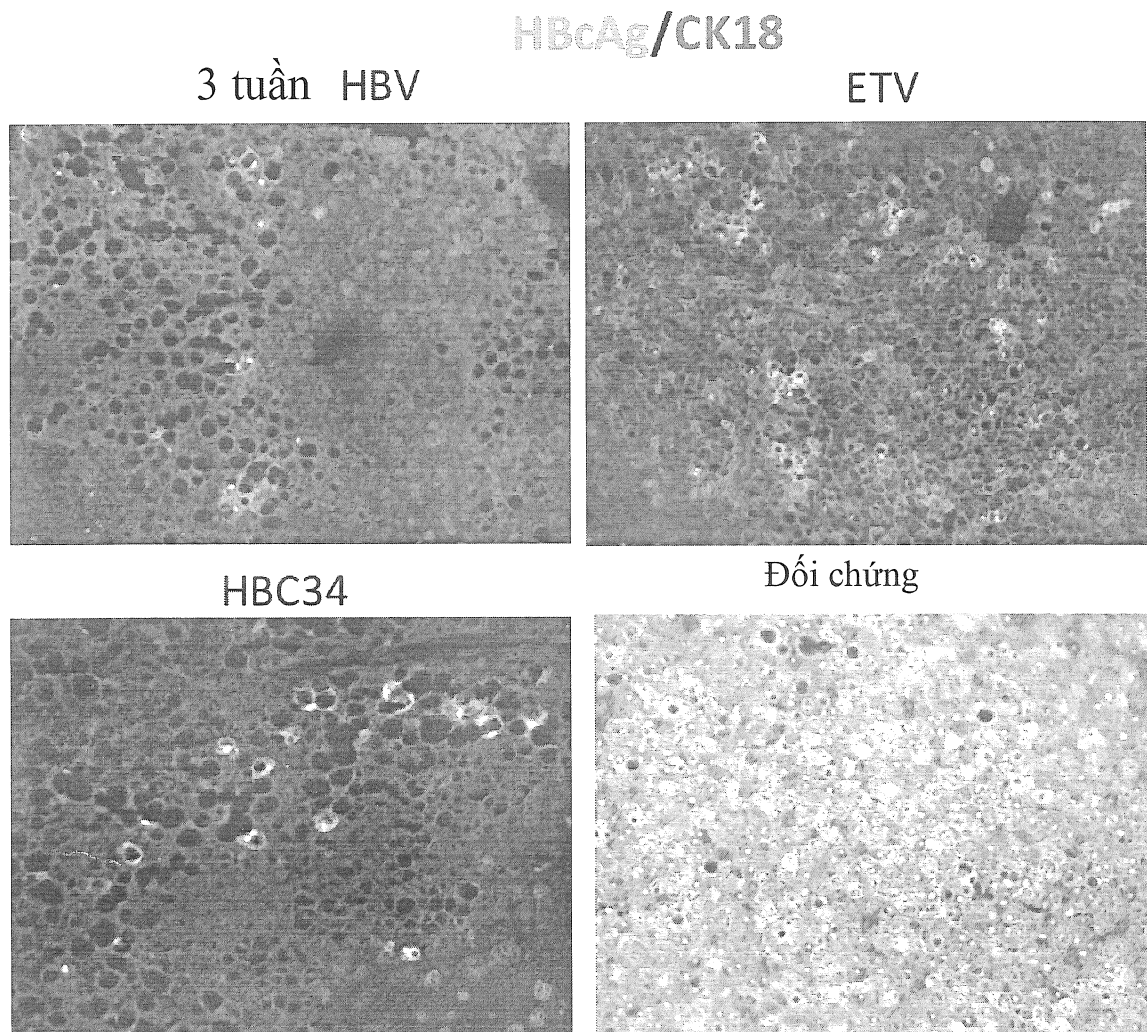


FIG. 12

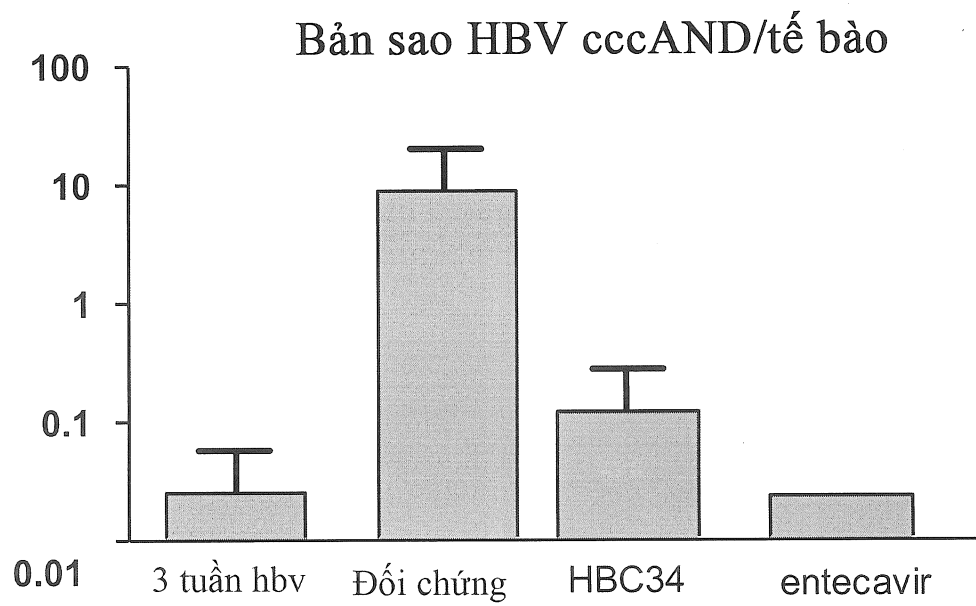


FIG. 13

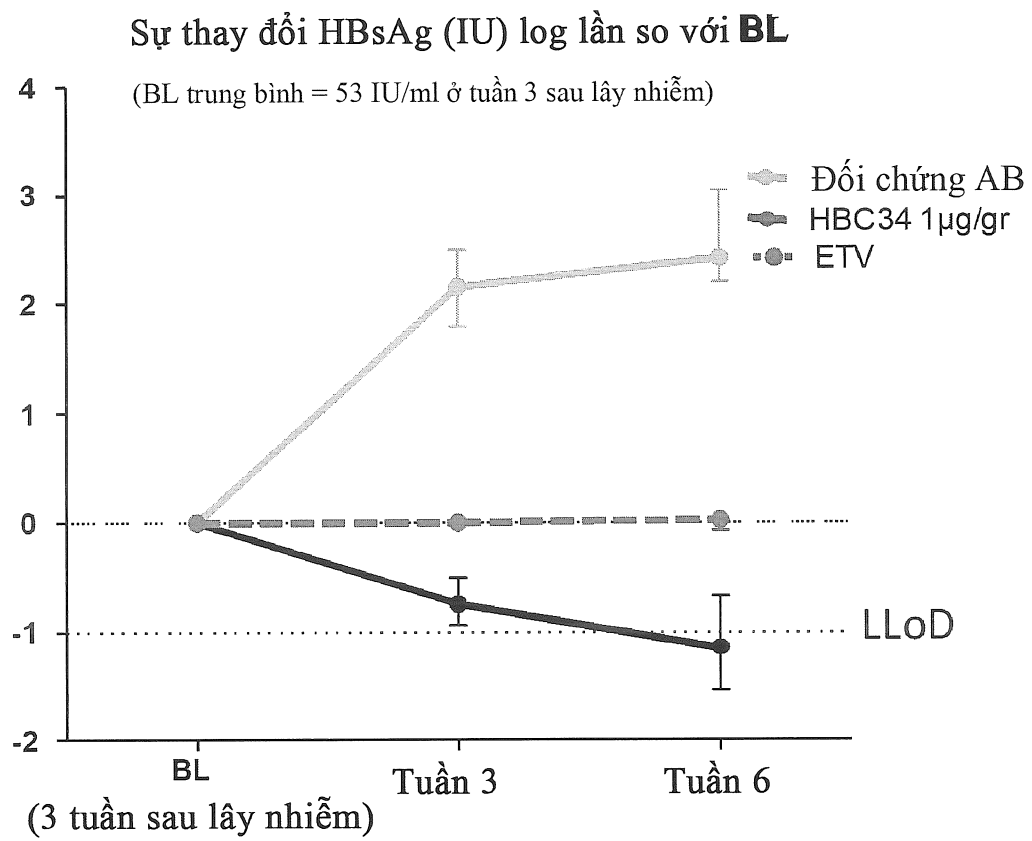


FIG. 14

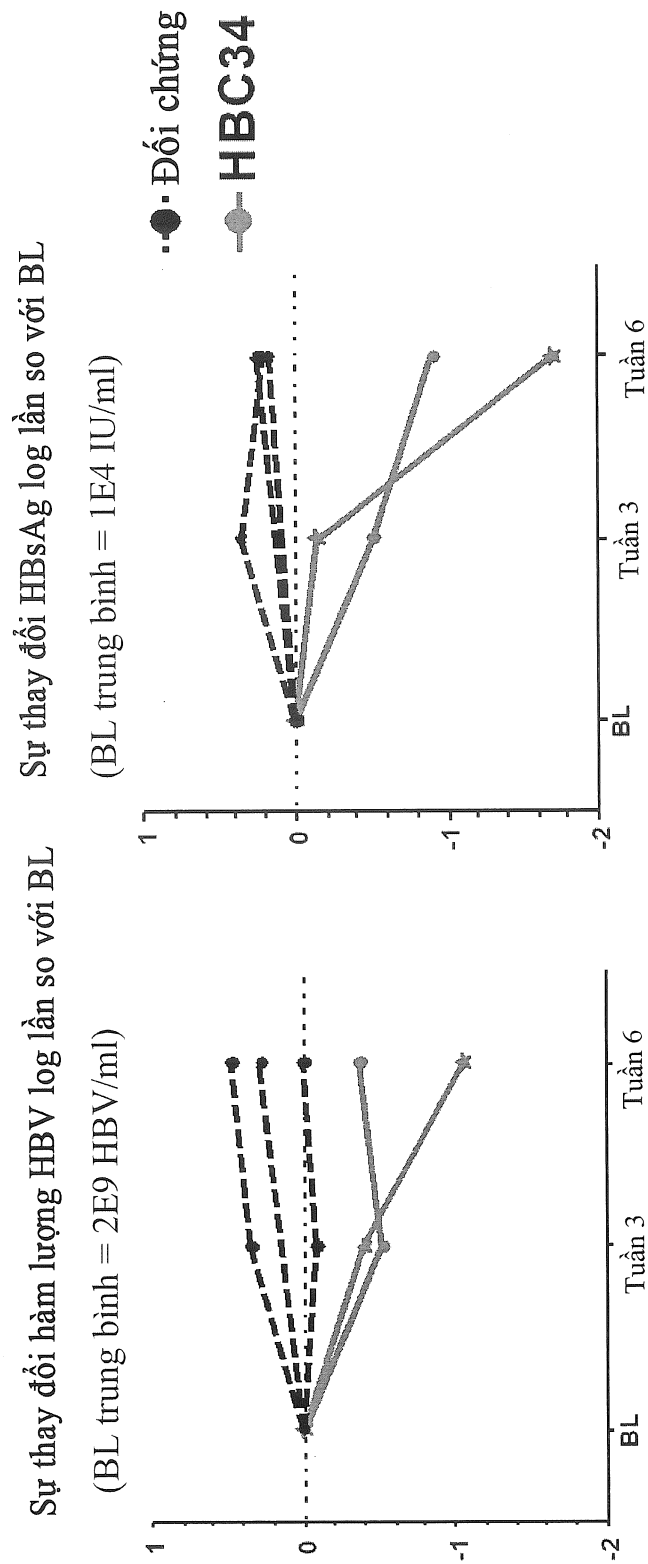


FIG. 15

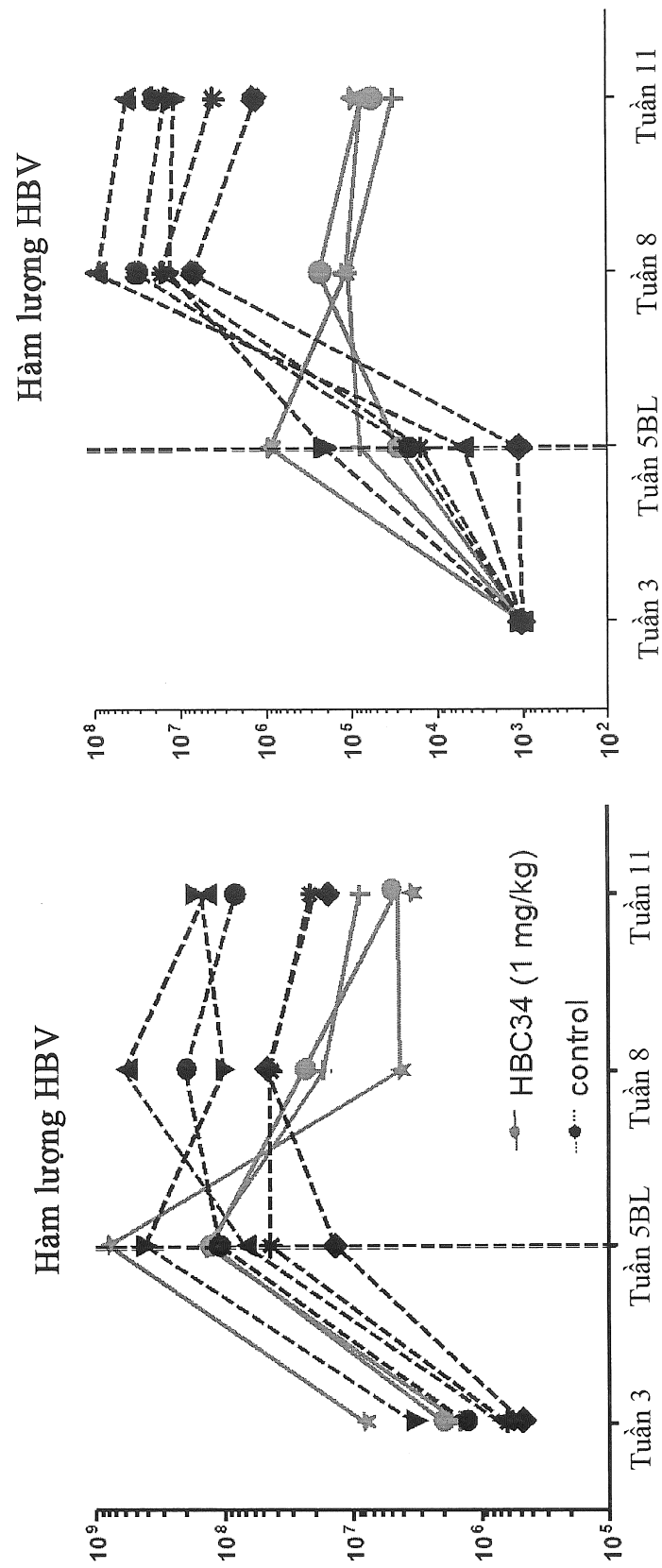


FIG. 16

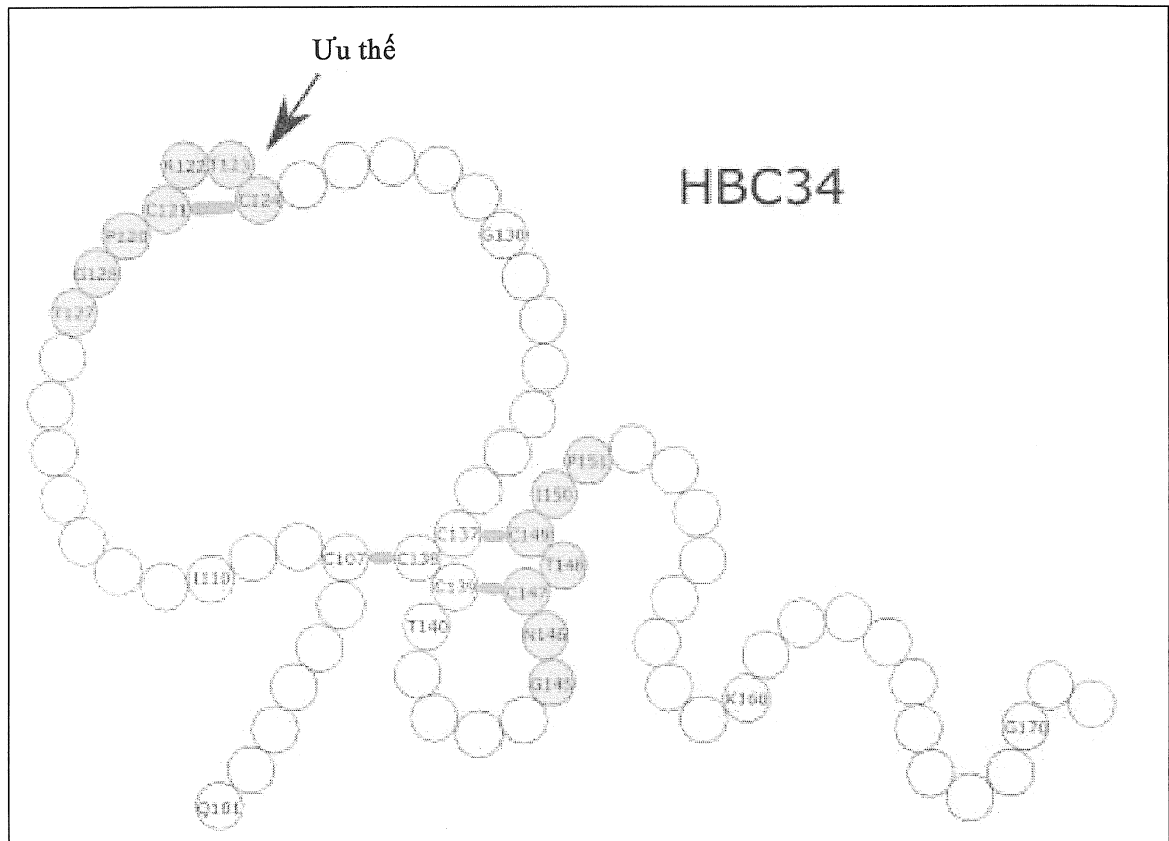
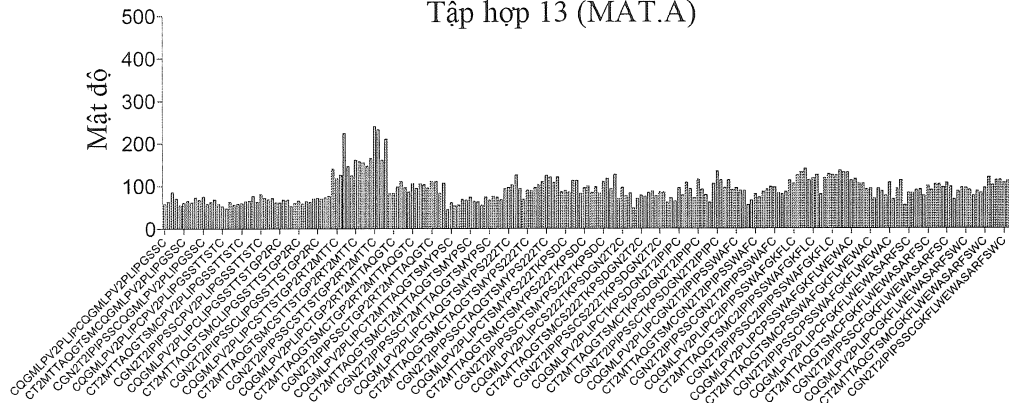
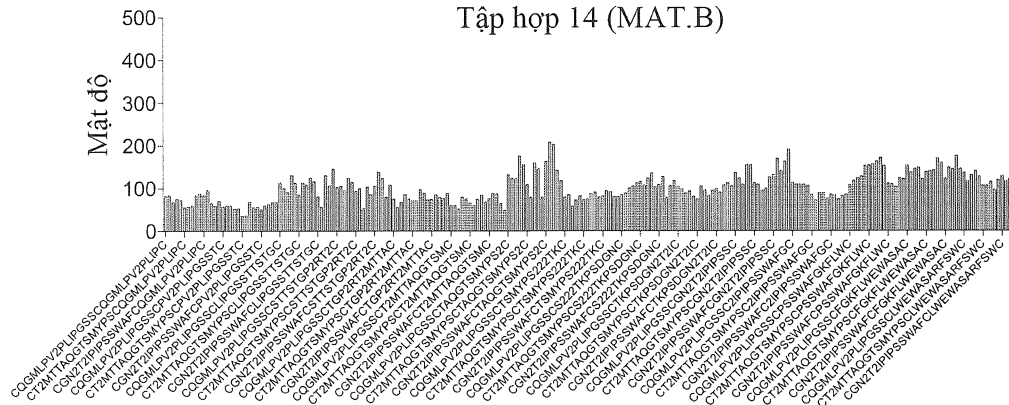


FIG. 17

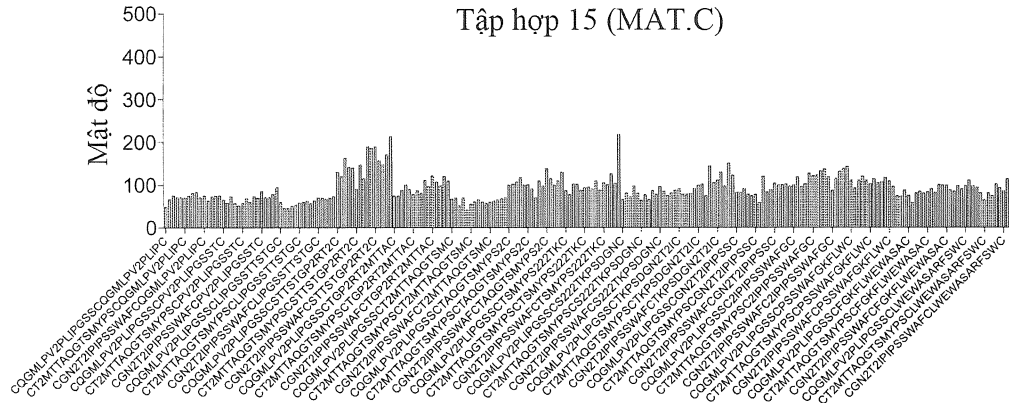
Tập hợp 13 (MAT.A)



Tập hợp 14 (MAT.B)



Tập hợp 15 (MAT.C)



Tập hợp 16 (MAT.D)

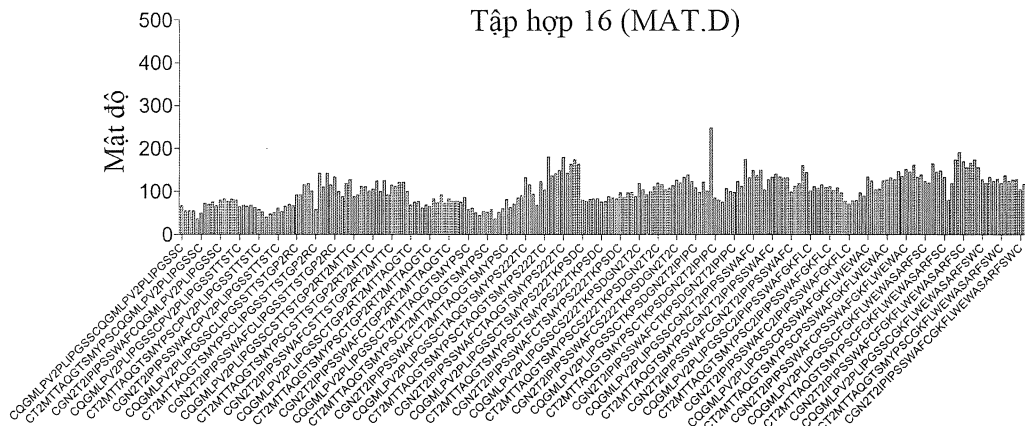


FIG. 17 (Tiếp theo)

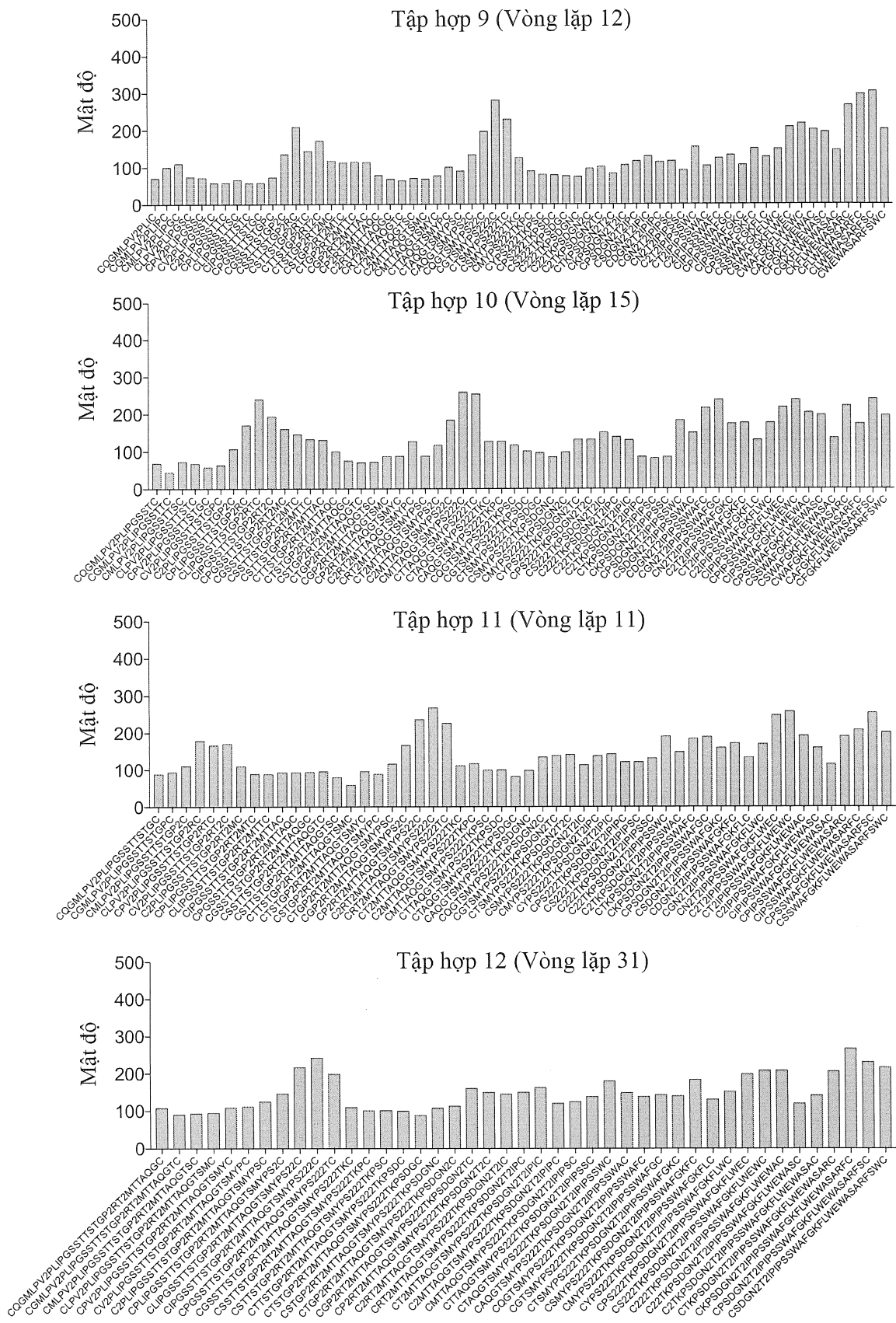


FIG. 17 (Tiếp theo)

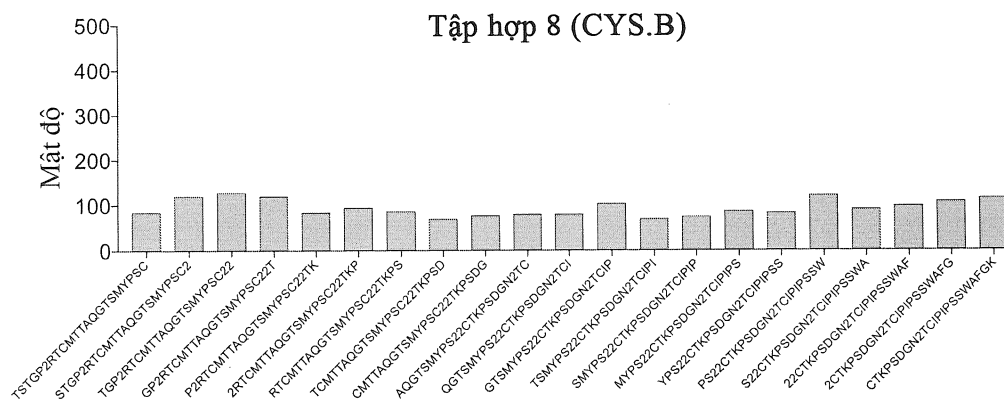
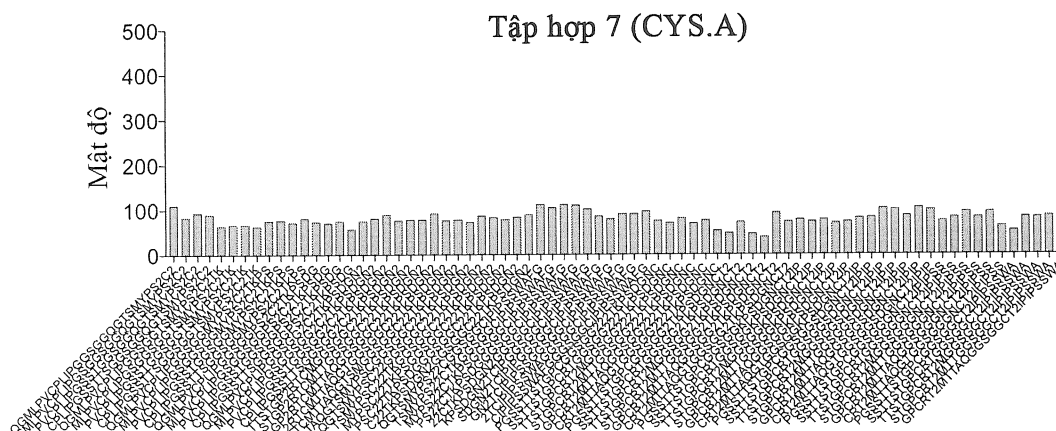
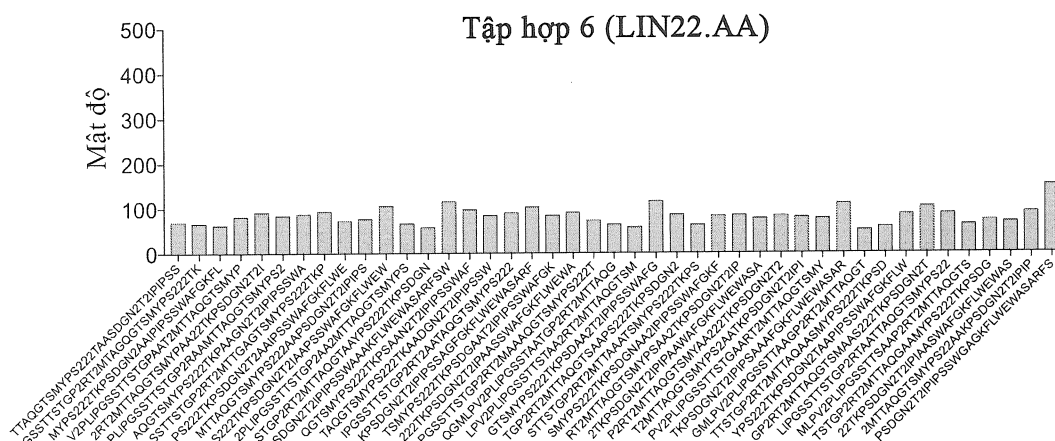
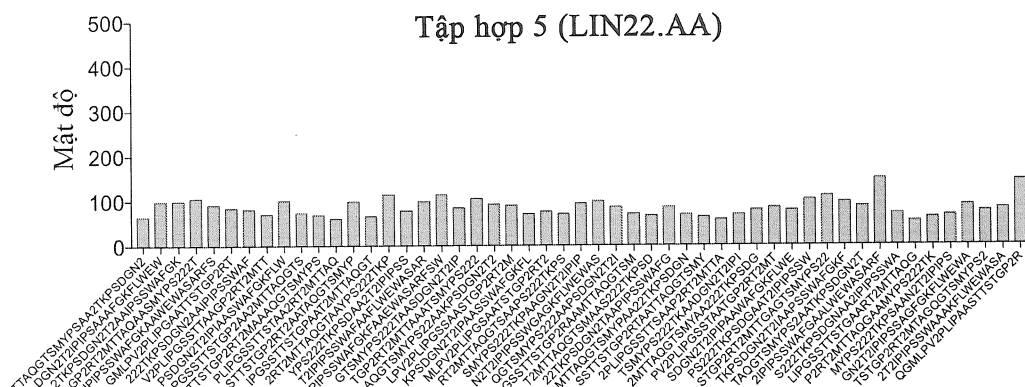
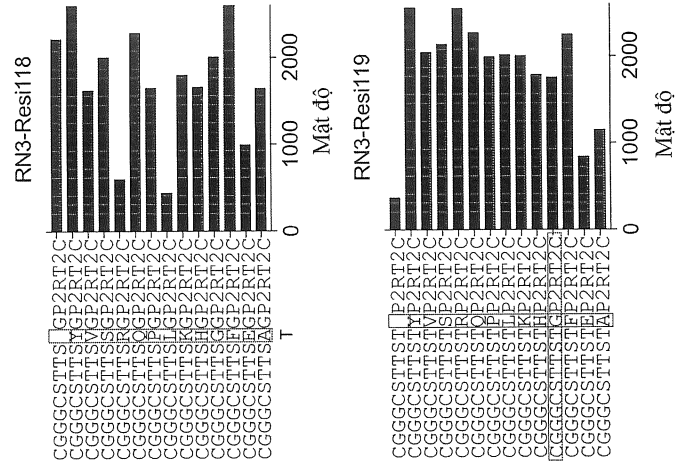
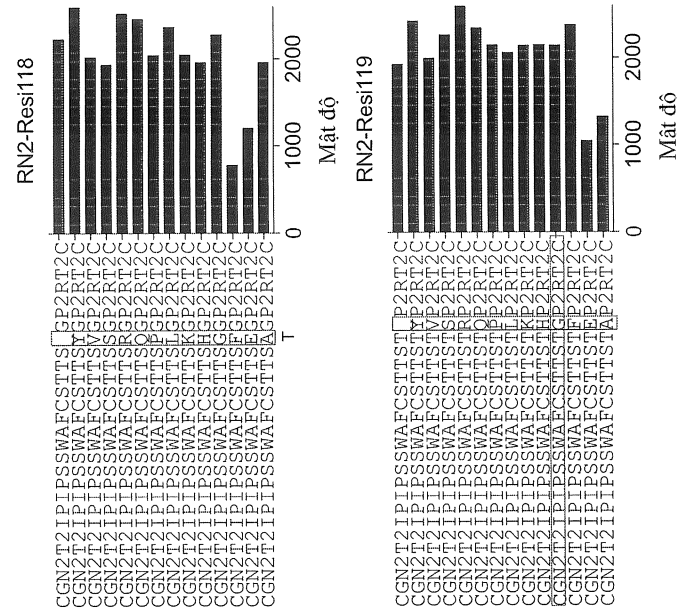


FIG. 17 (Tiếp theo)

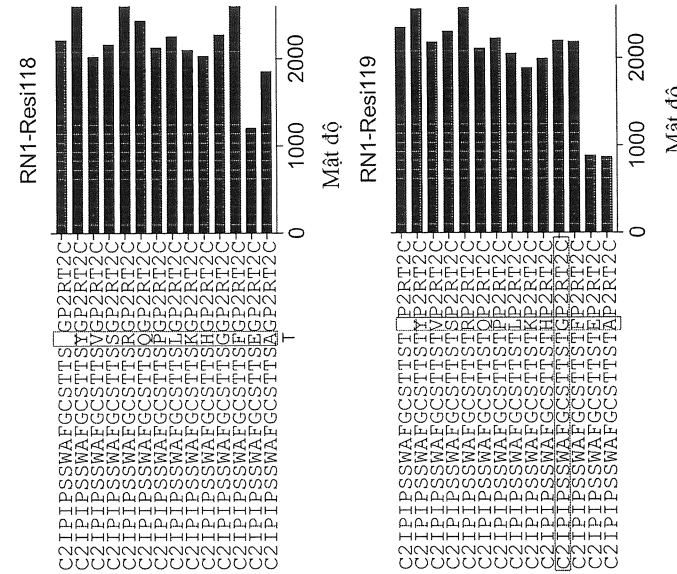
RN3



RN2



RN1



T

G

FIG. 18

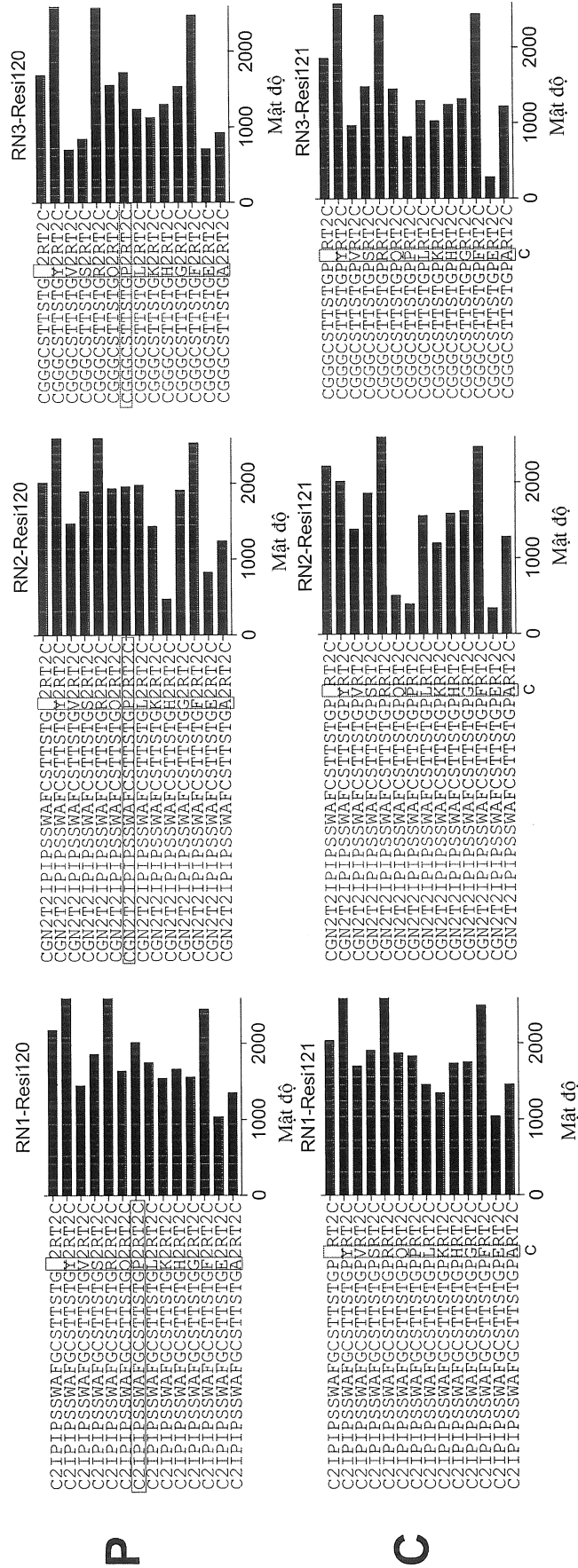
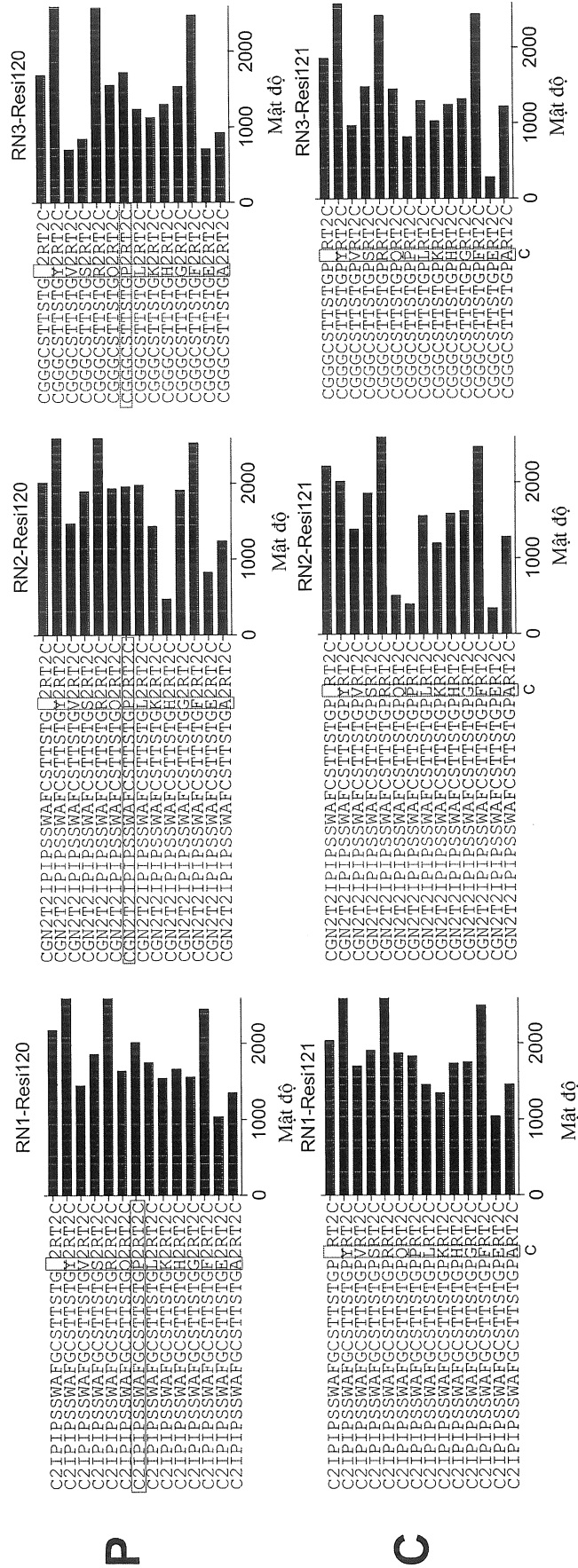
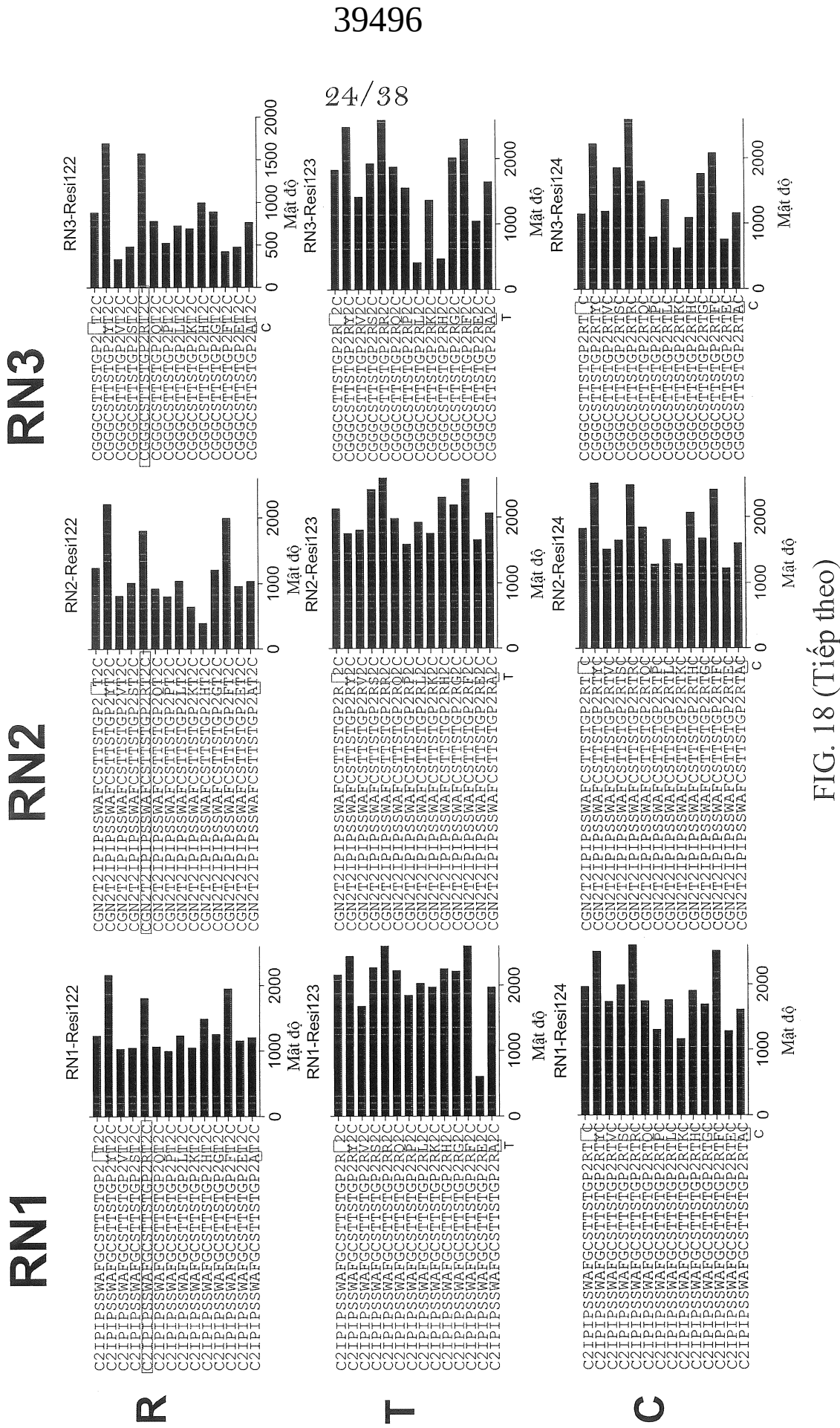


FIG. 18 (Tiếp theo)



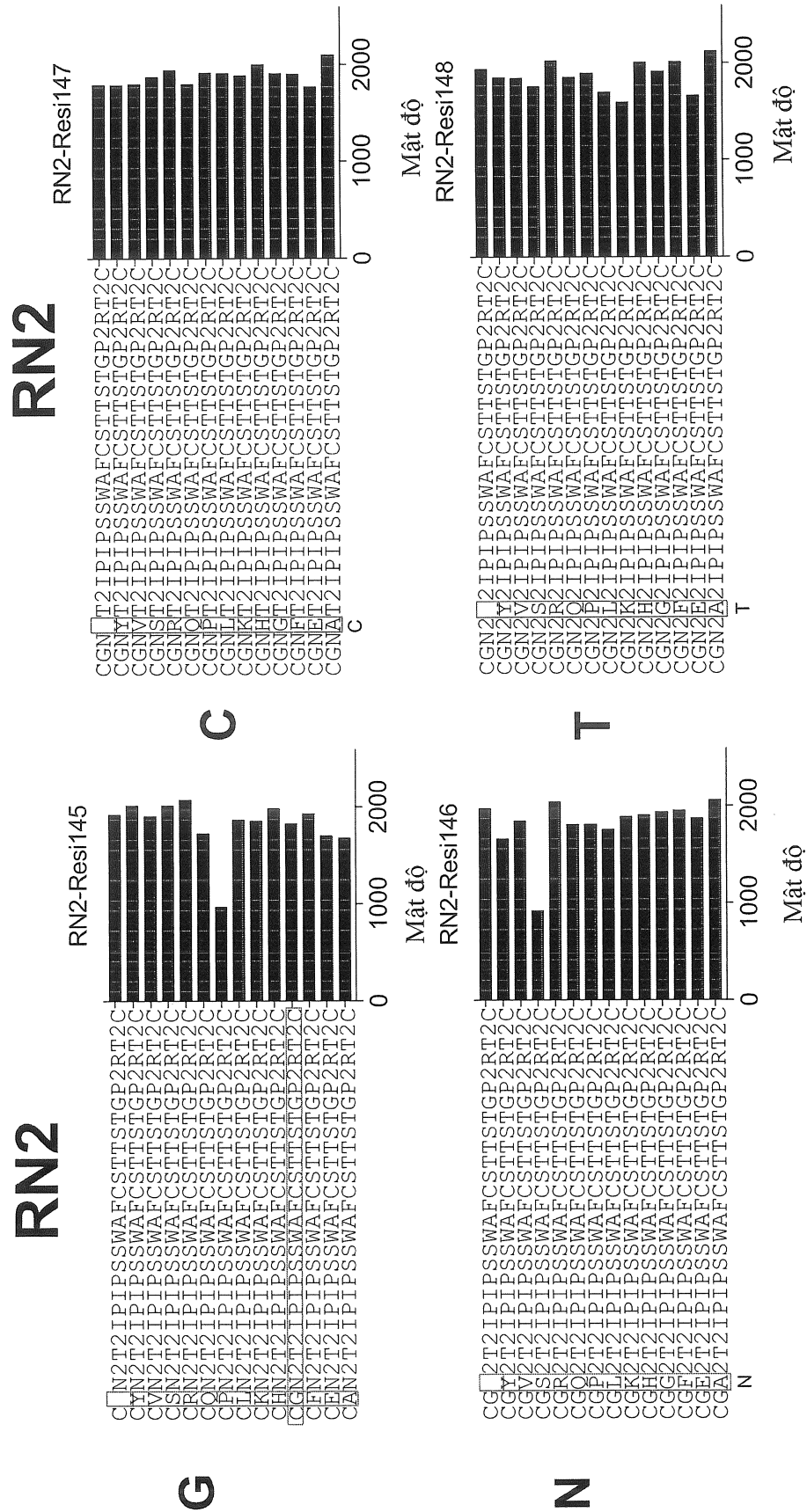


FIG. 18 (Tiếp theo)

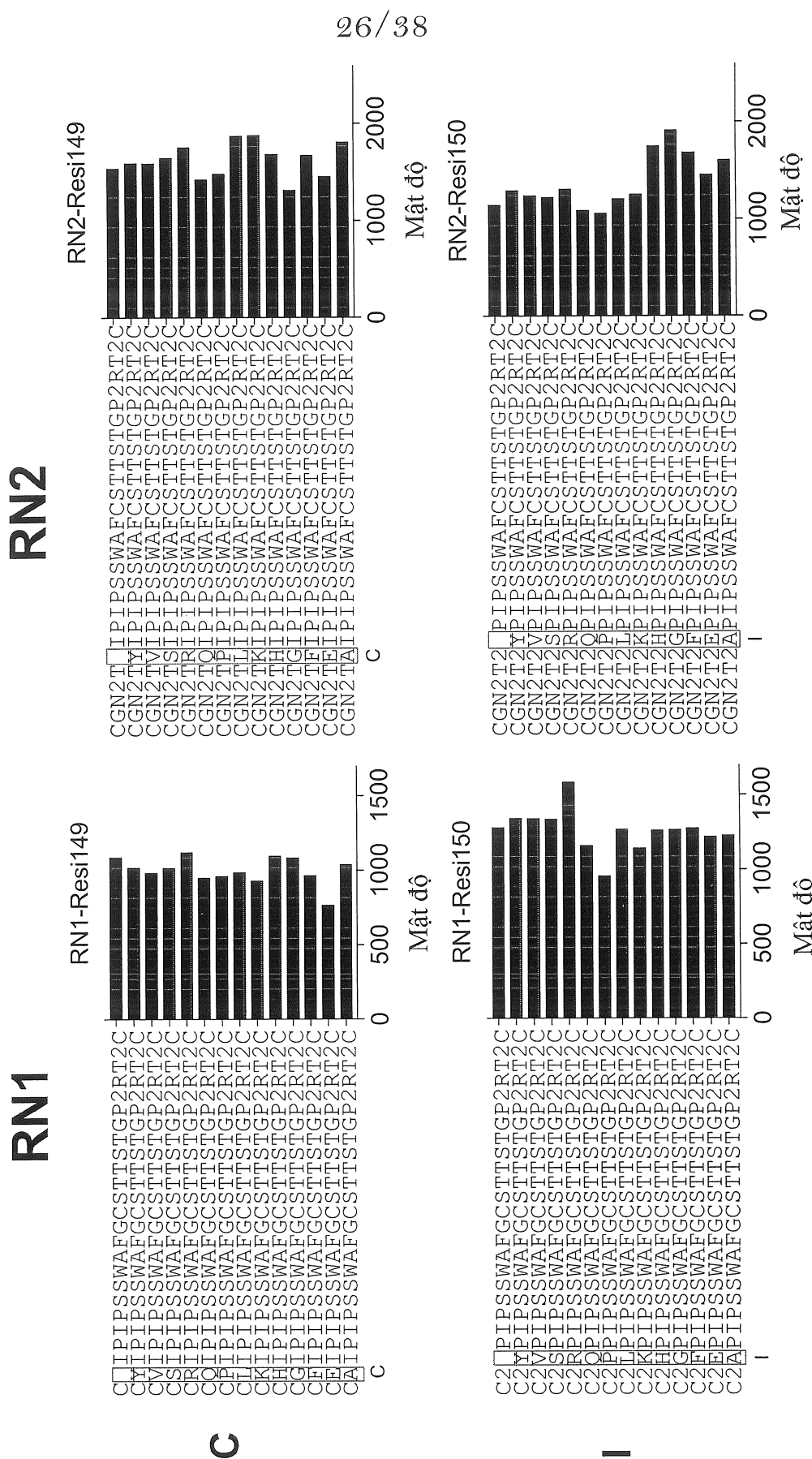


FIG. 18 (Tiếp theo)

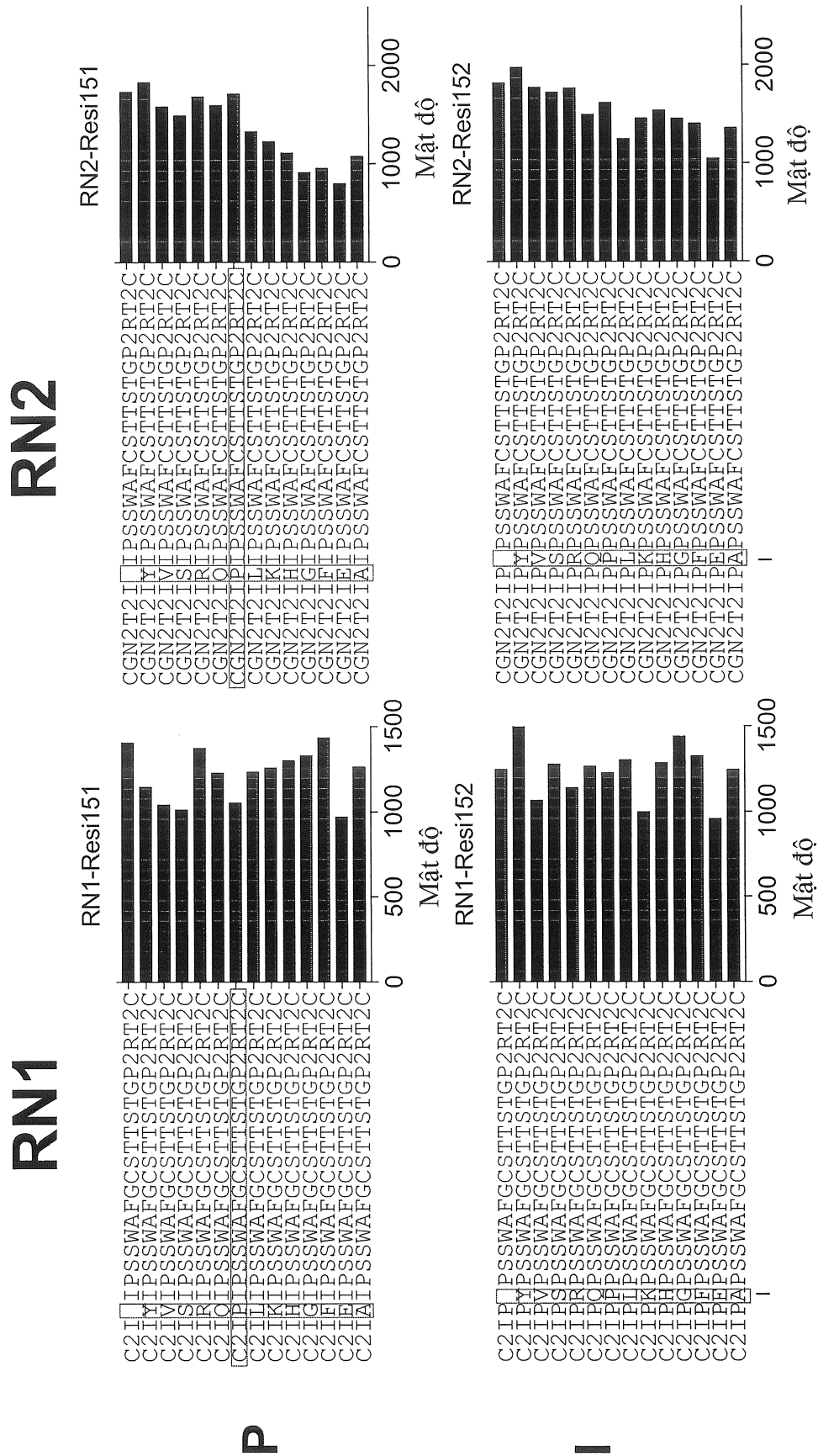


FIG. 18 (Tiếp theo)

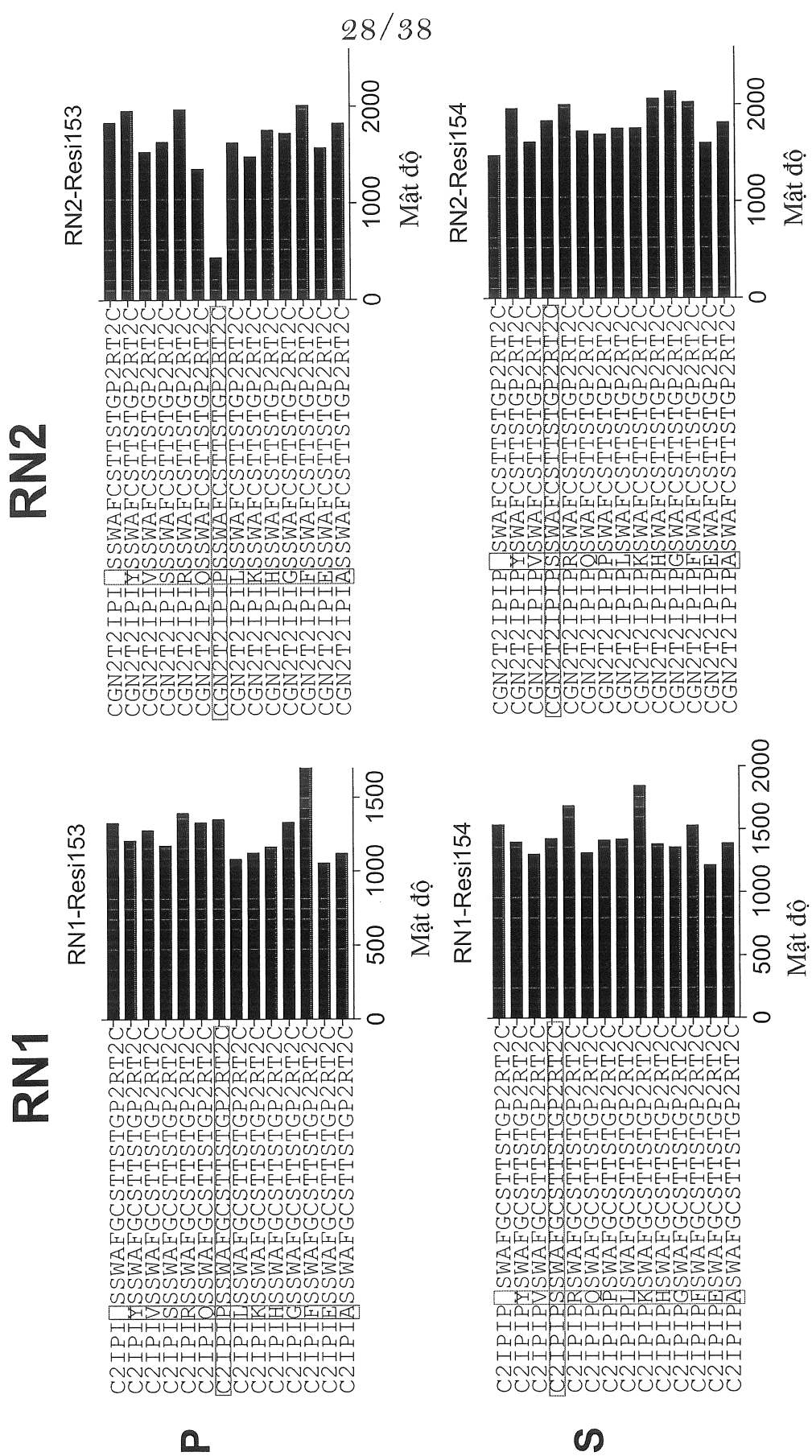


FIG. 18 (Tiếp theo)

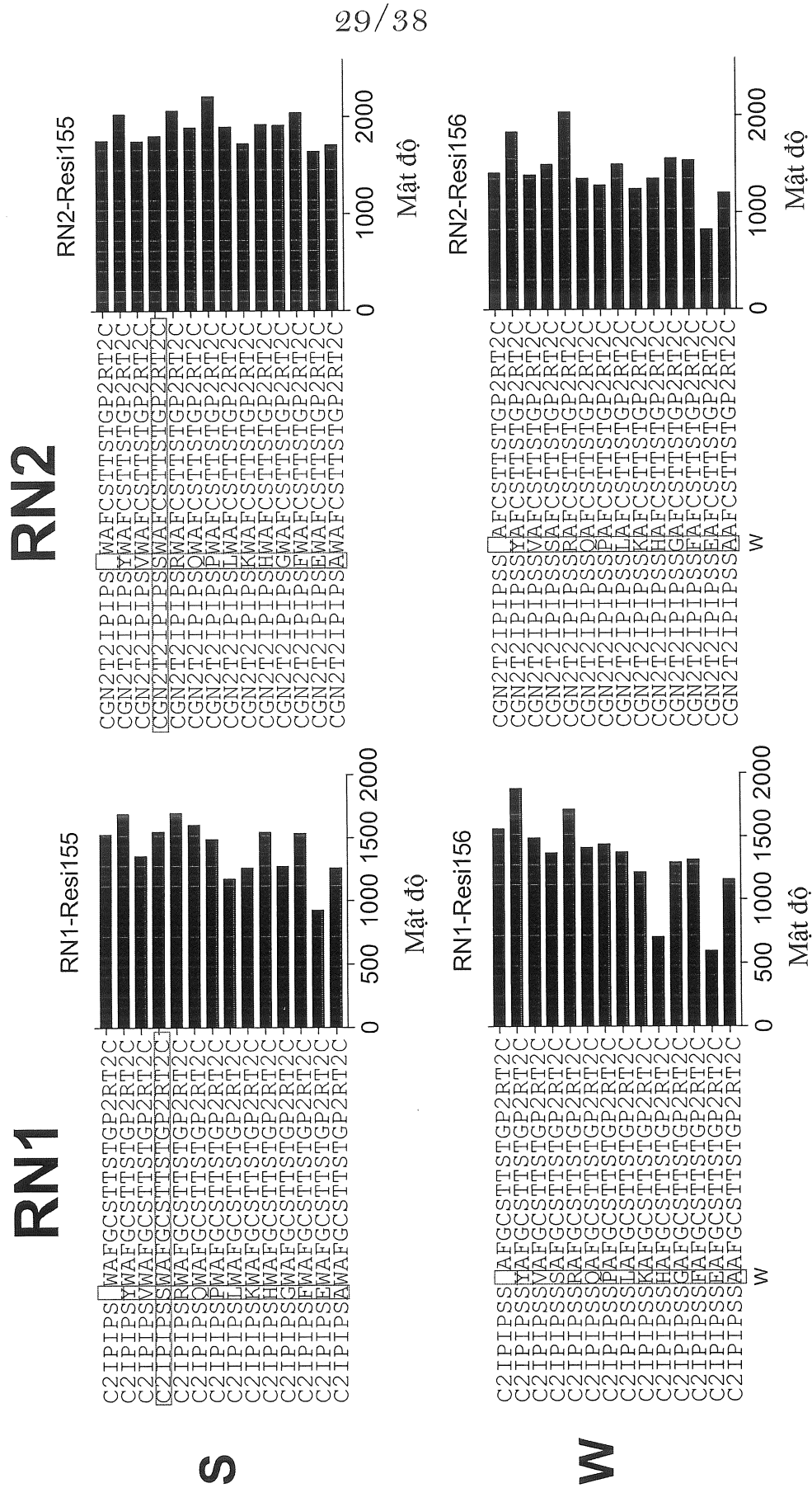
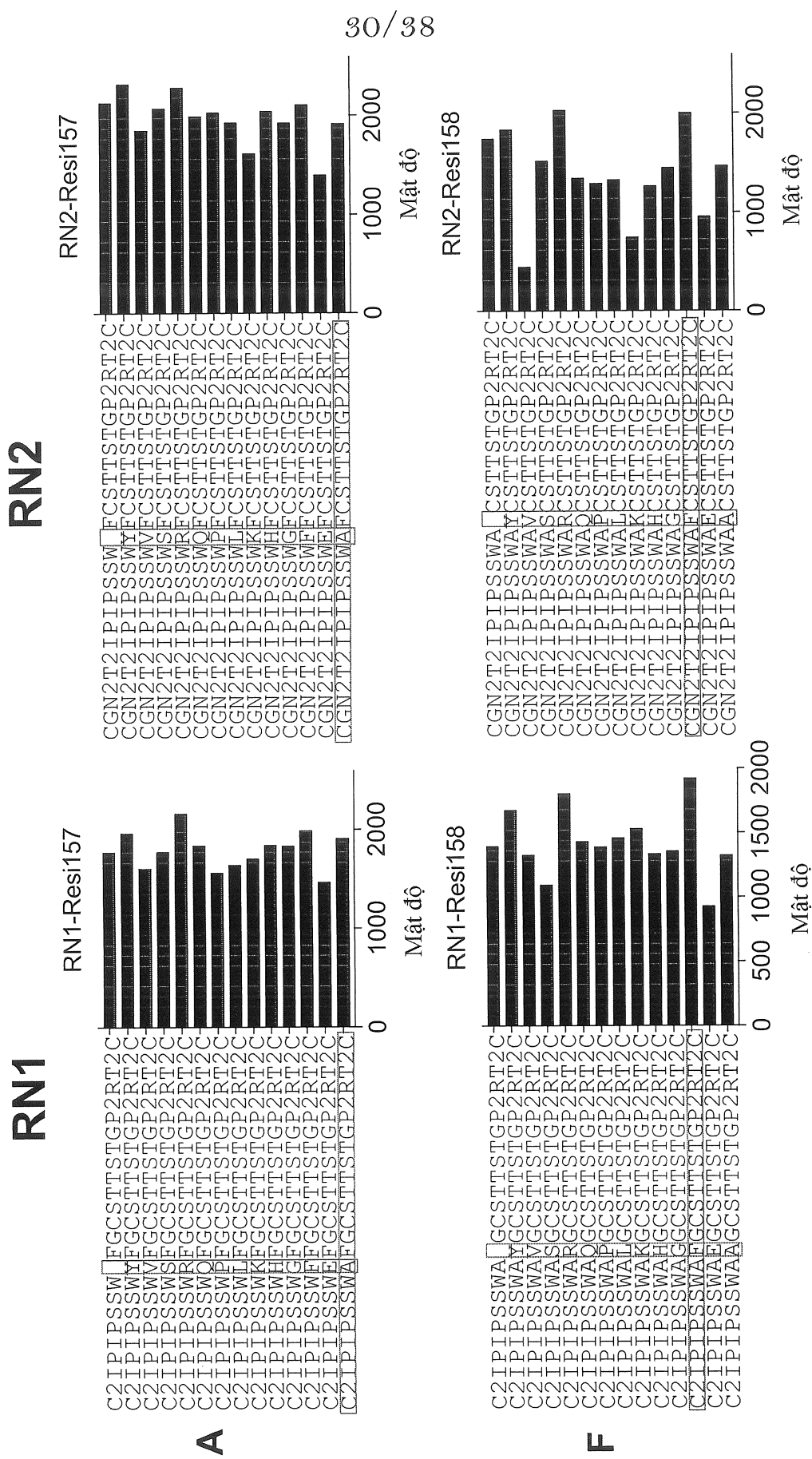


FIG. 18 (Tiếp theo)



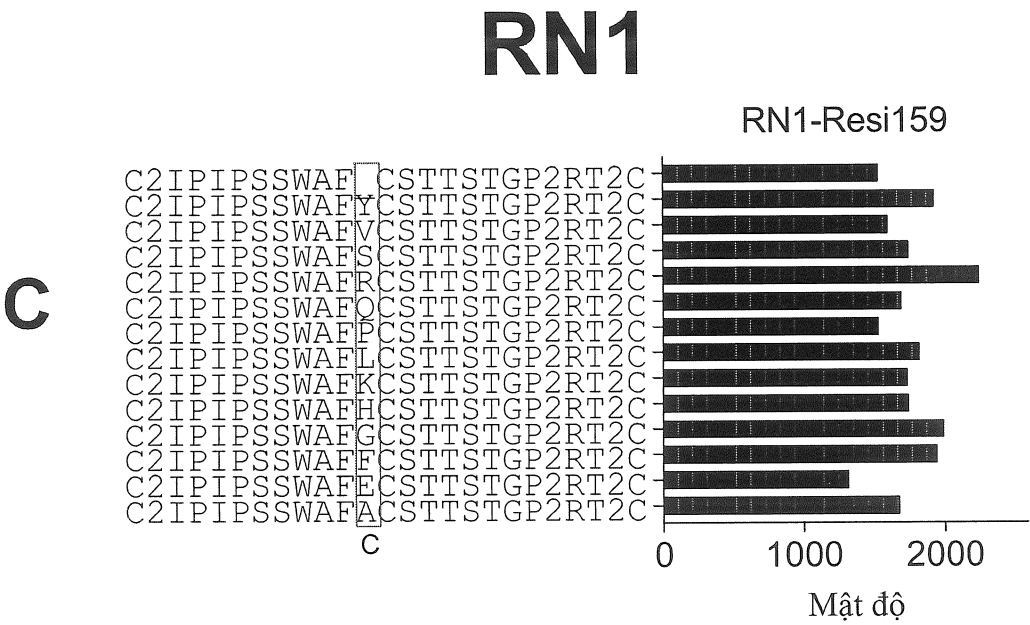


FIG. 18 (Tiếp theo)

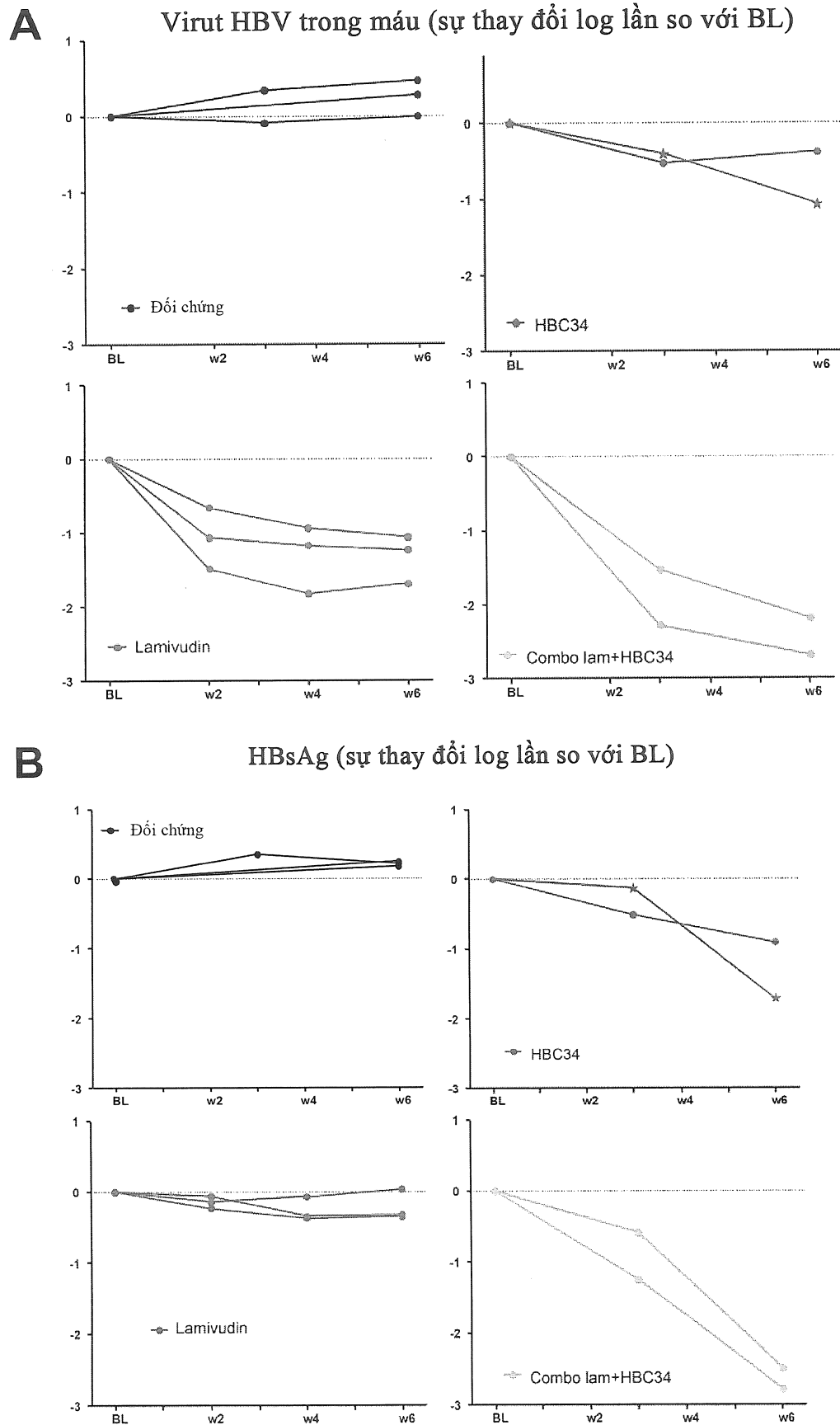


FIG. 19

A

VH-WT	ELQLVESGGGWVQPGGSQLSCAASGRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGGSEKLYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNSGGMDVWGQGT	TVSVSS	119
VH-M115I		I	119
VH-M115L		L	119
VH-W107A		A	119
VH-W107A/M115A		A	119
VH-W107F		F	119
VH-M115L/FR124GL	V	L	119
VH-M115L/FR1234GL	V	L	119
VH-FR124GL	V	L	119
VH-UCA	V	L	119

B

VL-WT	SYELTQPPSVSVSPGQTVSI	PCSGDKLGKKNVCWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGTOAMDEAA	YFCQ	TWDSTTVV	FGG	TRL	TVL	106
VL-W107A				A				106
VL-W107F				F				106
VL-W107F/FR1234GL	A	T	A	Y	Q	K		106
VL-W107F/FR1234GL/Y66	A	T	A	Y	Q	K		106
VL-UCA	A	T	D	Y	A	S	A	106

FIG. 20

Tên biến thể	VH	VL	Liên kết với HBsAg (adw)
HBC34	WT	WT	+
HBC34-V1	W107F	WT	+/-
HBC34-V2	W107F	W107A	-
HBC34-V3	W107F	W107F	+/-
HBC34-V4	M115I	W107F	+/-
HBC34-V5	W107A	W107F	-
HBC34-V6	M115L	W107F	+/~
HBC34-V7	WT	W107F	+
HBC34-V8	W107A/M115A	W107F	-
HBC34-V9	W107A/M115A	W107A	-
HBC34-V10	W107A/M115A	WT	-
HBC34-V11	M115I	WT	+/~
HBC34-V12	W107A	WT	-
HBC34-V13	M115L	WT	+
HBC34-V15	WT	W107A	+/~
HBC34-V16	M115L	W107A	+/-
HBC34-V17	W107A	W107A	-
HBC34-V18	M115I	W107A	+/-

FIG. 21

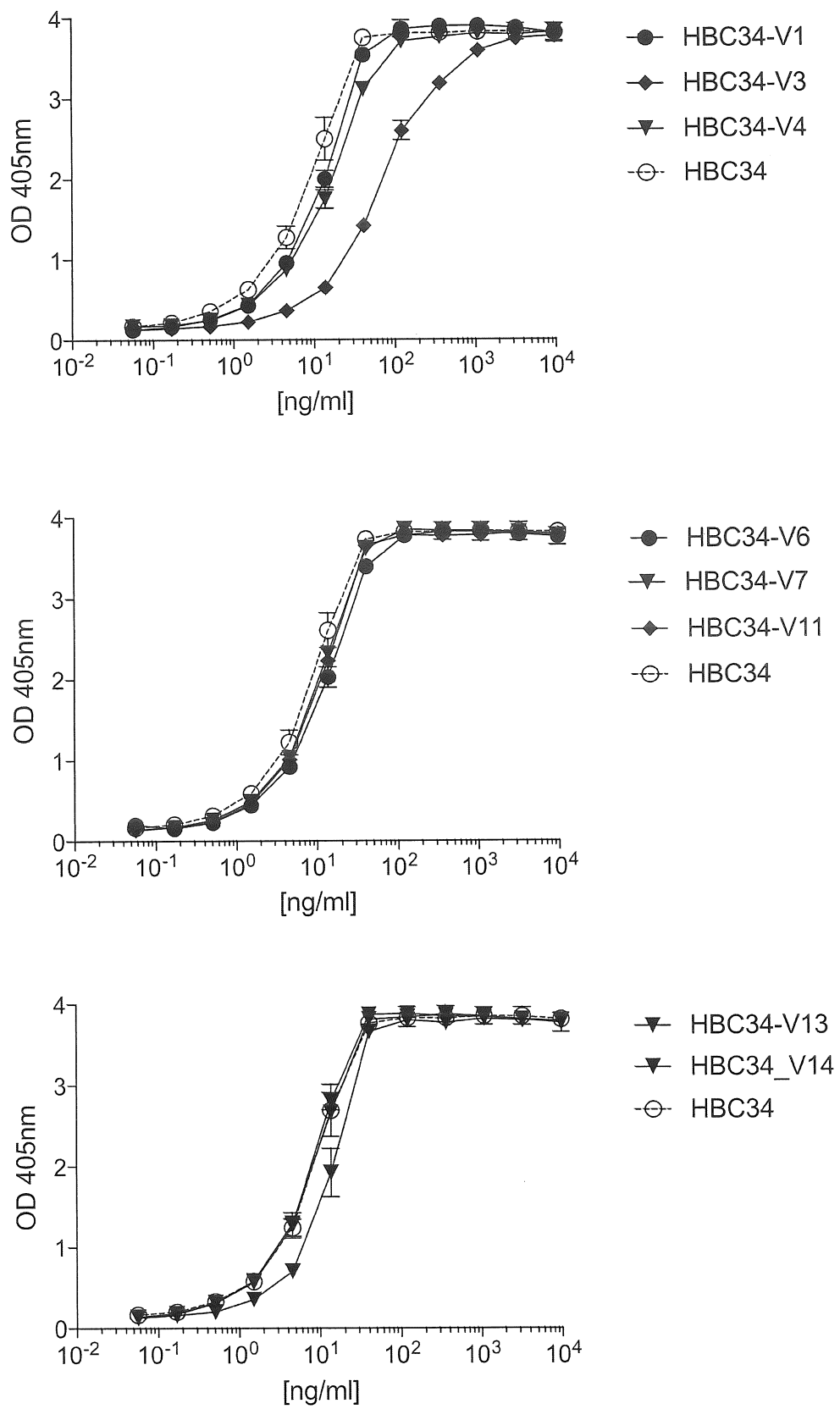


FIG. 22

Tên biến thể	VH	VL	Liên kết EC50	Sự thay đổi gấp (đột biến/wt)	Hiệu suất ($\mu\text{g/ml}$)	Sự thay đổi gấp (đột biến/wt)
HBC34	WT	WT	7,7	1,0	318	1,00
HBC34-V1	W107F	WT	12,8	1,6	79	0,25
HBC34-V3	W107F	W107F	69,4	9,0	64	0,20
HBC34-V4	M115I	W107F	15,7	2,0	112	0,35
HBC34-V6	M115L	W107F	12,7	1,6	103	0,32
HBC34-V7	WT	W107F	10,4	1,3	533	1,68
HBC34-V11	M115I	WT	10,8	1,4	195	0,61
HBC34-V13	M115L	WT	8,0	1,0	106	0,33

FIG. 23

A

Tên biến thể	Cải biến VH	Cải biến VL	EC50	Sự thay đổi gấp (đột biến/wt)	Hiệu suất ($\mu\text{g/ml}$)	Sự thay đổi gấp (đột biến/wt)
HBC34	WT	WT	13,3	1,0	197	1,00
HBC34-V6	M115L	W107F	16,5	1,2	35	0,18
HBC34-V7	WT	W107F	18,6	1,4	232	1,18
HBC34-V13	M115L	WT	12,0	0,9	46	0,23
HBC34-V19	M115L/FR124GL	WT	18,9	1,4	37	0,19
HBC34-V20	M115L/FR124GL	WT	31,8	2,4	145	0,73
HBC34-V21	M115L/FR124GL	W107F	607	45,6	28	0,14
HBC34-V22	M115L/FR124GL	W107F	419	31,4	110	0,56
HBC34-V23	WT	W107F/FR1234GL/CDR2Y66	20,1	1,5	184	0,93
HBC34-V24	M115L	W107F/FR1234GL/CDR2Y66	24,0	1,8	27	0,14
HBC34-V25	M115L/FR124GL	W107F/FR1234GL/CDR2Y66	492	36,9	26	0,13
HBC34-V26	M115L/FR1234GL	W107F/FR1234GL/CDR2Y66	125	9,4	93	0,47
HBC34-V27	WT	W107F/FR1234GL	2022	151,8	270	1,37
HBC34-V28	M115L	W107F/FR1234GL	2037	152,9	29	0,15
HBC34-V29	M115L/FR124GL	W107F/FR1234GL	>10000	ND	36	0,18
HBC34-V30	M115L/FR1234GL	W107F/FR1234GL	>10000	ND	101	0,51

B

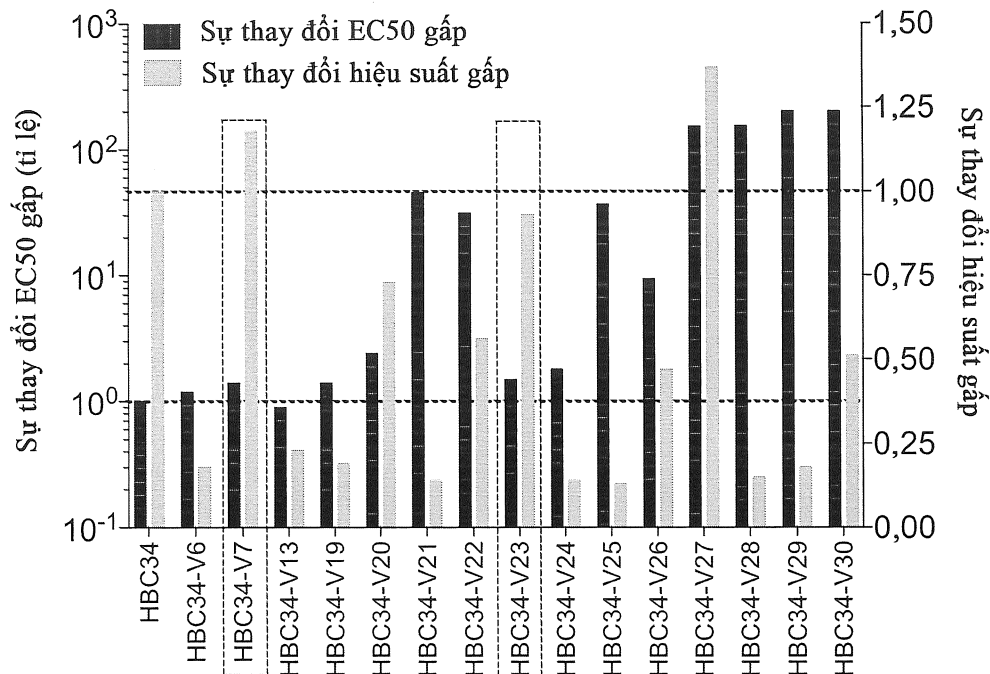


FIG. 24

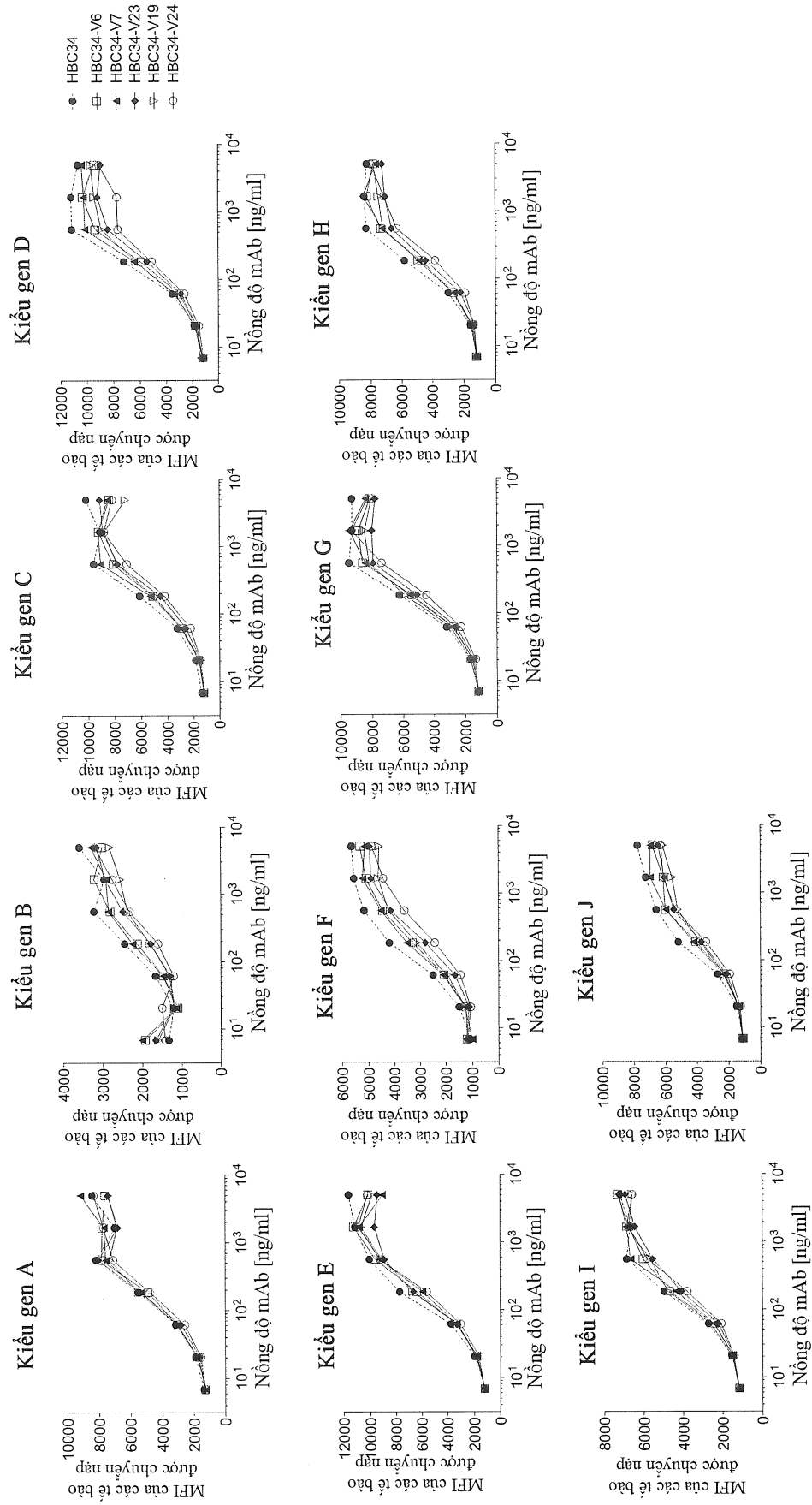


FIG. 25

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Humabs BioMed SA
 <120> KHÁNG THỂ PHÂN LẬP ĐƯỢC TRUNG HOÀ VIRUT VIÊM GAN B VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY
 <130> HB01P024WO1
 <150> PCT/EP2015/001970
 <151> 2015-10-07
 <160> 88
 <170> PatentIn phiên bản 3.5
 <210> 1
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> quyết định kháng nguyên
 <220>
 <221> đặc tính khác
 <222> (1)..(3)
 <223> Xaa có thể là axit amin có trong tự nhiên bất kỳ
 <220>
 <221> đặc tính khác
 <222> (6)..(8)
 <223> Xaa có thể là axit amin có trong tự nhiên bất kỳ
 <220>
 <221> đặc tính khác
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa có thể là axit amin có trong tự nhiên bất kỳ
 <400> 1
 Xaa Xaa Xaa Thr Cys Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Gly
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> quyết định kháng nguyên
 <220>
 <221> đặc tính khác
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa là Pro, Thr hoặc Ser

<220>
 <221> đặc tính khác
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa là Cys hoặc Ser

<220>
 <221> đặc tính khác
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa là Arg, Lys, Asp hoặc Ile

<220>
 <221> đặc tính khác
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa là Met hoặc Thr

<220>
 <221> đặc tính khác
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa là Thr, Ala hoặc Ile

<220>
 <221> đặc tính khác
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa là Thr, Pro hoặc Leu

<220>
 <221> đặc tính khác
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa là Gln, His hoặc Leu

<400> 2

Xaa Xaa Xaa Thr Cys Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Gly
 1 5 10

<210> 3
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Vùng S của HBsAg (Số truy cập ngân hàng gen J02203)

<400> 3

Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
 1 5 10 15

Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
 20 25 30

Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys
 35 40 45

Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
50 55 60

Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
65 70 75 80

Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
85 90 95

Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
100 105 110

Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala
115 120 125

Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
130 135 140

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys
145 150 155 160

Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
165 170 175

Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
180 185 190

Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile
195 200 205

Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
210 215 220

Tyr Ile
225

<210> 4
<211> 226
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vùng S của HBsAg (Số truy cập ngân hàng gen FJ899792)

<400> 4

Met Glu Asn Val Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
1 5 10 15

Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
20 25 30

Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys
35 40 45

Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
50 55 60

Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
65 70 75 80

Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
85 90 95

Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
100 105 110

Ser Ser Thr Thr Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala
115 120 125

Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
130 135 140

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys
145 150 155 160

Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
165 170 175

Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
180 185 190

Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Thr
195 200 205

Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
210 215 220

Tyr Ile
225

<210> 5

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

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên J02203 (D, ayw3)

<400> 5

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 6
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên FJ899792 (D, adw2)

<400> 6

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 7
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên AM282986 (A)

<400> 7

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Thr Thr Thr Thr
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser
 20 25 30

Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 8
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên D23678 (B1)

<400> 8

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 9
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên AB117758 (C1)

<400> 9

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 10
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên AB205192 (E)

<400> 10

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Leu Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Ser Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

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

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên X69798 (F4)

<400> 11

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Ser Thr Thr Thr
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Leu Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Ser Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Leu Gly Lys Tyr Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 12
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên AF160501 (G)

<400> 12

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser
 20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 13
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên AY090454 (H)

<400> 13

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Ser Thr Thr Thr
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Leu Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Tyr Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 14
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên AF241409 (I)

<400> 14

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser
 20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 15
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên AB486012 (J)

<400> 15

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Ser Thr Thr Thr
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Ile Thr Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 16
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg Y100C/P120T

<400> 16

Cys Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr
 1 5 10 15

Thr Gly Thr Gly Thr Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr
 20 25 30

Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys
 35 40 45

Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp
 50 55 60

Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 17
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg P120T

<400> 17

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Thr Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 18
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg P120T/S143L

<400> 18

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Thr Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Leu Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 19
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg C121S

<400> 19

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Ser Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 20
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg R122D

<400> 20

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Asp Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 21
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg R122I

<400> 21

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Ile Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 22
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg T123N

<400> 22

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Asn Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 23
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg Q129H

<400> 23

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala His Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 24
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg Q129L

<400> 24

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Leu Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 25
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg M133H

<400> 25

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

His Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 26
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg M133L

<400> 26

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Leu Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 27
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg M133T

<400> 27

Gln	Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Ile	Pro	Gly	Ser	Ser	Thr	Thr
1				5					10					15	

Gly	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Thr	Cys	Thr	Thr	Pro	Ala	Gln	Gly	Thr	Ser
			20				25						30		

Thr	Tyr	Pro	Ser	Cys	Cys	Cys	Thr	Lys	Pro	Ser	Asp	Gly	Asn	Cys	Thr
		35					40					45			

Cys	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ala	Phe	Gly	Lys	Phe	Leu	Trp	Glu
	50					55					60				

Trp	Ala	Ser	Ala	Arg	Phe	Ser	Trp
65					70		

<210> 28
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg K141E

<400> 28

Gln	Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Ile	Pro	Gly	Ser	Ser	Thr	Thr
1				5					10					15	

Gly	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Thr	Cys	Thr	Thr	Pro	Ala	Gln	Gly	Thr	Ser
			20				25						30		

Met	Tyr	Pro	Ser	Cys	Cys	Cys	Thr	Glu	Pro	Ser	Asp	Gly	Asn	Cys	Thr
		35					40					45			

Cys	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ala	Phe	Gly	Lys	Phe	Leu	Trp	Glu
	50					55					60				

Trp	Ala	Ser	Ala	Arg	Phe	Ser	Trp
65					70		

<210> 29
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg P142S

<400> 29

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Ser Ser Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 30
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg S143K

<400> 30

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Lys Asp Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 31
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg D144A

<400> 31

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Ala Gly Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 32
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg G145R

<400> 32

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Arg Asn Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 33
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> vùng vòng lặp kháng nguyên HBsAg N146A

<400> 33

Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
 20 25 30

Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Ala Cys Thr
 35 40 45

Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
 50 55 60

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
 65 70

<210> 34
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> kháng thể HBC34 CDRH1 aa

<400> 34

Gly Arg Ile Phe Arg Ser Phe Tyr
 1 5

<210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> kháng thể HBC34 CDRH2 aa

<400> 35

Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys
 1 5

<210> 36

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

<220>
 <223> kháng thể HBC34 CDRH3 aa

<400> 36

Ala Ala Trp Ser Gly Asn Ser Gly Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 37
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> kháng thể HBC34 CDRL1 aa

<400> 37

Lys Leu Gly Asn Lys Asn
 1 5

<210> 38

<400> 38
 000

<210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> kháng thể HBC34 CDRL2 dài aa

<400> 39

Val Ile Tyr Glu Val Lys Tyr Arg Pro
 1 5

<210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> kháng thể HBC34 CDRL3 aa

<400> 40

Gln Thr Trp Asp Ser Thr Thr Val Val
 1 5

<210> 41
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> kháng thể HBC34 VH aa

<400> 41

Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Arg Ser Phe
 20 25 30

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

Ala Thr Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Leu Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Trp Ser Gly Asn Ser Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Ser Val Ser Ser
 115

<210> 42
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> kháng thể HBC34 VL aa

<400> 42

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Ser Ile Pro Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Val
 20 25 30

Cys Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Thr Trp Asp Ser Thr Thr Val Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 43
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> kháng thể HBC34 CDRH1 nuc

<400> 43
 ggacgcatct ttagaagttt ttac
 24

<210> 44
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> kháng thể HBC34 CDRH2 nuc

<400> 44
 ataaaccaag atggaagtga gaaa
 24

<210> 45
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> kháng thể HBC34 CDRH3 nuc

<400> 45
 gcggccttgga gcggcaatag tgggggtatg gacgtc
 36

<210> 46
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> kháng thể HBC34 CDRL1 nuc

<400> 46
 aaattgggga ataaaaat
 18

<210> 47

<400> 47
 000

<210> 48
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> kháng thể HBC34 CDRL2 dài nuc

<400> 48
 gtcattctatg aggttaaata ccgcccc
 27

<210> 49
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> kháng thể HBC34 CDRL3 nuc

<400> 49
 cagacgtggg acagcaccac tgtggtg
 27

<210> 50
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> kháng thể HBC34 VH nuc

<400> 50
 gaactgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tgggtccagc cggggggggtc ccagagactg
 60

tcctgtgcag cctctggacg catctttaga agtttttaca tgagctgggt ccgccaggcc
120

ccagggaagg ggctggagtg ggtggccact ataaaccaag atggaagtga gaaattatat
180

gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactattt
240

ctgcaaatga acaacctgag agtcgaggac acggccgttt attactgcgc ggcttggagc
300

ggcaatagtg ggggtatgga cgtctggggc caggggacca cggctctcgt ctctca
357

<210> 51

<211> 318

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> kháng thể HBC34 VL nuc

<400> 51

tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agtcagcatc
60

ccctgctctg gagataaatt ggggaataaa aatgtttgct ggtttcagca taagccaggc
120

cagtcacctg tgttggtcat ctatgagggt aaataccgcc cctcggggat tcctgagcga
180

ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg
240

gatgaggctg cctatttctg tcagacgtgg gacagcacca ctgtggtggt cggcggaggg
300

accaggctga ccgtccta
318

<210> 52

<211> 33

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> peptit

<220>

<221> đặc tính khác

<222> (1)..(1)

<223> Xaa được thế bằng Cys

<220>

<221> đặc tính khác
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa được thể bằng Cys

<220>
 <221> đặc tính khác
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa được thể bằng Cys

<400> 52

Xaa	Gly	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Thr	Cys	Met	Thr
1				5					10					15	

Xaa	Pro	Ser	Asp	Gly	Asn	Ala	Thr	Ala	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp
			20					25					30		

Xaa

<210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 53

Thr	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Thr	Cys	Met	Thr	Thr	Ala	Gln	Gly
1				5					10					15

<210> 54
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> peptit

<400> 54

Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Ile	Pro	Gly	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser
1				5					10					15	

Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Thr	Cys	Met	Thr	Thr
			20					25	

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

<220>
 <223> peptit

<220>
 <221> đặc tính khác
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa được thế bằng Cys

<220>
 <221> đặc tính khác
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa được thế bằng Cys

<220>
 <221> đặc tính khác
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa được thế bằng Cys

<400> 55

Xaa	Ser	Met	Tyr	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	Thr	Lys	Pro	Ser	Asp	Gly	Asn
1				5					10					15	

Xaa	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Thr	Cys	Met	Thr	Thr	Ala	Gln	Gly	Thr	Ser
			20					25					30		

Xaa

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

<220>
 <223> mảnh vùng vòng lặp kháng nguyên(các amino axit từ 120 - 130 của miền S của HBsAg HBV-D J02203)

<400> 56

Pro	Cys	Arg	Thr	Cys	Met	Thr	Thr	Ala	Gln	Gly
1				5					10	

<210> 57
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> quyết định kháng nguyên

<220>
 <221> đặc tính khác
 <222> (3)..(3)

<223> Xaa có thể là amino axit bất kỳ, tốt hơn là Xaa là Arg hoặc Lys

<220>

<221> đặc tính khác

<222> (6)..(6)

<223> Xaa có thể là amino axit bất kỳ, tốt hơn là Xaa là Met hoặc Thr

<220>

<221> đặc tính khác

<222> (7)..(7)

<223> Xaa có thể là amino axit bất kỳ, tốt hơn là Xaa là Thr hoặc Ile

<220>

<221> đặc tính khác

<222> (8)..(8)

<223> Xaa có thể là amino axit bất kỳ, tốt hơn là Xaa là Thr, Pro hoặc Leu

<400> 57

Pro	Cys	Xaa	Thr	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Ala	Gln	Gly
1				5					10	

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CDRL3 v7 and CDRL3 v23 (aa)

<400> 58

Gln	Thr	Phe	Asp	Ser	Thr	Thr	Val	Val
1				5				

<210> 59

<211> 106

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> VL v7

<400> 59

Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	Gln
1				5				10						15	

Thr	Val	Ser	Ile	Pro	Cys	Ser	Gly	Asp	Lys	Leu	Gly	Asn	Lys	Asn	Val
			20					25					30		

Cys	Trp	Phe	Gln	His	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
		35					40					45			

Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Thr Phe Asp Ser Thr Thr Val Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 60
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDRL1 v7 and CDRL1 v23 (nuc)

<400> 60
 aagctgggga acaaaaat
 18

<210> 61

<400> 61
 000

<210> 62
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CDRL2 v7 dài và CDRL2 v23 nuc dài

<400> 62
 gtcattctacg aggtgaaata tcggcct
 27

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

<220>
 <223> CDRL3 v7 và CDRL3 v23 nuc

<400> 63
 cagacattcg attccaccac agtgggc
 27

<210> 64
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL v7 nuc

<400> 64
 tcttacgagc tgacacagcc acctagcgtg tccgtctctc caggacagac cgtgtccatc
 60
 ccttgctctg gcgacaagct ggggaacaaa aatgtctgtt ggttccagca caagccaggg
 120
 cagagtcccg tgctgggtcat ctacgaggtg aaatatcggc cttcaggaat tccagaacgg
 180
 ttcagcggat caaacagcgg caatactgca accctgacaa ttagcggggac ccaggccatg
 240
 gacgaagccg cttatttctg ccagacattc gattccacca cagtgggtctt tggcggggga
 300
 actaggctga ccgtgctg
 318

<210> 65
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VL v23 aa

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Phe Asp Ser Thr Thr Val Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 66
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HBC34wt CDRH2 aa

<400> 66

Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys
 1 5

<210> 67
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HBC34 v31, HBC34 v32 and HBC34 v33 VH

<400> 67

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Arg Ser Phe
 20 25 30

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

Ala Asn Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Leu Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Trp Ser Gly Asn Ser Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 68
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HBC34 v31, HBC34 v32 and HBC34 v33 VH (nuc)

<400> 68
gaggtgcagc tgggtggaatc cggcggggga ctggtgcagc ctggcggctc actgagactg
60
agctgtgcag cttctggaag aatcttcaga tctttttaca tgagttgggt gagacaggct
120
cctgggaagg gactggagtg ggtcgcaaac atcaatcagg acggatcaga aaagctgtat
180
gtggatagcg tcaaaggcag gttcactatt tcccgcgaca acgcaaaaaa ttctctgttt
240
ctgcagatga acaatctgcg ggtggaggat accgctgtct actattgtgc agcctgggtc
300
ggcaacagtg gaggcattga cgtgtgggga cagggaacca cagtgacagt cagctcc
357

<210> 69
<211> 318
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> VL v23 nuc

<400> 69
tcttacgagc tgacacagcc ccctagcgtg tccgtctctc caggccagac agcatccatc
60
acttgctctg gcgacaagct ggggaacaaa aatgcctgtt ggtatcagca gaagccaggg
120
cagagtcccg tgctgggtcat ctacgaggtg aaatatcggc cttcaggaat tccagaaaga
180
ttcagtggat caaacagcgg caatactgct accctgacaa ttagcggggac ccaggccatg
240
gacgaagctg attactattg ccagacattc gattccacca cagtgggtctt tggcggggga
300

actaagctga ccgtgctg
318

<210> 70
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HBC34 wt VH codon tối ưu hóa

<400> 70
gaactgcagc tggtcgaatc aggaggaggg tgggtccagc ccggagggag ccagagactg
60

tcttgtgccg catcagggag gatcttcagg agctttctaca tgccttgggt gcgccaggca
120

ccaggcaagg gactggagtg ggtcgccacc atcaaccagg acggatctga aaagctgtat
180

gtggatagtg tcaaaggccg gttcacaatt agcagagaca acgctaaaaa ttctctgttt
240

ctgcagatga acaatctgcg agtggaggat accgccgtct actattgcgc cgcttgggtct
300

ggcaacagcg gcgggatgga tgtctggggg cagggcacia cagtgagcgt ctcttcc
357

<210> 71
<211> 318
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HBC34 wt VL codon tối ưu hóa

<400> 71
tcatacgaac tgactcagcc tccctccgtc tccgtctcac ctggacagac cgtctcaatc
60

ccctgctccg gcgataaact gggcaacaag aacgtgtgct ggttccagca caaacccgga
120

cagagtctctg tgctgggtcat ctacgaggtc aagtatcggc caagcggcat tcccgaaga
180

ttcagcggct ccaactctgg gaataccgca aactgacta tctctggaac ccaggcaatg
240

gacgaggcag cttacttttg ccagacttgg gattcaacta ctgtcgtgtt cggcggcgga
300

actagactga ctgtcctg
318

<210> 72
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HBC34 wt CDRH1 codon tối ưu hóa

<400> 72
 gggaggatct tcaggagctt ctac
 24

<210> 73
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HBC34 wt CDRH2 codon tối ưu hóa

<400> 73
 atcaaccagg acggatctga aaag
 24

<210> 74
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HBC34 wt CDRH3 codon tối ưu hóa

<400> 74
 gccgcttggt ctggcaacag cggcgggatg gatgtc
 36

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

<220>
 <223> HBC34 wt CDRL1 codon tối ưu hóa

<400> 75
 aaactgggca acaagaac
 18

<210> 76

<400> 76
 000

<210> 77

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

<220>
 <223> HBC34 wt CDRL2 codon dài tối ưu hóa

<400> 77
 gtcacatctacg aggtcaagta tcggcca
 27

<210> 78
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HBC34 wt CDRL3 codon tối ưu hóa

<400> 78
 cagacttggg attcaactac tgtcgtg
 27

<210> 79
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> linker

<400> 79

Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5

<210> 80
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> quyết định kháng nguyên

<400> 80

Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys
 1 5

<210> 81
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> quyết định kháng nguyên

<400> 81

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro
1 5

<210> 82

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dạng quyết định kháng nguyên bất chức không liên tục

<220>

<221> đặc tính khác

<222> (2)..(2)

<223> xystein được ghép cặp với axetamidometyl

<220>

<221> đặc tính khác

<222> (21)..(21)

<223> xystein được ghép cặp với axetamidometyl

<220>

<221> đặc tính khác

<222> (24)..(24)

<223> xysteine được ghép cặp với axetamidometyl

<400> 82

Cys Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Cys Ser Thr Thr
1 5 10 15

Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Cys
20 25

<210> 83

<211> 28

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dạng quyết định kháng nguyên bất trước không liên tục

<220>

<221> đặc tính khác

<222> (4)..(4)

<223> xystein được ghép cặp với axetamidometyl

<220>

<221> đặc tính khác

<222> (6)..(6)

<223> xystein được ghép cặp với axetamidometyl

<220>

<221> đặc tính khác

<222> (24)..(24)

<223> xystein được ghép cặp với axetamidometyl

<220>

<221> đặc tính khác

<222> (27)..(27)

<223> xystein được ghép cặp với axetamidometyl

<400> 83

Cys	Gly	Asn	Cys	Thr	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ala	Phe	Cys
1				5					10					15	

Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Thr	Cys	Cys
			20					25			

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dạng quyết định kháng nguyên bắt chước vòng lặp

<220>

<221> đặc tính khác

<222> (13)..(13)

<223> xystein được ghép cặp với axetamidometyl

<220>

<221> đặc tính khác

<222> (16)..(16)

<223> xystein được ghép cặp với axetamidometyl

<400> 84

Cys	Gly	Gly	Gly	Cys	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Thr	Cys
1				5					10					15	

Cys

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> quyết định kháng nguyên

<400> 85

Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Thr	Cys
1				5					10	

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> quyết định kháng nguyên

<400> 86

Gly	Asn	Cys	Thr	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ala	Phe	Cys
1				5					10					15

<210> 87

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> quyết định kháng nguyên

<400> 87

Gly	Asn	Cys	Thr	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ala	Phe
1				5					10				

<210> 88

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> quyết định kháng nguyên

<220>

<221> đặc tính khác

<222> (4)..(4)

<223> Xaa có thể là axit amin có trong tự nhiên bất kỳ

<400> 88

Pro	Cys	Arg	Xaa	Cys
1				5