



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

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



1-0040211

(51)¹⁹ C07K 16/16; A61P 37/08; A61K 39/00; (13) B
A61K 39/395

-
- (21) 1-2019-06928 (22) 31/05/2018
(86) PCT/US2018/035366 31/05/2018 (87) WO/2018/222854 06/12/2018
(30) 62/513,872 01/06/2017 US; 62/571,696 12/10/2017 US; 62/662,165 24/04/2018 US
(45) 25/06/2024 435 (43) 25/06/2020 387
(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591, United States of
America
(72) Jamie M. ORENGO (US); Andrew J. MURPHY (US); Ashok T. BADITHE (US);
Vishal KAMAT (IN); Yashu LIU (CN).
(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)
-

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG ĐƯỢC PHÂN LẬP LIÊN KẾT VỚI BET V 1 TỰ
NHIÊN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết với chất gây dị ứng Fagales, chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales, phấn hoa bạch dương hoặc Bet v 1, chế phẩm chứa kháng thể, axit nucleic mã hóa cho kháng thể, và phương pháp sử dụng kháng thể. Theo một số phương án cụ thể, kháng thể là kháng thể đơn dòng người đầy đủ mà liên kết với Bet v 1. Kháng thể có ích trong việc liên kết với Bet v 1 in vivo, do đó ngăn cản liên kết của chất gây dị ứng với IgE được tạo thành từ trước trên bề mặt của dưỡng bào và bạch cầu ưa kiềm. Các kháng thể đóng vai trò cản trở sự giải phóng histamin và chất trung gian gây viêm từ dưỡng bào và/hoặc bạch cầu ưa kiềm, do đó cải thiện đáp ứng không mong muốn với chất gây dị ứng Fagales ở những người mẫn cảm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể người và mảnh liên kết kháng nguyên của các kháng thể người liên kết với chất gây dị ứng phấn hoa bạch dương, Bet v 1, chế phẩm điều trị chứa kháng thể, và phương pháp sử dụng kháng thể này.

Danh sách trình tự

Bản sao chính thức của danh sách trình tự được nộp cùng với bản mô tả điện tử thông qua trang web EFS dưới dạng danh sách trình tự được định dạng ASCII có tên file là 10301WO01_SEQ_LIST_ST25, tạo vào ngày 31 tháng 5 năm 2018, kích thước khoảng 137 kilobyte. Trình tự trong tài liệu được định dạng ASCII này là một phần của bản mô tả và được kết hợp vào đây bằng cách tham chiếu đến toàn bộ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bạch dương là tác nhân chính gây dị ứng chính ở 23% bệnh nhân mắc dị ứng ở Mỹ và 14% ở châu Âu (báo cáo về bệnh viêm mũi dị ứng, tháng 7 năm 2010), và là nguyên nhân gây ra dị ứng typ 1 vào mùa xuân trên khắp châu Âu, Bắc Mỹ, Nga và Úc (Breiteneder et al., *EMBO J.* 1989, 8(7):1935-8). Protein Bet v 1 là chất gây dị ứng bạch dương chính được tìm thấy trong phấn hoa của *Betula verrucosa* (cây bạch dương trắng Châu Âu, cũng đồng nghĩa với *Betula pendula*), và chịu trách nhiệm liên kết với IgE trong hơn 95% bệnh nhân dị ứng phấn hoa bạch dương (Breiteneder, supra). Bet v 1 là protein nhỏ, cấu trúc 7 tấm β đối song song được bện với ba cấu trúc xoắn α và một cấu trúc tinh thể đã biết (Kofler et al., 2012, 422(1): 109-23; Markovic-Housley et al., *J Mol Biol.* 2003, 325(1): 123-33; Spangfort et al., *J Immunol.* 2003, 171(6): 3084-90). WO 94/10194 đề cập đến các peptit có nguồn gốc từ các cây thuộc họ Fagales.

Sáu mươi phần trăm bệnh nhân dị ứng phấn hoa bạch dương phản ứng riêng với Bet v 1. 1989, 88(1-2): 180-2). Một cây bạch dương có thể tạo ra lên đến năm triệu hạt phấn hoa di chuyển trong không khí lên đến 100 thước từ cây. Các triệu chứng của dị ứng phấn hoa bạch dương có thể từ viêm mũi nhẹ và viêm kết mạc đến các phản ứng hen suyễn đe dọa tính mạng.

Globulin miễn dịch E (IgE) chịu trách nhiệm với bệnh quá mẫn typ 1, tự biểu

hiện trong viêm mũi dị ứng, viêm kết mạc dị ứng, cảm mạo, hen suyễn dị ứng, dị ứng nọc ong và dị ứng thực phẩm. IgE tuần hoàn trong máu và liên kết với các thụ thể FcR1 có ái lực cao đối với IgE trên bạch cầu ưa kiềm và dưỡng bào. Trong hầu hết các phản ứng dị ứng, các chất gây dị ứng xâm nhập vào cơ thể thông qua việc hít, tiêu hóa hoặc qua da. Chất gây dị ứng sau đó liên kết với IgE đã được tạo ra từ trước liên kết với thụ thể có ái lực cao trên bề mặt dưỡng bào và bạch cầu ưa kiềm, dẫn đến liên kết chéo của một vài phân tử IgE và kích hoạt giải phóng histamin và các chất trung gian gây viêm khác gây ra nhiều triệu chứng dị ứng khác nhau.

Việc điều trị dị ứng bao gồm steroid để ức chế hoạt động miễn dịch và thuốc giãn phế quản để làm giảm các triệu chứng hen suyễn. Liệu pháp khử nhạy cũng được sử dụng cho những bệnh nhân dị ứng nặng. Tổ hợp vắc-xin peptit đã được thử nghiệm để giảm mẫn cảm cho các cá thể đối với các chất gây dị ứng cụ thể ví dụ, Bet v 1 (Xem bằng sáng chế Mỹ số 9,017,689). Các kháng thể đã được đề xuất như là một phương pháp điều trị dị ứng, vì chúng có thể cản trở sự xâm nhập của các phân tử gây dị ứng vào trong các mô niêm mạc, hoặc có thể liên kết với chất gây dị ứng trước khi nó có cơ hội liên kết với IgE, mà liên kết với thụ thể có ái lực cao trên dưỡng bào hoặc bạch cầu ưa kiềm, do đó ngăn chặn sự giải phóng histamin và các chất trung gian gây viêm khác từ các tế bào này.

Bằng sáng chế Mỹ số 5.670.626 mô tả việc sử dụng kháng thể đơn dòng để điều trị các bệnh dị ứng qua trung gian IgE như viêm mũi dị ứng, hen suyễn dị ứng và viêm kết mạc dị ứng bằng cách cản trở sự liên kết của các chất gây dị ứng với mô niêm mạc. Bằng sáng chế Mỹ số 6.849.259 mô tả việc sử dụng các kháng thể đặc hiệu với chất gây dị ứng để ức chế viêm dị ứng trong mô hình dị ứng chuột *in vivo*. Hệ thống kháng thể trên cơ sở sữa và trứng đã được mô tả. Ví dụ, US2003/0003133A1 mô tả việc sử dụng sữa làm chất mang chất gây dị ứng để tạo ra dung nạp theo đường miệng đối với phấn hoa bạch dương và các chất gây dị ứng khác. Các chế phẩm và phương pháp làm giảm phản ứng dị ứng ở động vật đối với chất gây dị ứng trong môi trường thông qua việc sử dụng phân tử ức chế khả năng liên kết của chất gây dị ứng với dưỡng bào được mô tả trong WO1994/024164A2. Các kháng thể khác liên kết với Bet v 1 đã được đề cập trong đơn sáng chế Mỹ số 2010/0034812.

Sáng chế được hướng tới giải quyết một hoặc nhiều vấn đề được thảo luận ở trên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Được đề xuất ở đây là các kháng thể đơn dòng người đầy đủ và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, mà liên kết với phần hoa bạch dương, ví dụ Bet v 1 tự nhiên, chiết xuất phần hoa bạch dương (birch pollen extract-BPE) *Betula Pendula*, BPE *Betula nigra* hoặc BPE *Betula populifolia*. Các kháng thể có thể hữu dụng để liên kết với chất gây dị ứng Bet v 1 *in vivo* sau khi bệnh nhân bị nhạy cảm phơi nhiễm với chất gây dị ứng bạch dương, và như vậy có thể có tác dụng hoặc là thúc đẩy sự thanh thải của Bet v 1 tự nhiên, chiết xuất phần hoa bạch dương (BPE) *Betula Pendula*, BPE *Betula nigra*, hoặc BPE *Betula populifolia* hoặc là cản trở liên kết của chất gây dị ứng với IgE được hình thành từ trước trên bề mặt dưỡng bào hoặc bạch cầu ưa kiềm. Bằng cách này, các kháng thể được mô tả trong tài liệu này có thể ngăn chặn việc giải phóng histamin hoặc chất trung gian gây viêm từ dưỡng bào hoặc các bạch cầu ưa kiềm, nhờ đó ngăn chặn hoặc làm giảm bớt các tác dụng không mong muốn quan sát được ở bệnh nhân mắc cảm với chất gây dị ứng bạch dương. Theo các phương án nhất định, các kháng thể có khả năng làm giảm, giảm đến mức thấp nhất, hoặc ngăn ngừa ít nhất một triệu chứng ở bệnh nhân mắc cảm với chất gây dị ứng bạch dương hoặc chất gây dị ứng liên quan đến bạch dương, như hắt hơi, nghẹt mũi, ngạt mũi, ho, thở khò khè, co thắt phế quản, viêm mũi, viêm kết mạc. Theo một số phương án, các kháng thể có thể có khả năng ngăn ngừa các biến chứng *in vivo* nghiêm trọng hơn liên quan đến phơi nhiễm với chất gây dị ứng phần hoa bạch dương ở những người nhạy cảm, như phản ứng hen, sốc phản vệ hoặc thậm chí tử vong.

Các kháng thể được đề xuất ở đây có thể là kháng thể đầy đủ chiều dài, ví dụ, kháng thể IgG1 hoặc IgG4, hoặc có thể chỉ bao gồm một mảnh liên kết kháng nguyên, ví dụ, mảnh Fab, F(ab')₂, hoặc scFv và có thể được biến đổi để tạo ra tác động đến chức năng, ví dụ, để loại bỏ các chức năng tác động dư thừa (Reddy *et al.*, 2000, *J. Immunol.* 164: 1925-1933).

Khía cạnh thứ nhất của sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng người được phân lập và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tự nhiên, chiết xuất phần hoa bạch dương *Betula Pendula* (BPE), BPE *Betula nigra* hoặc BPE *Betula populifolia*.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng người được phân lập hoặc mảnh liên

kết kháng nguyên của nó ức chế Bet v 1 tự nhiên, chiết xuất phấn hoa bạch dương *Betula Pendula*, BPE *Betula nigra* hoặc BPE *Betula populifolia* liên kết với IgE đặc hiệu chất gây dị ứng.

Trong một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 với K_D bằng hoặc nhỏ hơn 10^{-8} M. Trong một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 với K_D nằm trong khoảng từ 10^{-8} đến khoảng 10^{-11} M. Trong một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 với K_D bằng hoặc nhỏ hơn 27,9 nM. Trong một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 với K_D nằm trong khoảng từ 0,66 nM đến khoảng 27,9 nM.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập là kháng thể đơn dòng người đầy đủ.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó phản ứng chéo với một hoặc nhiều chất gây dị ứng được chọn từ nhóm bao gồm Aln g1, Cor a1, Car b1, Que a1, Api g2, Api g1, Dau c1, Mal d1, Ost c1, Fag s1, và Cas s1. Các chất gây dị ứng này cũng được gọi là protein PR-10, hay còn gọi là protein liên quan đến tác nhân gây bệnh (PR). Các protein PR-10 bổ sung (các thành viên họ Bet v 1) cũng bao gồm Act c 8 và Act d 8 (kiwi), Ara h 8 (lạc), Pru ar 1 (cây mơ), Pru av 1 (anh đào), Pru p 1 (đào), Pyr c 1 (lê), Gly m 4 (đậu nành), Vig r 1 (đậu xanh), Sola I 4 (cà chua), Cuc m 3 (dưa lưới), Rub i 1 (cây mâm xôi), và Fra a 1 (dâu tây). Các chất gây dị ứng này cũng được coi là chất gây dị ứng liên quan đến bộ sồi dẻ.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó phản ứng chéo với một hoặc nhiều chất gây dị ứng được chọn từ nhóm bao gồm Aln g1, Mal d1, Api g1, Car b1, và Cor a1.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa ba CDR chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) nằm trong một trình tự bất kỳ trong số các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 282, và 290; và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và

LCDR3) nằm trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, và 298. Phương pháp và kỹ thuật để xác định CDR trong trình tự axit amin của HCVR và LCVR đều đã được biết đến trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng để xác định CDR trong trình tự axit amin của HCVR và/hoặc LCVR cụ thể được bộc lộ trong bản mô tả này. Ví dụ về quy ước có thể sử dụng để xác định ranh giới của CDR bao gồm, ví dụ, định nghĩa Kabat, định nghĩa Chothia, và định nghĩa AbM. Nói chung, định nghĩa Kabat dựa trên sự thay đổi về trình tự, định nghĩa Chothia dựa trên vị trí của vùng cấu trúc vòng, và định nghĩa AbM là sự điều chỉnh giữa phương pháp của Kabat và Chothia. *Xem, ví dụ, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Viện sức khỏe quốc gia, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., (1997), J. Mol. Biol. 273:927-948; và Martin et al., (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272.* Cơ sở dữ liệu công khai cũng giúp xác định trình tự CDR trong kháng thể.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa ba CDR chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) nằm trong một trình tự bất kỳ trong số các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 114, 146, 98, và 290; và ba CDR của chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) nằm trong trình tự bất kỳ trong số các trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 122, 154, 106, và 298.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 282, và 290.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 114, 146, 98, và 290.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, và

298.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 122, 154, 106, và 298.

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

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó bao gồm: (a) HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 114, 146, 98, và 290; và (b) LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 122, 154, 106, và 298.

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

(a) miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 284, và 292;

(b) miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 286, và 294;

(c) miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 288, và 296;

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

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

(f) miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No:

16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, và 304.

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

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 114/122, 146/154, 98/106, và 290/298.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 bao gồm cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 146/154 và 290/298.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 23 đến khoảng vị trí 44 trong SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 44 đến vị trí 70 trong SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 2 đến vị trí 19 trong SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 57 đến vị trí 70 trong SEQ ID NO: 306; và các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 81 đến vị trí 96 trong SEQ ID NO: 306.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 23 đến khoảng vị trí 44 trong SEQ ID NO: 306.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 23 đến khoảng vị trí 43 trong SEQ ID NO: 306.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với trình tự axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 44 đến khoảng vị trí 70 trong SEQ ID NO: 306.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng

nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 44 đến khoảng vị trí 56 trong SEQ ID NO: 306.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 2 đến khoảng vị trí 19 trong SEQ ID NO: 306.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 57 đến khoảng vị trí 70 trong SEQ ID NO: 306.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 57 đến khoảng vị trí 66 trong SEQ ID NO: 306.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 81 đến khoảng vị trí 96 trong SEQ ID NO: 306.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 81 đến khoảng vị trí 89 trong SEQ ID NO: 306.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 307, 308, 309, 310, và 311. Các quyết định kháng nguyên bao gồm các SEQ ID NO: 307, 308, 309, 310, hoặc 311 có thể được kéo dài thêm 1 đến 5 axit amin, hoặc 5 đến 10 axit amin, hoặc trên đầu C hoặc đầu N. Ví dụ, quyết định kháng nguyên của SEQ ID NO: 311, khi được kéo dài thêm từ 5 đến 10 axit amin chứa quyết định kháng nguyên của SEQ ID NO: 115. Nói các khác, quyết định kháng nguyên chứa SEQ ID NO: 311, ví dụ, bao gồm quyết định kháng nguyên của SEQ ID NO: 315.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với SEQ ID No: 307.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với SEQ ID No: 308.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với SEQ ID No: 309.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với SEQ ID No: 310.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với SEQ ID No: 311.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với SEQ ID No: 315.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tương tác với ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No.: 307, 308, 309, 310, 311, và 315 và chứa cặp trình tự HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 114/122, 146/154, 98/106, và 290/298.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó, mà tương tác với SEQ ID NO: 307 chứa ba HCDR nằm trong vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 146 và ba LCDR nằm trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 154.

Theo một phương án, kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó, mà tương tác với SEQ ID NO: 310 chứa ba HCDR nằm trong vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 290 và ba LCDR nằm trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 298.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 148, 150, và 152, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 156, 158 và 160.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 292, 294, và 296, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 300, 302 và 304.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 4, 6, và 8, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 12, 14 và 16.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 20, 22, và 24, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 28, 30 và 32.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 36, 38, và 40, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 44, 46 và 48.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 52, 54, và 56, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 60, 62 và 64.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 68, 70, và 72, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 76, 78 và 80.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 84, 86, và 88, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 92, 94 và 96.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 100, 102, và 104, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 108, 110 và 112.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 116, 118, và 120, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và

LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 124, 126 và 128.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 132, 134, và 136, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 140, 142 và 144.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 164, 166, và 168, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 172, 174 và 176.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 180, 182, và 184, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 188, 190 và 192.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 196, 198, và 200, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 204, 206 và 208.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 212, 214, và 216, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 220, 222 và 224.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 228, 230, và 232, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 236, 238 và 234.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 244, 246, và 248, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 252, 254 và 256.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó

mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 260, 262, và 264, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 268, 270 và 272.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 276, 278, và 280, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 268, 270 và 272.

Theo một phương án, kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 chứa trình tự axit amin HCDR1, HCDR2 và HCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 284, 286, và 288, và trình tự axit amin LCDR1, LCDR2 và LCDR3 lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 268, 270 và 272.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng người đầy đủ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 tự nhiên, BPE *Betula pendula*, BPE *Betula nigra*, hoặc BPE *Betula populifolia*, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó có một hoặc nhiều đặc tính sau đây: (i) chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 282, và 290, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (ii) chứa LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, và 298, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (iii) chứa miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 288, và 296, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 116, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, và 304, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (iv) chứa miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 284 và 292, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ

ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 286 và 294, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268 và 300, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, và 302, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (v) liên kết với Bet v 1 với K_D bằng hoặc nhỏ hơn 10^{-8} và nằm trong khoảng từ 10^{-8} đến khoảng 10^{-11} ; (vi) chứng minh là có hiệu quả trong ít nhất một mô hình động vật quá mẫn hoặc gây viêm; hoặc (vii) hoặc cạnh tranh với kháng thể tham chiếu để liên kết với Bet v 1 tự nhiên, BPE *Betula pendula*, BPE *Betula nigra*, hoặc BPE *Betula populifolia*.

Theo một phương án, “kháng thể tham chiếu” có thể bao gồm, ví dụ, kháng thể có tổ hợp của cặp trình tự axit amin chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/266, 282/266, và 290/298.

Sáng chế bao gồm các kháng thể có dạng glycosyl hóa được biến đổi. Trong một vài ứng dụng, việc biến đổi để loại bỏ các vị trí glycosyl hóa không mong muốn là rất hữu ích, hoặc ví dụ, việc loại bỏ gốc fructozơ để làm tăng chức năng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular cytotoxicity- ADCC) (Xem Shield *et al.*, 2002, *JBC* 277: 26733). Trong các ứng dụng khác, việc biến đổi galactosyl hóa có thể được thực hiện để biến đổi hoạt tính gây độc phụ thuộc vào bổ thể (complement dependent cytotoxicity, CDC).

Khía cạnh thứ hai đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà cạnh tranh để liên kết đặc hiệu với Bet v 1 tự nhiên, BPE *Betula pendula*, BPE *Betula nigra*, hoặc BPE *Betula populifolia* với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa vùng xác định bổ sung (CDR) của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), trong đó HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274,

282, và 290; và các CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), trong đó LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, và 298.

Một phương án đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà cạnh tranh để liên kết đặc hiệu với Bet v 1 tự nhiên, BPE *Betula pendula*, BPE *Betula nigra*, hoặc BPE *Betula populifolia* với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa vùng xác định bổ sung (CDR) của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), trong đó HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 114, 146, 98, và 290; và các CDR của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR), trong đó LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 122, 154, 106, và 298.

Trong một phương án liên quan, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà cạnh tranh để liên kết đặc hiệu với Bet v 1 tự nhiên, BPE *Betula pendula*, BPE *Betula nigra*, hoặc BPE *Betula populifolia* với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nằm trong cặp trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/266, 282/266, và 290/298.

Khía cạnh thứ ba đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên trên Bet v 1 tự nhiên là kháng thể hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó chứa vùng xác định bổ sung (CDR) của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), trong đó HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 282, và 290; và CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), trong đó LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, và 298.

Một phương án đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên trên Bet v 1 tự nhiên là kháng thể hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó chứa vùng xác định bổ sung (CDR) của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), trong đó HCVR có trình tự axit amin

được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 114, 146, 98, và 290; và (b) CDR của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR), trong đó LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 122, 154, 106, và 298.

Trong một phương án liên quan, được đề xuất ở đây là kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên trên Bet v 1 tự nhiên là kháng thể hoặc mảnh liên kết với kháng nguyên của nó chứa CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nằm trong cặp trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/266, 282/266, và 290/298.

Theo khía cạnh tư, sáng chế còn đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa cho kháng thể Bet v 1 hoặc mảnh của nó. Vectơ biểu hiện tái tổ hợp mang axit nucleic này, và tế bào chủ mà vectơ này được đưa vào, cũng được dự tính trong tài liệu này, là các phương pháp sản xuất kháng thể bằng cách nuôi cấy tế bào chủ dưới các điều kiện cho phép sản xuất kháng thể, và thu hồi kháng thể được tạo ra.

Theo một phương án, được đề xuất ở đây là phân tử axit nucleic mã hóa cho kháng thể đơn dòng người hoặc mảnh của nó mà liên kết với Bet v 1 tự nhiên, BPE *Betula Pendula*, BPE *Betula nigra*, hoặc BPE *Betula populifolia*.

Theo một phương án, được đề xuất ở đây là kháng thể hoặc mảnh của nó chứa HCVR được mã hóa bởi trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 241, 257, 273, 281, và 289, hoặc trình tự gần như tương tự có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99%.

Theo một phương án, HCVR được mã hóa bởi trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 113, 145, 257, và 289.

Theo một phương án, kháng thể hoặc kháng nguyên của nó còn bao gồm LCVR được mã hóa bởi trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217, 233, 249, 265, và 297, hoặc trình tự gần như tương tự có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99%.

Theo một phương án, LCVR được mã hóa bởi trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 121, 153, 265, và 297.

Theo một phương án, được đề xuất ở đây là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể chứa miền HCDR3 được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 7, 23, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 151, 167, 183, 199, 215, 231, 247, 263, 279, 287, và 295, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền LCDR3 được mã hóa bởi trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 15, 31, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 159, 175, 191, 207, 223, 239, 255, 271, và 303, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Theo một phương án, được đề xuất ở đây là kháng thể hoặc mảnh của nó còn chứa miền HCDR1 được mã hóa bởi trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3, 19, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147, 163, 179, 195, 211, 227, 243, 259, 275, 283, và 291 hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền HCDR2 có trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 5, 21, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 149, 165, 181, 197, 213, 229, 245, 261, 277, 285, và 293 hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 11, 27, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155, 171, 187, 203, 219, 235, 251, 267, và 299, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền LCDR2 có trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 13, 29, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 157, 173, 189, 205, 221, 237, 253, 269, và 301, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Khía cạnh thứ năm đề xuất được phẩm chứa lượng hiệu quả trị liệu của một hoặc nhiều kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 tự nhiên, BPE *Betula pendula*, BPE *Betula nigra*, hoặc BPE *Betula populifolia*, cùng với một hoặc nhiều chất mang được dụng.

Theo một phương án, được phẩm chứa lượng hiệu quả trị liệu của hai hoặc nhiều

kháng thể người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 cùng với một hoặc nhiều chất mang được dùng.

Theo một phương án cụ thể, được phẩm bao gồm:

(a) kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1, chứa HCVR có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 146; và LCVR có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 154;

(b) kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1, chứa HCVR có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 146, 98, và 290; và LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 122, 106, và 298; và

c) một hoặc nhiều tá được dùng.

Theo một phương án cụ thể, được phẩm bao gồm:

(a) kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1, chứa HCVR có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 290; và LCVR có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 298;

(b) kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1, chứa HCVR có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 114, 146, và 98; và LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 122, 154, và 106; và

c) một hoặc nhiều tá được dùng.

Theo một phương án cụ thể, được phẩm bao gồm:

(a) kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1, chứa HCVR có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 146; và LCVR có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 154;

(b) kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1, chứa HCVR có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 290; và LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 298; và

c) một hoặc nhiều tá được dùng.

Theo một phương án cụ thể, được phẩm bao gồm:

(a) kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa HCVR có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 146 và LCVR chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 154;

(b) kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 290 và LCVR chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 298;

c) một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 114 và 98 và LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 122 và 106; và

d) một hoặc nhiều tá dược được dùng.

Theo một phương án cụ thể, được phẩm bao gồm:

kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, cái mà liên kết Bet v 1, chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 146/154;

kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, cái mà liên kết Bet v 1, chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 114/122, 98/106, và 290/298; và

một hoặc nhiều tá dược được dùng.

Theo một phương án cụ thể, được phẩm bao gồm:

kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1, chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 146/154;

kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1, chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 290/298; và

một hoặc nhiều tá dược được dùng.

Theo một phương án, được phẩm chứa hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng người

được phân lập hoặc mảnh liên kết dòng kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1, chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/266, 282/266, và 290/298; và một hoặc nhiều tá được được dụng.

Theo một phương án, được phẩm chứa ba hoặc nhiều kháng thể đơn dòng người được phân lập hoặc mảnh liên kết dòng kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1, chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/266, 282/266, và 290/298; và một hoặc nhiều tá được được dụng.

Theo một phương án, được phẩm chứa bốn kháng thể đơn dòng người được phân lập mà liên kết với Bet v 1 hoặc mảnh liên kết dòng kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No: 114/122, 146/154, 98/106, và 290/298; và một hoặc nhiều tá được được dụng.

Theo một phương án, được phẩm chứa kháng thể được kí hiệu là H4H16992P có cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR là SEQ ID NO: 146/154; kháng thể được kí hiệu là H4H17082P2 có cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR là SEQ ID NO: 290/298; và kháng thể được kí hiệu là H4H17038P2 có cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR là SEQ ID NO: 98/106.

Theo một phương án, được phẩm chứa kháng thể được kí hiệu là H4H16992P có cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR là SEQ ID NO: 146/154; kháng thể được kí hiệu là H4H17082P2 có cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR là SEQ ID NO: 290/298; kháng thể được kí hiệu là H4H17038P2 có cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR là SEQ ID NO: 98/106; và kháng thể được kí hiệu là H4H16987P có cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR là SEQ ID NO: 114/122.

Theo một phương án, được phẩm chứa lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1, trong đó kháng thể thứ nhất hoặc mảnh của nó tương tác với các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 23 đến khoảng vị trí 44 trong SEQ ID NO: 306,

và kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1, trong đó kháng thể thứ hai hoặc mảnh của nó tương tác với gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 44 đến khoảng vị trí 70 trong SEQ ID NO: 306, cùng với một hoặc nhiều tá được được dụng.

Theo một phương án, được phẩm chứa lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1, cùng với một hoặc nhiều tá được được dụng, trong đó kháng thể thứ nhất hoặc mảnh của nó tương tác với các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 23 đến khoảng vị trí 43 trong SEQ ID NO: 306, và kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1, trong đó kháng thể thứ hai hoặc mảnh của nó tương tác với gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 44 đến khoảng vị trí 56 trong SEQ ID NO: 306.

Theo một phương án, được phẩm chứa lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1, cùng với một hoặc nhiều tá được được dụng, trong đó kháng thể thứ nhất hoặc mảnh của nó tương tác với trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 307, và kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ hai hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1, trong đó kháng thể thứ hai hoặc mảnh của nó tương tác với trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 308, 309, 310, 311 hoặc 315.

Theo một phương án, được phẩm chứa lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1, và một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng người được phân lập tiếp theo, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1, cùng với một hoặc nhiều tá được được dụng, trong đó kháng thể thứ nhất hoặc mảnh của nó tương tác với ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 23 đến khoảng vị trí 43 trong SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 44 đến vị trí 56 trong SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 2 đến vị trí 19 trong SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 57 đến vị trí 70 trong SEQ ID NO: 306; và các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 81 đến vị trí 89 hoặc vị trí từ khoảng 81 đến vị trí 96 trong SEQ ID NO: 306.

Theo một phương án, một hoặc nhiều kháng thể người được phân lập tiếp theo hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó tương tác với ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 23 đến khoảng vị trí 43 trong SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 44 đến vị trí 56 trong SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 2 đến vị trí 19 trong SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 57 đến vị trí 70 trong SEQ ID NO: 306; và các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí vị trí 81 đến vị trí 89 hoặc vị trí từ khoảng 81 đến vị trí 96 trong SEQ ID NO: 306, trong đó ít nhất một trong số một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng người được phân lập tiếp theo tương tác với trình tự axit amin khác so với kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ nhất.

Theo một phương án, được phẩm chứa lượng hiệu quả trị liệu của kháng thể đơn dòng người được phân lập thứ nhất hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1, và một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng người được phân lập tiếp theo hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1, cùng với một hoặc nhiều tá được được dụng, trong đó kháng thể thứ nhất hoặc mảnh của nó tương tác với trình tự axit amin trong SEQ ID NO: 307 và trong đó một hoặc nhiều kháng thể tiếp theo hoặc các mảnh của nó tương tác với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 308, 309, 310, 311, và 315.

Theo một phương án, được phẩm chứa lượng hiệu quả trị liệu của ít nhất hai kháng thể đơn dòng người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 tự nhiên hoặc BPE, cùng với một hoặc nhiều tá được được dụng, trong đó ít nhất hai kháng thể không cạnh tranh để liên kết với Bet v 1 tự nhiên hoặc BPE. Theo một số khía cạnh, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể Bet v 1 H4H16992P và H4H17082P2 chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR lần lượt là SEQ ID NO 146/154 và 290/298.

Theo một phương án, được phẩm chứa lượng hiệu quả trị liệu của ít nhất ba kháng thể đơn dòng người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên mà liên kết với Bet v 1 tự nhiên hoặc BPE, cùng với một hoặc nhiều tá được được dụng, trong đó ít nhất ba kháng thể không cạnh tranh để liên kết với Bet v 1 tự nhiên hoặc BPE. Theo một vài khía cạnh, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể Bet v 1 H4H16992P, H4H17082P2, và H4H17038P2 chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR lần lượt là SEQ ID NO: 146/154, 290/298, và 98/106.

Theo một phương án, dược phẩm chứa lượng hiệu quả trị liệu của ít nhất bốn kháng thể đơn dòng người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên mà liên kết với Bet v 1 tự nhiên hoặc BPE, cùng với một hoặc nhiều tá dược được dụng, trong đó ít nhất ba kháng thể không cạnh tranh để liên kết với Bet v 1 tự nhiên hoặc BPE. Theo một vài khía cạnh, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể Bet v 1 H4H16992P, H4H17082P2, H4H17038P2, và H4H16987P chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR lần lượt là SEQ ID NO: 146/154, 290/298, 98/106, và 114/122.

Theo một phương án, dược phẩm chứa lượng hiệu quả trị liệu của kháng thể đơn dòng người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1, cùng với một hoặc nhiều tá dược được dụng, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó phản ứng chéo với một hoặc nhiều chất gây dị ứng được chọn từ nhóm bao gồm Aln g1, Cor a1, Car b1, Que a1, Api g2, Api g1, Dau c1, Mal d1, Ost c1, Fag s1, và Cas s1. Theo một vài phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó phản ứng chéo với một hoặc nhiều chất gây dị ứng được chọn từ nhóm bao gồm Aln g1, Mal d1, Api g1, Car b1, và Cor a1.

Theo một phương án, sáng chế mô tả chế phẩm, là tổ hợp của lượng có hiệu quả điều trị của một hoặc nhiều kháng thể kháng Bet v 1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, và lượng có hiệu quả trị liệu của chất trị liệu thứ hai, cùng với một hoặc nhiều tá dược được dụng.

Chất trị liệu thứ hai có thể là thuốc phân tử nhỏ, protein/polypeptit, kháng thể, phân tử axit nucleic, chẳng như phân tử đối nghĩa, hoặc siARN. Chất trị liệu thứ hai có thể có nguồn gốc tự nhiên hoặc tổng hợp.

Chất trị liệu thứ hai có thể là bất kỳ chất nào được kết hợp thuận lợi với kháng thể hoặc mảnh của nó trong sáng chế, ví dụ, kháng thể thứ hai khác ngoài những kháng thể được mô tả ở đây mà có khả năng cản trở liên kết của Bet v 1 với IgE có mặt trên đường bào hoặc bạch cầu ưa kiềm. Chất trị liệu thứ hai cũng có thể là chất bất kỳ được sử dụng làm tiêu chuẩn chăm sóc trong điều trị đáp ứng dị ứng với bất kỳ chất gây dị ứng nào. Chất trị liệu thứ hai này có thể là thuốc kháng histamin, epinephrin, thuốc làm thông mũi, corticosteroid, hoặc vacxin peptit.

Theo một số phương án, chất trị liệu thứ hai có thể là chất giúp chống lại hoặc làm giảm (các) tác dụng phụ bất kỳ liên quan đến kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng

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

Cần phải hiểu rằng kháng thể và dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng trong liệu pháp trị liệu kết hợp, cụ thể là kháng thể và dược phẩm có thể được sử dụng đồng thời, trước, hoặc sau, một hoặc nhiều chất trị liệu hoặc quá trình điều trị mong muốn khác, bao gồm, ví dụ, kết hợp với chế độ trị liệu miễn dịch đặc hiệu chất gây dị ứng (SIT) trong đó kháng thể được dùng trước hoặc trong khi điều trị với chế độ SIT. Sự kết hợp cụ thể của các liệu pháp (trị liệu hoặc quá trình) để sử dụng trong chế độ điều trị kết hợp sẽ phụ thuộc vào khả năng tương thích của chất trị liệu mong muốn và/hoặc quá trình điều trị và tác dụng trị liệu mong muốn cần tạo ra. Cần phải hiểu rằng liệu pháp được sử dụng có thể tạo ra tác dụng mong muốn đối với cùng một rối loạn (ví dụ, kháng thể có thể được dùng cùng lúc với các chất khác được sử dụng để điều trị cùng một rối loạn), hoặc chúng có thể tạo ra các tác dụng khác nhau (ví dụ, kiểm soát tác dụng phụ bất kỳ). Như được sử dụng trong bản mô tả này, chất trị liệu khác mà thường được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh cụ thể, hoặc tình trạng bệnh lý, thích hợp đối với bệnh, hoặc tình trạng bệnh lý, được điều trị.

Khi nhiều liệu pháp được dùng cùng lúc, các liều lượng có thể được điều chỉnh theo, như được công nhận trong lĩnh vực kỹ thuật thích hợp.

Khía cạnh thứ sáu đề xuất phương pháp điều trị cho bệnh nhân, người chứng minh là nhạy cảm, hoặc phản ứng dị ứng chống lại protein Fagales, chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales, phấn hoa bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1, hoặc để điều trị ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng liên quan đến nhạy cảm, hoặc phản ứng dị ứng chống lại protein Fagales, chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales, phấn hoa bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1, bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị dùng một lượng có hiệu quả của một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tự nhiên, BPE *Betula Pendula*, BPE *Betula nigra*, hoặc BPE *Betula populifolia*, hoặc dược phẩm chứa lượng có hiệu quả của một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1 tự nhiên, BPE *Betula Pendula*, BPE *Betula nigra*, hoặc BPE *Betula populifolia*, trong đó mức độ nhạy cảm, hoặc phản ứng dị ứng chống lại protein Fagales, chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales, phấn hoa bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1 hoặc được ngăn ngừa hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng và/hoặc thời gian, hoặc ít nhất một triệu chứng

hoặc biến chứng liên quan đến nhạy cảm, hoặc phản ứng dị ứng chống lại protein Fagales, chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales, phần hoa bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1 được ngăn ngừa hoặc cải thiện, hoặc tần suất và/hoặc thời gian, hoặc mức độ nhạy cảm, hoặc phản ứng dị ứng chống lại protein Fagales, chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales, phần hoa bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1, giảm đi sau khi dùng một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng người được phân lập hoặc mảnh của nó, mà liên kết với Bet v 1 tự nhiên, BPE *Betula Pendula*, BPE *Betula nigra*, hoặc BPE *Betula populifolia*, hoặc sau khi dùng chế phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể đã nêu ở trên.

Theo một số phương án, chiết xuất phần hoa bạch dương được chọn từ nhóm bao gồm Bet v 1 tự nhiên, BPE *Betula Pendula*, BPE *Betula nigra*, và BPE *Betula populifolia*.

Theo một số phương án, điều trị dẫn đến làm giảm viêm mũi dị ứng, viêm kết mạc dị ứng, hen suyễn dị ứng, hoặc đáp ứng quá mẫn sau khi cho bệnh nhân phơi nhiễm với protein Fagales, chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales, phần hoa bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1.

Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước dùng một lượng có hiệu quả của chất trị liệu thứ hai hữu ích trong việc làm giảm bớt đáp ứng dị ứng với protein Fagales, chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales, phần hoa bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1. Chất trị liệu thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm corticosteroid, thuốc giãn phế quản, thuốc kháng histamin, epinephrin, thuốc làm thông mũi, kháng thể liên kết với Bet v 1 khác và vaccin peptit.

Theo một vài phương án, phương pháp còn bao gồm điều trị cho bệnh nhân bằng chế độ trị liệu miễn dịch đặc hiệu chất gây dị ứng (SIT) ngay sau hoặc cùng lúc với kháng thể hoặc mảnh của nó hoặc được phẩm chứa các kháng thể này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho bệnh nhân dị ứng Fagales, người chứng minh nhạy cảm với, hoặc phản ứng dị ứng chống lại một hoặc nhiều chất gây dị ứng Fagales, chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales, hoặc để điều trị ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng liên quan đến nhạy cảm, hoặc phản ứng dị ứng chống lại một hoặc nhiều chất gây dị ứng Fagales, chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales, bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị dùng một lượng có hiệu quả của một hoặc

nhiều kháng thể đơn dòng người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1, hoặc được phẩm chứa một lượng có hiệu quả của một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với Bet v 1, trong đó mức độ nhạy cảm, hoặc phản ứng dị ứng chống lại chất gây dị ứng Fagales, chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales, hoặc được ngăn ngừa hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng và/hoặc thời gian, hoặc ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng liên quan đến độ nhạy cảm, hoặc phản ứng dị ứng chống lại chất gây dị ứng Fagales, chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales, được ngăn ngừa hoặc cải thiện, hoặc tần suất và/hoặc thời gian, hoặc mức độ nhạy cảm, hoặc phản ứng dị ứng chống lại chất gây dị ứng Fagales, chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales, giảm đi sau khi dùng một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng người được phân lập hoặc mảnh của nó, mà liên kết với Bet v 1 hoặc sau khi dùng chế phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể đã nêu ở trên.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều chất gây dị ứng Fagales được chọn từ nhóm bao gồm Bet v 1, Aln g1, Cor a1, Car b1, và Que a1.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất được phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể được mô tả trong tài liệu này, mà liên kết với Bet v 1 tự nhiên, BPE *Betula Pendula*, BPE *Betula nigra*, hoặc BPE *Betula populifolia*, để sử dụng trong điều trị cho bệnh nhân chứng minh nhạy cảm với, hoặc phản ứng dị ứng chống lại protein Fagales, phấn hoa bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1, hoặc để điều trị ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng liên quan đến nhạy cảm, hoặc phản ứng dị ứng chống lại protein Fagales, phấn hoa bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1, trong đó mức độ nhạy cảm, hoặc phản ứng dị ứng chống lại protein Fagales, phấn hoa bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1 hoặc được ngăn ngừa hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng và/hoặc thời gian, hoặc ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng liên quan đến độ nhạy cảm, hoặc phản ứng dị ứng chống lại protein Fagales, phấn hoa bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1 được ngăn ngừa hoặc cải thiện, hoặc tần suất và/hoặc thời gian, hoặc mức độ nhạy cảm, hoặc phản ứng dị ứng chống lại protein Fagales, phấn hoa bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1, giảm đi.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất việc sử dụng được phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế, mà liên kết với Bet v 1 trong sản xuất được phẩm để điều trị cho bệnh nhân chứng minh nhạy cảm với, hoặc phản ứng dị ứng chống lại phấn hoa

bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1, hoặc để điều trị ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng liên quan đến nhạy cảm, hoặc phản ứng dị ứng chống lại phấn hoa bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1, trong đó mức độ nhạy cảm, hoặc phản ứng dị ứng chống lại phấn hoa bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1 hoặc được ngăn ngừa hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng và/hoặc thời gian, hoặc ít nhất một triệu chứng hoặc biến chứng liên quan đến nhạy cảm, hoặc phản ứng dị ứng chống lại phấn hoa bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1 được ngăn ngừa hoặc cải thiện, hoặc tần suất và/hoặc thời gian, hoặc mức độ nhạy cảm, hoặc phản ứng dị ứng chống lại phấn hoa bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1, giảm đi.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất việc sử dụng được phẩm đã mô tả ở trên, trong đó được phẩm được dùng kết hợp với chất trị liệu thứ hai có hiệu quả trong việc làm giảm phản ứng dị ứng với protein Fagales, phấn hoa bạch dương hoặc chiết xuất của nó, hoặc protein Bet v 1. Theo một phương án, sáng chế đề xuất việc sử dụng được phẩm như đã mô tả ở trên, trong đó chất trị liệu thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm corticosteroid, thuốc giãn phế quản, thuốc kháng histamin, epinephrin, thuốc làm thông mũi, kháng thể liên kết với Bet v 1 khác và vacxin peptit.

Theo các phương án nhất định, các kháng thể trong sáng chế, mà liên kết với Bet v 1 có khả năng làm giảm, giảm đến mức thấp nhất, hoặc ngăn ngừa ít nhất một triệu chứng ở bệnh nhân mắc cảm với chất gây dị ứng bạch dương hoặc Bet v 1, chẳng hạn như hắt hơi, ngứa mũi, ngạt mũi, ho, thở khò khè, co thắt phế quản, viêm mũi, viêm kết mạc.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế liên kết với Bet v 1, hoặc chế phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể của sáng chế có thể sử dụng để ngăn ngừa biến chứng in vivo nghiêm trọng hơn liên quan đến dị ứng với Bet v 1, bao gồm đáp ứng hen, sốc phản vệ, hoặc thậm chí tử vong do quá mẫn.

Theo một phương án, được phẩm được dùng cho bệnh nhân kết hợp với chất trị liệu thứ hai.

Theo một phương án, chất trị liệu thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm corticosteroid, thuốc giãn phế quản, thuốc kháng histamin, epinephrin, thuốc làm thông mũi, kháng thể liên kết với Bet v 1 khác và vacxin peptit và liệu pháp làm giảm nhẹ tạm

thời khác hiệu quả trong việc làm giảm mức độ nghiêm trọng của phản ứng dị ứng hoặc để cải thiện ít nhất một triệu chứng liên quan đến phản ứng dị ứng.

Theo một phương án khác nữa, dược phẩm được dùng cùng lúc, trước hoặc sau một hoặc nhiều liệu pháp trị liệu hoặc thủ tục y khoa mong muốn khác, bao gồm, ví dụ, dùng trước hoặc cùng lúc với chế độ trị liệu miễn dịch đặc hiệu chất gây dị ứng (SIT). Theo một vài khía cạnh, việc sử dụng chế độ SIT cùng với kháng thể được đề xuất ở đây mang lại hiệu quả hiệp đồng.

Theo một phương án, phương pháp được đề xuất để tăng cường hiệu quả và/hoặc độ an toàn của chế độ trị liệu miễn dịch đặc hiệu chất gây dị ứng (SIT), phương pháp bao gồm cho bệnh nhân cần điều trị dùng một lượng có hiệu quả trị liệu của một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng người được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, như được đề xuất ở đây, hoặc dược phẩm chứa một lượng có hiệu quả trị liệu của một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng người được phân lập hoặc mảnh của nó ngay trước hoặc cùng lúc với chế độ SIT, trong đó mức độ nghiêm trọng của phản ứng dị ứng với chế độ SIT bị giảm đi. Theo một vài phương án, chế độ SIT bao gồm pha liều lượng tăng dần sau đó là pha duy trì. Theo một số phương án, chế độ SIT là chế độ SIT không có giá trị.

Theo một khía cạnh khác nữa, phương pháp được đề xuất để ngăn ngừa hoặc làm giảm việc phóng thích hạt của dưỡng bào liên quan đến protein Fagales, chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales, phấn hoa bạch dương hoặc chiết xuất phấn hoa bạch dương hoặc Bet v 1, phương pháp bao gồm cho đối tượng cần điều trị dùng dược phẩm mô tả trong tài liệu này.

Theo một số phương án, BPE được chọn từ nhóm bao gồm Bet v 1 tự nhiên, BPE *Betula Pendula*, BPE *Betula nigra*, và BPE *Betula populifolia*.

Các phương án khác sẽ trở nên rõ ràng thông qua phần mô tả chi tiết sáng chế dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: là bản đồ quyết định kháng nguyên MS trao đổi H/D đối với tương tác giữa H4H16992P với Bet v 1.

Fig. 2: là bản đồ quyết định kháng nguyên MS trao đổi H/D đối với tương tác

giữa H4H17082P với Bet v 1.

Fig. 3: là bản đồ quyết định kháng nguyên MS trao đổi H/D đối với tương tác giữa H4H17038P2 với Bet v 1.

Fig. 4: là bản đồ quyết định kháng nguyên MS trao đổi H/D đối với tương tác giữa H4H16987P với Bet v 1.

Fig. 5: là bản đồ quyết định kháng nguyên MS trao đổi H/D đối với tương tác giữa H4H16992P, H4H17082P, H4H17038P2 và H4H16987P với Bet v 1.

Fig. 6 là sơ đồ minh họa quy trình được sử dụng để xác định hiệu quả của các tổ hợp kháng thể trong việc cản trở dưỡng bào bị phóng thích hạt do Bet v 1 gây ra trong mô hình chuột PCA được làm giống người.

Fig. 7 mô tả các tổ hợp kháng thể kháng Bet v 1 có khả năng cản trở dưỡng bào bị phóng thích hạt trong mô hình chuột PCA được làm giống người sử dụng IgE chứa huyết thanh thu được từ ba người hiến tặng miễn cảm với Bet v 1.

Fig. 8 mô tả hai đồ thị, đồ thị thứ nhất cung cấp dữ liệu chứng minh tổ hợp kháng thể kháng Bet v 1 mà cản trở hoạt động của bạch cầu ưa kiềm trong PBMC thu được từ người hiến tặng dị ứng bạch dương. Biểu đồ cột cung cấp dữ liệu mô phỏng phần trăm cản trở hoạt động của bạch cầu ưa kiềm trong PBMC thu được từ nhiều người hiến tặng bởi các tổ hợp kháng thể kháng Bet v 1 so với khi chỉ sử dụng một mình kháng thể.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi chế phẩm và phương pháp theo sáng chế được mô tả, cần phải hiểu rằng sáng chế này không bị giới hạn ở chế phẩm và phương pháp cụ thể, và điều kiện thử nghiệm được mô tả, vì phương pháp, chế phẩm và điều kiện này có thể thay đổi. Cũng cần hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không dự định bị giới hạn, do phạm vi bảo hộ của sáng chế sẽ chỉ bị giới hạn ở phần yêu cầu bảo hộ đính kèm.

Trừ khi được chỉ ra khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có cùng ý nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế này thuộc về. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “khoảng”, khi được sử dụng để tham chiếu đến giá trị dạng số cụ thể được nêu ra, có nghĩa là giá trị này có thể thay đổi từ giá trị được nêu ra không quá 1%. Ví dụ, như được

sử dụng trong bản mô tả này, việc thể hiện “khoảng 100” bao gồm 99 và 101 và toàn bộ các giá trị nằm giữa (ví dụ, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, v.v.).

Tất cả các phương pháp và vật liệu tương tự hoặc tương đương với phương pháp và vật liệu được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong thực hành và thử nghiệm theo sáng chế, phương pháp và vật liệu ưu tiên bây giờ sẽ được mô tả.

Định nghĩa

Thuật ngữ “Bet v 1” như được sử dụng trong tài liệu này, dùng để chỉ ít nhất một protein Bet v 1, hoặc ở dạng tự nhiên/bẩm sinh, hoặc được tạo ra bằng tái tổ hợp. Protein Bet v 1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 306 và trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 305. Protein Bet v 1 có khối lượng xấp xỉ 17 kD và tồn tại ở dạng 7 tấm β (β 1– β 7) đối song song được bện lại, hai cấu trúc xoắn α ngắn (α 1 và α 2) nối với β 1 và β 2, cấu trúc xoắn α dài (α 3) đầu C, và môtip vòng giàu glyxerin giữa β 2 và β 3 (Kofler *et al.* (2012) *J. Mol. Biol.* 422(1): 109-123). Bet v 1 đột biến được tạo ra bằng tái tổ hợp, SEQ ID NO: 312, chứa G2-N160 nêu trong Uniprot P15494 với đột biến thế S85A và chứa đuôi Myc-Myc-hexahistidin. Trình tự axit amin Bet v 1 từ Uniprot: P15494, tức là SEQ ID NO: 314, cũng có thể được gọi là Bet v 1.

“Bet v 1” là polypeptit bao gồm, hoặc theo cách khác, chỉ bao gồm, trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 306 hoặc SEQ ID NO: 314, hoặc trình tự tương đồng của nó. Thuật ngữ “trình tự tương đồng của SEQ ID NO: 306 hoặc SEQ ID NO: 314” như được sử dụng trong tài liệu này, dùng để chỉ polypeptit mà có độ tương đồng với SEQ ID NO: 306 hoặc SEQ ID NO: 314, hơn 70%, tốt hơn nếu hơn 80%, tốt hơn nữa nếu hơn 90%, và thậm chí tốt hơn nữa nếu hơn 95%.

Thuật ngữ “mảnh Bet v 1” như được sử dụng trong tài liệu này dùng để chỉ polypeptit bao gồm hoặc theo cách khác chỉ bao gồm, ít nhất một vị trí kháng nguyên của Bet v 1. Theo một phương án, thuật ngữ “mảnh Bet v 1” như được sử dụng trong tài liệu này dùng để chỉ polypeptit bao gồm hoặc theo cách khác chỉ bao gồm, ít nhất hai vị trí kháng nguyên của Bet v 1. Theo một phương án, các vị trí kháng nguyên được liên kết theo kiểu đồng hóa trị. Theo một phương án, vị trí kháng nguyên được liên kết bởi ít nhất một liên kết peptit. Theo một phương án, các vị trí kháng nguyên được liên kết bởi ít nhất một liên kết peptit và một vùng đệm giữa các vị trí kháng nguyên. Theo một phương án, ít nhất hai vị trí kháng nguyên chứa trình tự axit amin 23-44 và 44-56 trong

Uniprot P15494. Theo một phương án, ít nhất hai vị trí kháng nguyên chứa trình tự axit amin trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 306, 307, 308, 309, 310, 311, và 315. Theo một phương án, bất kỳ mảnh Bet v 1 nào có khả năng gây ra việc sản xuất kháng thể in vivo, mà liên kết đặc hiệu với Bet v 1 có trong tự nhiên hoặc Bet v 1 được tạo ra theo cách tái tổ hợp.

Thuật ngữ "kháng thể", như được sử dụng trong bản mô tả này, nghĩa là phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ hoặc phức hợp phân tử chứa ít nhất một vùng xác định bổ trợ (CDR) mà liên kết đặc hiệu với hoặc tương tác với kháng nguyên cụ thể (ví dụ, Bet v 1). Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể" được dự tính để đề cập đến phân tử globulin miễn dịch chứa bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua (tức là, "phân tử kháng thể đầy đủ"), cũng như các đa phân của nó (ví dụ, IgM) hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng ("HCVR" hoặc "V_H") và vùng hằng định chuỗi nặng (bao gồm các miền C_{H1}, C_{H2} và C_{H3}). Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ ("LCVR" hoặc "V_L") và vùng hằng định chuỗi nhẹ (C_L). Vùng V_H và V_L có thể còn được chia nhỏ thành vùng siêu biến, được gọi là vùng xác định bổ trợ (CDR), đặt giữa các vùng bảo thủ hơn, gọi là vùng khung (FR). Mỗi V_H và V_L bao gồm ba CDR và bốn FR, từ đầu cuối amino đến đầu cuối cacboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo các phương án khác của sáng chế, FR của kháng thể (hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) có thể tương đồng với trình tự dòng mầm ở người, hoặc có thể được biến đổi tự nhiên hoặc nhân tạo. Trình tự liên ứng axit amin có thể được xác định dựa trên phân tích kép của hai hoặc nhiều CDR.

Đột biến thể của một hoặc nhiều gốc CDR hoặc sự mất đoạn một hoặc hai CDR cũng có thể xảy ra. Các kháng thể được mô tả trong các tài liệu khoa học trong đó một hoặc hai CDR có thể không liên kết. Padlan *et al.* (1995, *FASEB J.* 9:133-139) đã phân tích vùng tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên của chúng, dựa trên cấu trúc tinh thể được công bố và kết luận rằng thực tế chỉ khoảng một phần năm đến một phần ba các gốc CDR tiếp xúc với kháng nguyên. Padlan còn phát hiện ra nhiều kháng thể trong đó một hoặc hai CDR không có axit amin tiếp xúc với kháng nguyên (Xem also, Vajdos *et al.*, 2002, *J Mol Biol* 320:415-428).

Các gốc CDR không tiếp xúc với kháng nguyên có thể được xác định dựa trên các nghiên cứu trước đó (ví dụ các gốc H60-H65 trong CDRH2 thường không yêu cầu),

từ các vùng CDR Kabat nằm bên ngoài CDR Chothia, bằng mô hình phân tử và/hoặc bằng thực nghiệm. Nếu CDR hoặc (các) gốc của nó không liên kết, thì thường được thế bởi axit amin chiếm vị trí tương ứng trong trình tự kháng thể người khác hoặc liên ứng của trình tự này. Vị trí thế trong CDR và các axit amin để thế có thể được chọn bằng thực nghiệm. Đột biến thế thực nghiệm có thể là thay thế bảo thủ hoặc thay thế không bảo thủ.

Kháng thể đơn dòng đơn dòng người đầy đủ, mà liên kết đặc hiệu với Bet v 1 như được bộc lộ trong bản mô tả này có thể chứa một hoặc nhiều đột biến thế, thêm và/hoặc mất axit amin trong khung và/hoặc vùng CDR của miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ so với các trình tự dòng mầm tương ứng. Các đột biến này có thể được xác định một cách dễ dàng bằng cách so sánh trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này với trình tự có sẵn từ, ví dụ, cơ sở dữ liệu trình tự kháng thể công khai. Sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó có nguồn gốc từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này, trong đó, một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều vùng khung và/hoặc vùng CDR bị đột biến với (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm mà kháng thể có nguồn gốc từ dòng mầm này, hoặc với (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm người, hoặc đột biến thay thế axit amin bảo thủ của (các) gốc dòng mầm tương ứng (các sự thay đổi trình tự như trên được đề cập trong đây gọi chung là “đột biến dòng mầm”). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, bắt đầu từ trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể dễ dàng sản xuất một lượng lớn kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên mà chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm riêng lẻ hoặc tổ hợp của các đột biến này. Theo một số phương án, tất cả các gốc của vùng khung và/hoặc vùng CDR trong vùng V_H và/hoặc V_L được đột biến quay trở lại các gốc được tìm thấy trong trình tự dòng mầm ban đầu mà kháng thể được tạo ra từ đó. Theo các phương án khác, chỉ một số gốc được đột biến quay trở lại trình tự dòng mầm ban đầu, ví dụ, chỉ các gốc bị đột biến được tìm thấy trong 8 axit amin đầu tiên của FR1, hoặc trong 8 axit amin cuối cùng của FR4, hoặc chỉ các gốc bị đột biến được tìm thấy ở CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều gốc ở vùng khung và/hoặc vùng CDR bị đột biến với các gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm khác (cụ thể là, trình tự dòng mầm khác với trình tự dòng mầm mà kháng thể được tạo ra từ đó).

Hơn nữa, kháng thể theo sáng chế có thể chứa tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều đột biến dòng mầm trong vùng khung và/hoặc vùng CDR, ví dụ, trong đó các gốc riêng lẻ nhất định bị đột biến với gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm cụ thể, trong khi một số gốc khác có khác biệt với trình tự dòng mầm ban đầu được duy trì hoặc được gây đột biến với gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm khác. Khi thu hồi, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên mà chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm có thể được kiểm tra một cách dễ dàng đối với một hoặc nhiều đặc tính mong muốn như, tăng độ đặc hiệu liên kết, tăng ái lực liên kết, tăng hoặc cải thiện đặc tính sinh học đối kháng hoặc chủ vận (trong trường hợp có thể), giảm tính sinh miễn dịch, v.v.. Kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên thu được theo cách này nằm trong phạm vi của sáng chế.

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

Thuật ngữ "kháng thể ở người", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định để bao gồm kháng thể người có trong tự nhiên. Thuật ngữ này bao gồm kháng thể mà được tạo ra bằng cách tái tổ hợp trong động vật có vú không phải con người, hoặc trong tế bào của động vật có vú không phải con người. Thuật ngữ này không được dự tính để bao gồm kháng thể được phân lập từ hoặc được tạo ra trong đối tượng con người.

Kháng thể theo sáng chế có thể, theo một số phương án, là kháng thể người tái tổ hợp và/hoặc không có trong tự nhiên. Thuật ngữ "kháng thể người tái tổ hợp", như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm tất cả kháng thể người mà được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng cách tái tổ hợp, chẳng hạn như kháng thể được biểu hiện bằng cách sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nạp vào trong tế bào chủ (còn được mô tả dưới đây), kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể người tổ hợp, tái tổ hợp (được mô tả dưới đây), kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột) mà chuyển gen cho gen globulin miễn dịch ở người (xem, ví dụ, Taylor *et al.*, 1992, *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295) hoặc kháng thể được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng cách bất kỳ khác bao gồm việc ghép mảnh của trình tự gen globulin miễn dịch ở người vào trình tự ADN khác. Theo một số phương

án, kháng thể tái tổ hợp này được đột biến gen *in vitro* (hoặc, khi chuyển gen động vật đối với trình tự Ig ở người được sử dụng, đột biến gen xôma *in vivo*) và do đó trình tự axit amin của vùng V_H và V_L trong kháng thể tái tổ hợp là trình tự mà, mặc dù liên quan đến trình tự V_H và V_L dòng mầm ở người, có thể không có trong tự nhiên trong dòng mầm kháng thể ở người *in vivo*.

Kháng thể ở người có thể tồn tại ở hai dạng mà liên quan đến tính không đồng nhất vùng bản lề. Trong một dạng, phân tử globulin miễn dịch chứa cấu trúc bốn chuỗi ổn định khoảng 150-160 kDa trong đó dime được giữ cùng nhau bằng liên kết disulfua chuỗi nặng liên chuỗi. Trong dạng thứ hai, dime không được liên kết thông qua liên kết disulfua liên chuỗi và phân tử khoảng 75-80 kDa được tạo thành bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng liên kết cộng hóa trị với nhau (nửa kháng thể). Các dạng này rất khó để tách riêng, thậm chí sau khi tinh chế ái lực.

Tần suất xuất hiện của dạng thứ hai trong các lớp kháng thể IgG nguyên vẹn là do, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự khác nhau về cấu trúc liên quan đến lớp kháng thể vùng bản lề của kháng thể. Đột biến thể axit amin duy nhất trong vùng bản lề của bản lề IgG4 ở người có thể làm giảm đáng kể sự xuất hiện của dạng thứ hai Angal *et al.*, 1993, *Molecular Immunology* 30:105) đến mức độ thường quan sát được sử dụng vùng bản lề IgG1. Sáng chế bao gồm kháng thể có một hoặc nhiều đột biến trong bản lề, vùng CH_2 hoặc CH_3 mà có thể là mong muốn, ví dụ, để sản xuất, để làm tăng hiệu suất của dạng kháng thể mong muốn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phân tử liên kết kháng nguyên” có nghĩa là protein, polypeptit hoặc phức hợp phân tử bao gồm hoặc chỉ bao gồm ít nhất một vùng xác định bổ trợ (CDR) cái mà một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều CDR bổ sung và/hoặc vùng sườn (FR), liên kết đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể. Theo các phương án cụ thể, phân tử liên kết kháng nguyên là kháng thể hoặc mảnh kháng thể, khi các thuật ngữ này được định nghĩa ở một nơi khác trong bản mô tả này.

Cụm từ "liên kết đặc hiệu", hoặc “liên kết với đặc hiệu với”, hoặc thuật ngữ tương tự, có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó tạo thành phức hợp với kháng nguyên mà tương đối ổn định dưới các điều kiện sinh lý. Liên kết đặc hiệu có thể đặc trưng bởi hằng số phân ly cân bằng ít nhất là khoảng 1×10^{-6} M hoặc ít hơn (ví dụ, K_D càng nhỏ nghĩa là liên kết càng bền). Phương pháp xác định việc hai phân tử liên

kết đặc hiệu với nhau đã được biết đến trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, thẩm tách cân bằng, cộng hưởng plasmon bề mặt, và phương pháp tương tự. Như được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể được xác định phương pháp bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™, mà liên kết đặc hiệu với Bet v 1.

Thuật ngữ kháng thể “ái lực cao” dung để chỉ các kháng thể đơn dòng có ái lực liên kết với Bet v 1, được thể hiện dưới dạng K_D ít nhất 10^{-8} M; tốt hơn là 10^{-9} M; tốt hơn nữa là 10^{-10} M, tốt hơn nữa là 10^{-11} M, tốt hơn nữa là 10^{-12} M, như được xác định bằng thử nghiệm giao thoa lớp sinh học không chất đánh dấu, thời gian thực, ví dụ, bộ cảm biến sinh học Octet® HTX, hoặc cộng hưởng plasmon bề mặt ví dụ, BIACORE™, hoặc bằng ELISA dung dịch-ái lực.

Thuật ngữ “tỷ lệ chậm lại”, “Koff” hoặc “kd” có nghĩa là kháng thể phân ly từ Bet v 1 có hằng số tỷ lệ là $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ hoặc thấp hơn, tốt hơn là $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ hoặc thấp hơn, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, BIACORE™.

Thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể, "mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể, và tương tự, như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein bất kỳ có trong tự nhiên, thu được bằng enzym, tổng hợp, hoặc được biến đổi gen mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo thành phức hợp. Thuật ngữ “phần liên kết kháng nguyên” của kháng thể, hoặc “mảnh kháng thể”, như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ một hoặc nhiều mảnh kháng thể giữ lại khả năng liên kết với Bet v 1.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế có thể liên hợp với gốc trị liệu (“liên hợp miễn dịch”), như corticosteroid, kháng thể kháng Bet v 1 thứ hai, hoặc epinephrin, vaccin, hoặc gốc trị liệu khác bất kỳ có ích trong điều trị đáp ứng dị ứng với Bet v 1.

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể được phân lập. "Kháng thể được phân lập" như được sử dụng trong bản mô tả này, nghĩa là kháng thể mà được xác định và được tách và/hoặc được thu hồi từ ít nhất một thành phần của môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, kháng thể mà được phân tách hoặc loại bỏ ra khỏi ít nhất một bộ phận của cơ thể, hoặc từ mô hoặc tế bào trong đó kháng thể có trong tự nhiên hoặc được tạo ra một cách tự nhiên, là "kháng thể được phân lập" theo sáng chế. Kháng thể được phân lập còn bao gồm kháng thể in situ trong tế bào tái tổ hợp. Kháng thể được phân lập là

kháng thể mà được xử lý bởi ít nhất một bước tinh chế hoặc phân lập. Theo một số phương án, kháng thể được phân lập có thể hầu như không chứa nguyên liệu tế bào và/hoặc hóa chất khác.

Theo các phương án nhất định, kháng thể được phân lập có thể gần như không có các kháng thể (Ab) khác có tính đặc hiệu kháng nguyên khác nhau (ví dụ, kháng thể được phân lập liên kết đặc hiệu với Bet v 1 hoặc mảnh của nó, gần như không có các Ab liên kết đặc hiệu với kháng nguyên khác ngoài kháng nguyên Fagales, hoặc theo một vài khía cạnh, ngoài Bet v 1.

“Kháng thể cản trở” hoặc “kháng thể trung hòa”, như được sử dụng trong bản mô tả này (hoặc “kháng thể mà trung hòa hoạt tính của Bet v 1” hoặc “kháng thể đối kháng”), được dùng để chỉ kháng thể mà khi liên kết với Bet v 1 làm ức chế ít nhất một hoạt tính sinh học của Bet v 1. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế giúp ngăn ngừa đáp ứng chất gây dị ứng nguyên phát với Bet v 1. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể chứng minh khả năng ngăn ngừa đáp ứng dị ứng thứ phát với Bet v 1, hoặc ít nhất một triệu chứng của đáp ứng dị ứng với Bet v 1, bao gồm hắt hơi, ho, tình trạng hen suyễn, hoặc đáp ứng quá mẫn gây ra bởi Bet v 1. Việc ức chế hoạt tính sinh học của Bet v 1 có thể được đánh giá bằng cách đo một hoặc nhiều chỉ số hoạt tính sinh học của Bet v 1 bởi một hoặc nhiều thử nghiệm in vitro hoặc in vivo tiêu chuẩn (như thử nghiệm quá mẫn trên da thụ động, như được mô tả trong tài liệu này) hoặc thử nghiệm in vivo khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (ví dụ, mô hình động vật khác để xem xét bảo vệ khỏi thử thách với Bet v 1 sau khi sử dụng một hoặc nhiều kháng thể được mô tả trong tài liệu này).

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

Thuật ngữ “ K_D ”, như được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ hằng số phân ly cân bằng của sự tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể.

Thuật ngữ “quyết định kháng nguyên” đề cập đến yếu tố quyết định kháng nguyên tương tác với vị trí liên kết kháng nguyên đặc hiệu trong vùng biến đổi của phân tử kháng thể được gọi là paratop. Một kháng nguyên có thể có nhiều hơn một quyết định

kháng nguyên. Do đó, các kháng thể khác nhau có thể liên kết với các vùng khác nhau trên kháng nguyên và có thể tạo ra các hiệu quả sinh học khác nhau. Thuật ngữ “quyết định kháng nguyên” còn dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà đáp ứng với tế bào B và/hoặc tế bào T. Thuật ngữ này cũng dùng để chỉ vùng trên kháng nguyên mà được liên kết bởi kháng thể. Quyết định kháng nguyên có thể là thẳng hoặc lập thể. Quyết định kháng nguyên thẳng là quyết định kháng nguyên được tạo ra bằng các gốc axit amin liên kề trong chuỗi polypeptit. Quyết định kháng nguyên lập thể được tạo ra bằng cách đặt kề nhau về mặt không gian các axit amin từ các đoạn khác nhau của chuỗi polypeptit thẳng. Theo một số phương án, quyết định kháng nguyên có thể bao gồm yếu tố quyết định là các nhóm bề mặt hoạt động hóa học như axit amin, chuỗi bên đường, nhóm phosphoryl hoặc nhóm sulfonyl, và theo một số phương án, có thể có các đặc tính cấu trúc không gian ba chiều, và/hoặc các đặc tính điện tích cụ thể. Quyết định kháng nguyên cũng có thể được xác định dựa theo cấu trúc hoặc chức năng. Quyết định kháng nguyên chức năng thường là nhóm nhỏ các quyết định kháng nguyên chức năng và chứa các gốc làm tăng ái lực tương tác một cách trực tiếp. Quyết định kháng nguyên được tạo ra từ các axit amin liên kề thường giữ lại đặc tính khi phơi nhiễm với dung môi làm biến tính, trong khi đó quyết định kháng nguyên được tạo ra bằng cách gấp bậc ba thường mất đặc tính khi xử lý với dung môi làm biến tính. Quyết định kháng nguyên thường bao gồm ít nhất 3, và thường là nhiều hơn, ít nhất 5 hoặc 8-10 axit amin trong một cấu hình không gian.

Thuật ngữ "gần như tương đồng" hoặc "về cơ bản tương đồng" khi đề cập đến axit nucleic hoặc mảnh của nó, chỉ ra rằng, khi được sắp thẳng hàng tối ưu với sự chèn thêm nucleotit hoặc loại bỏ với axit nucleic thích hợp với axit nucleic khác (hoặc sợi bổ sung của nó), thì độ tương đồng về trình tự nucleotit là ít nhất khoảng 90%, và tốt hơn nữa nếu ít nhất khoảng 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% của các bazơ nucleotit, như được xác định bằng bất kỳ thuật toán đã biết cho độ tương đồng trình tự, như FASTA, BLAST hoặc GAP, như được mô tả dưới đây. Trong một số trường hợp, phân tử axit nucleic gần như tương đồng với phân tử axit nucleic đối chứng có thể mã hóa polypeptit có cùng trình tự axit amin hoặc gần như tương tự với polypeptit được mã hóa bằng phân tử axit nucleic đối chứng này.

Đối với polypeptit, thuật ngữ "về cơ bản tương tự" hoặc "gần như tương tự" có nghĩa là hai trình tự peptit, khi sắp thẳng hàng cặp tối ưu, như bằng chương trình GAP

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

Độ tương tự trình tự đối với polypeptit thường được xác định bằng phần mềm phân tích trình tự. Phần mềm phân tích protein đối chiếu các trình tự tương tự bằng cách sử dụng giá trị về mức tương tự dùng cho đột biến thể, mất và các biến đổi khác, bao gồm đột biến thể axit amin bảo thủ. Ví dụ, phần mềm GCG bao gồm chương trình như GAP và BESTFIT mà có thể được sử dụng với thông số mặc định để xác định tính tương đồng về trình tự hoặc độ tương đồng về trình tự giữa các polypeptit có mối liên quan mật thiết, như các polypeptit tương đồng từ loài sinh vật khác nhau hoặc giữa protein kiểu đại và thể đột biến của nó. Xem, ví dụ, GCG Version 6.1. Trình tự polypeptit còn có thể được so sánh bằng FASTA với thông số mặc định hoặc thông số yêu cầu, chương trình trong GCG Version 6.1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) tạo ra thông tin về

sự bất cập và phần trăm độ tương đồng về trình tự của vùng có sự trùng lặp tốt nhất giữa các trình tự tra cứu và truy vấn (Pearson (2000 *supra*). Kỹ thuật giải được ưu tiên khác khi so sánh trình tự theo sáng chế với cơ sở dữ liệu chứa lượng lớn các trình tự từ các sinh vật khác nhau là chương trình máy tính BLAST, đặc biệt là BLASTP hoặc TBLASTN, bằng cách sử dụng thông số mặc định. (Xem, ví dụ, Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 và 1997 *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402).

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

Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng “làm bớt nhạy cảm” ở cá thể dị ứng Fagales. Thuật ngữ “làm bớt nhạy cảm” như được sử dụng ở đây dùng để giảm độ phản ứng - dị ứng của cá thể dị ứng Fagales khi phơi nhiễm với chất gây dị ứng Fagales, như phấn hoa bạch dương, ví dụ, Bet v 1, Aln g1, Cor a1, Car b1, Que a1, Api g2, Api g1, Dau c1, Mal d1, Ost c1, Fag s1, và/hoặc Cas s1 (xuống mức độ nhỏ hơn mức độ mà cá thể dị ứng Fagales sẽ gặp phải), hoặc với chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales. Thuật ngữ “làm giảm bớt nhạy cảm” như được định nghĩa trong tài liệu này còn làm giảm độ phản ứng-độ dị ứng của cá thể với protein PR-10 bao gồm Act c 8 và Act d 8 (kiwi), Ara h 8 (lạc), Pru ar 1 (cây mơ), Pru av 1 (anh đào), Pru p 1 (đào), Pyr c 1 (lê), Gly m 4 (đậu nành), Vig r 1 (đậu xanh), Sola I 4 (cà chua), Cuc m 3 (dưa lưới), Rub i 1 (cây mâm xôi), và Fra a 1 (dâu tây).

Mô tả chung

Các cây thuộc bộ Fagales là nguyên nhân của triệu chứng dị ứng mùa xuân, và chất gây dị ứng của cây bạch dương chính, Bet v 1 có thể phản ứng để liên kết IgE là hơn 95% trong số các bệnh nhân dị ứng phấn hoa bạch dương ((Breiteneder, EMBO J. 1989, 8(7):1935-8). Cây bạch dương là yếu tố khởi phát chiếm ưu thế ở 23% bệnh nhân dị ứng ở Hoa Kỳ và 14% ở Châu Âu. (DataMonitor report on Allergic Rhinitis, July, 2010). Mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng ở người đã được chứng minh là nhạy cảm với phấn hoa bạch dương nằm trong khoảng từ viêm mũi và viêm kết mạc tương đối nhẹ đến tình trạng hen suyễn có khả năng đe dọa tính mạng. Có hơn 60% bệnh nhân

dị ứng với phấn hoa bạch dương có kháng thể IgE với Bet v 1 này (Jarolim et al., *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1989, 88(1-2):180-2).

Cây Fagales cho thấy sự phân bố địa lý riêng biệt mà ở đó cây bạch dương và cây tổng quán sủi là loài đặc hữu ở phía bắc châu Âu và Bắc Mỹ, trong khi cây phỉ, cây gỗ trần và cây sồi thích hợp với khí hậu ẩm hơn, do đó cư trú ở phần phía nam của các lục địa này. Đồng quần thể của cả năm loài thường được tìm thấy ở vùng khí hậu nhiệt đới 5. (Spieksma FTM. *Regional European pollen calendars*. D'Amato G, Spieksma FTM, Bonini S, editors. *Allergenic pollen and pollinosis in Europe*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 1991. pp. 49–65). Một số cây Betulaceae bao gồm cây tổng quán sủi, cây phỉ và cây gỗ trần có khả năng khởi đầu sự nhạy cảm với chất gây dị ứng tương tự Bet v 1 ở người dễ mắc dẫn đến tạo ra kháng thể IgE phản ứng chéo cao. (Hauser, et al., 2011, *Clin Exp Allergy*. 41: 1804–14)

Chất gây dị ứng bộ Fagales, hoặc chất gây dị ứng Fagales, như được định nghĩa trong bản mô tả này bao gồm phấn hoa bạch dương (Bet v 1), phấn hoa tổng quán sủi (Aln g1 và Aln g4), phấn hoa cây phỉ (Cor a1, Cor a2, Cor a8, Cor a9, Cor a10, Cor a11, Cor a12, Cor a13 và Cor a14), phấn hoa cây trần (Car b1), phấn hoa cây bublông (Ost c1), phấn hoa cây hạt dẻ (Cas s1, Cas s5, Cas s8, và Cas s9), phấn hoa cây sồi (Fag s1) và phấn hoa cây sồi trắng (Que a1 và Que a2). Trong số các phấn hoa không phải của cây bạch dương, Aln g1, Cor a1, Car b1, Ost c1, Cas s1, Fag s1 và Que a1 là giống hoặc liên quan đến Bet v 1, tức là, chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales. Các chất gây dị ứng này còn được biểu hiện ở quả hạch của cây Fagales, và trái cây của cây không có họ hàng thuộc về bộ Rosales. Khả năng phản ứng chéo của các chất gây dị ứng này có thể đẩy nhanh triệu chứng dị ứng thức ăn ở bệnh nhân bị dị ứng phấn hoa. Các chất gây dị ứng thức ăn phản ứng chéo tiêu biểu bao gồm táo, anh đào, mơ, lê, linh lăng, đậu, đậu tương, cà chua, cần tây, cà rốt và măng tây. (Allergens and Allergen Immunotherapy: Subcutaneous, Sublingual, and Oral, 5th Edition. Richard F. Lockey, Dennis K. Ledford, editors. CRC Press, Taylor & Francis Group, London, NY, 2014. pp. 114, 118-119).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ “chất gây dị ứng Fagales” bao gồm chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales”. Theo một số phương án, “chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales” được định nghĩa là protein có độ tương đồng trình tự tổng thể với Bet v 1 ít nhất khoảng 35%, hoặc độ tương đồng trình tự với quyết định kháng nguyên 1 của Bet v 1 ít nhất khoảng 50%, hoặc độ tương đồng trình tự với quyết định

kháng nguyên 2 của Bet v 1 ít nhất khoảng 40%, hoặc độ tương đồng trình tự với quyết định kháng nguyên 3 của Bet v 1 ít nhất khoảng 25%, hoặc độ tương đồng trình tự với quyết định kháng nguyên 4 của Bet v 1 ít nhất khoảng 15%. Theo một số phương án, “chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales” được định nghĩa là kháng thể kháng Bet v 1, bao gồm chất gây dị ứng từ bộ Rosales.

Globulin miễn dịch E (IgE) chịu trách nhiệm đối với quá mẫn typ 1, biểu hiện ở viêm mũi dị ứng, viêm kết mạc dị ứng, cảm mạo, hen suyễn dị ứng, dị ứng nọc ong và dị ứng thực phẩm. IgE tuần hoàn trong máu và liên kết với các thụ thể Fc có ái lực cao đối với IgE trên bạch cầu ưa kiềm và dưỡng bào. Trong hầu hết các phản ứng dị ứng, các chất gây dị ứng xâm nhập vào cơ thể thông qua việc hít, tiêu hóa hoặc qua da. Chất gây dị ứng liên kết với IgE đã được tạo thành từ trước đã gắn vào thụ thể có ái lực cao trên bề mặt dưỡng bào và bạch cầu ưa kiềm, dẫn đến liên kết chéo của một vài phân tử IgE và kích hoạt giải phóng histamin và các chất trung gian gây viêm khác tạo ra các triệu chứng dị ứng khác nhau.

Việc điều trị đối với các chất gây dị ứng phấn hoa bạch dương bao gồm liệu pháp khử nhạy, việc điều trị này bao gồm tiêm lặp lại các liều tăng dần của chiết phần hoa bạch dương thô, hoặc peptit ngắn có nguồn gốc từ Bet v 1. Sự thiếu hiệu quả của trị liệu miễn dịch đặc hiệu chất gây dị ứng bao gồm thời gian điều trị kéo dài dẫn đến các vấn đề về tuân thủ điều trị ở bệnh nhân, và phản ứng dị ứng thường xuyên (tăng đến 30%) đối với protein được tiêm. Liệu pháp khử nhạy có thể mất đến vài năm trước khi được xem là đạt được hiệu quả điều trị. Sự thành công của điều trị phụ thuộc vào chế phẩm và chất lượng của dịch chiết, và khi bệnh nhân bị hen suyễn/dị ứng thức ăn nghiêm trọng thì không được tiếp nhận điều trị do các nguy cơ về tác dụng phụ nghiêm trọng qua trung gian IgE. Do đó, có nhu cầu trong lĩnh vực điều trị dị ứng phấn hoa bạch dương về các giải pháp thay thế điều trị cho các bệnh nhân nhạy cảm với chất gây dị ứng Fagales, cụ thể là Bet v 1.

Các kháng thể đã được đề xuất làm giải pháp điều trị dị ứng chung, vì chúng có thể ngăn chặn sự xâm nhập của các phân tử gây dị ứng vào trong các mô niêm mạc, hoặc có thể liên kết với chất gây dị ứng trước khi nó có cơ hội liên kết với IgE, mà liên kết với thụ thể có ái lực cao trên dưỡng bào hoặc bạch cầu ưa kiềm, do đó ngăn chặn sự giải phóng histamin và các chất trung gian gây viêm khác từ các tế bào này. Bằng sáng chế Mỹ số 5.670.626 mô tả việc sử dụng kháng thể đơn dòng để điều trị các bệnh dị ứng qua

trung gian IgE như viêm mũi dị ứng, hen suyễn dị ứng và viêm kết mạc dị ứng bằng cách ngăn chặn sự liên kết của các chất gây dị ứng với mô niêm mạc. Bằng sáng chế Mỹ số 6.849.259 mô tả việc sử dụng các kháng thể đặc hiệu với chất gây dị ứng để ức chế viêm dị ứng trong mô hình dị ứng chuột in vivo. Hệ thống kháng thể trên cơ sở sữa và trứng đã được mô tả. Ví dụ, US20030003133A1 mô tả việc sử dụng sữa làm chất mang chất gây dị ứng để tạo ra dung nạp theo đường miệng đối với phấn hoa bạch dương và các chất gây dị ứng khác. Các chế phẩm và phương pháp làm giảm phản ứng dị ứng ở động vật đối với chất gây dị ứng trong môi trường thông qua việc sử dụng phân tử ức chế khả năng chất gây dị ứng liên kết với dưỡng bào được mô tả trong WO1994 / 024164A2. Các kháng thể khác gắn với Bet v 1 đã được đề cập trong đơn sáng chế Mỹ số 2010/0034812.

Kháng thể người đầy đủ được mô tả trong bản mô tả này chứng minh liên kết đặc hiệu với Bet v 1 và có thể hữu dụng trong điều trị cho các bệnh nhân bị dị ứng phấn hoa bạch dương, cụ thể, ở bệnh nhân được chứng minh là nhạy cảm với chất gây dị ứng Bet v 1. Việc sử dụng kháng thể này có thể là giải pháp hiệu quả để điều trị cho bệnh nhân bị dị ứng phấn hoa của cây Fagales, hoặc kháng thể này có thể được sử dụng để ngăn chặn phản ứng nặng hơn với Bet v 1 khi tiếp xúc lần hai, hoặc triệu chứng kèm theo liên quan đến dị ứng, hoặc có thể được sử dụng để làm giảm độ nghiêm trọng và/hoặc thời gian phản ứng dị ứng liên quan đến tiếp xúc lần đầu với chất gây dị ứng phấn hoa bạch dương hoặc tần suất xuất hiện khi tiếp xúc lần hai. Kháng thể có thể được sử dụng một mình hoặc dưới dạng liệu pháp bổ sung với các gốc trị liệu khác hoặc phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật để điều trị dị ứng, chẳng hạn như, nhưng không chỉ giới hạn ở, điều trị với corticosteroid hoặc epinephrin. Kháng thể có thể được sử dụng kết hợp với kháng thể thứ hai hoặc thứ ba khác đặc hiệu với Bet v 1. Kháng thể có thể được sử dụng với miễn dịch trị liệu đặc hiệu chất gây dị ứng (allergen-specific immunotherapy - SIT). Theo một số phương án, việc kết hợp với SIT mang lại hiệu quả hiệp đồng.

Không như liệu pháp khử nhạy, việc điều trị với kháng thể được mô tả trong bản mô tả này có thể giúp giảm nhẹ một cách hiệu quả trong khoảng 2 tuần từ khi bắt đầu điều trị, hoặc trong khoảng 10 ngày hoặc khoảng 8 ngày từ khi bắt đầu điều trị. Khi kết hợp tiếp xúc với protein hoặc peptit Bet v 1, hoặc một hoặc nhiều chất gây dị ứng Fagales bổ sung, việc điều trị với kháng thể người đầy đủ được mô tả trong bản mô tả này có thể không chỉ ngăn chặn phản ứng dị ứng mà còn có thể khử nhạy một cách hiệu quả hoặc

hiệp đồng ở bệnh nhân bị dị ứng với phấn hoa từ cây Fagales.

Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế được thu từ chuột được sinh miễn dịch với chất sinh miễn dịch, như Bet v 1 tự nhiên, có thể mua được trên thị trường (ví dụ, từ Indoor Biotechnologies, VA, # NA-BV1-1), hoặc có thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp. Trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ của Bet v 1 được thể hiện ở SEQ ID NO: 306. Trình tự axit amin Bet v 1 có chiều dài đầy đủ có thể còn được tìm thấy ở SEQ ID NO: 314, từ Uniprot: P15494.

Chất sinh miễn dịch có thể là mảnh có hoạt tính sinh học và/hoặc có tính sinh miễn dịch của Bet v 1 tự nhiên, bản sinh hoặc được tạo ra bằng cách tái tổ hợp hoặc ADN mã hóa mảnh có hoạt tính của nó. Mảnh có thể có nguồn gốc từ đầu N hoặc đầu C của Bet v 1, hoặc từ vị trí bất kỳ trong trình tự axit amin Bet v 1.

Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể

Trừ khi có chỉ dẫn cụ thể khác, thuật ngữ “kháng thể”, như được sử dụng trong bản mô tả này, sẽ được hiểu là bao hàm các phân tử kháng thể chứa hai chuỗi nặng globulin miễn dịch và hai chuỗi nhẹ globulin miễn dịch (tức là, “phân tử kháng thể đầy đủ”) cũng như mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Thuật ngữ “phần liên kết kháng nguyên” của kháng thể, “mảnh liên kết kháng nguyên” của kháng thể, và tương tự, như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein bất kỳ có trong tự nhiên, thu được bằng enzym, tổng hợp được, hoặc được thiết kế di truyền mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo thành phức hợp. Thuật ngữ “mảnh liên kết kháng nguyên” của kháng thể, hoặc “mảnh kháng thể”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến một hoặc nhiều mảnh kháng thể giữ lại khả năng liên kết đặc hiệu với Bet v 1. Mảnh kháng thể có thể bao gồm mảnh Fab, mảnh F(ab')₂, mảnh Fv, mảnh dAb, mảnh chứa CDR hoặc mảnh CDR được phân lập. Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể được tạo ra, ví dụ, từ phân tử kháng thể đầy đủ bằng cách sử dụng kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp bất kỳ như thủy phân protein hoặc kỹ thuật biến đổi gen tái tổ hợp bao gồm kỹ thuật thao tác trên gen và biểu hiện ADN mã hóa vùng biến đổi và vùng hằng định (tùy ý) của kháng thể. ADN này đã được biết đến và/hoặc có thể dễ dàng thu được từ, ví dụ, nguồn thương mại, thư viện ADN (bao gồm, ví dụ, thư viện thực thể khuẩn-kháng thể), hoặc có thể được tổng hợp. ADN này có thể được giải trình tự hoặc thao tác bằng các kỹ thuật hóa học hoặc sinh học phân tử, ví dụ, để sắp xếp một hoặc nhiều miền

biến đổi và/hoặc hằng định thành cấu hình phù hợp, hoặc để đưa các mã bộ ba, tạo gốc xystein, biến đổi, thêm hoặc bớt các axit amin, v.v..

Ví dụ không giới hạn về mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm: (i) mảnh Fab; (ii) mảnh $F(ab')_2$; (iii) mảnh Fd; (iv) mảnh Fv; (v) phân tử Fv đơn chuỗi (scFv); (vi) mảnh dAb; và (vii) đơn vị nhận diện tối thiểu bao gồm các gốc axit amin tương tự với vùng siêu biến của kháng thể (ví dụ, vùng xác định bổ trợ (CDR) được phân lập như peptit CDR3), hoặc peptit FR3-CDR3-FR4 được ràng buộc với nhau. Phân tử được biến đổi khác, như kháng thể đặc hiệu miễn, kháng thể đơn miễn, kháng thể loại bỏ miễn, kháng thể khảm, kháng thể ghép CDR, thể hai, thể ba, thể bốn, thể mini, thể nano (ví dụ, thể nano hóa trị một, thể nano hóa trị hai, v.v.), thuốc miễn dịch mô đun nhỏ (small modular immunopharmaceuticals - SMIP), và vùng IgNAR biến đổi của cá mập, cũng bao gồm trong định nghĩa “mảnh liên kết kháng nguyên” như được sử dụng trong bản mô tả này.

Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể sẽ thường chứa ít nhất một miền biến đổi. Miền biến đổi có thể có kích thước bất kỳ hoặc có cấu tạo từ axit amin và sẽ thường chứa ít nhất một CDR, mà liên kết hoặc nằm trong khung với một hoặc nhiều trình tự khung. Trong mảnh liên kết kháng nguyên có miền V_H liên kết với miền V_L , các miền V_H và V_L có thể được sắp xếp theo thứ tự thích hợp bất kỳ. Ví dụ, vùng biến đổi có thể là dime và chứa các dime V_H - V_H , V_H - V_L hoặc V_L - V_L . Ngoài ra, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa miền V_H hoặc V_L monome.

Theo các phương án nhất định, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất một miền biến đổi được liên kết cộng hóa trị với ít nhất một miền hằng định. Ví dụ về cấu hình của miền hằng định và miền biến đổi mà có thể có trong mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; và (xiv) V_L - C_L . Trong bất kỳ cấu tạo của miền biến đổi và miền hằng định, bao gồm ví dụ bất kỳ về cấu tạo được liệt kê trên đây, miền biến đổi và miền hằng định có thể được liên kết trực tiếp với nhau hoặc có thể được liên kết bởi toàn bộ hoặc một phần vùng bản lề hoặc vùng liên kết. Vùng bản lề có thể bao gồm ít nhất 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều hơn) axit amin mà tạo ra liên kết linh hoạt hoặc bán linh hoạt giữa miền biến đổi và/hoặc miền hằng định

liên kết trong một phân tử polypeptit. Ngoài ra, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể chứa dime cùng loại hoặc dime khác loại (hoặc multime khác) có cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình của miền hằng định và miền biến đổi được liệt kê trên đây liên kết không cộng hóa trị với một miền khác và/hoặc với một hoặc nhiều miền V_H hoặc V_L monome (ví dụ, bằng (các) liên kết disulfua).

Sản xuất kháng thể người

Các phương pháp để tạo ra kháng thể người trong chuột chuyển gen đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Bất kỳ phương pháp đã biết nào đều có thể được sử dụng trong phạm vi của sáng chế để tạo ra kháng thể người mà liên kết đặc hiệu với Bet v 1.

Sử dụng kỹ thuật VELOCIMMUNE® (xem, ví dụ, US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) hoặc phương pháp đã biết bất kỳ khác để tạo ra kháng thể đơn dòng, kháng thể khảm ái lực cao với Bet v 1 được phân lập ban đầu có vùng biến đổi của người và vùng hằng định của chuột. Kỹ thuật VELOCIMMUNE® bao gồm việc tạo ra chuột chuyển gen có bộ gen chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của người có thể được liên kết hoạt động với locut vùng hằng định của chuột nội sinh sao cho chuột này tạo ra kháng thể chứa vùng biến đổi của người và vùng hằng định của chuột đáp ứng với sự kích thích kháng nguyên. Vùng biến đổi mã hóa ADN của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được phân lập và có thể được liên kết hoạt động với vùng hằng định mã hóa ADN của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của người. Sau đó, ADN được biểu hiện trong tế bào có khả năng biểu hiện kháng thể người đầy đủ.

Nói chung, chuột VELOCIMMUNE® được thử thách với kháng nguyên quan tâm, và tế bào bạch huyết (như tế bào B) được thu hồi từ chuột biểu hiện kháng thể. Tế bào bạch huyết có thể được dung hợp với dòng tế bào u tủy để sản xuất dòng tế bào lai bất tử, và dòng tế bào lai này được sàng lọc và được chọn để xác định dòng tế bào lai mà tạo ra kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên quan tâm. Vùng biến đổi mã hóa ADN của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được phân lập và được liên kết với vùng hằng định kiểu tương đương mong muốn của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Protein kháng thể này có thể được sản xuất trong tế bào, như tế bào CHO. Ngoài ra, ADN mã hóa kháng thể khảm đặc hiệu kháng nguyên hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể được phân lập trực tiếp từ tế bào bạch huyết đặc hiệu kháng nguyên.

Ban đầu, kháng thể khảm ái lực cao được phân lập có vùng biến đổi của người

và vùng hằng định của chuột. Như trong mục thí nghiệm sau đây, kháng thể được xác định đặc tính và được lựa chọn cho các đặc tính mong muốn, bao gồm ái lực, độ chọn lọc, quyết định kháng nguyên, v.v.. Vùng hằng định của chuột được thay thế bằng vùng hằng định mong muốn của người để tạo ra kháng thể người đầy đủ theo sáng chế, ví dụ IgG1 hoặc IgG4 kiểu đại hoặc được biến đổi. Trong khi vùng hằng định được lựa chọn có thể thay đổi theo mục đích sử dụng cụ thể, thì các đặc tính liên kết với kháng nguyên ái lực cao và đặc hiệu đích lại thuộc về vùng biến đổi.

Nói chung, kháng thể theo sáng chế có ái lực rất cao, thường có K_D nằm trong khoảng từ khoảng 10^{-12} đến khoảng 10^{-9} M, khi được xác định bằng cách liên kết với kháng nguyên được cố định trên pha rắn hoặc trong pha dung dịch. Vùng hằng định của chuột được thay thế bằng vùng hằng định mong muốn của người để tạo ra kháng thể người đầy đủ theo sáng chế. Trong khi vùng hằng định được lựa chọn có thể thay đổi theo mục đích sử dụng cụ thể, thì các đặc tính liên kết với kháng nguyên ái lực cao và đặc hiệu đích lại thuộc về vùng biến đổi.

Tương đương sinh học

Kháng thể kháng Bet v 1 và mảnh kháng thể theo sáng chế bao gồm protein có trình tự axit amin thay đổi từ trình tự axit amin của kháng thể được mô tả nhưng vẫn duy trì khả năng liên kết với Bet v 1. Các kháng thể biến thể và mảnh kháng thể này chứa một hoặc nhiều đột biến thêm, bớt hoặc thay thế các axit amin so với trình tự mẹ, nhưng có hoạt tính sinh học gần như tương đương với các kháng thể được mô tả. Tương tự, trình tự ADN mã hóa cho kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự mã chứa một hoặc nhiều nucleotit được thêm, bớt hoặc thay thế so với trình tự được bộc lộ, nhưng mã hóa kháng thể hoặc mảnh kháng thể mà về cơ bản tương đương sinh học với kháng thể hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế.

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

hấp thụ là do có chủ đích và được tạo ra trong quá trình đánh dấu, không nhất thiết phải duy trì được nồng độ thuốc hữu hiệu trong cơ thể đối với, ví dụ, sử dụng mạn tính, và được xem là không khác nhau đáng kể về mặt y học đối với sản phẩm thuốc cụ thể được nghiên cứu.

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

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên tương đương sinh học nếu bệnh nhân có thể thay đổi một hoặc nhiều lần giữa sản phẩm đối chứng và sản phẩm sinh học mà không làm tăng nguy cơ tác dụng phụ có hại, bao gồm sự thay đổi đáng kể về mặt lâm sàng trong tính sinh miễn dịch, hoặc làm giảm hiệu lực so với liệu pháp trị liệu liên tục mà không thực hiện sự thay đổi này.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu cả hai đều tác động theo một cơ chế chung hoặc cơ chế tác động đối với điều kiện hoặc các điều kiện sử dụng, trong phạm vi mà cơ chế này đã được biết đến.

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

Ví dụ, biến thể tương đương sinh học của kháng thể theo sáng chế có thể được xây dựng bằng cách thay thế các gốc hoặc các trình tự khác nhau hoặc loại bỏ gốc hoặc trình tự bên trong hoặc đầu cuối không cần thiết đối với hoạt tính sinh học. Ví dụ, gốc cystein không cần thiết đối với hoạt tính sinh học có thể được loại bỏ hoặc được thay thế bằng axit amin khác để ngăn ngừa sự tạo thành cầu nối disulfua trong phân tử không thích hợp hoặc không cần thiết do quá trình phục hồi đặc tính. Theo các phương án khác,

kháng thể tương đương sinh học có thể bao gồm các biến thể của kháng thể chứa sự thay đổi axit amin, mà biến đổi đặc tính glycosyl hóa của kháng thể, ví dụ, các đột biến khử hoặc loại bỏ sự glycosyl hóa.

Đặc tính sinh học của kháng thể

Nói chung, kháng thể theo sáng chế có thể thực hiện chức năng bằng cách liên kết với Bet v 1, mảnh của Bet v 1 hoặc với Bet v 1 và một hoặc nhiều chất gây dị ứng Fagales hoặc chất gây dị ứng có họ hàng với Fagales.

Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với quyết định kháng nguyên hoặc mảnh nằm trong protein Bet v 1, ví dụ, quyết định kháng nguyên hoặc mảnh chứa gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 23 đến vị trí 43 của SEQ ID NO: 306; quyết định kháng nguyên hoặc mảnh chứa gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 44 đến vị trí 56 của SEQ ID NO: 306; quyết định kháng nguyên hoặc mảnh chứa gốc axit amin nằm trong khoảng từ 2 đến 19 của SEQ ID NO: 306; quyết định kháng nguyên hoặc mảnh chứa gốc axit amin nằm trong khoảng từ 57 đến 70 của SEQ ID NO: 306; hoặc quyết định kháng nguyên hoặc mảnh chứa gốc axit amin nằm trong khoảng từ 81 đến 89 hoặc từ 81 đến 96 của SEQ ID NO: 306. Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 307, 308, 309, 310, 311 và 315, trong đó trình tự quyết định kháng nguyên có thể được kéo dài thêm 1 đến 5 axit amin, hoặc từ 5 đến 10 axit amin trên đầu C hoặc đầu N.

Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế có thể thực hiện chức năng bằng cách cản trở hoặc ức chế sự liên kết của IgE với đường bào hoặc bạch cầu ưa kiềm ở bệnh nhân nhạy cảm với chất gây dị ứng Bet v 1. Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế ức chế hoặc cản trở hoạt động của bạch cầu ưa kiềm xuống, ví dụ, ít nhất khoảng 70% so với kháng thể đối chứng lớp kháng thể. Theo các phương án nhất định, kháng thể ức chế hoặc cản trở việc dưỡng bào bị phóng thích hạt xuống, ví dụ, ít nhất khoảng 70%, hoặc ít nhất khoảng 75%, hoặc ít nhất khoảng 80%, hoặc ít nhất khoảng 85%, hoặc ít nhất khoảng 90%, hoặc ít nhất khoảng 95% so với kháng thể đối chứng lớp kháng thể.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng người đầy đủ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1, trong đó kháng thể hoặc

mảnh của nó có một hoặc nhiều đặc tính sau: (i) chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 282 và 290, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (ii) chứa LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266 và 298, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (iii) chứa miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 288 và 296, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272 và 304, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (iv) chứa miền HCDR1 vùng có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 284 và 292, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (ii) miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 286 và 294, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268 và 300, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền LCDR2 vùng có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270 và 302, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (v) liên kết với Bet v 1 với K_D bằng hoặc nhỏ hơn 10^{-8} hoặc nằm trong khoảng từ 10^{-8} đến 10^{-11} ; (vi) chứng minh hiệu quả ở ít nhất một mô hình động vật về tính quá mẫn hoặc viêm; hoặc (vii) cạnh tranh với kháng thể tham chiếu để liên kết với Bet v 1.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất việc sử dụng kết hợp hai hoặc nhiều kháng

thể người đầy đủ theo sáng chế hoặc mảnh của nó, để điều chế chế phẩm, trong đó kháng thể này liên kết với Bet v 1, và trong đó kháng thể liên kết với Bet v 1, và trong đó mỗi kháng thể hoặc mảnh của nó có trong chế phẩm có một hoặc nhiều đặc tính sau: (i) chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 282 và 290, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (ii) chứa LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266 và 298, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (iii) chứa miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 288 và 296, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272 và 304, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (iv) chứa miền HCDR1 vùng có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 284 và 292, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 286 và 294, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268 và 300, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; miền LCDR2 vùng có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270 và 302, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; (v) liên kết với Bet v 1 với K_D bằng hoặc nhỏ hơn 10^{-8} hoặc nằm trong khoảng từ 10^{-8} đến 10^{-11} ; (vi) chứng minh hiệu quả ở ít nhất một mô hình động vật về tính quá mẫn hoặc viêm; hoặc (vii) cạnh

tranh với kháng thể tham chiếu để liên kết với Bet v 1.

Một số kháng thể Bet v 1 nhất định theo sáng chế, khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp, có khả năng liên kết và trung hòa ít nhất một hiệu quả sinh học của Bet v 1, như được xác định bởi thử nghiệm in vitro hoặc in vivo. Khả năng liên kết và trung hòa hoạt tính của Bet v 1 của kháng thể theo sáng chế có thể được xác định bằng các phương pháp tiêu chuẩn bất kỳ đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm phân tích liên kết hoặc phân tích sự trung hòa hoạt tính (ví dụ, bảo vệ khỏi quá mẫn), như được xác định trong bản mô tả này.

Các thử nghiệm in vitro minh họa, không xác định để đo hoạt tính liên kết được minh họa ở ví dụ 3 trong bản mô tả này. Trong ví dụ 3, ái lực liên kết và hằng số động học của kháng thể kháng Bet v 1 được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt.

Protein hoặc peptit Bet v 1 có thể được biến đổi để chứa thêm hoặc thay thế một số gốc nhất định để đánh dấu hoặc nhằm mục đích liên hợp các phân tử mang, như KLH. Ví dụ, xystein có thể được thêm vào tại cả đầu N hoặc đầu C của peptit, hoặc trình tự cầu nối có thể được thêm vào để tạo ra peptit để liên hợp với, ví dụ, KLH để sinh miễn dịch. Kháng thể đặc hiệu với Bet v 1 có thể không chứa các chất đánh dấu hoặc gốc bổ sung, hoặc có thể chứa chất đánh dấu hoặc gốc đầu N hoặc đầu C. Theo một phương án, chất đánh dấu hoặc gốc là biotin. Trong thử nghiệm liên kết, vị trí của chất đánh dấu (nếu có) có thể xác định hướng của peptit với bề mặt mà peptit được liên kết. Ví dụ, nếu bề mặt được phủ avidin, peptit chứa biotin đầu N sẽ được định hướng sao cho phần đầu C của peptit sẽ ở xa bề mặt.

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

Thuật ngữ “quyết định kháng nguyên” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ yếu tố quyết định kháng nguyên tương tác với vị trí liên kết kháng nguyên đặc hiệu trên vùng biến đổi của phân tử kháng thể được gọi là paratop. Một kháng nguyên có thể có nhiều hơn một quyết định kháng nguyên. Do đó, các kháng thể khác nhau có thể liên kết với các vùng khác nhau trên kháng nguyên và có thể có các tác dụng sinh học khác nhau. Quyết định kháng nguyên có thể là lập thể hoặc thẳng. Quyết định kháng nguyên lập thể được tạo ra bởi các axit amin kề nhau về mặt không gian từ các đoạn khác nhau của chuỗi polypeptit thẳng. Quyết định kháng nguyên thẳng là quyết

định kháng nguyên được tạo ra bằng các gốc axit amin liền kề trong chuỗi polypeptit. Trong một số trường hợp, quyết định kháng nguyên có thể bao gồm các gốc saccarit, nhóm phosphoryl hoặc nhóm sulfonyl trên kháng nguyên.

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng Bet v 1 tương tác với một hoặc nhiều axit amin được tìm thấy trong phân tử Bet v 1 bao gồm, ví dụ, đoạn bất kỳ của Bet v 1 được thể hiện ở SEQ ID NO: 306, hoặc trong vùng so sánh của protein Bet v 1 được tạo ra bằng cách tái tổ hợp. Quyết định kháng nguyên liên kết với kháng thể có thể chứa một hoặc nhiều trình tự liên tục của 3 hoặc nhiều (ví dụ, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều) axit amin nằm trong phân tử Bet v 1. Các trình tự liên tục ví dụ bao gồm các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 23 đến vị trí 44 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 23 đến vị trí 43 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 23 đến vị trí 38 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 23 đến vị trí 41 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 26 đến vị trí 43 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 29 đến vị trí 43 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 44 đến vị trí 70 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 44 đến vị trí 56 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 45 đến vị trí 56 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 2 đến vị trí 19 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 5 đến vị trí 10 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 5 đến vị trí 19 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 8 đến vị trí 19 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 11 đến vị trí 19 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 57 đến vị trí 70 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 57 đến vị trí 66 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 81 đến vị trí 96 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 84 đến vị trí 96 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 85 đến vị trí 96 của SEQ ID NO: 306; và các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 81 đến vị trí 89 của SEQ ID NO: 306. Trình tự liên tục ví dụ khác bao gồm ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 307, 308, 309, 310, 311 và 315, trong đó trình tự này có thể được kéo dài thêm kháng từ 1 đến 5 axit amin, hoặc từ 5 đến 10 axit amin trên đầu C hoặc đầu N. Ngoài ra, quyết định kháng nguyên có thể chứa nhiều axit

amin (hoặc trình tự axit amin) không liên tục nằm trong phân tử Bet v 1 (ví dụ, quyết định kháng nguyên lập thể).

Các kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để xác định xem kháng thể "tương tác với một hoặc nhiều axit amin" trong polypeptit hoặc protein. Các kỹ thuật ví dụ bao gồm thử nghiệm cản trở chéo, như được mô tả trong *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Phương pháp khác bao gồm phân tích đột biến quét alanin, phân tích thẩm thấu (Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248:443-63), phân tích phân cắt, nghiên cứu tinh thể phân và phân tích NMR. Ngoài ra, các phương pháp như cắt quyết định kháng nguyên, chiết quyết định kháng nguyên và biến đổi hóa học kháng nguyên có thể được sử dụng (Tomer, 2000) *Protein Science* 9: 487-496). Một phương pháp khác mà có thể được sử dụng để xác định axit amin trong polypeptit mà kháng thể tương tác với là phương pháp trao đổi hydro/đơteri được phát hiện bằng khối phổ. Nhìn chung, phương pháp trao đổi hydro/đơteri bao gồm đánh dấu bằng đơteri protein quan tâm, sau đó liên kết kháng thể với protein được đánh dấu bằng đơteri. Tiếp theo, phức hợp protein/kháng thể được chuyển vào nước và các proton có thể được trao đổi trong axit amin mà được bảo vệ bởi phức hợp kháng thể trải qua sự trao đổi lại đơteri thành hydro ở tốc độ chậm hơn các proton được trao đổi trong axit amin mà không phải là một phần của bề mặt phân cách. Do đó, axit amin mà tạo nên một phần bề mặt phân cách giữa protein/kháng thể có thể giữ lại đơteri và do đó có khối lượng cao hơn tương đối so với axit amin không nằm trong bề mặt phân cách. Sau quá trình phân ly của kháng thể, protein đích được phân cắt bằng proteaza và được phân tích khối phổ, qua đó bộc lộ các gốc được đánh dấu bằng đơteri tương ứng với axit amin cụ thể có tương tác với kháng thể. Xem, ví dụ, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Phương pháp khảo sát tinh thể bằng tia X phức hợp kháng nguyên/kháng thể có thể còn được sử dụng cho mục đích lập bản đồ quyết định kháng nguyên.

Phương pháp xác định đặc tính có biến đổi (Modification-Assisted Profiling - MAP), còn được gọi là phương pháp xác định đặc tính kháng thể dựa vào cấu trúc kháng nguyên (Antigen Structure-based Antibody Profiling - ASAP) là phương pháp phân loại một lượng lớn kháng thể đơn dòng (kháng thể đơn dòng) được định hướng chống lại kháng nguyên theo đặc tính liên kết tương tự của mỗi kháng thể với bề mặt kháng nguyên

được biến đổi hóa học hoặc enzym (xem, US 2004/0101920). Mỗi loại có thể phản ánh một quyết định kháng nguyên duy nhất khác biệt rõ ràng hoặc trùng khớp với quyết định kháng nguyên ở một loại khác. Kỹ thuật này cho phép lọc kháng thể tương đồng về mặt di truyền nhanh chóng, sao cho việc xác định đặc tính có thể tập trung vào kháng thể khác biệt về mặt di truyền. Khi áp dụng phương pháp này đối với việc sàng lọc tế bào lai, MAP có thể làm đơn giản hóa việc định danh các dòng tế bào lai hiếm sản xuất kháng thể đơn dòng có các đặc tính mong muốn. MAP có thể được sử dụng để phân loại kháng thể theo sáng chế thành các nhóm kháng thể liên kết với các quyết định kháng nguyên khác nhau.

Theo một số phương án, kháng thể kháng Bet v 1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết quyết định kháng nguyên trong Bet v 1, ở dạng tự nhiên hoặc bẩm sinh, ví dụ như ở SEQ ID NO: 306 (hoặc SEQ ID NO: 314 (trình tự axit amin Bet v 1 từ Uniprot: P15494), hoặc được tạo ra bằng cách tái tổ hợp, hoặc với mảnh của nó. Theo một số phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế, như được trình bày trong bảng 1, tương tác với ít nhất một trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 23 đến khoảng vị trí 44 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 23 đến vị trí 43 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 23 đến vị trí 38 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 23 đến vị trí 41 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 26 đến vị trí 43 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 29 đến vị trí 43 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 44 đến vị trí 70 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 44 đến vị trí 56 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 45 đến vị trí 56 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 2 đến vị trí 19 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 5 đến vị trí 10 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 5 đến vị trí 19 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 8 đến vị trí 19 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 11 đến vị trí 19 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 57 đến vị trí 70 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 57 đến vị trí 66 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 81 đến vị trí 96 của SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 84 đến vị trí 96 của

SEQ ID NO: 306; các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 85 đến vị trí 96 của SEQ ID NO: 306; và các gốc axit amin nằm trong khoảng từ vị trí 81 đến vị trí 89 của SEQ ID NO: 306. Các vùng này còn được lấy làm ví dụ ở SEQ ID NO: 307, 308, 309, 310, 311 và 315.

Sáng chế bao gồm kháng thể kháng Bet v 1 mà liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên hoặc một phần của quyết định kháng nguyên, như kháng thể minh họa được mô tả trong bản mô tả này ở bảng 1, hoặc kháng thể có trình tự CDR của kháng thể minh họa được mô tả ở bảng 1. Tương tự, sáng chế cũng bao gồm kháng thể kháng Bet v 1 cạnh tranh để liên kết với Bet v 1 hoặc mảnh Bet v 1 với kháng thể bất kỳ trong số kháng thể minh họa được mô tả trong bản mô tả này ở bảng 1, hoặc kháng thể có trình tự CDR của kháng thể minh họa được mô tả ở bảng 1.

Người có hiểu biết trung bình có thể xác định một cách dễ dàng việc kháng thể liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên, hoặc cạnh tranh liên kết với, kháng thể kháng Bet v 1 tham chiếu bằng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, để xác định liệu kháng thể thử nghiệm có liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như kháng thể kháng Bet v 1 tham chiếu theo sáng chế hay không, kháng thể tham chiếu được cho liên kết với protein hoặc peptit Bet v 1 dưới điều kiện bão hòa. Sau đó, khả năng liên kết với phân tử Bet v 1 của kháng thể thử nghiệm được đánh giá. Nếu kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với Bet v 1 sau khi tạo liên kết bão hòa với kháng thể kháng Bet v 1 tham chiếu, thì có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm liên kết với quyết định kháng nguyên khác với kháng thể kháng Bet v 1 tham chiếu. Mặt khác, nếu kháng thể thử nghiệm không có khả năng liên kết với phân tử Bet v 1 sau khi liên kết bão hòa với kháng thể kháng Bet v 1 tham chiếu, thì sau đó kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như quyết định kháng nguyên được liên kết bởi kháng thể kháng Bet v 1 tham chiếu theo sáng chế.

Để xác định liệu kháng thể có cạnh tranh liên kết với kháng thể kháng Bet v 1 tham chiếu, phương pháp luận liên kết được mô tả trên đây được thực hiện theo hai hướng: Theo hướng thứ nhất, kháng thể tham chiếu được cho liên kết với phân tử Bet v 1 dưới điều kiện bão hòa sau đó đánh giá liên kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử Bet v 1. Theo hướng thứ hai, kháng thể thử nghiệm được liên kết với phân tử Bet v 1 dưới điều kiện bão hòa sau đó đánh giá liên kết của kháng thể tham chiếu với phân tử Bet v 1. Nếu, theo cả hai hướng, chỉ kháng thể (bão hòa) thứ nhất có thể liên kết với

phân tử Bet v 1, thì có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm và kháng thể tham chiếu cạnh tranh liên kết với Bet v 1. Như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, kháng thể mà cạnh tranh để liên kết với kháng thể tham chiếu có thể không cần phải liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như kháng thể tham chiếu, nhưng có thể cản trở về mặt không gian liên kết của kháng thể tham chiếu bằng cách liên kết với quyết định kháng nguyên trùng khớp hoặc liên kề.

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

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

Liên hợp miễn dịch

Sáng chế bao gồm kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 của người được liên hợp với gốc trị liệu (“liên hợp miễn dịch”), chẳng hạn như chất có khả năng làm giảm độ nghiêm trọng của phản ứng dị ứng với chất gây dị ứng Bet v 1, hoặc trong môi trường có cây Fagales, hoặc để cải thiện ít nhất một triệu chứng liên quan đến việc tiếp xúc với

phần hoa bạch dương hoặc với chất gây dị ứng Bet v 1, bao gồm viêm mũi, viêm kết mạc hoặc khó thở hoặc độ nghiêm trọng của các triệu chứng này. Chất này có thể là corticosteroid, kháng thể thứ hai khác với Bet v 1 hoặc vắc xin. Loại gốc trị liệu có thể được liên hợp với kháng thể Bet v 1 sẽ phụ thuộc vào tình trạng bệnh lý cần được điều trị và hiệu quả trị liệu mong muốn cần đạt được. Ngoài ra, nếu hiệu quả trị liệu mong muốn là điều trị dị chứng hoặc triệu chứng liên quan đến việc tiếp xúc với chất gây dị ứng Bet v 1 hoặc tình trạng khác do việc tiếp xúc này, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, viêm mũi hoặc viêm kết mạc, có thể thuận lợi để liên hợp chất thích hợp để điều trị dị chứng hoặc triệu chứng của tình trạng này, hoặc làm giảm tác dụng phụ bất kỳ của kháng thể theo sáng chế. Ví dụ về chất thích hợp để tạo liên hợp miễn dịch đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật; xem ví dụ, WO 05/103081.

Bào chế và sử dụng chế phẩm điều trị

Sáng chế đề xuất chế phẩm điều trị chứa kháng thể kháng Bet v 1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Chế phẩm điều trị theo sáng chế sẽ được dùng theo đường dùng phù hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tiêm vào tĩnh mạch, tiêm dưới da, tiêm vào cơ, dùng trong mũi, với chất mang, tá dược và các chất khác mà được đưa vào chế phẩm để làm tăng sự vận chuyển, phân phối, dung nạp và tương tự. Các dược phẩm thích hợp có thể được bào chế ở dạng đã biết bởi các nhà hóa dược: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Các dược phẩm này bao gồm, ví dụ, dạng bột, bột nhão, thuốc mỡ, dạng thạch, sáp, dầu, lipit, chất dẫn thuốc chứa lipit (cation hoặc anion) (như LIPOFECTIN™), liên hợp ADN, bột nhão hấp thụ dạng khan, nhũ tương dầu trong nước và nước trong dầu, nhũ tương polyetylen glycol (polyetylen glycol với khối lượng phân tử khác nhau), gel bán rắn, và hỗn hợp bán rắn chứa chế phẩm polyetylen glycol. Ngoài ra, xem, Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Liều lượng kháng thể có thể thay đổi phụ thuộc vào độ tuổi và thể trọng bệnh nhân sử dụng, bệnh đích, tình trạng bệnh lý, đường dùng và các yếu tố tương tự. Khi kháng thể theo sáng chế được dùng để điều trị viêm mũi hoặc viêm kết mạc liên quan đến việc tiếp xúc với phần hoa từ cây Fagales hoặc phần hoa bạch dương hoặc Bet v 1 ở người nhạy cảm với Bet v 1 hoặc để ngăn ngừa phản ứng quá mẫn với chất gây dị ứng Fagales, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng của phản ứng dị ứng, kháng thể theo sáng chế

nên được tiêm vào tĩnh mạch, thông thường ở liều đơn nằm trong khoảng từ 0,01 đến 30 mg/kg thể trọng, tốt hơn là từ 0,02 đến 7, từ 0,03 đến 5, hoặc từ 0,05 đến 3 mg/kg thể trọng. Phụ thuộc vào mức độ nghiêm trọng của tình trạng, tần suất và thời gian điều trị có thể được điều chỉnh. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được dùng như liều ban đầu là ít nhất khoảng từ 0,1mg đến khoảng 800 mg, khoảng từ 1 đến khoảng 500 mg, khoảng từ 5 đến khoảng 300 mg, hoặc khoảng từ 10 đến khoảng 200 mg, đến khoảng 100mg, hoặc đến khoảng 50mg. Theo một số phương án, liều thứ hai hoặc nhiều liều tiếp theo có thể được sử dụng sau khi dùng liều ban đầu của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó ở lượng mà có thể xấp xỉ hoặc thấp hơn liều ban đầu, trong đó các liều tiếp theo được chia thành ít nhất 1 đến 3 ngày; ít nhất một tuần, ít nhất 2 tuần, ít nhất 3 tuần, ít nhất 4 tuần, ít nhất 5 tuần, ít nhất 6 tuần, ít nhất 7 tuần, ít nhất 8 tuần, ít nhất 9 tuần, ít nhất 10 tuần, ít nhất 12 tuần, hoặc ít nhất 14 tuần.

Ví dụ, các hệ thống phân phối đã biết và có thể được sử dụng để dùng dược phẩm theo sáng chế bao gồm, ví dụ, bao trong liposom, vi hạt, vi nang, tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện virus đột biến, nhập bào qua trung gian thụ thể (xem, ví dụ, Wu *et al.*, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Phương pháp bổ sung bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trong da, qua da, trong cơ, trong bụng, trong tĩnh mạch, dưới da, trong mũi, trên màng cứng, và đường miệng. Chế phẩm có thể được sử dụng theo đường thông dụng bất kỳ, ví dụ, bằng cách truyền hoặc tiêm nhanh một liều, bằng cách hấp thụ qua lớp biểu bì hoặc niêm mạc da (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và ruột, v.v.) và có thể được sử dụng cùng với hoạt chất sinh học khác. Việc sử dụng có thể là toàn thân hoặc cục bộ.

Dược phẩm còn có thể được phân phối trong hạt, cụ thể là liposom (ví dụ, xem Langer (1990) Science 249:1527-1533). 1527-1533).

Trong một số trường hợp nhất định, dược phẩm có thể được phân phối trong hệ thống giải phóng có kiểm soát. Theo một phương án, bơm có thể được sử dụng. Theo một phương án khác, vật liệu polyme có thể được sử dụng. Theo một phương án khác nữa, hệ thống giải phóng có kiểm soát có thể được đặt ở vị trí lân cận với đích của dược phẩm, do đó chỉ cần sử dụng một phần của liều toàn thân.

Dược phẩm tiêm có thể bao gồm dạng liều để tiêm trong tĩnh mạch, dưới da,

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

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

Các bút tái sử dụng lại và thiết bị phân phối tự tiêm có thể được sử dụng để phân phối dược phẩm theo sáng chế dưới da. Ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), bút DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland), bút HUMALOG MIX 75/25™, bút HUMALOG™, bút HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), bút BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, và OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany). Ví dụ về thiết bị phân phối dạng

bút dùng một lần có thể được sử dụng để phân phối dược phẩm theo sáng chế dưới da bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bút SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), và thiết bị tự tiêm KWIKPEN™ (Eli Lilly), SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLETT™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.), và bút HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL).

Tốt hơn là, dược phẩm để sử dụng theo đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa được mô tả trên đây được điều chế ở dạng liều ở liều đơn vị được làm thích hợp cho liều chứa thành phần hoạt tính. Dạng liều này ở dạng liều đơn vị bao gồm, ví dụ, viên nén, viên thuốc, viên nang, thuốc tiêm (ống thuốc tiêm), thuốc đạn, v.v. lượng kháng thể trên đây có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 500 mg mỗi dạng liều ở dạng liều đơn vị; đặc biệt là ở dạng tiêm, tốt hơn là kháng thể đã nêu có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 100 mg và lượng nằm trong khoảng từ 10 đến khoảng 250 mg đối với dạng liều khác.

Sử dụng kháng thể để trị liệu

Do sự tương tác của chúng với Bet v 1, kháng thể theo sáng chế hữu dụng trong điều trị phản ứng sơ cấp sau khi tiếp xúc với chất gây dị ứng Fagales, phấn hoa bạch dương, hoặc với môi trường chứa protein Bet v 1 hoặc ít nhất một triệu chứng liên quan đến phản ứng dị ứng, như ngứa mắt, viêm kết mạc, viêm mũi, thở khò khè, thở khó hoặc ngăn chặn phản ứng với chất gây dị ứng Bet v 1, bao gồm phản ứng quá mẫn nghiêm trọng hơn, hoặc làm giảm độ nghiêm trọng, thời gian và/hoặc tần suất của các triệu chứng sau khi tiếp xúc lại với chất gây dị ứng Fagales. Theo đó, có thể thấy rằng kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để phòng bệnh hoặc trị liệu.

Theo một phương án khác nữa của sáng chế, kháng thể được sử dụng để bào chế dược phẩm để điều trị cho các bệnh nhân bị nhạy cảm với phấn hoa bạch dương hoặc phần chiết của nó và/hoặc protein Bet v 1. Theo một phương án khác nữa của sáng chế, kháng thể được sử dụng để bào chế dược phẩm để làm giảm độ nghiêm trọng của tiếp xúc lần đầu với Bet v 1, hoặc để giảm độ nghiêm trọng, thời gian và/hoặc số lần phản ứng dị ứng với Bet v 1. Theo một phương án khác nữa của sáng chế, kháng thể được sử dụng dưới dạng liệu pháp bổ sung với chất khác hữu dụng để điều trị chất gây dị ứng Fagales, bao gồm corticosteroid, vaccin, trị liệu miễn dịch đặc hiệu chất gây dị ứng (allergen specific immunotherapy - SIT) hoặc liệu pháp giảm nhẹ khác đã biết đối với

người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Liệu pháp trị liệu kết hợp

Liệu pháp trị liệu kết hợp có thể bao gồm kháng thể kháng Bet v 1 theo sáng chế và chất trị liệu bổ sung bất kỳ khác mà có thể được kết hợp một cách có lợi với kháng thể theo sáng chế hoặc với mảnh hoạt tính sinh học của kháng thể theo sáng chế.

Ví dụ, chất trị liệu thứ hai có thể được dùng để hỗ trợ trong việc làm giảm các triệu chứng dị ứng sau khi tiếp xúc với chất gây dị ứng Fagales, hạt phấn hoa hoặc phần chiết của nó hoặc Bet v 1 hoặc tiếp xúc với môi trường mà ở đó cây Fagales có mặt và nở hoa, như corticosteroid. Kháng thể có thể còn được sử dụng kết hợp với liệu pháp khác, như vắc xin đặc hiệu đối với chất gây dị ứng Bet v 1. (Các) thành phần hoạt tính trị liệu bổ sung có thể được sử dụng trước, cùng lúc, hoặc sau khi sử dụng kháng thể kháng Bet v 1 theo sáng chế. Theo sáng chế, phác đồ dùng được xem là việc dùng kháng thể kháng Bet v 1 “kết hợp với” thành phần hoạt tính trị liệu thứ hai.

Trị liệu miễn dịch đặc hiệu chất gây dị ứng (Allergen-specific Immunotherapy - SIT)

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “trị liệu miễn dịch đặc hiệu chất gây dị ứng”, “trị liệu miễn dịch đặc hiệu”, “SIT”, “phác đồ SIT” và thuật ngữ tương tự dùng để chỉ việc cho bệnh nhân dùng lặp lại chất gây dị ứng trong khoảng thời gian làm giải pháp để điều trị hoặc ngăn ngừa phản ứng dị ứng hoặc làm giảm hoặc loại bỏ phản ứng dị ứng. Ở phác đồ SIT cụ thể, lượng nhỏ chất gây dị ứng được cho bệnh nhân dị ứng dùng ban đầu, sau đó dùng lượng chất gây dị ứng tăng lên. Trong một số trường hợp nhất định, phác đồ SIT bao gồm ít nhất hai pha liên tiếp: (1) pha tăng liều, và (2) pha duy trì. Trong pha tăng liều, liều chất gây dị ứng tăng lên được dùng cho đến khi đạt được liều hiệu quả và an toàn. Sau đó, liều được thiết lập ở cuối pha tăng liều được dùng cho bệnh nhân trong cả pha duy trì. Thời gian của pha tăng liều có thể là một vài tuần hoặc một vài tháng. Tuy nhiên, theo một số phương án, pha tăng liều có thời gian về cơ bản ngắn hơn (ví dụ, ít hơn một tuần, ít hơn 6 ngày, ít hơn 5 ngày, ít hơn 4 ngày, ít hơn 3 ngày hoặc ít hơn 2 ngày). Phác đồ SIT bao gồm pha tăng liều ít hơn 5 ngày đôi khi còn được đề cập là trị liệu miễn dịch “tăng vọt” hoặc “SIT tăng vọt”. Pha duy trì của phác đồ SIT có thể kéo dài vài tuần, vài tháng, vài năm hoặc vô hạn.

Phác đồ dùng

Theo một số phương án nhất định của sáng chế, nhiều liều của một hoặc nhiều kháng thể kháng Bet v 1 (tổ hợp kháng thể) có thể được dùng cho bệnh nhân trong khoảng thời gian xác định. Phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm bước cho bệnh nhân dùng liên tiếp nhiều liều của kháng thể, tổ hợp kháng thể. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "dùng liên tiếp" có nghĩa là mỗi liều kháng thể hoặc tổ hợp kháng thể được cho đối tượng dùng ở các thời điểm khác nhau, ví dụ, vào các ngày khác nhau phân biệt bởi khoảng thời gian xác định trước (ví dụ, giờ, ngày, tuần hoặc tháng). Sáng chế bao gồm phương pháp, phương pháp này bao gồm bước cho bệnh nhân dùng liên tiếp liều đơn đầu tiên của kháng thể hoặc tổ hợp kháng thể, sau đó là một hoặc nhiều liều thứ hai của kháng thể hoặc tổ hợp kháng thể, và tùy ý sau đó là một hoặc nhiều liều thứ ba của kháng thể hoặc tổ hợp kháng thể.

Các thuật ngữ "liều thứ nhất", "liều thứ hai" và "liều thứ ba" dùng để chỉ trình tự thời gian dùng kháng thể hoặc tổ hợp kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này. Do đó, "liều thứ nhất" là liều mà được dùng ở thời điểm bắt đầu phác đồ điều trị (còn gọi là "liều cơ sở"); "liều thứ hai" là liều mà được dùng sau liều thứ nhất; và "liều thứ ba" là liều mà được sử dụng sau liều thứ hai. Liều thứ nhất, thứ hai, và thứ ba có thể đều là các liều chứa cùng một lượng kháng thể hoặc tổ hợp kháng thể, nhưng thường có thể khác nhau khi xét về tần suất sử dụng. Tuy nhiên, theo một số phương án, lượng kháng hoặc tổ hợp kháng thể có trong liều thứ nhất, thứ hai và/hoặc thứ ba thay đổi khác nhau (ví dụ, được điều chỉnh lên hoặc xuống sao cho thích hợp) trong quá trình điều trị. Theo một số phương án, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, hoặc 5) liều được dùng tại thời điểm bắt đầu phác đồ điều trị làm "liều nạp" sau đó là liều tiếp theo mà được sử dụng trên cơ sở tần suất sử dụng ít hơn (ví dụ, "liều duy trì").

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

Phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm bước cho bệnh nhân dùng

số liệu thứ hai và/hoặc thứ ba bất kỳ của kháng thể hoặc tổ hợp kháng thể. Ví dụ, theo một số phương án, chỉ một liều thứ hai được dùng cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều) liều thứ hai được dùng cho bệnh nhân. Tương tự, theo một số phương án, chỉ duy nhất liều thứ ba được dùng cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn) liều thứ ba được dùng cho bệnh nhân.

Theo phương án bao gồm nhiều liều thứ hai, mỗi liều thứ hai có thể được dùng ở cùng một tần suất dùng như các liều thứ hai còn lại. Phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm bước cho bệnh nhân dùng 1 đến 2 tuần sau liều ngay trước. Tương tự, theo phương án bao gồm nhiều liều thứ ba, mỗi liều thứ ba có thể được dùng ở cùng một tần suất dùng như các liều thứ ba còn lại. Ví dụ, mỗi liều thứ ba có thể được dùng cho bệnh nhân 2 đến 4 tuần sau liều ngay trước. Theo một số phương án theo sáng chế, tần suất dùng trong đó liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba được dùng cho bệnh nhân có thể thay đổi theo phác đồ điều trị. Tần suất dùng có thể còn được điều chỉnh trong quá trình điều trị bởi bác sỹ, phụ thuộc vào nhu cầu của mỗi bệnh nhân sau khi được kiểm tra lâm sàng.

Sử dụng kháng thể trong chẩn đoán

Kháng thể kháng Bet v 1 theo sáng chế có thể còn được sử dụng để phát hiện và/hoặc xác định lượng Bet v 1 trong mẫu, ví dụ, cho mục đích chẩn đoán. Việc xác định phản ứng dị ứng được cho là do Bet v 1 gây ra có thể được thực hiện bằng cách đo sự có mặt của Bet v 1 thông qua việc sử dụng một hoặc nhiều kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể của sáng chế. Thử nghiệm chẩn đoán minh họa đối với Bet v 1 có thể bao gồm, ví dụ, cho mẫu, thu được từ bệnh nhân, tiếp xúc với kháng thể kháng Bet v 1 theo sáng chế, trong đó kháng thể kháng Bet v 1 được đánh dấu bằng chất đánh dấu hoặc chất báo cáo có thể phát hiện được hoặc chất báo cáo hoặc được sử dụng làm phối tử bắt giữ để phân lập một cách chọn lọc protein Bet v 1 từ các mẫu của bệnh nhân. Ngoài ra, kháng thể kháng Bet v 1 không được đánh dấu có thể được sử dụng để chẩn đoán kết hợp với kháng thể thứ hai mà được đánh dấu theo cách phát hiện được. Chất đánh dấu hoặc chất báo cáo có thể phát hiện có thể là đồng vị phóng xạ, như ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , hoặc ^{125}I ; gốc huỳnh quang hoặc quang hóa như florescein isothiocyanat hoặc rhodamin; hoặc enzym như alkaline phosphatase, β -galactosidase, peroxidase cải ngựa hoặc luciferase. Thử nghiệm minh họa cụ thể mà có thể được sử dụng để phát hiện hoặc xác định Bet v

1 trong mẫu bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) và phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS).

Mẫu mà có thể được sử dụng trong thử nghiệm chẩn đoán Bet v 1 theo sáng chế bao gồm mẫu mô hoặc dịch lỏng bất kỳ có thể thu được từ bệnh nhân, mà chứa lượng có thể phát hiện được của protein Bet v 1, hoặc mảnh của nó, dưới điều kiện bệnh lý hoặc điều kiện bình thường. Nhìn chung, lượng Bet v 1 trong mẫu cụ thể thu được từ người khỏe mạnh/bệnh nhân không bị dị ứng (ví dụ, bệnh nhân không bị nhạy cảm với sự có mặt của Bet v 1) sẽ được xác định để thiết lập ban đầu đường cơ sở hoặc tiêu chuẩn, hàm lượng của Bet v 1. Sau đó, đường cơ sở của lượng Bet v 1 có thể được so sánh với lượng Bet v 1 được xác định trong mẫu thu được từ người bị nghi ngờ là nhạy cảm với Bet v 1 trong phần hoa bạch dương hoặc triệu chứng liên quan đến tình trạng này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Mặc dù sáng chế không chỉ ra và mô tả một cách cụ thể với tham chiếu đến số lượng các phương án, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể hiểu được rằng các thay đổi về dạng và chi tiết có thể được thực hiện đối với các phương án được bộc lộ trong bản mô tả này mà không xa rời tinh thần và phạm vi của sáng chế và các phương án được bộc lộ trong bản mô tả này không có mục đích giới hạn phạm vi của bộ yêu cầu bảo hộ.

Ví dụ 1: Tạo ra kháng thể của người liên kết với Bet v 1

Chất sinh miễn dịch bao gồm chất bất kỳ trong các chất sau có thể được dùng để tạo ra kháng thể liên kết với Bet v 1. Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế được thu từ chuột được sinh miễn dịch với chất sinh miễn dịch, như Bet v 1 tự nhiên có chiều dài đầy đủ, có thể mua được trên thị trường (ví dụ, từ Stallergenes Greer, Lenoir, NC, # XP527D3A25) hoặc được phân lập từ phần hoa bạch dương (xem, ví dụ, Buters, et al. (2012), *Atmospheric Environment* 55:496-505), hoặc có thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp (xem số truy cập ngân hàng gen P 15494 đối với trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ của Bet v 1), hoặc mảnh của protein Bet v 1, sau đó sinh miễn dịch với chất sinh miễn dịch thứ cấp hoặc với mảnh có hoạt tính miễn dịch của protein tự nhiên. Các cấu trúc có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phần protein Bet v 1 đã

biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Các cấu trúc này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp để tạo ra phản ứng kháng thể *in vivo*. Ví dụ, cấu trúc Bet v 1 tái tổ hợp, như cấu trúc minh họa nêu trong SEQ ID NO: 307, 308, 309, 310, 311 và 315, hoặc mảnh của nó, có thể được sử dụng làm chất sinh miễn dịch.

Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế thu được từ chuột được sinh miễn dịch với chất sinh miễn dịch sơ cấp, chẳng hạn như mảnh có hoạt tính sinh học và/hoặc mảnh có hoạt tính miễn dịch của Bet v 1 tự nhiên, hoặc ADN mã hóa mảnh có hoạt tính của nó. Mảnh này có thể có nguồn gốc từ phần đầu N hoặc đầu C của Bet v 1.

Theo các phương án nhất định, cấu trúc protein Bet v 1 tái tổ hợp được sử dụng trong nghiên cứu được mô tả trong bản mô tả này có thể còn bao gồm đuôi đầu C (đuôi myc-myc-hexahistidin) như được nêu dưới đây. Theo các phương án khác, cấu trúc protein Bet v 1 tái tổ hợp bao gồm axit amin G2 thông qua N160 của Uniprot P15494. Theo một số phương án, cấu trúc bao gồm đột biến thế S85A. Protein được biểu hiện ở tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc (Chinese hamster ovary - CHO). Trình tự tín hiệu ngoại sinh được sử dụng để thúc đẩy sự biểu hiện ở tế bào CHO không nằm trong danh sách trình tự.

Theo một số phương án nhất định, chất sinh miễn dịch có thể là mảnh Bet v 1 hoặc protein dung hợp chứa một hoặc nhiều gốc sau: (i) gốc axit amin 23-43 của Bet v 1 (xem Uniprot P15494 và SEQ ID NO: 307); ii) gốc axit amin 44-56 của Bet v 1 (xem Uniprot P15494 và SEQ ID NO: 308); iii) gốc axit amin 2-19 của Bet v 1 (xem Uniprot P15494 và SEQ ID NO: 309); iv) gốc axit amin 57-70 của Bet v 1 (xem Uniprot P15494 và SEQ ID NO: 310); v) gốc axit amin 81-89 của Bet v 1 ((xem Uniprot P15494 và SEQ ID NO: 311) và vi) gốc axit amin 81-96 của Bet v 1 ((xem Uniprot P15494 và SEQ ID NO: 315).

Theo các phương án nhất định, kháng thể liên kết với Bet v 1 có thể được tạo ra bằng cách sử dụng mảnh của vùng được nêu ở trên, hoặc peptit kéo dài quá vùng được thiết kế thêm trong khoảng từ 5 đến 20 gốc axit amin từ mỗi đầu hoặc cả hai đầu N và đầu C của vùng được mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, việc kết hợp vùng được nêu ở trên hoặc mảnh của nó có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể đặc hiệu Bet v 1. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều vùng bất kỳ trong

số các vùng được nêu ở trên của Bet v 1 hoặc mảnh của nó có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu.

Protein có chiều dài đầy đủ hoặc mảnh của nó được sử dụng làm chất sinh miễn dịch, như được nêu ở trên, được dùng trực tiếp, với chất bổ trợ để kích thích phản ứng miễn dịch, cho chuột VELOCIMMUNE® bao gồm ADN mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kappa globulin miễn dịch của người.

Kháng thể kháng Bet v 1 được phân lập trực tiếp từ tế bào B dương tính với kháng nguyên mà không cần dung hợp với tế bào tủy, như được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số US 7,582,298. Sử dụng phương pháp này, kháng thể kháng Bet v 1 người đầy đủ (tức là, kháng thể có vùng biến đổi của người và vùng hằng định của người) được thu lại, kháng thể minh họa được tạo ra theo cách này được thiết kế như sau: H4H16943P, H4H16946P, H4H16950P, H4H16960P, H4H16967P, H4H16971P, H4H16979P, H4H16987P, H4H16991P, H4H16992P, H4H17001P, H4H17015P, H4H17027P, H4H17028P, H4H17031P, H4H17033P, H4H17038P2, H4H17045P2, H4H17067P2 và H4H17082P2.

Một số đặc tính sinh học của kháng thể minh họa được tạo ra theo phương pháp của ví dụ này được mô tả chi tiết hơn trong ví dụ sau đây.

Ví dụ 2: Trình tự axit amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

Bảng 1a cung cấp các mã nhận dạng trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng và CDR của kháng thể kháng Bet v 1 được lựa chọn. Bảng 1b cung cấp các mã nhận dạng trình tự axit nucleic của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng và CDR của kháng thể kháng Bet v 1 được lựa chọn.

Bảng 1a: Mã nhận dạng trình tự axit amin

	SEQ ID NO:							
Ký hiệu kháng thể	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H4H16943P	2	4	6	8	10	12	14	16
H4H16946P	18	20	22	24	26	28	30	32

H4H16950P	34	36	38	40	42	44	46	48
H4H16960P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4H16967P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4H16971P	82	84	86	88	90	92	94	96
H4H17038P2	98	100	102	104	106	108	110	112
H4H16987P	114	116	118	120	122	124	126	128
H4H16991P	130	132	134	136	138	140	142	144
H4H16992P	146	148	150	152	154	156	158	160
H4H17001P	162	164	166	168	170	172	174	176
H4H17015P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4H17027P	194	196	198	200	202	204	206	208
H4H17028P	210	212	214	216	218	220	222	224
H4H17031P	226	228	230	232	234	236	238	240
H4H17033P	242	244	246	248	250	252	254	256
H4H16979P	258	260	262	264	266	268	270	272
H4H17045P2	274	276	278	280	266	268	270	272
H4H17067P2	282	284	286	288	266	268	270	272
H4H17082P2	290	292	294	296	298	300	302	304

Bảng 1b: Mã nhận dạng trình tự axit nucleic

	SEQ ID NO:							
Ký hiệu kháng thể	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
H4H16943P	1	3	5	7	9	11	13	15
H4H16946P	17	19	21	23	25	27	29	31
H4H16950P	33	35	37	39	41	43	45	47
H4H16960P	49	51	53	55	57	59	61	63
H4H16967P	65	67	69	71	73	75	77	79
H4H16971P	81	83	85	87	89	91	93	95
H4H17038P2	97	99	101	103	105	107	109	111
H4H16987P	113	115	117	119	121	123	125	127
H4H16991P	129	131	133	135	137	139	141	143
H4H16992P	145	147	149	151	153	155	157	159
H4H17001P	161	163	165	167	169	171	173	175
H4H17015P	177	179	181	183	185	187	189	191
H4H17027P	193	195	197	199	201	203	205	207
H4H17028P	209	211	213	215	217	219	221	223
H4H17031P	225	227	229	231	233	235	237	239
H4H17033P	241	243	245	247	249	251	253	255
H4H16979P	257	259	261	263	265	267	269	271
H4H17045P2	273	275	277	279	265	267	269	271

H4H17067P2	281	283	285	287	265	267	269	271
H4H17082P2	289	291	293	295	297	299	301	303

Kháng thể được đề cập thông thường trong bản mô tả này theo danh pháp sau: Tiền tố Fc (ví dụ, “H4H,” “H2M,” v.v.), theo sau bởi mã nhận dạng dạng số (ví dụ, “16943,” “17001,” v.v., như được trình bày trong bảng 1), theo sau bởi hậu tố “P” hoặc “P2”. Tiền tố H4H và H2M trên ký hiệu kháng thể được sử dụng trong bản mô tả này chỉ kiểu tương đương của vùng Fc cụ thể của kháng thể. Do đó, theo danh pháp này, kháng thể có thể được dùng trong bản mô tả này để chỉ ví dụ, “H4H16943P”, v.v., “H4H” chỉ kháng thể có Fc IgG4 của người (tất cả vùng biến đổi là hoàn toàn của người như được thể hiện bằng “H” thứ nhất trong ký hiệu kháng thể. Như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, kháng thể có kiểu tương đương của vùng Fc cụ thể có thể được biến đổi thành kháng thể với kiểu tương đương Fc khác (ví dụ, kháng thể với Fc IgG1 của người có thể được biến đổi thành kháng thể với IgG4 của người, v.v.), nhưng trong trường hợp bất kỳ, vùng biến đổi (bao gồm CDR) - mà được thể hiện bằng mã nhận dạng trong bảng 1 sẽ giữ nguyên không đổi, và đặc tính liên kết được cho là giống nhau hoặc gần như tương tự bất kể bản chất của vùng Fc.

Bảng 1c cung cấp các mã nhận dạng trình tự axit amin của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ của kháng thể kháng Bet v 1 được lựa chọn.

Bảng 1c: Mã nhận dạng trình tự axit amin chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

	SEQ ID NO:	
Ký hiệu kháng thể	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ
H4H17038P2	316	317
H4H16987P	318	319
H4H16992P	320	321
H4H17082P2	322	323

Ví dụ 3: Liên kết kháng thể với Bet v 1 như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt

Hằng số phân ly cân bằng (K_D) đối với Bet v 1 tự nhiên liên kết với kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 tinh sạch được xác định bằng cách sử dụng bộ cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt thời gian thực (SPR-Biacore) trên thiết bị Biacore 4000. Tất cả các nghiên cứu liên kết được thực hiện ở 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA và 0,05% thể tích/thể tích chất hoạt động bề mặt Tween-20, đệm chạy pH 7,4 (HBS-ET) ở nhiệt độ 25°C và 37°C. Bề mặt cảm biến Biacore CM5 được tạo dẫn xuất thứ nhất bằng cách bắt cặp amin với kháng thể đơn dòng chuột kháng Fc của người (GE, # BR-1008-39) để sau đó bắt giữ kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1. Các nồng độ khác nhau của Bet v 1 tự nhiên (Indoor, Cat# NA-BV1-1) hoặc CHO được sản xuất bởi Bet v 1 tái tổ hợp chứa đột biến S85A với đuôi myc-myc hexahistidin đầu C (Bet v 1-MMH đột biến; SEQ ID NO: 312) chất phản ứng được điều chế đầu tiên trong đệm chạy HBS-ET (100nM – 1,23nM; được pha loãng liên tục 3 lần) và được tiêm qua bề mặt kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 được bắt bởi kháng Fc của người trong 4 phút ở tốc độ dòng là 30µL/phút, đồng thời sự phân ly kháng thể đơn dòng được liên kết bởi chất phản ứng Bet v 1 được theo dõi trong 10 phút trong đệm chạy HBS-ET. Hằng số tốc độ liên kết (k_a) và phân ly (k_d) được xác định bằng cách khớp dữ liệu quang phổ phản xạ liên kết thời gian thực với mô hình liên kết 1:1 với giới hạn vận chuyển khối sử dụng phần mềm khớp đường cong Scrubber 2.0c. Hằng số cân bằng phân ly liên kết (K_D) và thời gian bán phân ly ($t_{1/2}$) được tính từ hằng số tốc độ động theo phương trình sau:

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

Thông số động học liên kết đối với Bet v 1 tự nhiên và Bet v 1-MMH đột biến với kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 khác nhau theo sáng chế ở nhiệt độ 25°C và 37°C được trình bày trong bảng 2 đến bảng 5.

Ở nhiệt độ 25°C, tất cả kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 theo sáng chế được liên kết với Bet v 1 tự nhiên với giá trị K_D nằm trong khoảng từ 0,66nM đến 13,5nM, như được trình bày trong bảng 2. Ở nhiệt độ 37°C, tất cả kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 theo sáng chế được liên kết với Bet v 1 tự nhiên với giá trị K_D nằm trong khoảng từ 1,59nM đến 27,9nM, như được trình bày trong bảng 3. Ở cả nhiệt độ 25°C và 37°C,

kháng thể đối chứng lớp kháng thể không cho thấy bất kỳ liên kết có thể xác định được nào với Bet v 1 tự nhiên.

Ở cả nhiệt độ 25°C và 37°C, 3 trong số 20 kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 theo sáng chế không liên kết với Bet v 1-MMH đột biến. Ở nhiệt độ 25°C, 17 trong số 20 kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 được liên kết với Bet v 1-MMH đột biến với giá trị K_D nằm trong khoảng từ 348pM đến 43,8nM, như được trình bày trong bảng 4. Ở nhiệt độ 37°C, 17 trong số 20 kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 theo sáng chế được liên kết với Bet v 1-MMH đột biến với giá trị K_D nằm trong khoảng từ 655pM đến 106nM, như được trình bày trong bảng 5. Ở cả nhiệt độ 25°C và 37°C, kháng thể đối chứng lớp kháng thể không cho thấy bất kỳ liên kết có thể xác định được nào với Bet v 1-MMH đột biến.

Bảng 2: Thông số động học liên kết của Bet v 1 tự nhiên liên kết với kháng thể đơn dòng Bet v 1 ở nhiệt độ 25°C.

Kháng thể	Lượng bắt giữ mAb (RU)	100nM Bet v 1 tự nhiên được liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H16943P	$346 \pm 1,5$	71	1,64E+05	2,30E-04	1,40E-09	50
H4H16946P	$355 \pm 1,8$	74	2,05E+05	2,01E-04	9,82E-10	58
H4H16950P	$357 \pm 2,3$	58	9,61E+04	5,03E(-	5,23E-09	23
H4H16960P	$342 \pm 2,2$	57	4,22E+05	6,90E-04	1,64E-09	17
H4H16967P	$332 \pm 0,9$	27	3,76E+04	1,49E-04	3,98E-09	77
H4H16971P	$343 \pm 0,5$	57	2,40E+05	7,81E-04	3,26E-09	15
H4H16979P	$295 \pm 0,8$	41	2,30E+05	2,78E-04	1,21E-09	42
H4H16987P	$334 \pm 0,5$	61	4,10E+05	1,14E-03	2,77E-09	10
H4H16991P	$313 \pm 0,4$	57	2,95E+05	3,12E-04	1,06E-09	37
H4H16992P	$351 \pm 0,7$	64	3,73E+05	2,48E-04	6,65E-10	47

H4H17001P	$352 \pm 0,6$	71	$3,29E+05$	$3,29E-04$	$1,00E-09$	35
H4H17015P	$370 \pm 0,7$	68	$1,84E+05$	$2,46E-04$	$1,34E-09$	47
H4H17027P	$340 \pm 0,6$	48	$6,24E+04$	$2,70E-04$	$4,32E-09$	43
H4H17028P	$350 \pm 0,7$	63	$2,81E+05$	$1,07E-03$	$3,79E-09$	11
H4H17031P	$335 \pm 0,7$	54	$1,24E+05$	$1,68E-03$	$1,35E-08$	6,8
H4H17033P	$336 \pm 0,4$	61	$3,94E+05$	$4,69E-04$	$1,19E-09$	25
H4H17038P2	$324 \pm 0,9$	64	$2,77E+05$	$3,64E-04$	$1,32E-09$	32
H4H17045P2	$368 \pm 0,9$	69	$1,22E+05$	$1,49E-04$	$1,22E-09$	78
H4H17067P2	$344 \pm 0,5$	58	$1,13E+05$	$4,02E-04$	$3,56E-09$	29
H4H17082P2	$366 \pm 0,6$	72	$5,45E+05$	$5,97E-04$	$1,09E-09$	19
Đối chứng kiểu tương đương	$345 \pm 0,5$	1	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB chỉ ra rằng không có liên kết nào được quan sát thấy dưới điều kiện thử nghiệm hiện tại.

Bảng 3: Thông số động học liên kết của Bet v 1 tự nhiên liên kết với kháng thể đơn dòng Bet v 1 ở nhiệt độ 37°C.

Kháng thể	Lượng bắt mAb (RU)	100nM Bet v 1 tự nhiên được liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H16943P	$451 \pm 2,7$	88	$2,60E+05$	$1,27E-03$	$4,89E-09$	9,1
H4H16946P	$469 \pm 2,6$	93	$2,89E+05$	$6,01E-04$	$2,08E-09$	19
H4H16950P	$471 \pm 2,1$	76	$1,41E+05$	$1,21E-03$	$8,57E-09$	10
H4H16960P	$422 \pm 0,9$	65	$6,62E+05$	$1,68E-03$	$2,54E-09$	6,8
H4H16967P	$412 \pm 1,9$	45	$5,04E+04$	$7,19E-04$	$1,43E-08$	16

H4H16971P	433 ± 1,3	66	3,52E+05	2,44E-03	6,93E-09	4,7
H4H16979P	352 ± 1,3	52	3,42E+05	6,16E-04	1,80E-09	19
H4H16987P	436 ± 1,7	74	5,20E+05	4,77E-03	9,16E-09	2,4
H4H16991P	379 ± 1,0	66	5,00E+05	1,08E-03	2,16E-09	11
H4H16992P	436 ± 1,1	73	5,38E+05	8,53E-04	1,59E-09	14
H4H17001P	457 ± 0,8	87	4,85E+05	1,22E-03	2,52E-09	9,5
H4H17015P	464 ± 1,4	84	2,93E+05	7,92E-04	2,70E-09	15
H4H17027P	427 ± 0,9	67	9,81E+04	9,30E-04	9,48E-09	12
H4H17028P	435 ± 1,3	71	3,73E+05	2,90E-03	7,77E-09	3,9
H4H17031P	419 ± 1,8	63	4,85E+05	5,44E-03	2,79E-08	2,1
H4H17033P	417 ± 1,4	74	6,27E+05	1,19E-03	1,90E-09	10
H4H17038P2	406 ± 1,4	74	3,73E+05	1,62E-03	4,33E-09	7,1
H4H17045P2	465 ± 1,4	90	2,37E+05	4,41E-04	1,86E-09	26
H4H17067P2	440 ± 1,2	80	2,68E+05	1,47E-03	5,48E-09	7,9
H4H17082P2	453 ± 1,1	83	7,48E+05	1,82E-03	2,43E-09	6,3
Đối chứng kiểu tương đương	426 ± 1	1	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB chỉ ra rằng không có liên kết nào được quan sát thấy dưới điều kiện thí nghiệm hiện tại.

Bảng 4: Thông số động học liên kết của Bet v 1-MMH đột biến liên kết với kháng thể đơn dòng Bet v 1 ở nhiệt độ 25°C.

Kháng thể	Lượng bắt mAb (RU)	100nM Bet v 1- MMH đột biến được liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
-----------	-----------------------	--	-----------------	----------------	--------------	---------------------

H4H16943P	$344 \pm 0,8$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16946P	$354 \pm 0,5$	83	4,05E+05	1,41E-04	3,48E-10	82
H4H16950P	$357 \pm 0,6$	70	1,51E+05	3,35E-04	2,21E-09	35
H4H16960P	$343 \pm 0,8$	64	5,62E+05	4,43E-04	7,89E-10	26
H4H16967P	$331 \pm 0,3$	0	NB	NB	NB	NB
H4H16971P	$343 \pm 0,5$	58	4,07E+05	3,86E-03	9,48E-09	3,0
H4H16979P	$293 \pm 1,0$	46	2,86E+05	2,30E-04	8,04E-10	50
H4H16987P	$334 \pm 0,4$	46	4,90E+05	2,15E-02	4,38E-08	0,5
H4H16991P	$312 \pm 0,5$	61	3,90E+05	2,87E-04	7,35E-10	40
H4H16992P	$350 \pm 0,4$	70	4,59E+05	2,76E-04	6,01E-10	42
H4H17001P	$351 \pm 0,7$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17015P	$368 \pm 0,8$	76	2,72E+05	2,81E-04	1,03E-09	41
H4H17027P	$340 \pm 0,4$	63	1,10E+05	3,19E-04	2,90E-09	36
H4H17028P	$349 \pm 0,5$	71	8,11E+05	6,93E-04	8,54E-10	17
H4H17031P	$333 \pm 0,5$	63	1,87E+05	1,05E-03	5,61E-09	11
H4H17033P	$336 \pm 0,5$	67	5,40E+05	4,15E-04	7,68E-10	28
H4H17038P2	324 ± 1	63	6,42E+05	6,41E-03	9,98E-09	1,8
H4H17045P2	$368 \pm 1,1$	60	8,00E+04	4,98E-04	6,23E-09	23
H4H17067P2	$344 \pm 0,3$	55	1,00E+05	1,17E-03	1,17E-08	9,9
H4H17082P2	$366 \pm 0,5$	78	5,30E+05	6,12E-04	1,16E-09	19
Đối chứng kiểu tương đương	$344 \pm 0,8$	1	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB chỉ ra rằng không có liên kết nào được quan sát thấy dưới điều kiện thí nghiệm hiện tại.

Bảng 5: Thông số động học liên kết của Bet v 1-MMH đột biến liên kết với kháng thể đơn dòng Bet v 1 ở nhiệt độ 37°C.

Kháng thể	Lượng bắt mAb (RU)	100nM Bet v 1-MMH đột biến được liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H16943P	$441 \pm 1,3$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16946P	$459 \pm 1,8$	97	$6,03E+05$	$3,95E-04$	$6,55E-10$	29
H4H16950P	$461 \pm 1,2$	83	$2,15E+05$	$1,25E-03$	$5,81E-09$	9,2
H4H16960P	$417 \pm 1,4$	72	$8,79E+05$	$1,77E-03$	$2,01E-09$	6,5
H4H16967P	$405 \pm 0,8$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16971P	$427 \pm 1,2$	60	$6,48E+05$	$1,20E-02$	$1,86E-08$	1,0
H4H16979P	$348 \pm 0,7$	56	$4,62E+05$	$7,30E-04$	$1,58E-09$	16
H4H16987P	$429 \pm 1,1$	36	$7,95E+05$	$8,47E-02$	$1,06E-07$	0,14
H4H16991P	$376 \pm 0,7$	67	$7,17E+05$	$1,06E-03$	$1,48E-09$	11
H4H16992P	$432 \pm 0,6$	78	$7,84E+05$	$8,85E-04$	$1,13E-09$	13
H4H17001P	$451 \pm 0,8$	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17015P	$458 \pm 1,1$	89	$4,45E+05$	$8,99E-04$	$2,02E-09$	13
H4H17027P	$421 \pm 0,8$	78	$1,71E+05$	$1,16E-03$	$6,80E-09$	9,9
H4H17028P	$430 \pm 0,8$	77	$1,01E+06$	$2,35E-03$	$2,32E-09$	4,9
H4H17031P	$413 \pm 1,4$	71	$2,78E+05$	$4,06E-03$	$1,46E-08$	2,8
H4H17033P	$414 \pm 0,8$	79	$8,83E+05$	$1,18E-03$	$1,34E-09$	9,8
H4H17038P2	$399 \pm 0,9$	56	$8,33E+05$	$2,96E-02$	$3,56E-08$	0,39

H4H17045P2	$458 \pm 1,2$	84	1,62E+05	2,32E-03	1,43E-08	5,0
H4H17067P2	$435 \pm 0,7$	76	2,53E+05	4,28E-03	1,69E-08	2,7
H4H17082P2	448 ± 1	89	8,21E+05	1,90E-03	2,31E-09	6,1
Đối chứng kiểu tương đương	$421 \pm 0,7$	-2	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB chỉ ra rằng không có liên kết nào được quan sát thấy dưới điều kiện thí nghiệm hiện tại.

Ví dụ 4: Liên kết kháng thể với các chất gây dị ứng có liên quan được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt

Hằng số cân bằng phân ly (K_D) đối với các chất gây dị ứng liên quan khác nhau liên kết với kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 tinh sạch được xác định bằng cách sử dụng bộ cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt thời gian thực (SPR-Biacore) trên thiết bị Biacore 4000. Tất cả các nghiên cứu về liên kết đã được thực hiện trong 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA và 0,05% thể tích/thể tích chất hoạt động bề mặt Tween-20, pH 7,4 (HBS-ET) ở 25°C. Bề mặt cảm biến Biacore CM5 thứ nhất được tạo dẫn xuất bằng cách bắt cặp amin với kháng thể đơn dòng chuột kháng Fc người (GE, # BR-1008-39) để bắt giữ các kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1. Các nghiên cứu liên kết đã được thực hiện trên các chất gây dị ứng liên quan sau đây: Tổng quán sủi (Aln g 1, MyBiosource, Cat# MBS1041484), táo (Mal d 1, MyBiosource, Cat# MBS1224919), cà rốt (Dau c 1.2, MyBiosource, Cat# MBS1212920), cần tây (Api g 1, MyBiosource, Cat# MBS1171376), cần tây (Api g 2, MyBiosource, Cat# MBS1047880), cây trần châu âu (Car b 1 isoform 1A & 1B, MyBiosource, Cat# MBS1200018), cây trần châu âu (Car b 1 isoform 2, MyBiosource, Cat# MBS1043940), cây phỉ (Cor A 1, MyBiosource, Cat# MBS5304600), và sồi trắng (Que a 1, MyBiosource, Cat# MBS1258822). Nồng độ khác nhau của các chất gây dị ứng có liên quan đã được điều chế trong dung dịch đệm HBS-ET (100nM - 6,25nM; được pha loãng gấp 4 lần) và sau đó được tiêm trên bề mặt kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 bị bắt giữ kháng Fc ở người trong 3 phút tại tốc độ dòng chảy 30 μ L/phút, trong khi sự phân ly của các chất gây dị ứng liên kết với kháng thể đơn dòng được theo dõi trong 8 phút trong bộ đệm chạy HBS-ET. Hằng số tốc độ liên kết (k_a) và phân ly (k_d) được xác định bằng

cách điều chỉnh các biểu đồ cảm ứng liên kết thời gian thực thành kiểu liên kết 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm điều chỉnh đường cong Scrubber 2.0c. Hằng số cân bằng phân ly liên kết (K_D) và thời gian bán phân ly ($t^{1/2}$) được tính từ hằng số tốc độ động theo phương trình sau:

$$K_D = \frac{kd}{ka}, \quad \text{và} \quad t^{1/2} = \frac{\ln(2)}{kd}$$

Các tham số động học liên kết đối với các chất gây dị ứng có liên quan với các kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 khác nhau theo sáng chế ở 25°C được trình bày trong Bảng 6 đến Bảng 11.

Như được trình bày trong Bảng 6 ở 25°C, chín trong số 20 kháng thể kháng Bet v 1 theo sáng chế đã chứng minh liên kết có thể đo được với Aln g 1 với các giá trị K_D nằm trong khoảng từ 1,03 nM đến 175 nM. 11 kháng thể khác không chứng minh được bất kỳ liên kết có thể đo được nào với Aln g 1 trong các điều kiện được thử nghiệm.

Như được trình bày trong Bảng 7 ở 25°C, hai trong số 20 kháng thể kháng Bet v 1 theo sáng chế đã chứng minh liên kết có thể đo được với Mal d 1 với các giá trị K_D là 29,8 nM và 494 nM. 18 kháng thể khác không chứng minh được bất kỳ liên kết có thể đo được nào với Mal d 1 trong các điều kiện được thử nghiệm.

Như được trình bày trong Bảng 8 ở 25°C, một trong số các kháng thể kháng Bet v 1 theo sáng chế đã chứng minh liên kết có thể đo được với Api g 1 với giá trị K_D là 167 nM. 19 kháng thể khác không chứng minh được bất kỳ liên kết có thể đo được nào với Api g 1 trong các điều kiện được thử nghiệm.

Như được trình bày trong Bảng 9 ở 25°C, tám trong số 20 kháng thể kháng Bet v 1 theo sáng chế đã chứng minh liên kết có thể đo được với đồng dạng 1A & 1B của Car b 1 với các giá trị K_D nằm trong khoảng từ 1,2 nM đến 380 nM. 12 kháng thể khác không chứng minh được bất kỳ liên kết có thể đo được nào với đồng dạng 1A & 1B của Xe b 1 trong các điều kiện được thử nghiệm.

Như được trình bày trong Bảng 10 ở 25°C, 14 trong số 20 kháng thể kháng Bet v 1 theo sáng chế đã chứng minh liên kết có thể đo được với đồng dạng 2 của Car b 1 với các giá trị K_D nằm trong khoảng từ 335 pM đến 564 nM. 6 kháng thể khác không chứng minh được bất kỳ liên kết có thể đo được nào với đồng dạng 2 của Car b 1 trong các điều kiện được thử nghiệm.

Như được trình bày trong Bảng 11 ở 25°C, một số trong các kháng thể kháng Bet v 1 theo sáng chế đã chứng minh liên kết có thể đo được với Cor A 1 với giá trị K_D là 396 nM. 19 kháng thể khác không chứng minh được bất kỳ liên kết có thể đo được nào với Cor A 1 trong các điều kiện được thử nghiệm.

Không có kháng thể nào theo sáng chế chứng minh liên kết có thể đo được với Dau c 1.2, Api g 2 hoặc Que a 1 trong các điều kiện được thử nghiệm (dữ liệu không được thể hiện). Kháng thể đối chứng lớp kháng thể không chứng minh bất kỳ liên kết có thể đo được với bất kỳ chất gây dị ứng có thể đo được được thử nghiệm.

Bảng 6: Các tham số động học liên kết của tổng quán sứ (Aln g1) liên kết với kháng thể đơn dòng Bet v 1 ở 25°C.

Kháng thể:	Mức bắt giữ mAb (RU)	100nM chất phân tích liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (nhỏ nhất)
H4H16943P	675 ± 0,9	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16946P	668 ± 1,2	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16950P	634 ± 1,7	15	9,12E+04	1,60E-02	1,75E-07	0,7
H4H16960P	681 ± 2,1	29	2,26E+05	3,32E-02	1,47E-07	0,3
H4H16967P	666 ± 3,1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16971P	668 ± 2,1	41	9,30E+04	1,18E-02	1,26E-07	1,0
H4H16979P	545 ± 0,4	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16987P	667 ± 1,6	139	2,21E+05	8,70E-04	3,94E-09	13
H4H16991P	608 ± 0,4	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16992P	653 ± 1,3	5	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17001P	630 ± 1,6	49	2,64E+05	2,78E-02	1,05E-07	0,4
H4H17015P	745 ± 3	8	NB*	NB*	NB*	NB*

H4H17027P	$772 \pm 0,4$	9	9,29E+04	6,43E-03	6,92E-08	1,8
H4H17028P	$708 \pm 1,5$	16	5,17E+04	1,90E-03	3,67E-08	6,1
H4H17031P	$727 \pm 1,3$	59	5,29E+04	2,38E-03	4,50E-08	4,8
H4H17033P	$649 \pm 0,2$	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17038P2	$660 \pm 1,3$	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17045P2	$746 \pm 1,2$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17067P2	$617 \pm 2,2$	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17082P2	$662 \pm 3,6$	132	3,12E+05	3,23E-04	1,03E-09	36
Đối chứng lớp kháng thể	$686 \pm 1,3$	0	NB*	NB*	NB*	NB*

* NB chỉ ra rằng không có liên kết nào được quan sát trong các điều kiện thí nghiệm hiện tại.

Bảng 7: Các tham số động học liên kết của tảo (Mal d 1) liên kết với kháng thể đơn dòng Bet v 1 ở 25°C.

Kháng thể	Mức bắt giữ mAb (RU)	100nM chất phân tích liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (nhỏ nhất)
H4H16943P	$676 \pm 0,7$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16946P	$668 \pm 2,2$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16950P	$635 \pm 1,9$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16960P	$690 \pm 8,2$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16967P	$671 \pm 3,2$	-2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16971P	$667 \pm 3,4$	25	1,61E+05	7,95E-02	4,94E-07	0,2
H4H16979P	$545 \pm 0,5$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16987P	$668 \pm 0,8$	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16991P	$608 \pm 1,4$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16992P	$652 \pm 0,8$	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17001P	$626 \pm 0,8$	0	NB*	NB*	NB*	NB*

H4H17015P	$741 \pm 2,6$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17027P	$767 \pm 1,4$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17028P	$704 \pm 2,3$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17031P	$727 \pm 1,6$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17033P	$650 \pm 1,6$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17038P2	$658 \pm 1,5$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17045P2	$747 \pm 1,3$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17067P2	616 ± 2	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17082P2	$662 \pm 1,9$	112	1,25E+06	3,74E-02	2,98E-08	0,3
Đối chứng lớp kháng thể	$686 \pm 1,1$	0	NB*	NB*	NB*	NB*

* NB chỉ ra rằng không có liên kết nào được quan sát trong các điều kiện thí nghiệm hiện tại.

Bảng 8: Các tham số động học liên kết của cân tây (Api g 1) liên kết với kháng thể đơn dòng Bet v 1 ở 25°C.

Kháng thể	Mức bắt giữ mAb (RU)	100nM chất phân tích liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (nhỏ nhất)
H4H16943P	$674 \pm 0,7$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16946P	$666 \pm 0,4$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16950P	632 ± 3	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16960P	$684 \pm 3,6$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16967P	$668 \pm 4,2$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16971P	$666 \pm 0,7$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16979P	$546 \pm 1,1$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16987P	$668 \pm 0,8$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16991P	$607 \pm 1,3$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16992P	$651 \pm 2,9$	1	NB*	NB*	NB*	NB*

H4H17001P	$625 \pm 1,3$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17015P	$740 \pm 1,5$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17027P	$765 \pm 1,1$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17028P	$705 \pm 2,2$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17031P	$727 \pm 1,3$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17033P	$648 \pm 0,3$	39	4,75E+05	7,91E-02	1,67E-07	0,2
H4H17038P2	$659 \pm 0,6$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17045P2	$747 \pm 0,5$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17067P2	$613 \pm 0,6$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17082P2	$660 \pm 3,1$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
Đối chứng lớp kháng thể	$684 \pm 3,1$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*

* NB chỉ ra rằng không có liên kết nào được quan sát trong các điều kiện thí nghiệm hiện tại.

Bảng 9: Các tham số động học liên kết của cây trần châu Âu (đồng dạng 1A& 1B của Car b 1) liên kết với kháng thể đơn dòng Bet v 1 ở 25°C.

Kháng thể	Mức bắt giữ mAb (RU)	100nM chất phân tích liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (nhỏ nhất)
H4H16943P	674 ± 1	26	1,52E+05	5,78E-02	3,80E-07	0,2
H4H16946P	$667 \pm 1,6$	63	1,43E+05	2,40E-02	1,68E-07	0,5
H4H16950P	$633 \pm 1,6$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16960P	$687 \pm 0,8$	4	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16967P	$666 \pm 3,3$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16971P	$669 \pm 4,6$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16979P	$545 \pm 0,4$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16987P	$668 \pm 0,3$	0	NB*	NB*	NB*	NB*

H4H16991P	$608 \pm 1,8$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16992P	$653 \pm 0,6$	161	$2,81E+05$	$3,37E-04$	$1,20E-09$	34
H4H17001P	626 ± 1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17015P	$742 \pm 1,8$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17027P	$767 \pm 0,3$	41	$3,14E+04$	$6,73E-03$	$2,14E-07$	1,7
H4H17028P	$705 \pm 0,7$	159	$2,10E+05$	$5,11E-04$	$2,43E-09$	23
H4H17031P	$726 \pm 3,2$	126	$8,04E+04$	$1,11E-03$	$1,38E-08$	10
H4H17033P	$650 \pm 1,3$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17038P2	$659 \pm 0,9$	105	$1,51E+05$	$6,23E-03$	$4,14E-08$	1,9
H4H17045P2	748 ± 1	5	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17067P2	616 ± 1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17082P2	$664 \pm 1,6$	69	$3,90E+05$	$3,53E-02$	$9,05E-08$	0,3
Đối chứng lớp kháng thể	$686 \pm 0,7$	0	NB*	NB*	NB*	NB*

* NB chỉ ra rằng không có liên kết nào được quan sát trong các điều kiện thí nghiệm hiện tại.

Bảng 10: Các tham số động học liên kết của cây trần châu Âu (đồng dạng 2 của) liên kết với kháng thể đơn dòng Bet v 1 ở 25°C.

Kháng thể	Mức bắt giữ mAb (RU)	100nM chất phân tích liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (nhỏ nhất)
H4H16943P	$675 \pm 1,6$	183	$1,11E+06$	$3,71E-04$	$3,35E-10$	31
H4H16946P	$666 \pm 0,7$	63	$7,69E+04$	$1,38E-02$	$1,79E-07$	0,8
H4H16950P	633 ± 3	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16960P	$682 \pm 4,5$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16967P	$663 \pm 5,4$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16971P	$668 \pm 4,1$	23	$2,59E+05$	$1,46E-01$	$5,64E-07$	0
H4H16979P	$547 \pm 1,1$	114	$9,71E+05$	$2,41E-03$	$2,48E-09$	4,8
H4H16987P	$667 \pm 1,3$	153	$1,01E+06$	$5,61E-03$	$5,56E-09$	2,1

H4H16991P	$607 \pm 3,4$	93	$1,07E+06$	$4,04E-02$	$3,78E-08$	0,3
H4H16992P	$652 \pm 0,6$	156	$1,40E+06$	$8,61E-04$	$6,17E-10$	13
H4H17001P	$625 \pm 1,1$	157	$2,03E+06$	$3,20E-03$	$1,58E-09$	3,6
H4H17015P	$741 \pm 1,6$	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17027P	$765 \pm 1,8$	42	$5,84E+04$	$5,77E-03$	$9,89E-08$	2,0
H4H17028P	$703 \pm 4,1$	95	$9,71E+04$	$4,37E-03$	$4,50E-08$	2,6
H4H17031P	$727 \pm 1,2$	160	$3,95E+05$	$5,17E-03$	$1,31E-08$	2,2
H4H17033P	$650 \pm 1,2$	111	$1,34E+06$	$4,47E-02$	$3,34E-08$	0,3
H4H17038P2	$660 \pm 1,6$	73	$1,28E+05$	$6,48E-03$	$5,05E-08$	1,8
H4H17045P2	$747 \pm 1,2$	5	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17067P2	616 ± 1	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17082P2	661 ± 2	166	$2,18E+06$	$1,24E-03$	$5,67E-10$	9,3
Đối chứng lớp kháng thể	$685 \pm 1,2$	0	NB*	NB*	NB*	NB*

* NB chỉ ra rằng không có liên kết nào được quan sát trong các điều kiện thí nghiệm hiện tại.

Bảng 11: Các tham số động học liên kết của cây phi (Cor A 1) liên kết với kháng thể đơn dòng Bet v 1 ở 25°C.

Kháng thể	Mức bắt giữ mAb (RU)	100nM chất phân tích liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (nhỏ nhất)
H4H16943P	$673 \pm 0,4$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16946P	$665 \pm 0,6$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16950P	$635 \pm 3,3$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16960P	687 ± 7	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16967P	$668 \pm 1,7$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16971P	$666 \pm 5,8$	0	NB*	NB*	NB*	NB*

H4H16979P	546 ± 1,1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16987P	668 ± 0,7	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16991P	607 ± 1,3	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H16992P	652 ± 1,6	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17001P	626 ± 0,4	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17015P	740 ± 0,7	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17027P	766 ± 2,8	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17028P	704 ± 1,3	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17031P	727 ± 1,2	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17033P	649 ± 1,5	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17038P2	659 ± 0,1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17045P2	748 ± 0,8	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17067P2	614 ± 0,7	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H17082P2	661 ± 0,8	20	1,06E+05	4,18E-02	3,96E-07	0,3
Đối chứng lớp kháng thể	685 ± 0,5	1	NB*	NB*	NB*	NB*

* NB chỉ ra rằng không có liên kết nào được quan sát trong các điều kiện thí nghiệm hiện tại.

Ví dụ 5: Cản trở Bet v 1 liên kết với IgE đặc hiệu gây dị ứng bằng kháng thể IgG kháng Bet v 1

Khả năng của các kháng thể kháng Bet v 1 đơn của sáng chế hoặc kết hợp các kháng thể kháng Bet v 1 của sáng chế để cản trở Bet v 1 liên kết với IgE được bắt giữ trên đĩa từ huyết tương/huyết thanh của người hiến tặng mắc dị ứng được xác định bằng ELISA. Kháng thể được thử nghiệm một mình hoặc trong hỗn hợp đa dòng. Để thử nghiệm, các vi đĩa được phủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C với protein miễn ngoại bào (thụ thể có ái lực cao đối với IgE) FcεR1α ở người được tạo ra với nhãn Fc chuột ở đầu C (hFcεR1α-mFc; SEQ ID NO: 313). Các đĩa sau đó được cản trở bằng 0,5% BSA (trọng lượng/thể tích) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng (RT). Huyết tương từ người hiến tặng mắc dị ứng đã được pha loãng và IgE tổng số sau đó được thu giữ trên bề mặt phủ thụ thể.

Một lượng không đổi 0,1nM Bet v 1 tự nhiên được gắn nhãn biotin (Indoor Biotechnologies, # NA-BV1-1) đã được trộn sẵn từ trước với các kháng thể kháng Bet v 1, với nồng độ duy nhất là 1 µg/mL hoặc dịch pha loãng liên tiếp từ 10 µg/mL hoặc 1 µg/mL của mỗi kháng thể và được ủ trong 1 giờ ở RT để cho phép tương tác kháng thể - Bet v 1 đạt đến trạng thái cân bằng. Hỗn hợp kháng thể-Bet v 1 sau đó được thêm vào đĩa được phủ IgE trong 1 giờ. Các đĩa sau đó được rửa và hàm lượng Bet v 1 tự nhiên liên kết với đĩa được phát hiện bằng cách sử dụng streptavidin liên hợp với peroxidaza củ cải ngựa (Thermo Science, # N200/QJ223091) với độ pha loãng 1:10.000 và ủ trong 1 giờ ở RT. Các đĩa sau đó được rửa bằng PBS-T ở giữa mỗi bước của quy trình ELISA được mô tả ở trên. Để xây dựng phản ứng so màu, cơ chất TMB/H₂O₂ (chất phản ứng BD Pharmingen A # 51-2602KC + chất phản ứng B, # 51-2607KC) đã được thêm vào các đĩa và ủ trong 20 phút ở RT. Phản ứng đã được dừng lại bằng cách sử dụng axit sunfuric 2 N (H₂SO₄; VWR, # BDH3500-1). Độ hấp thụ sau đó được đo trên máy quang phổ (Victor, Perkin Elmer) ở 450nm. Phần trăm cản trở được tính toán bằng cách sử dụng nồng độ kháng thể cao nhất được sử dụng trong mỗi thử nghiệm như được mô tả dưới đây.

$$\text{Phần trăm cản trở} = \frac{(A_{450} \text{ không có kháng thể}) - (A_{450} \text{ tại nồng độ kháng thể cao nhất})}{(A_{450} \text{ không có kháng thể})} \times 100$$

Hai mươi kháng thể kháng Bet v 1 đã được thử nghiệm dưới dạng các kháng thể đơn lẻ về khả năng của chúng để cản trở Bet v 1 liên kết với IgE bắt giữ trên đĩa từ huyết tương của người hiến tặng mắc dị ứng bằng ELISA được mô tả. Các kháng thể đơn dòng riêng lẻ có khả năng cản trở một phần khoảng từ 8,5 đến 64% IgE liên kết với Bet v 1, điều này nhấn mạnh đến tính đa dòng của IgEs. Bảy kháng thể thể hiện khả năng cản trở nằm trong khoảng từ 36 đến 64% ở nồng độ kháng thể cao nhất được thử nghiệm là 10 µg/mL, như trình bày trong Bảng 12.

Bốn kháng thể kháng Bet v 1, H4H17082P2, H4H17038P2, H4H16987P và H4H16992P đã được thử nghiệm trong một thử nghiệm cản trở tại một điểm duy nhất. Tổ hợp của H4H17082P2 và H4H16992P đã chứng minh cản trở hơn 90% ở bảy trong số mười người hiến tặng IgE. Ba và bốn tổ hợp kháng thể đơn dòng đã chứng minh kết

quả tương tự và dường như không thêm bất kỳ hiệu quả cản trở nào so với tổ hợp hai kháng thể H4H17082P2 và H4H16992P, như trong Bảng 13.

Bốn kháng thể đơn dòng, H4H17082P2, H4H17038P2, H4H16987P và H4H16992P, sau đó đã được thử nghiệm dưới dạng tổ hợp một và 2, 3 và 4 kháng thể đơn dòng trong thử nghiệm cản trở đáp ứng theo liều với 3 mẫu IgE của người hiến tặng. Kết quả cho thấy tổ hợp hai kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 của H4H17082P2 và H4H16992P đã cản trở Bet v 1 liên kết với IgE đặc hiệu gây dị ứng hơn 90% và gần với đường cơ sở ở 3 người hiến tặng, như trong Bảng 14. Tổ hợp kháng thể 3 và 4 được thử nghiệm cho thấy độ rộng và tiềm năng tương tự của hoạt tính cản trở. Làm đối chứng dương, IgG đa dòng kháng Bet v 1 ở chuột tinh sạch đã chứng minh khả năng cản trở > 90%.

Bảng 12: Kháng thể kháng Bet v 1 cản trở Bet v 1 liên kết với IgE đặc hiệu với chất gây dị ứng

ID người hiến tặng:	23397-PB	24606-AB
Kháng thể	% cản trở Bet v 1 liên kết với IgE bị bắt giữ	
H4H17082P2 MAB2	56,6	60,3
H4H16971P	35,4	12,8
H4H17027P	23,0	28,4
H4H17028P	19,7	16,6
H4H16946P	27,6	22,8
H4H17038P2 MAB3	49,0	55,3
H4H16950P	32,3	20,7
H4H16987P MAB4	15,2	12,8
H4H17045P2	27,4	27,2

H4H17067P2	25,7	22,2
H4H16967P	21,8	23,5
H4H17015P	41,8	63,4
H4H16979P	33,6	12,9
H4H16991P	30,0	32,6
H4H17033P	51,8	49,0
H4H16992 MAB1	36,7	64,4
H4H16960P	8,5	17,6
H4H17031	16,7	20,5
H4H17001P	47,2	52,7
H4H16943P	47,7	52,5

Huyết tương người hiến tặng đã được pha loãng 1:50 cho các thử nghiệm này.

Bảng 13: Kháng thể đơn và tổ hợp kháng thể cản trở Bet v 1 liên kết với IgE đặc hiệu chất gây dị ứng

ID người hiến:	23658-MD	23939-MH	23035-BL	25414-CW	25340-RR	25299-RJ	25609-MS	26532-CC	29718-MW	22627-MN
Kháng thể	Phần trăm cản trở (1 µg/mL mỗi kháng thể)									
H4H17082P2 MAB2	62	79	52	38	81	66	51	74	49	61
H4H17038P2 MAB3	24	17	36	23	28	24	17	23	14	23
H4H16987P MAB4	27	16	-46	-4	15	9	16	4	13	12
H4H16992P MAB1	44	53	43	53	67	70	89	80	82	62
H4H17082P2 + H4H17038P2	70	85	73	57	90	78	65	83	60	79
H4H17082P2 + H4H16987P	74	88	21	45	84	69	65	75	61	76

H4H17082P2 + H4H16992P	79	93	72	77	91	91	98	94	94	96
H4H17038P2 + H4H16987P	47	31	16	28	41	29	33	29	28	47
H4H17038P2 + H4H16992P	58	62	51	77	83	75	93	87	87	77
H4H16987P + H4H16992P	61	61	-6	63	75	69	94	81	89	64
H4H17082P2 + H4H17038P2 + H4H16987P	78	88	39	63	91	79	72	83	68	85
H4H17082P2 + H4H17038P2 + H4H16992P	83	92	65	91	96	89	98	94	94	90
H4H17082P2 + H4H16987P + H4H16992P	83	91	16	85	91	79	96	90	95	78
H4H17038P2 + H4H16987P + H4H16992P	71	69	3	82	88	71	95	86	93	76
H4H17082P2 + H4H17038P2 + H4H16987P + H4H16992P	86	93	44	89	95	84	98	94	97	87
Bet v 1 biotin hóa (không có kháng thể) tại 0,1nM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Đối chứng lớp kháng thể	-3	-2	-5	-4	-1	-4	-2	-4	-2	-3

Huyết tương của người hiến tặng đã được chuẩn hóa thành 1:20 (6 người hiến tặng), 1:10 (3 người hiến tặng) hoặc 1: 9 (1 người hiến tặng) chuẩn độ IgE đặc hiệu Bet v 1 và sau đó pha loãng 1:50 cho thử nghiệm này.

Bảng 14: Tổ hợp kháng thể cản trở Bet v 1 liên kết với IgE đặc hiệu chất gây dị

ứng

ID người hiến:	23939-MH	25340-RR	25609-MS
Kháng thể	Phần trăm cản trở (1 µg/mL mỗi kháng thể)		
H4H17082P2	82,9	82,7	56,4
H4H17038P2	20,2	23,2	22,8
H4H16987P	19,6	11,1	21,6
H4H16992P	63,3	70,2	86,9
H4H17082P2 + H4H16992P	94,8	93,8	96,5
H4H17082P2 + H4H17038P2 + H4H16992P	93,4	96,4	95,2
H4H17082P2 + H4H16987P + H4H16992P	91,5	93,1	94,2
H4H17082P2 + H4H17038P2 + H4H16987P + H4H16992P	92,6	95,4	95,7
Đối chứng lớp kháng thể	16,8	10,6	8,8
IgG ở chuột kháng Bet v 1 tinh sạch ở 333,3nM	92,7	93,9	94,6

Ví dụ 6: Bản đồ quyết định kháng nguyên của kháng thể kháng Bet v 1 liên kết với Bet v 1 bằng trao đổi hydro đơteri (H/D)

Để xác định gốc axit amin của Bet v 1 [(axit amin M1-N160 của Uniprot P15494]

với H4H16992P2, H4H17082P2, H4H17038P2 và H4H16987P tương tác với nhau, bản đồ quyết định kháng nguyên trao đổi H/D với nghiên cứu khối phổ được thực hiện. Mô tả chung về phương pháp trao đổi H/D được nêu trong ví dụ, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; and Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Các thử nghiệm HDX-MS đã được thực hiện trên nền tảng Waters HDX/MS tích hợp, bao gồm hệ thống Leaptac HDX PAL để gắn nhãn đơteri, M-Class Waters Waters (quản lý dung môi bổ trợ) để thủy phân và nạp mẫu, Waters Waters M -Class (quản lý dung môi μ nhĩ phân) cho độ dốc cột phân tích và máy quang phổ khối lượng Synapt G2-Si để đo khối lượng peptit peptit.

Dung dịch gắn nhãn được chuẩn bị trong dung dịch đệm PBS 10 mM trong D₂O ở pD 7,0 (tương đương với 6,6). Để gắn nhãn đơteri, 3,8 μ L Bet v 1 tự nhiên (Indoor Biotech, Catalog # NA-BV1-1, 28 pmol/ μ L), Bet v 1 được trộn sẵn với mỗi kháng thể hoặc hỗn hợp của cả 4 kháng thể kháng Bet v 1 theo tỷ lệ mol 1:1 được ủ với 56,2 μ L dung dịch gắn nhãn D₂O đối với các thời điểm khác nhau (ví dụ: đối chứng không được đơteri hóa = 0 giây, gắn nhãn trong 1 phút, 5 phút, 10 phút và 20 phút). Quá trình đơteri hóa được dừng lại bằng cách chuyển 50 μ L mẫu vào 50 μ L TCEP 0,2 M được làm lạnh trước, guanidin clorua 6 M trong dung dịch đệm 100 mM phosphat, pH 2,5 (dung dịch đệm) và hỗn hợp mẫu được ủ ở 1,0°C trong 2 phút. Mẫu đã dừng phản ứng sau đó được tiêm vào Trình quản lý Waters HDX để thủy phân pepsin/proteaza XIII trực tuyến. Các peptit được thủy phân đã bị giữ lại trên cột có sẵn ACQUITY UPLC BEH C18 1,7- μ m, 2,1 $\times$ 5 mm VanGuard ở 0°C và rửa giải vào cột phân tích ACQUITY UPLC BEH C18 1,7- μ m, 1,0 $\times$ 50 mm trong 9 phút phân tách theo độ chênh lệch từ 5% đến 40% B (pha chuyển động A: 0,1% axit formic trong nước, giai đoạn biến đổi B: 0,1% axit formic trong axetonitril). Máy quang phổ khối được đặt ở điện áp hình nón là 37 V, thời gian quét 0,5 giây và phạm vi khối lượng/điện tích là từ 50 đến 1700 Th.

Để xác định các peptit từ Bet v 1, dữ liệu LC-MSE từ mẫu không bị đơteri hóa đã được xử lý và tìm kiếm dựa trên cơ sở dữ liệu bao gồm Bet v 1 và chuỗi ngẫu nhiên của nó thông qua phần mềm Waters ProteinLynx Global Server (PLGS). Các peptit được xác định đã được nhập vào phần mềm DynamX và được lọc theo hai tiêu chí: 1) sản phẩm tối thiểu cho mỗi axit amin: 0,3, và 2) ngưỡng sao chép tệp: 3. Phần mềm DynamX sau đó tự động xác định mức độ hấp thụ đơteri của từng peptit dựa trên thời gian ghi

nhớ và độ chính xác khối lượng cao (<10ppm) trên nhiều điểm thời gian với 3 lần lặp.

Sử dụng cột pepsin/protease XIII trực tuyến cùng với thu thập dữ liệu MSE, tổng cộng 36 peptit từ Bet v 1 đã được xác định một cách có thể tái sản xuất khi không có hoặc có mặt của kháng thể, chiếm tỷ lệ 91,2% trình tự. Các peptit với sự giảm hấp thu đoteri hóa khử đáng kể khi liên kết với H4H16992P2, H4H17082P2, H4H17038P2, H4H16987P và 4 tổ hợp kháng thể được minh họa trong hình 1 đến 4 và 5, tương ứng. Khối lượng peptit được ghi nhận tương ứng với giá trị trung bình của trọng tâm khối lượng MH^+ từ ba lần sao chép Bet v 1 trong phức hợp với kháng thể hoặc các kháng thể kháng Bet v 1.

Như được thể hiện trong hình 1, các peptit tương ứng với các axit amin 23-43 (FILDGDNLF PKVAPQAISSE, SEQ ID NO: 307) có tốc độ đoteri hóa chậm hơn khi có mặt của H4H16992P.

Như được thể hiện trong hình 2, các peptit tương ứng với các axit amin 44-56 (NIEGNNGPGTIKK, SEQ ID NO: 308) có tốc độ đoteri hóa chậm hơn khi có mặt của H4H17082P.

Như được thể hiện trong hình 3, các peptit tương ứng với các axit amin 2-19 (GVFNYETETTSVIPAARL, SEQ ID NO: 309) có tốc độ đoteri hóa chậm hơn khi có mặt của H4H17038P2.

Như được thể hiện trong hình 4, các peptit tương ứng với các axit amin 57-70 (ISFPEGFPFKYVKD, SEQ ID NO: 310) và 81-96 (KYNYSVIEGGPIGDTL, SEQ ID NO: 315) có tốc độ đoteri hóa chậm hơn khi có mặt của H4H16987P.

Như được thể hiện trong hình 5, các peptit tương ứng với các axit amin 23-43 (FILDGDNLF PKVAPQAISSE, SEQ ID NO: 307), axit amin 44-56 (NIEGNNGPGTIKK, SEQ ID NO: 308), 2-19 (GVFNYETETTSVIPAARL, SEQ ID NO: 309), axit amin 57-70 (ISFPEGFPFKYVKD, SEQ ID NO: 310) và 81-96 (KYNYSVIEGGPIGDTL, SEQ ID NO: 315) có tốc độ đoteri hóa chậm hơn khi có mặt của 4 tổ hợp kháng thể kháng Bet v 1 (H4H16992P, H4H17082P, H4H17038P2 và H4H16987P).

Ngoài ra, mức độ bảo vệ vừa phải đã được quan sát đối với peptit 23-43 khi có mặt H4H17082P, H4H17038P2 và H4H16987P, xác định rằng vùng này có thể tương

ứng với quyết định kháng nguyên thứ cấp đối với kháng thể đơn dòng này.

Ví dụ 7: Hiệu quả của kháng thể kháng Bet v 1 trong mô hình phản vệ thụ động ở da (PCA) in vivo

Để xác định hiệu quả của kháng thể kháng Bet v 1 theo sáng chế trong việc cản trở chất gây dị ứng khiến cho đường bào phóng thích hạt, mô hình phản vệ thụ động ở da (PCA) in vivo đã được sử dụng. Mô hình này bao gồm việc tiêm qua da kháng huyết thanh đặc hiệu chất gây dị ứng vào vùng cục bộ trên da, sau đó tiêm tĩnh mạch kháng nguyên cùng với thuốc nhuộm. Phản ứng dị ứng gây ra giãn mao mạch và tăng tính thấm thành mạch tại vị trí nhạy cảm, dẫn đến ưu tiên tích tụ thuốc nhuộm tại vị trí này. Thuốc nhuộm có thể được chiết từ mô và định lượng bằng phương pháp quang phổ. Sự thoát mạch của thuốc nhuộm vào mô nhạy cảm với kháng huyết thanh thử nghiệm sau đó có thể được so sánh với sự thoát mạch vào mô nhạy cảm với kháng huyết thanh không liên quan.

Kháng huyết thanh được tạo ra để sử dụng trong thử nghiệm bằng cách tiêm cho chuột Balb/c với 5µg protein Bet v 1 tự nhiên (Indoor Biotechnologies, # NA-BV1-1) trong dung dịch 1mg/mL phen trong dung dịch muối đệm phosphat (PBS) 1X vào ngày 0. Một tuần sau (ngày 7), chuột nhạy cảm được tăng cường với 5µg protein Bet v 1 tự nhiên trong dung dịch phen 1mg/mL trong PBS 1X. Hai tuần sau khi làm tăng cường, chuột phải trải qua thử thách đường thở trong mũi với 0,5 µg protein Bet v 1 tự nhiên trong 20µL PBS vào các ngày 21, 24 và 28. Chuột sau đó đã bị giết chết nhân đạo vào ngày 31 và huyết thanh đã được thu lại. Nồng độ IgE tổng số trong kháng huyết thanh được phân lập được xác định bằng cách sử dụng bộ kit ELISA OptEIA™ (BD Biosciences, # 555248) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ cuối cùng của kháng huyết thanh Bet v 1 đã được pha loãng thành 2600 ng/mL IgE trong PBS.

Kháng huyết thanh được sử dụng làm đối chứng âm trong thử nghiệm được tạo ra bằng cách tạo miễn dịch cho chuột Balb/c với 5µg protein Fel d 1 tự nhiên được tinh chế từ chiết xuất lông mèo (Indoor Biotechnologies, # LTN-FD1-1) trong dung dịch 1mg/mL phen trong PBS vào ngày 0. Chuột được tăng cường với 5µg protein Fel d 1 trong 1mg/mL dung dịch phen trong PBS vào ngày 14 và 21. Một tuần sau lần tăng cường cuối cùng (ngày 28), chuột được giết chết nhân đạo và huyết thanh được thu lại. Nồng độ IgE tổng số trong kháng huyết thanh được phân lập được xác định bằng cách

sử dụng bộ kit ELISA OptEIA™ (BD Biosciatics, # 555248) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ cuối cùng của kháng huyết thanh đã được pha loãng đến 2500 ng/mL IgE trong PBS.

Đối với các thử nghiệm PCA, các nhóm chuột Balb/c ($n \geq 5$ mỗi thử nghiệm) lần đầu tiên được tiêm dưới da bằng kháng thể đối chứng lớp kháng thể, kháng thể kháng Bet v 1 hoặc tổ hợp các kháng thể kháng Bet v 1 với liều lượng 1mg/kg (liều lượng kháng thể tổng số). Ba ngày sau khi sử dụng kháng thể, 10 μ L của 1,5 ng kháng huyết thanh Bet v 1 hoặc 3 ng kháng huyết thanh đối chứng âm lần lượt được tiêm vào tai phải và tai trái của mỗi nhóm chuột. 24 giờ sau khi sử dụng kháng huyết thanh đặc hiệu chất gây dị ứng, chuột đã được thử thách bằng cách tiêm tĩnh mạch (100 μ L mỗi con chuột) với 1 μ g/mL dung dịch Bet v 1 tự nhiên hòa tan trong PBS chứa 0,5% (trọng lượng/thể tích) thuốc nhuộm màu xanh của Evan (Sigma Aldrich, # E2129). Một giờ sau thử thách kháng nguyên, chuột được giết chết nhân đạo, tai của chúng bị cắt bỏ, được đặt trong 1 mL formamit và sau đó được ủ trong 3 ngày trong khoảng từ 50 đến 56°C để chiết thuốc nhuộm màu xanh Evan. Các mô tai sau đó được lấy ra khỏi formamit, thấm để loại bỏ chất lỏng dư và đem cân. Phần phân ước hai trăm microlit của mỗi chiết xuất formamit đã được chuyển sang đĩa 96 giếng hai lần và độ hấp thụ của chúng sau đó được đo ở 620nm. Mật độ quang học đo được được chuyển đổi thành nồng độ thuốc nhuộm màu xanh Evan bằng cách sử dụng đường cong chuẩn và được biểu thị bằng ng của thuốc nhuộm màu xanh Evan trên mỗi mg mô. Giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn được thể hiện trong Bảng 15 đối với mỗi nhóm. Sự khác biệt trung bình so với đối chứng lớp kháng thể được tính toán bằng cách sử dụng thử nghiệm so sánh bội số Bonferroni trong GraphPad Prism.

Như được thể hiện trong Bảng 15, trong nghiên cứu thứ nhất, chỉ một kháng thể kháng Bet v 1, H4H17082P2, không chứng minh được việc làm giảm đáng kể của quá trình thoát mạch của thuốc nhuộm màu so với đối chứng lớp kháng thể. Ngược lại trong nghiên cứu 2, tổ hợp của hai kháng thể kháng Bet v 1 theo sáng chế (H4H16992P và H4H17082P2) và tổ hợp của bốn kháng thể kháng Bet v 1 theo sáng chế (H4H16992P, H4H17082P2, H4H17082P2 và H4H16987P) đã chứng minh làm giảm đáng kể sự thoát mạch của thuốc nhuộm so với điều đối chứng lớp kháng thể, với mức giảm lần lượt là 35,26 và 36,49 ng/mg. Tương tự như vậy, trong nghiên cứu 3, tổ hợp của hai kháng thể kháng Bet v 1 theo sáng chế (H4H16992P và H4H17082P2) một lần nữa chứng minh

làm giảm đáng kể sự thoát mạch của thuốc nhuộm so với điều trị đối chứng lớp kháng thể, với mức giảm 41,09 ng/mg. Như đã được chứng minh trước đây trong nghiên cứu 1, trong nghiên cứu 3, kháng thể kháng Bet v 1 duy nhất, H4H17082P2, đã không chứng minh được việc làm giảm đáng kể sự thoát mạch của thuốc nhuộm so với đối chứng lớp kháng thể. Tuy nhiên, kháng thể đơn khác, H4H16992P, đã chứng minh việc làm giảm đáng kể sự thoát mạch của thuốc nhuộm so với đối chứng lớp kháng thể, với mức giảm là 25,86ng/mg. Từ các nghiên cứu đã tiến hành bằng kháng thể đơn H4H16992P, tổ hợp hai kháng thể của H4H17082P2 + H4H16992P, cũng như tổ hợp bốn kháng thể của H4H17082P2 + H4H16992P + H4H17038P2 + H4H16987P có thể ngăn chặn quá trình dưỡng bào giải phóng hạt như được thể hiện bằng việc làm giảm đáng kể sự thoát mạch của thuốc nhuộm so với đối chứng lớp kháng thể trong mô hình phản vệ thụ động ở da in vivo được xác định bằng ANOVA hai chiều với thử nghiệm sau của Bonferroni. Chỉ riêng kháng thể H4H17082P2 đã không thể cản trở quá trình dưỡng bào giải phóng hạt như được thể hiện bằng việc làm giảm đáng kể sự thoát mạch của thuốc nhuộm so với đối chứng lớp kháng thể trong hai nghiên cứu được thực hiện. Số lượng chuột được sử dụng cho mỗi nhóm (n) được ghi chú trong ngoặc đơn trong bảng.

Bảng 15: Hiệu quả của kháng thể kháng Bet v 1 trong mô hình phản vệ thụ động ở da in vivo

Nhóm được điều trị	Chất gây dị ứng đối chứng âm (ng thuốc nhuộm xanh Evans/mg mô ± SD)	Hiệu số trung bình so với đối chứng lớp kháng thể	Bet v 1 (ng thuốc nhuộm xanh Evans/mg mô ± SD)	Hiệu số trung bình so với đối chứng lớp kháng thể
<i><u>Nghiên cứu 1</u></i>				
H4H17082P2 (n=8)	2,1±0,9	-0,31	46,6±17,3	7,5
<i><u>Nghiên cứu 2</u></i>				
H4H17082P2 +	6,3±3,8	1,807	8,3±7,7	-35,26

H4H16992P (n=10)				(****)
H4H17082P2 + H4H16992P + H4H17038P2 + H4H16987P (n=10)	7,6±5,5	3,090	7,1±4,1	-36,49 (****)
<u>Nghiên cứu 3</u>				
H4H17082P2 (n=5)	6,5±1,4	-0,311	89,4±28,3	27,37 (*)
H4H16992P (n=5)	6,4±2,1	-0,324	36,2±14	-25,86 (*)
H4H17082P2 + H4H16992P (n=5)	3,6±31	-3,118	21±9,6	-41,09 (***)

1mg/kg tổng nồng độ kháng thể được sử dụng cho tất cả các nhóm điều trị kháng thể

* $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$

n = số chuột trong mỗi nhóm

Ví dụ 8: Hiệu quả của kháng thể kháng Bet v 1 chống lại chiết xuất phấn hoa bạch dương trong mô hình phản vệ thụ động ở da (PCA) in vivo

Kháng thể kháng Bet v 1 được đề cập ở đây đã được thử nghiệm về hiệu quả trong việc cản trở chất gây dị ứng khiến cho dưỡng bào giải phóng hạt trong mô hình phản vệ thụ động ở da (PCA) in vivo. Kháng huyết thanh đặc hiệu chất gây dị ứng được tiêm qua da vào vùng cục bộ trên da, sau đó tiêm tĩnh mạch kháng nguyên cùng với thuốc nhuộm. Phản ứng dị ứng gây ra giãn mao mạch và tăng tính thấm thành mạch tại vị trí nhạy cảm, dẫn đến ưu tiên tích tụ thuốc nhuộm tại vị trí này. Thuốc nhuộm có thể được chiết từ mô và định lượng bằng phương pháp quang phổ. Sự thoát mạch của thuốc nhuộm vào mô nhạy cảm với kháng huyết thanh thử nghiệm sau đó có thể được so sánh với sự thoát mạch vào mô nhạy cảm với kháng huyết thanh không liên quan.

Kháng huyết thanh đối với Bet v 1 tự nhiên, chiết xuất phấn hoa bạch dương (BPE) Betula Pendula (còn được gọi là Betula verrucosa), Betula nigra BPE và Betula populifolia BPE đã được tạo ra để sử dụng trong thử nghiệm này bằng cách tạo miễn

dịch cho chuột Balb/c tự nhiên với 5µg protein Bet v 1 (Indoor Biotechnologies, Catalog# NA-BV1-1 Lot 36164) hoặc 5µg BPE; pendula (Stallargenes Greer, Catalog # XP527D3A25 Lô # 277.329), nigra (Stallargenes Greer Catalog # XP79D3A25 Lô # 285.077) hoặc populifolia (Stallargenes Greer Catalog # XP80D3A2.5 Lô # 273.622) trong 1mg/ml dung dịch phèn trong dung dịch muối đệm phosphat (PBS) 1X vào ngày 0. Một tuần sau (ngày 7), chuột nhạy cảm được tăng cường với 5µg protein Bet v 1 tự nhiên hoặc 5µg BPE tương ứng (Pendula, nigra hoặc populifolia) trong dung dịch phèn 1mg/mL trong PBS 1X. Hai tuần sau khi làm tăng cường, chuột trải qua thử thách đường thở trong mũi với 0,5 µg protein Bet v 1 tự nhiên hoặc 0,5µg chiết xuất phấn hoa bạch dương tương ứng trong 20µL PBS 1X vào các ngày 21, 24 và 28. Chuột sau đó được giết chết nhân đạo vào ngày 31 và huyết thanh đã được thu lại. Nồng độ IgE tổng số trong các lô kháng huyết thanh được phân lập được xác định bằng cách sử dụng bộ kit ELISA OptEIA™ (BD Biosciatics, # 555248) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ cuối cùng của kháng huyết thanh Bet v 1 đã được pha loãng thành 2500 ng/mL IgE trong PBS 1X và nồng độ cuối cùng của các lô kháng huyết thanh chiết xuất phấn hoa đã được pha loãng thành 3000 ng/mL đối với Pendula, 1900 ng/mL đối với nigra và 3700 ng/mL đối với populifolia.

Kháng huyết thanh được sử dụng làm đối chứng âm trong thử nghiệm này được tạo ra bằng cách tạo miễn dịch cho chuột Balb/c với 5µg protein Fel d 1 tự nhiên được tinh chế từ chiết xuất lông mèo (Indoor Biotechnologies, Catalog# LTN-FD1-1, Lot #36099) trong 1mg/mL dung dịch phèn trong PBS 1X. Chuột được tăng cường với 5µg protein Fel d 1 trong 1mg/mL dung dịch phèn trong PBS 1X vào ngày 14 và 21. Một tuần sau lần tăng cường cuối cùng (ngày 28), chuột được giết chết nhân đạo và huyết thanh được thu lại. Nồng độ IgE tổng số trong kháng huyết thanh được phân lập được xác định bằng cách sử dụng bộ kit ELISA OptEIA™ (BD Biosciatics, # 555248) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ cuối cùng của kháng huyết thanh đã được pha loãng thành 4800 ng/mL IgE trong PBS.

Đối với các thử nghiệm PCA, các nhóm chuột Balb/c ($n \geq 4$ mỗi thí nghiệm, lặp lại ba lần) thứ nhất được tiêm dưới da bằng kháng thể đối chứng lớp kháng thể hoặc tổ hợp hai kháng thể kháng Bet v 1 với liều lượng 1mg/kg (liều lượng kháng thể tổng số). Ba ngày sau khi sử dụng kháng thể, 10µL hoặc là kháng huyết thanh 1ng Bet v 1, kháng huyết thanh 25ng Betula Pendula, kháng huyết thanh 25ng Betula nigra hoặc kháng

huyết thanh 25ng *Betula populifolia* đã được tiêm vào tai phải của chuột trong các nhóm được chỉ định. Tai trái được tiêm 1ng hoặc 25ng Fel d 1 (đối chứng âm) để phù hợp với nồng độ kháng huyết thanh của tai phải tương ứng. 24 giờ sau khi sử dụng kháng huyết thanh đặc hiệu chất gây dị ứng tại chỗ, chuột được thử thách bằng cách tiêm tĩnh mạch (100 μ L mỗi con chuột) với 1 μ g/mL dung dịch Bet v 1 tự nhiên (Catalog# NA-BV1-1, Lot 36164) hoặc 1 μ g/mL BPE tương ứng (Stallargenes Greer, Catalog# XP527D3A25 Lot #277329, Catalog# XP79D3A25 Lot #285077, và Catalog# XP80D3A2.5 Lot #273622) hòa tan trong PBS 1X có chứa 0,5% thuốc nhuộm (trọng lượng/thể tích) (Sigma Aldrich, # E2129). Một giờ sau thử thách kháng nguyên, chuột được giết chết nhân đạo, tai của chúng bị cắt bỏ, được đặt trong 1 mL formamit và sau đó được ủ trong 3 ngày trong 50°C để chiết thuốc nhuộm màu xanh Evan. Các mô tai sau đó được lấy ra khỏi formamit, thấm để loại bỏ chất lỏng dư và đem cân. Phần phân ước hai trăm micro lít của mỗi chiết xuất formamit đã được chuyển sang đĩa 96 giếng hai lần. Độ hấp thụ của dịch nổi trên bề mặt được đo ở 620nm. Mật độ quang học đo được được chuyển đổi thành nồng độ thuốc nhuộm màu xanh Evan bằng cách sử dụng đường cong chuẩn và được biểu thị bằng ng của thuốc nhuộm màu xanh Evan trên mỗi mg mô ở tai. Giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn được thể hiện trong Bảng 1 cho mỗi nhóm. Sự khác biệt trung bình so với đối chứng lớp kháng thể được tính toán bằng cách sử dụng thử nghiệm so sánh bội số Bonferroni trong GraphPad Prism.

Bảng 16 chứng minh hiệu quả của tổ hợp hai kháng thể kháng Bet v 1, H4H16992P và H4H17082P2, được thể hiện bằng cách giảm đáng kể sự thoát mạch của thuốc nhuộm so với đối chứng lớp kháng thể trong tất cả các nhóm được thử nghiệm. Như được thể hiện, hai tổ hợp kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 của H4H17082P2/H4H16992P cản trở quá trình dưỡng bào giải phóng hạt trong mô hình in vivo thụ động trên da đối với sự nhạy cảm và thử thách tiếp theo với Bet v 1 tự nhiên được so sánh với đối chứng lớp kháng thể, chứng minh sự giảm đáng kể của quá trình thoát mạch của thuốc nhuộm là 88,34. Tương tự, việc giảm quá trình thoát mạch của thuốc nhuộm cũng được quan sát thấy trong các nhóm được điều trị H4H17082P2/H4H16992P đối với cả ba chiết xuất phấn hoa bạch dương so với các nhóm đối chứng lớp kháng thể tương ứng với mức giảm đáng kể về mặt thống kê là 62,52 đối với *Betula Pendula*, 71,19 đối với *Betula nula*. Hiệu số trung bình khi so sánh với đối chứng lớp kháng thể được tính bằng ANOVA hai chiều với thử nghiệm sau

Bonferroni. Số lượng chuột được sử dụng cho mỗi nhóm (n) được ghi chú trong ngoặc đơn trong các bảng.

Bảng 16: Hiệu quả của kháng thể kháng Bet v 1 trong mô hình phản vệ thụ động ở da (PCA) in vivo

Gây nhạy cảm và điều trị	Chất gây dị ứng đối chứng âm (ng thuốc nhuộm màu xanh Evans/mg mô $\pm$ SD)	Hiệu số trung bình so với đối chứng lớp kháng thể	Bet v 1 hoặc BPE (ng thuốc nhuộm màu xanh Evans/mg mô $\pm$ SD)	Hiệu số trung bình so với đối chứng lớp kháng thể
1ng nBet v 1 H4H17082P2+ H4H16992P (n $\geq$ 14)	7,59 $\pm$ 3,03	0,7623	9,56 $\pm$ 3,53	-88,34 (****)
25ng Betula pendula H4H17082P2+ H4H16992P (n $\geq$ 14)	7,76 $\pm$ 3,38	0,7337	15,54 $\pm$ 8,21	-62,52 (****)
25ng nBet v 1 H4H17082P2+ H4H16992P (n $\geq$ 14)	8,16 $\pm$ 4,44	1,05	23,94 $\pm$ 18,32	-71,19 (****)
25ng Betula populifolia H4H17082P2+ H4H16992P (n $\geq$ 14)	7,11 $\pm$ 2,37	0,5416	10,09 $\pm$ 5,90	-91,47 (****)

1mg/kg tổng nồng độ kháng thể được sử dụng cho tất cả các nhóm điều trị kháng

thể

* $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$, **** $P \leq 0,0001$

n = số chuột trong mỗi nhóm

Ví dụ 9: Cạnh tranh chéo giữa các kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1

Sự cạnh tranh liên kết trong một nhóm các kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 đã được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm giao thoa lớp sinh học không chất đánh dấu, thời gian thực trên nền tảng cảm thụ sinh học Octet HTX (Pall ForteBio Corp). Toàn bộ thí nghiệm được thực hiện ở 25°C trong 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA và 0,05% thể tích/thể tích chất hoạt động bề mặt Tween-20, và 1mg/mL BSA, đệm pH 7,4 (HBS-ET), lắc đĩa ở tốc độ 1000 rpm. Để đánh giá xem 2 kháng thể có thể cạnh tranh với nhau để liên kết với các quyết định kháng nguyên tương ứng của chúng trên Bet v 1 đột biến tái tổ hợp được thể hiện bằng nhãn myc-meah-hexahistidin đầu C (đột biến Bet v 1-MMH; SEQ ID NO: 312), khoảng ~ 0,21nm thể đột biến Bet v 1-MMH đầu tiên được bắt giữ lên trên kháng thể kháng Penta-His được phủ đầu cảm biến sinh học Octet (ForteBio Inc, # 18-5122) bằng cách ngâm đầu cảm biến sinh học trong 90 giây trong các giếng chứa 5µg/mL dung dịch Bet v 1-MMH đột biến. Các đầu cảm biến sinh học bắt giữ kháng nguyên được bão hòa với kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 thứ nhất (sau đây được gọi là mAb-1) bằng cách nhúng vào các giếng chứa 50µg/mL dung dịch mAb-1 trong 4 phút. Đầu cảm biến sinh học sau đó được nhúng trong các giếng chứa 50µg/mL dung dịch kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 thứ hai (sau đây gọi là mAb-2) trong 3 phút. Đầu cảm biến sinh học được rửa trong đệm HBS-EBT giữa mỗi bước thí nghiệm. Phản ứng liên kết thời gian thực được quan sát trong suốt cả quá trình thí nghiệm và phản ứng liên kết ở mỗi bước được ghi lại. Phản ứng của mAb-2 liên kết với Bet v 1-MMH đột biến được tạo phức từ trước với mAb-1 được so sánh và hành vi cạnh tranh/không cạnh tranh của kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 khác nhau được xác định như thể hiện trong bảng 17.

Ba trong số 20 kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 không liên kết với Bet v 1-MMH đột biến và dữ liệu cạnh tranh chéo được thấy là không xác định.

Bảng 17 Cạnh tranh chéo giữa các kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1

mAb-1	mAb-2 cạnh tranh với mAb-1
H4H17082P2	H4H16971P
H4H16971P	H4H17082P2
	H4H17027P
	H4H17028P
	H4H16946P
	H4H17038P2
H4H17027P	H4H16971P
	H4H17028P
	H4H16946P
	H4H17038P2
	H4H16950P
H4H17028P	H4H16971P
	H4H17027P
	H4H16946P
	H4H17038P2
	H4H16950P
H4H16946P	H4H16971P
	H4H17027P
	H4H17028P

	H4H17038P2
	H4H16950P
H4H17038P2	H4H16971P
	H4H17027P
	H4H17028P
	H4H16946P
	H4H16950P
	H4H16979P
H4H16950P	H4H17027P
	H4H17028P
	H4H16946P
	H4H17038P2
	H4H17015P
H4H16987P	H4H17045P2
	H4H17067P2
	H4H16967P
H4H17045P2	H4H16987P
	H4H17067P2
	H4H16967P
	H4H17015P

H4H17067P2	H4H16987P
	H4H17045P2
	H4H16967P
	H4H17015P
H4H16967P	H4H16987P
	H4H17045P2
	H4H17067P2
	H4H17015P
	H4H16992P
H4H17015P	H4H16950P
	H4H17045P2
	H4H17067P2
	H4H16967P
	H4H16979P
	H4H16991P
	H4H17033P
	H4H16992P
H4H16979P	H4H17038P2
	H4H17015P
	H4H16991P

	H4H17033P
	H4H16992P
H4H16991P	H4H17015P
	H4H16979P
	H4H17033P
	H4H16992P
H4H17033P	H4H17015P
	H4H16979P
	H4H16991P
	H4H16992P
H4H16992P	H4H16967P
	H4H17015P
	H4H16979P
	H4H16991P
	H4H17033P
	H4H16960P
	H4H17031P
H4H16960P	H4H16992P
	H4H17031P
H4H17031P	H4H16992P

	H4H16960P
H4H16943P	IC*
H4H17001P	IC*

* IC biểu thị rằng kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 không liên kết với Bet v 1-MMH đột biến và dữ liệu cạnh tranh chéo được thấy là không xác định.

Ví dụ 10 Khả năng của tổ hợp kháng thể kháng Bet v 1 để cản trở quá trình dưỡng bào giải phóng hạt do Bet v 1 gây rarong mô hình PCA của chuột được làm giống người

Để khám phá tính đa hình của phản ứng IgE đặc hiệu với chất gây dị ứng trên các cá thể dị ứng bạch dương ở người, mô hình chuột $Fc\epsilon R1\alpha$ được làm giống người đã được sử dụng để tạo thuận lợi cho việc liên kết IgE ở người với $Fc\epsilon R1\alpha$ trên bề mặt dưỡng bào của chuột. Vì IgE ở người không thể liên kết $Fc\epsilon R1\alpha$ ở chuột, chuột biến đổi gen đã được tạo ra trong đó $Fc\epsilon R1\alpha$ ở chuột nội sinh được thay thế bằng trình tự $Fc\epsilon R1\alpha$ tương ứng ở người và được ký hiệu là $Fc\epsilon R1\alpha^{hu/hu}$. Chuột $Fc\epsilon R1\alpha^{hu/hu}$ đã được xác nhận để sử dụng trong mô hình này bằng cách chứng minh biểu hiện bề mặt của $Fc\epsilon R1\alpha$ ở người và khả năng đáp ứng với chất gây dị ứng: hoạt hóa IgE trong mô hình phản vệ thụ động trên da (PCA) theo cách được so sánh với chuột kiểu dại. Mô hình PCA này bao gồm việc tiêm huyết thanh ở người mắc dị ứng vào vùng cục bộ trên da, sau đó tiêm tĩnh mạch kháng nguyên cùng với thuốc nhuộm. Phản ứng dị ứng gây ra giãn mao mạch và tăng tính thấm thành mạch tại vị trí nhạy cảm, dẫn đến tích ưu tiên lũy thuốc nhuộm tại vị trí này. Thuốc nhuộm có thể được chiết từ mô và định lượng bằng phương pháp quang phổ. Sự thoát mạch của thuốc nhuộm vào mô nhạy cảm với kháng huyết thanh thử nghiệm được so sánh với sự thoát mạch vào mô nhạy cảm với huyết thanh người không bị dị ứng.

Phương pháp

Để xác định hiệu quả của kháng thể kháng Bet v 1 đối với quá trình dưỡng bào giải phóng hạt trong mô hình này, chuột $Fc\epsilon R1\alpha$ được làm giống người đã được tiêm dưới da kháng thể đối chứng lớp kháng thể hoặc tổ hợp kháng thể kháng Bet v 1 vào ngày 1. Đối với mỗi người hiến tặng, hai thí nghiệm độc lập đã được thực hiện, $n = 5$ con chuột cho mỗi nhóm với dữ liệu được kết hợp. Các nhóm bao gồm không có kháng

thể đơn dòng đối chứng âm, đối chứng lớp kháng thể âm, nhóm điều trị kháng thể kháng thể kháng Bet v 1 kép REGN5713+REGN5715 và nhóm điều trị kháng thể kháng thể kháng thể Bet v 1 ba REGN5713 + REGN5714 + REGN5715. Tổng nồng độ kháng thể tổng hợp hoặc tổ hợp là 1mg/kg hoặc kháng thể đối chứng lớp kháng thể IgG4 (kháng IL6R α dưới dạng đối chứng lớp kháng thể âm). Ba ngày sau, huyết thanh từ bệnh nhân dị ứng bạch dương hoặc huyết thanh từ bệnh nhân không dị ứng bạch dương (đối chứng âm) được tiêm trong da vào tai phải và trái, tương ứng, cho phép IgE đặc hiệu với chất gây dị ứng liên kết với Fc ϵ RI trên dưỡng bào. Để đảm bảo rằng cùng một lượng IgE đặc hiệu gây dị ứng từ mỗi người hiến tặng đã được sử dụng trong thí nghiệm, mỗi lần tiêm kháng huyết thanh đã được chuẩn hóa đến IgE ImmunoCAP[®] đặc hiệu với Bet v 1 trong 10 KU_a/L.

Hai mươi bốn giờ sau khi sử dụng kháng thể đặc hiệu với chất gây dị ứng tại chỗ, chuột đã được thử thách bằng cách tiêm IV 1 μ g Bet v 1 pha loãng trong PBS chứa thuốc nhuộm màu xanh Evan 0,5%. Một giờ sau thử thách dị ứng, chuột được giết chết nhân đạo. Thuốc nhuộm màu xanh Evans được chiết từ mô tai và định lượng bằng phương pháp đo quang phổ bằng cách sử dụng đường cong chuẩn. (Xem Fig. 6 để biết sơ đồ của quy trình được sử dụng) Mức giảm trong quá trình thoát mạch thuốc nhuộm màu xanh Evan được tính trung bình bằng cách trừ đi nồng độ thuốc nhuộm màu xanh Evan (chuẩn hóa bằng trọng lượng mô tai) đối với huyết thanh chất gây dị ứng bạch dương của nhóm được điều trị bằng kháng thể, B (mAb, i), từ nhóm được điều trị bằng kháng thể đối chứng lớp kháng thể, B (isotyp, avg). Con số này sau đó được chia cho hiệu số giữa B (isotyp, avg) và nồng độ thuốc nhuộm đối với huyết thanh không phải chất gây dị ứng của nhóm được điều trị bằng kháng thể [N (mAb, i)] và nhân với 100 để giảm phần trăm trung bình chung trong sự thoát mạch thuốc nhuộm (%giảm). Phương trình được thể hiện dưới đây:

$$\% \text{ Giảm (trung bình)} = 100 * [B (\text{isotyp, avg}) - B (\text{mAb, i})] / [B (\text{isotyp, avg}) - N (\text{mAb, i})]$$

Sự tăng của phần trăm giảm của sự thoát mạch thuốc nhuộm trong nhóm được điều trị bằng kháng thể kháng Bet v1 so với nhóm đối chứng lớp kháng thể âm là giá trị đo tác dụng của tổ hợp kháng thể hoặc kháng thể Bet v 1 trong việc cản trở quá trình dưỡng bào giải phóng hạt.

Kết quả

Trong mô hình này, việc sử dụng kết hợp các kháng thể kháng Bet v 1 được chỉ định là H4H16992P (còn được gọi là REGN5713), H4H17038P2 (còn được gọi là REGN5714) và H4H17082P2 (còn được gọi là REGN5715) chứng minh cản trở tối đa đáp ứng qua trung gian IgE khi sử dụng huyết thanh chứa IgE từ 3/3 người hiến tặng dị ứng bạch dương (Xem Fig. 7). Sử dụng huyết thanh từ người hiến tặng dị ứng bạch dương 25609, H4H16992P, H4H17038P2 và H4H17082P2 khi kết hợp đã cho thấy cản trở 95% việc dưỡng bào giải phóng hạt so với đối chứng lớp kháng thể (hiệu số trung bình $-42,04 \pm 6,9$ ($p < 0,0001$)). H4H17082P2 cho thấy cản trở 93% quá trình dưỡng bào giải phóng hạt so với đối chứng lớp kháng thể (hiệu số trung bình $-41,74 \pm 3,7$ ($p < 0,0001$)). Sử dụng huyết thanh từ người hiến tặng dị ứng bạch dương 23658, H4H16992P, H4H17038P2 và H4H17082P2, khi kết hợp đã cho thấy cản trở 90% quá trình dưỡng bào giải phóng hạt so với đối chứng lớp kháng thể (hiệu số trung bình $-53,67 \pm 7,1$ ($p < 0,0001$)) và H4H16992P kết hợp với H4H17082P2 thể hiện 74% sự ngăn chặn quá trình dưỡng bào giải phóng hạt so với đối chứng lớp kháng thể (hiệu số trung bình $-44,58 \pm 11,4$ ($p < 0,0001$)). Cuối cùng, sử dụng huyết thanh từ người hiến tặng dị ứng bạch dương 25414, H4H16992P, H4H17038P2 và H4H17082P2, khi kết hợp đã cho thấy cản trở 92% quá trình dưỡng bào giải phóng hạt so với đối chứng lớp kháng thể (hiệu số trung bình $-39,72 \pm 7,5$ ($p < 0,0001$)) và H4H16992P được kết hợp với H4H17082P2 cho thấy cản trở 80% quá trình dưỡng bào giải phóng hạt so với đối chứng lớp kháng thể (hiệu số trung bình $-34,27 \pm 7,8$ ($p < 0,0001$)).

Ví dụ 11 Khả năng kết hợp kháng thể kháng Bet v 1 để cản trở sự hoạt hóa bạch cầu ưa kiềm trong thử nghiệm Phospho-Erk Phosphoflow

Đáp ứng IgE ở người đã được phát hiện bằng cách kiểm tra hiệu quả của các tổ hợp khác nhau của kháng thể kháng Bet v 1 H4H16992P (còn được gọi là REGN5713), H4H17038P2 (còn được gọi là REGN5714) và H4H17082P2 (còn được gọi là REGN5714) trong việc ức chế sự hoạt hóa bạch cầu ưa kiềm sử dụng mẫu từ 8 cá thể dị ứng bạch dương. Cụ thể hơn, để đánh giá sự tham gia và hoạt hóa FcεR, bạch cầu ưa kiềm đã được thử nghiệm trong thử nghiệm dựa trên biểu thức phosphoflow để đo mức độ phosphoryl hóa của kinase ERK, một chỉ số gần nhất về hoạt hóa và làm mất hạt nhỏ của bạch cầu ưa kiềm (Liu, Y. et al. (2007), *J Exp Med* 204, 93-103).

Phương pháp

Máu được lấy từ các bệnh nhân dị ứng bạch dương ($n = 8$) và PBMC được phân lập bằng cách ly tâm tỷ trọng trên lớp Ficoll, rửa sạch, tạo huyền phù lại và được đặt dưới dạng điểm đơn lên đĩa 96 giếng. Cùng với đó, đĩa kích thích 2X đã được tạo ra bao gồm đáp ứng với liều của Bet v 1 đã tinh sạch cũng như đáp ứng với liều của kháng thể kháng Bet v 1 và tổ hợp kháng thể ($2,56\mu\text{M}$ - 200nM) trộn với liều không đổi (nồng độ cuối cùng $100\mu\text{M}$) của Bet v t tự nhiên tinh sạch. Các tế bào được kích thích và sau đó nhuộm màu với một loại hỗn hợp kháng thể chứa kháng thể pErk-Alexa 488, CD123-BUV395 và HLA-DR-APC. Sau khi nhuộm, dữ liệu được thu thập bằng cách sử dụng dụng cụ LSR-Fortessa và được phân tích bằng cách tính MFI của quá trình nhuộm Erk phosphoryl hóa trong hàng rào bạch cầu ưa kiềm. Phần trăm ức chế tối đa được tính như sau: $100 - ((\text{Phản ứng kháng thể tối đa } 100 \text{ X}) / \text{Phản ứng kiểu mẫu})$. Đáp ứng kháng thể tối đa là Cường độ huỳnh quang trung vị (MFI) trung bình của Erk phosphoryl hóa trong ba liều kháng thể hàng đầu trong đường cong đáp ứng với liều (đoạn bằng của đường cong) trừ MFI cơ bản (trung bình của các mẫu không được mô phỏng) và đáp ứng isotyp là đáp ứng isotyp trung bình của tất cả các giá trị MFI trong đáp ứng với liều của kháng thể đối chứng lớp kháng thể được sản xuất (REGN1945 kháng Fel d 1 IgG4P) trừ đường gốc MFI.

Kết quả

Bạch cầu ưa kiềm từ tất cả 8 cá thể dị ứng phấn hoa bạch dương đã đáp ứng với kích thích Bet v 1 với cường độ khác nhau. Xem Fig. 8. H4H16992P, H4H17038P2 và H4H17082P2 đã cản trở ít nhất 70% sự hoạt hóa bạch cầu ưa kiềm ở 8/8 người hiến, trong khi sự kết hợp của H4H16992P với H4H17082P2 đạt được mức độ ức chế tương tự trong 6/8 người hiến. Đáng chú ý, các kháng thể riêng lẻ khi được thử nghiệm độc lập cho thấy mức độ biến đổi cao về khả năng tác động đến chất gây dị ứng liên kết với IgE. H4H16992P đạt được cản trở $\geq 70\%$ ở 3/8 người hiến và H4H17082P2 đạt được 70% sự cản trở quá trình hoạt hóa bạch cầu ưa kiềm ở 4/8 người hiến. H4H17038P2 đã cho thấy cản trở 70% chỉ trong 1/8 người hiến được thử nghiệm.

Ví dụ 12: Xác định liên kết đồng thời của ba kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 đối với Bet v 1 tự nhiên

Thí nghiệm này được thực hiện để đảm bảo rằng các quyết định kháng nguyên

liên kết của ba kháng thể đơn dòng Bet v 1 được chọn là duy nhất và theo bất kể thứ tự liên kết kháng thể đơn dòng, không có sự cản trở không gian được thể hiện khi liên kết đồng thời ba kháng thể. Sự cạnh tranh phụ thuộc thứ tự giữa ba kháng thể đơn dòng Bet v 1 cũng được đánh giá.

Liên kết đồng thời ba kháng thể đơn dòng kháng Bet v 1 với cùng Bet v 1 được xác định bằng cách sử dụng nền cảm biến sinh học Biacore 3000 dựa trên cộng hưởng plasmon bề mặt không có nhãn, thời gian thực (GECare.). Toàn bộ thí nghiệm được thực hiện ở 25°C trong bộ đệm đang chạy chứa 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3 triệu EDTA và 0,05% v/v chất hoạt tính bề mặt Tween-20, pH7,4 (HBS-ET). Các kháng thể được cố định trên các bề mặt khác nhau của cảm biến CM5 bằng cách sử dụng hóa chất EDC/NHS để đạt được mức độ cố định 5000 - 13.000 RU. REGN1945 (kháng thể đơn dòng Fel d 1) cũng được cố định làm đối chứng âm. Bet v 1 tự nhiên (nBet v 1), 10nM hoặc 20nM, đã được tiêm trên bề mặt cảm biến bất hoạt kháng thể đơn dòng Bet v 1 khác nhau trong 10-12 giây, sau đó tiêm liên tiếp các kháng thể đơn dòng Bet v 1 khác nhau trong 6 phút với tốc độ 15 μ L/phút.

Sự liên kết của các kháng thể đơn dòng Bet v 1 khác với nBet v 1 liên kết với bề mặt cảm biến bất hoạt kháng thể đơn dòng được đo bằng Scrubber 2.0c. Các kết quả được trình bày trong Bảng 18. Tín hiệu liên kết dưới 1 RU (Đơn vị cộng hưởng) chỉ ra rằng không có liên kết nào được quan sát khi tiêm kháng thể đơn dòng Bet v 1, trong khi tín hiệu liên kết cao hơn (lớn hơn 2 RU) không biểu thị sự cạnh tranh. Tất cả ba kháng thể đơn dòng Bet v 1 có trong ví dụ này đều có thể liên kết đồng thời với nBet v 1 và đáp ứng liên kết không bị ảnh hưởng bởi thứ tự các kháng thể được thêm vào.

Bảng 18: Cạnh tranh liên kết đồng thời kháng thể kháng Bet 1

Liên kết liên tiếp của 3 kháng thể đơn dòng Bet v 1								
Kháng thể đơn dòng Bet v 1 bất hoạt trên bề mặt	Liên kết nBet v 1 (RU)	mAb-1	Liên kết mAb-1 (RU)		mAb-2	Liên kết mAb-2 (RU)	mAb-3	Liên kết mAb-3 (RU)
REGN5713	10	REGN5713	0		REGN5714	59	REGN5715	44
	11		0		REGN5715	48	REGN5714	53
	10	REGN5714	59		REGN5713	-3	REGN5715	43
	10		60		REGN5715	43	REGN5713	-6

	10	REGN5715	46	REGN5713	-4	REGN5714	54
	10		46	REGN5714	54	REGN5713	-5
REGN5714	14	REGN5713	67	REGN5714	-4	REGN5715	40
	14		63	REGN5715	38	REGN5714	-5
	13	REGN5714	1	REGN5713	48	REGN5715	30
	13		1	REGN5715	35	REGN5713	42
	12	REGN5715	42	REGN5713	47	REGN5714	-3
	12		40	REGN5714	-2	REGN5713	44
REGN5715	14	REGN5713	62	REGN5714	69	REGN5715	-5
	14		60	REGN5715	-4	REGN5714	67
	13	REGN5714	73	REGN5713	56	REGN5715	-5
	13		73	REGN5715	-3	REGN5713	54
	12	REGN5715	-1	REGN5713	51	REGN5714	65
	12		0	REGN5714	69	REGN5713	47

Dữ liệu đại diện cho trung bình ít nhất 3 lần tiêm độc lập kháng thể đơn dòng Bet v 1 so với phức hợp kháng thể đơn dòng nBet v 1 và kháng thể đơn dòng Bet v 1 bất hoạt

Tóm lược

Bất kể thứ tự liên kết kháng thể với Bet v 1, không có sự cạnh tranh nào cản trở sự liên kết đồng thời của cả ba kháng thể, cho thấy rằng REGN5713, REGN5714 và REGN5715 liên kết với các quyết định kháng nguyên không chồng chéo, khác biệt.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với Bet v 1 tự nhiên hoặc chiết xuất phần hoa bạch dương (BPE), trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó bao gồm:

(a) vùng xác định bổ sung chuỗi nặng (HCDR)1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 148; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 150; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 152; vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (LCDR)1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 156; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 158; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 160; hoặc

(b) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 292; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 294; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 296; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 300; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 302; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 304; hoặc

(c) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 100; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 102; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 104; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 108; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 110; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 112; hoặc

(d) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 116; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 118; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 120; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 124; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 126; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 128; hoặc

(e) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16; hoặc

(f) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 22; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 24; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 28; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 30; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 32; hoặc

(g) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 36; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 40; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 44; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 46; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48; hoặc

(h) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 52; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 54; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 56; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 60; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 62; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64; hoặc

(i) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 68; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 70; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 72; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 76; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 78; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 80; hoặc

(j) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 84; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 86; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 88; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 92; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 94; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 96; hoặc

(k) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 132; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 134; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 136; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 140; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 142; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 144; hoặc

(l) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 164; HCDR2 chứa

trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 166; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 168; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 172; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 174; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 176; hoặc

(m) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 180; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 182; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 184; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 188; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 190; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 192; hoặc

(n) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 196; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 198; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 200; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 204; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 206; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 208; hoặc

(o) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 212; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 214; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 216; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 220; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 222; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 224; hoặc

(p) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 228; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 230; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 232; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 236; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 238; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 240; hoặc

(q) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 244; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 246; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 248; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 252; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 254; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 256; hoặc

(r) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 260; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 262; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong

SEQ ID NO: 264; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 268; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 270; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 272; hoặc

(s) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 276; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 278; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 280; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 268; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 270; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 272; hoặc

(t) HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 284; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 286; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 288; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 268; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 270; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 272.

2. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó là kháng thể đơn dòng người đầy đủ.

3. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa cặp trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ (HCVR/LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 146/154, 290/298, 98/106, 114/122, 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 130/138, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/266, và 282/266.

4. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, bao gồm HCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 146 và LCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 154.

5. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó BPE là từ *Betula pendula*, *Betula nigra*, hoặc *Betula populifolia*.

6. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó phản ứng chéo với một hoặc nhiều chất gây dị ứng được chọn từ nhóm bao gồm Aln g1, Cor a1, Car b1, Que a1, Api g2,

Api g1, Dau c1, Mal d1, Ost c1, Fag s1, và Cas s1.

7. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với Bet v 1 với K_D bằng hoặc nhỏ hơn 10^{-8} M như được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt.

8. Dược phẩm chứa lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 và tá dược được dụng.

9. Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, bao gồm:

HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 148; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 150; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 152; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 156; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 158; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 160.

10. Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, bao gồm:

HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 292; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 294; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 296; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 300; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 302; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 304.

11. Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, bao gồm:

HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 100; HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 102; HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 104; LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 108; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 110; và LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 112.

12. Dược phẩm chứa lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 9 và tá dược được dụng.

13. Dược phẩm chứa lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể hoặc mảnh liên

kết kháng nguyên của nó theo điểm 10 và tá được được dụng.

14. Dược phẩm chứa lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 11 và tá được được dụng.

15. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, bao gồm HCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 290 và LCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 298.

16. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, chứa HCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 98 và LCVR chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 106.

17. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với mảnh trình tự axit amin Bet v 1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 307, 308, 309, 310, và 311.

18. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó ức chế Bet v 1 tự nhiên, BPE *Betula pendula*, BPE *Betula nigra*, hoặc BPE *Betula populifolia* liên kết với IgE đặc hiệu chất gây dị ứng.

Peptit Bet v 1 với sự bảo vệ đáng kể khi liên kết với H4H16992P

Bet v 1	1 phút Đotêri hóa			5 phút Đotêri hóa		
	Bet v 1	Bet v 1 + H4H16992P	Δ	Bet v 1	Bet v 1 + H4H16992P	Δ
	MH ⁺ trung tâm	MH ⁺ trung tâm		MH ⁺ trung tâm	MH ⁺ trung tâm	
23-38	1748,25	1747,47	-0,78	1749,37	1747,81	-1,56
23-41	2035,88	2035,14	-0,74	2037,97	2035,48	-2,49
23-43	2265,54	2264,25	-1,29	2267,30	2264,60	-2,70
26-43	1890,50	1889,99	-1,80	1891,61	1890,02	-1,58
29-43	1603,03	1602,35	-0,67	1603,78	1602,49	-1,29

Bet v 1	10 phút Đotêri hóa			20 phút Đotêri hóa		
	Bet v 1	Bet v 1 + H4H16992P	Δ	Bet v 1	Bet v 1 + H4H16992P	Δ
	MH ⁺ trung tâm	MH ⁺ trung tâm		MH ⁺ trung tâm	MH ⁺ trung tâm	
23-38	1750,00	1748,05	-1,95	1750,83	1748,28	-2,55
23-41	2038,68	2035,86	-2,82	2039,74	2035,62	-4,12
23-43	2267,93	2264,97	-2,97	2268,94	2265,22	-3,72
26-43	1892,36	1890,15	-2,22	1893,15	1890,20	-2,95
29-43	1604,51	1602,69	-1,82	1605,34	1602,76	-2,59

Fig. 1

Peptit Bet v 1 với sự bảo vệ đáng kể khi liên kết với H4H17082P

Bet v 1	1 phút Đotêri hóa			5 phút Đotêri hóa		
	Bet v 1	Bet v 1 + H4H17082P2	Δ	Bet v 1	Bet v 1 + H4H17082P2	Δ
Khoảng peptit	MH+ trung tâm	MH+ trung tâm	Δ	MH+ trung tâm	MH+ trung tâm	Δ
44-56	1289,33	1286,44	-2,89	1289,83	1286,68	-3,16
44-70	2948,26	2945,90	-2,36	2949,94	2946,68	-3,26
45-56	1174,64	1172,13	-2,50	1175,00	1172,18	-2,83
57-66	1172,15	1172,31	0,16	1172,33	1172,62	0,29
57-70	1678,31	1678,21	-0,10	1678,93	1678,90	-0,03

Bet v 1	10 phút Đotêri hóa			20 phút Đotêri hóa		
	Bet v 1	Bet v 1 + H4H17082P2	Δ	Bet v 1	Bet v 1 + H4H17082P2	Δ
Khoảng peptit	MH+ trung tâm	MH+ trung tâm	Δ	MH+ trung tâm	MH+ trung tâm	Δ
44-56	1290,49	1286,72	-3,77	1290,74	1286,91	-3,83
44-70	2950,45	2947,01	-3,45	2951,12	2947,05	-4,14
45-56	1175,04	1172,36	-2,69	1175,43	1172,49	-2,94
57-66	1172,48	1172,46	-0,02	1172,49	1172,61	0,12
57-70	1678,94	1678,82	-0,12	1679,17	1678,89	-0,28

Fig. 2

Peptit Bet v 1 với sự bảo vệ đáng kể khi liên kết với H4H17038P2

Bet v 1	1 phút Dotêri hóa			5 phút Dotêri hóa		
	Bet v 1	Bet v 1 + H4H17038P2	Δ	Bet v 1	Bet v 1 + H4H17038P2	Δ
Khoảng peptit	MH+ trung tâm	MH+ trung tâm		MH+ trung tâm	MH+ trung tâm	
2-19	1974,52	1972,83	-1,68	1975,52	1973,95	-1,57
5-10	758,44	758,01	-0,43	758,46	758,14	-0,31
5-19	1670,08	1669,3	-0,77	1670,94	1670,04	-0,9
8-19	1262,02	1261,68	-0,34	1262,96	1262,49	-0,46
11-19	929,74	929,46	-0,28	930,65	930,36	-0,29

Bet v 1	110 phút Dotêri hóa			20 phút Dotêri hóa		
	Bet v 1	Bet v 1 + H4H17038P2	Δ	Bet v 1	Bet v 1 + H4H17038P2	Δ
Khoảng peptit	MH+ trung tâm	MH+ trung tâm		MH+ trung tâm	MH+ trung tâm	
2-19	1976,06	1974,38	-1,68	1976,36	1974,98	-1,39
5-10	758,48	758,18	-0,31	758,55	758,18	-0,36
5-19	1671,51	1670,47	-1,04	1671,91	1670,92	-0,98
8-19	1263,31	1262,9	-0,41	1263,57	1263,28	-0,29
11-19	931,1	930,7	-0,4	931,41	931,11	-0,31

Fig. 3

Peptit Bet v 1 với sự bảo vệ đáng kể khi liên kết với H4H16987P

Bet v 1	1 phút Đotêri hóa			5 phút Đotêri hóa		
	Bet v 1	Bet v 1 + H4H16987P	Δ	Bet v 1	Bet v 1 + H4H16987P	Δ
Khoảng peptit	MH+ trung tâm	MH+ trung tâm	Δ	MH+ trung tâm	MH+ trung tâm	Δ
57-66	1172,27	1169,98	-2,38	1172,64	1170,04	-2,61
57-70	1678,61	1675,67	-2,94	1679,17	1676,05	-3,13
81-96	1731,22	1730,33	-0,89	1731,66	1730,77	-0,89
85-96	1162,24	1161,44	-0,79	1162,25	1161,74	-0,51
89-96	732,56	732,41	-0,19	732,57	732,52	-0,08

Bet v 1	10 phút Đotêri hóa			20 phút Đotêri hóa		
	Bet v 1	Bet v 1 + H4H16987P	Δ	Bet v 1	Bet v 1 + H4H16987P	Δ
Khoảng peptit	MH+ trung tâm	MH+ trung tâm	Δ	MH+ trung tâm	MH+ trung tâm	Δ
57-66	1172,74	1170,28	-2,46	1172,74	1170,46	-2,28
57-70	1679,38	1676,22	-3,16	1679,44	1676,44	-3
81-96	1731,67	1730,95	-0,72	1731,8	1731,27	-0,53
85-96	1162,27	1161,92	-0,34	1162,31	1162,06	-0,26
89-96	732,58	732,54	-0,08	732,62	732,53	-0,13

Fig. 4

Peptit Bet v 1 với sự bảo vệ đáng kể khi liên kết với kết hợp 4 kháng thể H4H16992P, H4H17082P, H4H17038P2 và H4H16987P

Bet v 1	1 phút Đơteri hóa			5 phút Đơteri hóa		
	Bet v 1	Kết hợp Bet v1	Δ	Bet v 1	Kết hợp Bet v1	Δ
Khoảng peptit	MH+ trung tâm	MH+ trung tâm		MH+ trung tâm	MH+ trung tâm	
2-19	1974,69	1973,29	-1,41	1975,83	1973,96	-1,89
5-19	1670,16	1670,00	-0,41	1671,12	1670,00	-1,14
23-41	2265,84	2264,15	-1,75	2267,69	2264,35	-3,39
23-43	1228,61	1227,58	-1,04	1229,22	1227,62	-1,62
44-70	2948,40	2942,57	-5,75	2950,06	2943,03	-6,94
57-66	1171,88	1169,99	-1,44	1172,10	1169,99	-1,70
81-96	1731,58	1729,88	-1,72	1731,64	1729,99	-1,67
84-96	1325,51	1324,33	-1,24	1325,43	1324,67	-1,67

Bet v 1	10 phút Đơteri hóa			20 phút Đơteri hóa		
	Bet v 1	Kết hợp Bet v1	Δ	Bet v 1	Kết hợp Bet v1	Δ
Khoảng peptit	MH+ trung tâm	MH+ trung tâm		MH+ trung tâm	MH+ trung tâm	
2-19	1976,61	1974,04	-2,59	1976,99	1974,04	-3
5-19	1671,77	1670,06	-1,74	1672,03	1670,12	-1,96
23-41	2268,43	2264,50	-3,98	2269,66	2264,72	-4,99
23-43	1230,15	1227,64	-2,52	1230,88	1227,71	-3,24
44-70	2950,52	2943,40	-7,03	2951,79	2943,42	-8,28
57-66	1172,18	1170,22	-1,56	1172,32	1170,09	-1,85
81-96	1731,76	1730,22	-1,57	1732,01	1730,61	-1,49
84-96	1325,53	1324,72	-1,57	1325,82	1324,98	-1,5

Fig. 5

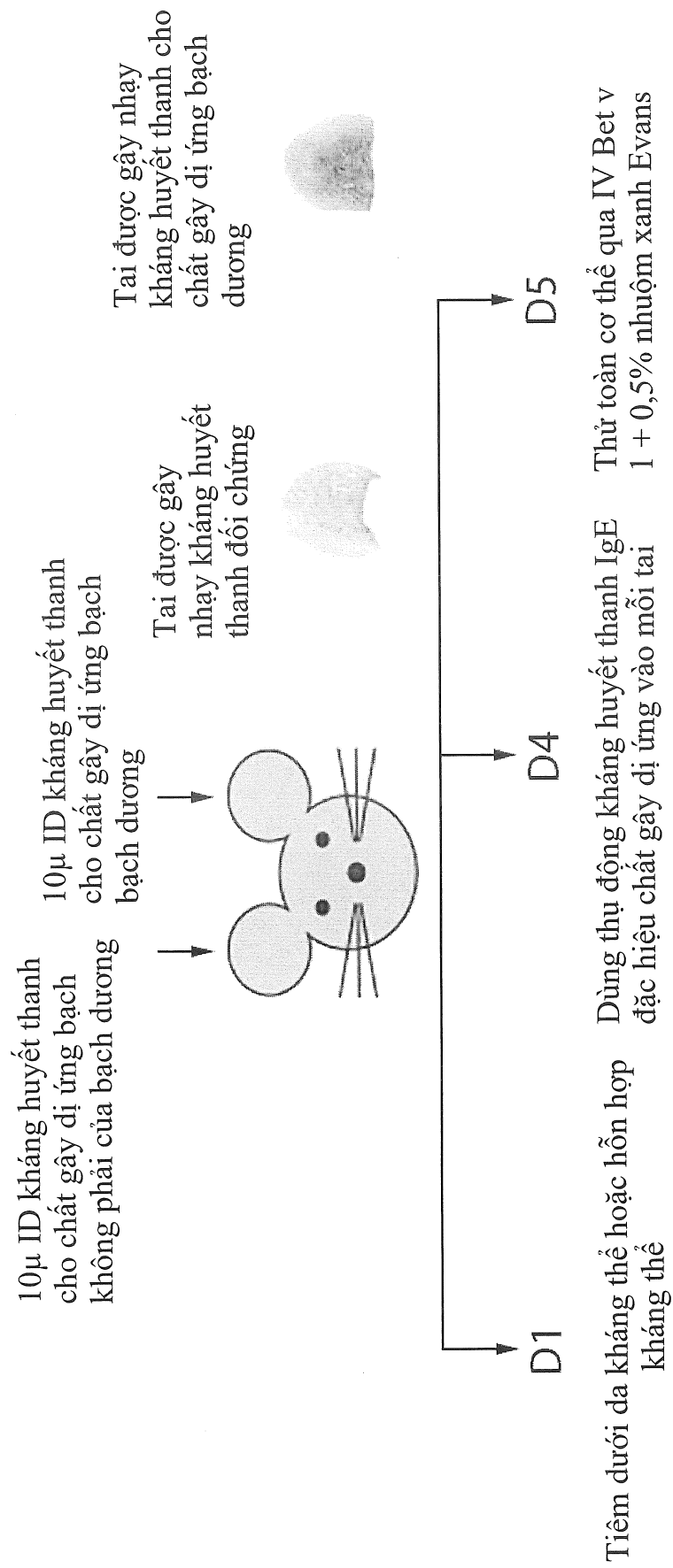


Fig. 6

Mô hình PCA sử dụng IgE của người đa dòng

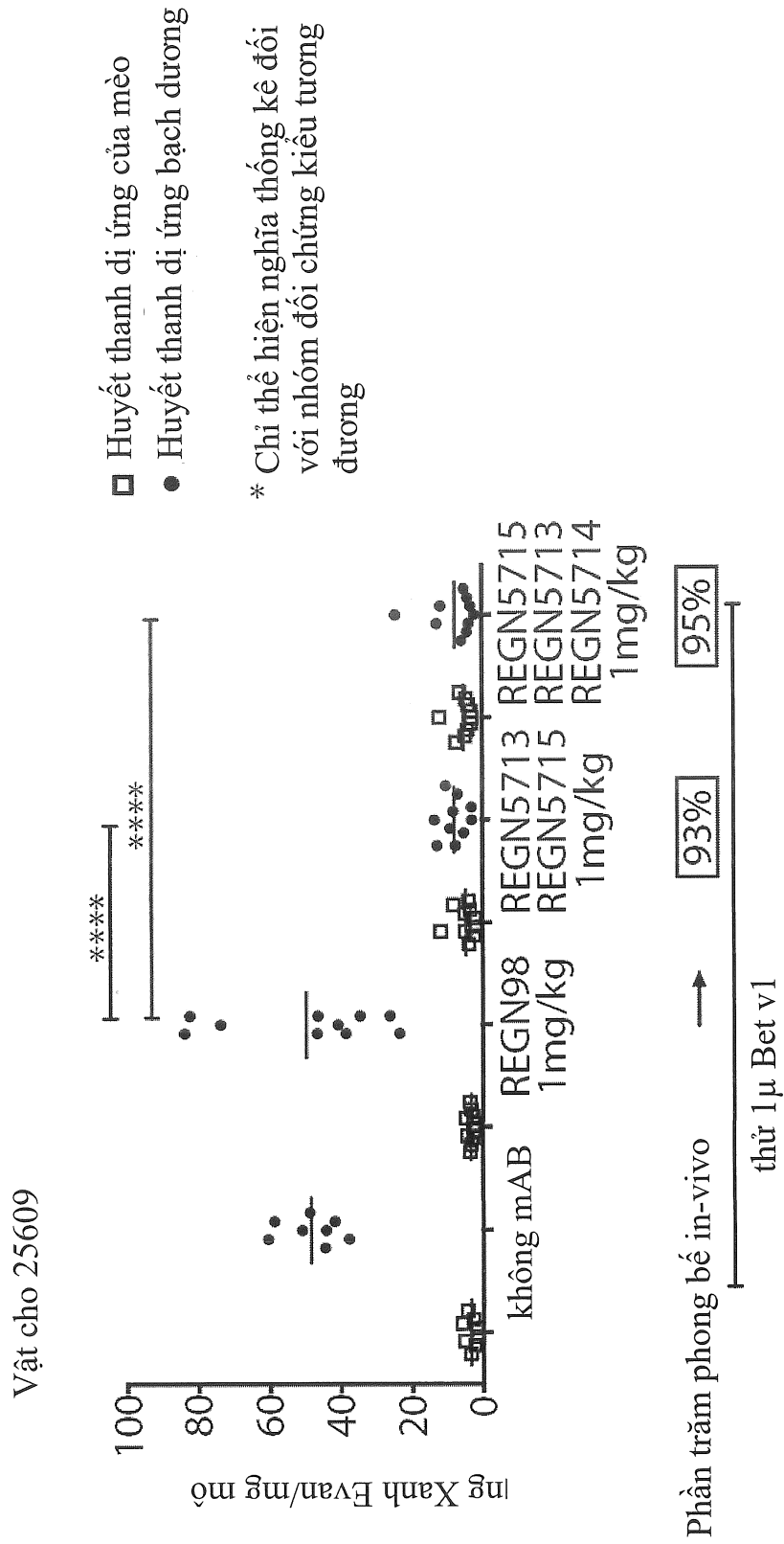


Fig. 7

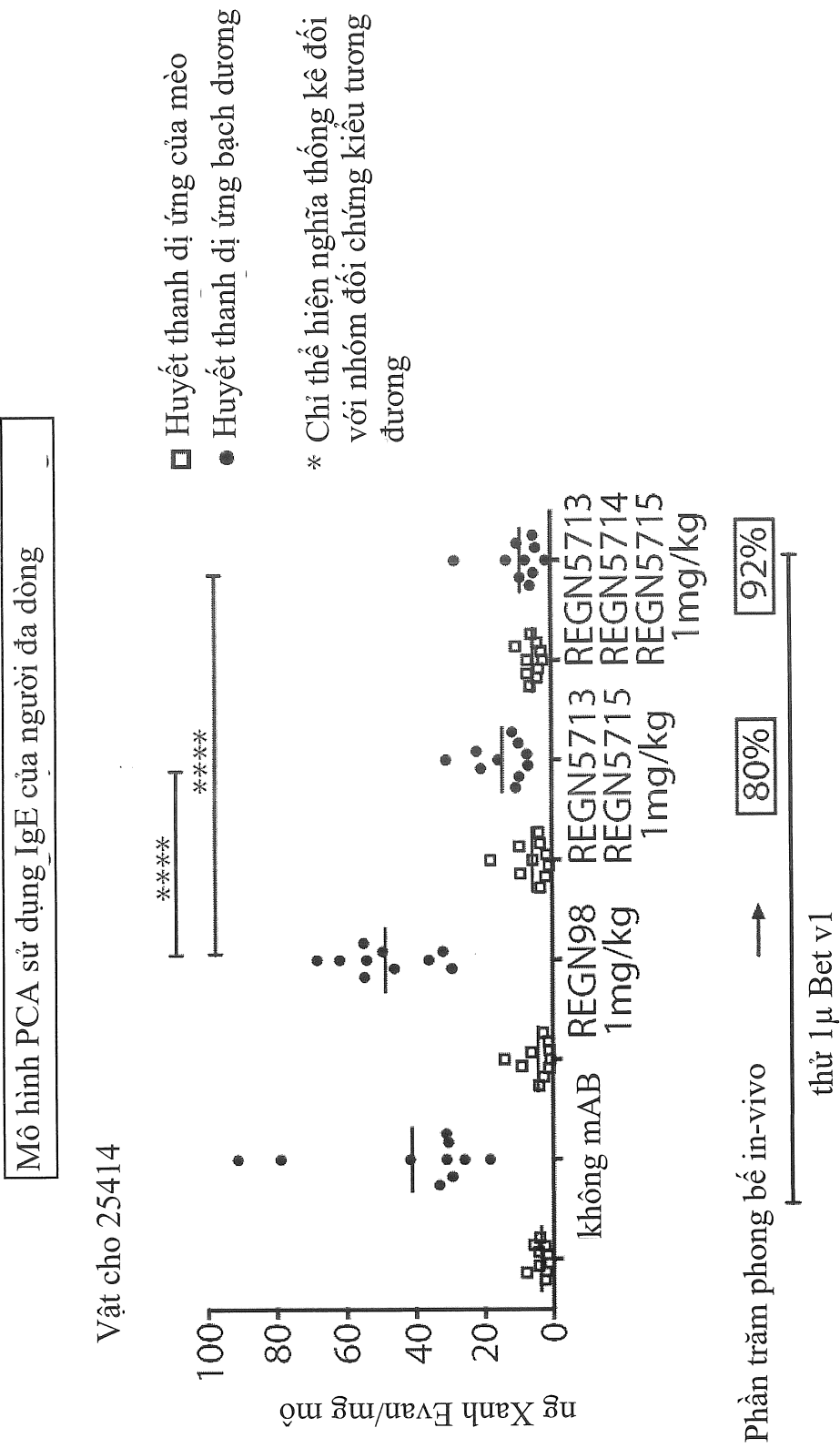


Fig. 7 (tiếp theo)

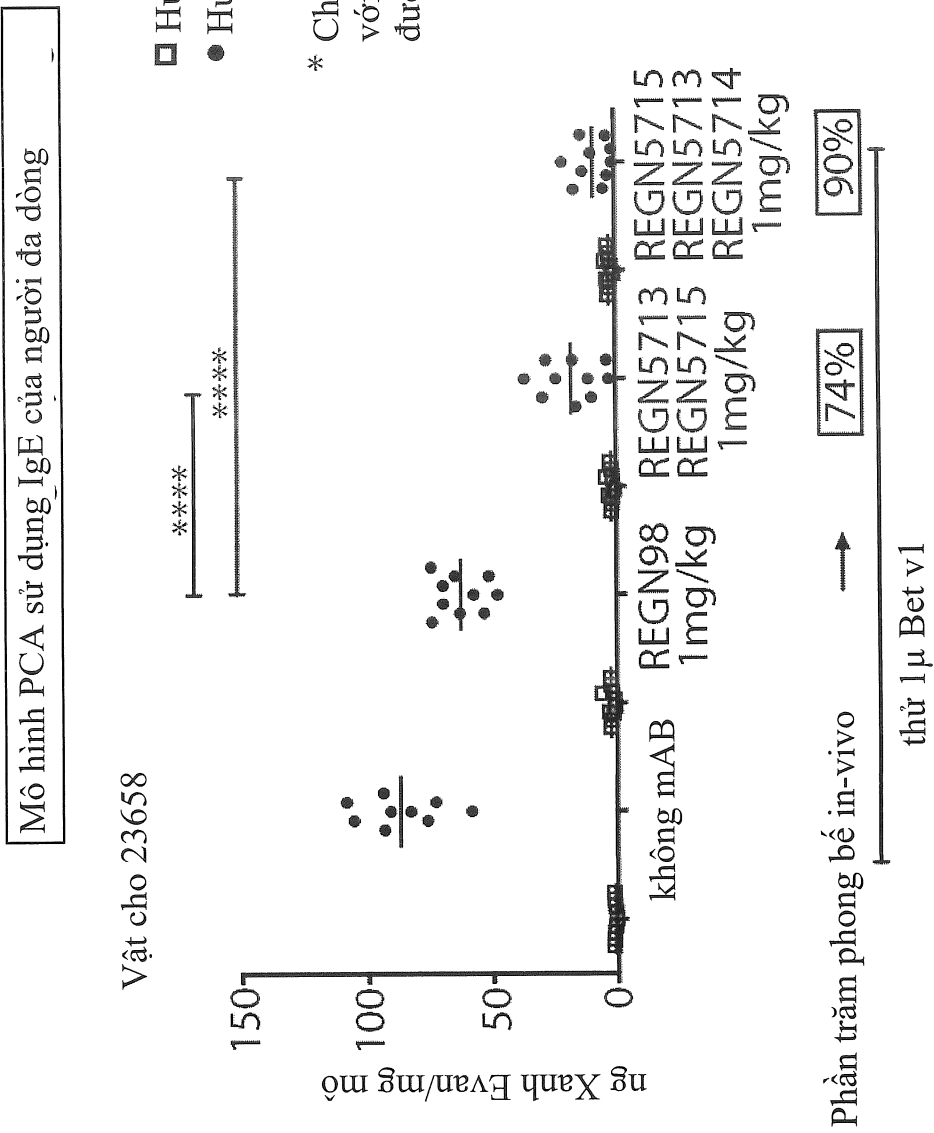


Fig. 7 (tiếp theo)

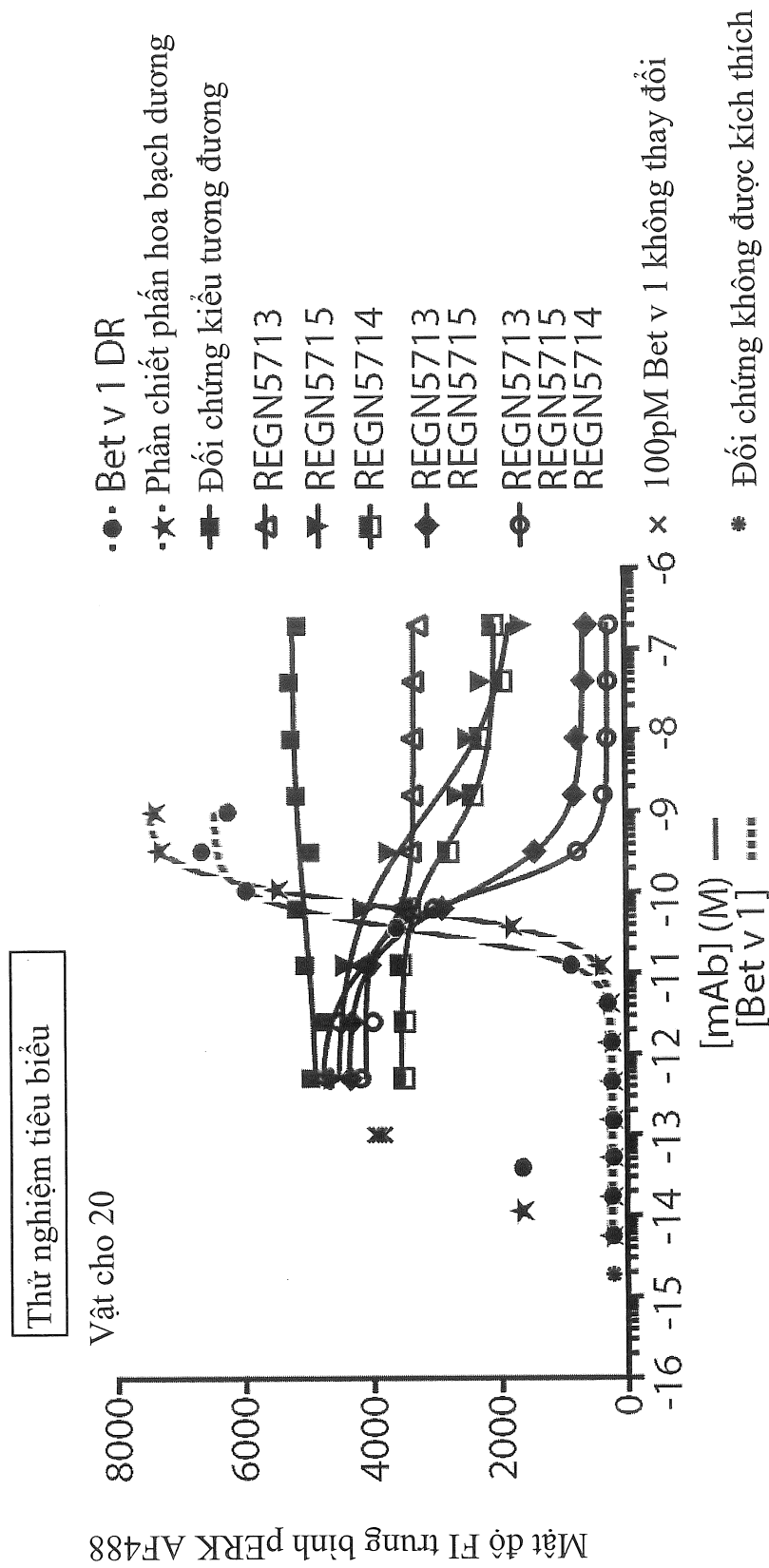


Fig. 8

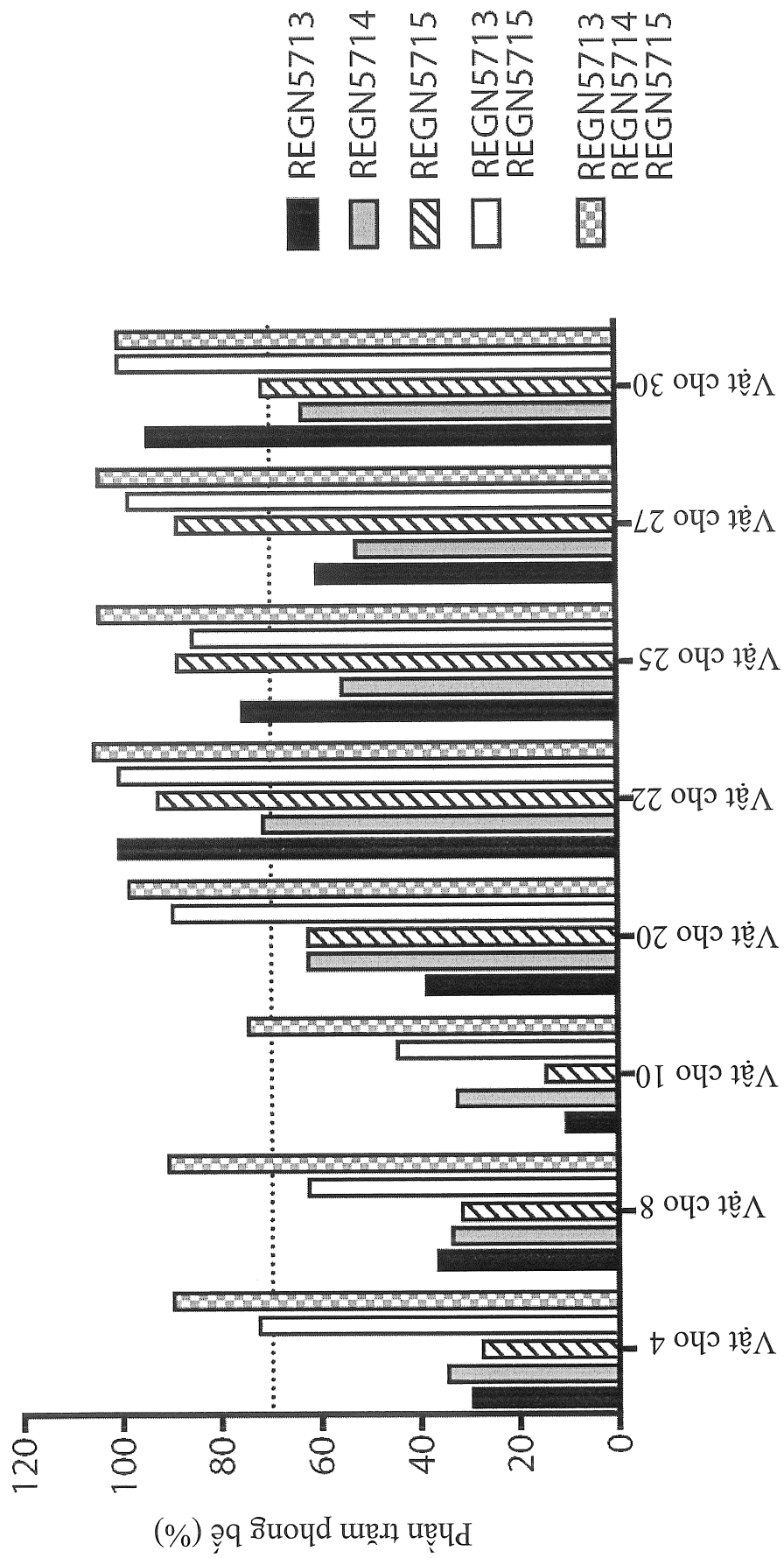


Fig. 8 (tiếp theo)

DANH SÁCH TRÌNH TỰ

- <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
 Orengo, Jamie M.
 Murphy, Andrew J.
 Badithe, Ashok T.
 Kamat, Vishal
 Liu, Yashu
- <120> KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG ĐƯỢC PHÂN LẬP LIÊN KẾT VỚI BET V 1 TỰ NHIÊN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY
- <130> 10301W001
- <140> TBD
 <141> 2018-05-31
- <150> 62/513,872
 <151> 2017-06-01
- <150> 62/571,696
 <151> 2017-10-12
- <150> 62/662,165
 <151> 2018-04-24
- <160> 323
- <170> PatentIn phiên bản 3.5
- <210> 1
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
 <223> Tổng hợp
- <400> 1
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtacag cctctggatt catgtctagt atgtattgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtgtccaac ataaagcaag atggaactga gaaaaactat 180
 gtggagtctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaataa acagcctgag aggcgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatctg 300
 tatagcagtt cgtccggcta ctattactac ggtttggacg tctggggcca agggaccacg 360
 gtcaccgtct cctca 375
- <210> 2
 <211> 125

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 2

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 Thr Ala Ser Gly Phe Met Ser Ser Met Tyr
 20 25 30

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

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

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

Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Leu Tyr Ser Ser Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu
 100 105 110

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

<210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 3
 ggattcatgt ctagtatgta ttgg

24

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 4

Gly Phe Met Ser Ser Met Tyr Trp
1 5

<210> 5
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 5
ataaagcaag atggaactga gaaa

24

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 6

Ile Lys Gln Asp Gly Thr Glu Lys
1 5

<210> 7
<211> 54
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 7
gcgagagatc tgtatagcag ttcgtccggc tactattact acggtttgga cgtc

54

<210> 8
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 8

Ala Arg Asp Leu Tyr Ser Ser Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Leu
 1 5 10 15

Asp Val

<210> 9

<211> 336

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 9

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaata aatacaatta tttggattgg 120
 tacctgcaga agccaggga gtctccacag ctctgatct atttgagttc taatcgggcc 180
 tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggctcaggca cagaatttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgttggtatt tattactgca tgcaagctct acacactccg 300
 ctcactttcg gcggaggga caaggtggag atcaaa 336

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 10

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Lys Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ser Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu His Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 11

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 11

cagagcctcc tgcataagtaa taaatacaat tat

33

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 12

Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Lys Tyr Asn Tyr
1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 13

ttgagttct

9

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 14

Leu Ser Ser
1

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 15
atgcaagctc tacacactcc gctcact

27

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 16

Met Gln Ala Leu His Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 17
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 17
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggttcagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgtag cctctggatt caccttcagt aattatgaca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccaggggagg ggctggaatg gatttcatac attagttata gtgatcataa catatactat 180
atagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctatit attactgtgc gagagaggcc 300
ctagcatcat cttcctttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 18
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 18

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

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

Asp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Tyr Ser Asp His Asn Ile Tyr Tyr Ile Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Leu Ala Ser Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 19

ggattcacct tcagtaatta tgac

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 20

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Asp
 1 5

<210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 21
 attagttata gtgatcataa cata

24

<210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 22

Ile Ser Tyr Ser Asp His Asn Ile
 1 5

<210> 23
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 23
 gcgagagagg ccctagcatc atcttccttt gactac

36

<210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 24

Ala Arg Glu Ala Leu Ala Ser Ser Ser Phe Asp Tyr

1

5

10

<210> 25

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 25

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagtcacc 60

ctctcctgca gggccagtc gagtggttagt ggcaacttag cctggtacca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatagt gcatccaccg gggccactgg tgtcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtct 240

gaagattttg cactttatta ctgtcagcag tataataaat ggcctcggac gatcggccaa 300

gggaccaagg tggaatcaa a 321

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 26

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Gly Asn

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Ser Ala Ser Thr Gly Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Lys Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Ile Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 27
cagagtgtta gtggcaac

18

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 28

Gln Ser Val Ser Gly Asn
1 5

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 29
agtgcattcc

9

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 30

Ser Ala Ser
 1

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 31
 cagcagtata ataaatggcc tcggacg

27

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 32

Gln Gln Tyr Asn Lys Trp Pro Arg Thr
 1 5

<210> 33
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 33
 caggttcagc tggatgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaaga cttctggtta cacctttacc aactatggta tcacctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag gacttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
 gcacagaatg tccagggcag agtcactatg accacggaca catccacgag cacagcctac 240
 atggagggtga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaagaagc 300
 agcatgttac acttcagca ctggggccag ggcaccctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 34
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 34

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Asn Val
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Ser Ser Met Leu His Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 35
 ggttacacct ttaccaacta tgggt

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 36

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 37
 atcagcgctt acaatggtaa caca

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 38

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
 1 5

<210> 39
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 39
 gcgagaagaa gcagcatgtt acacttccag cac

33

<210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 40

Ala Arg Arg Ser Ser Met Leu His Phe Gln His
 1 5 10

<210> 41

<211> 339

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 41

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gcatgtttta tacgactcca gtaatgagaa ctacttagct 120
 tggttccagc agaagccagg acagcctcct aaactttctca ttctactgggc atctaccgg 180
 gaatccggggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtc tgcaggctga agatgtggcg gtttattact gtcagcaata ttctagtgtc 300
 ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

<210> 42

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 42

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln His Val Leu Tyr Asp
 20 25 30

Ser Ser Asn Glu Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 43
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 43
cagcatgttt tatacgactc cagtaatgag aactac

36

<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 44

Gln His Val Leu Tyr Asp Ser Ser Asn Glu Asn Tyr
1 5 10

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 45
tgggcatct

9

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 46

Trp Ala Ser
 1

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 47
 cagcaatatt ctagtgctcc gtacact

27

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 48

Gln Gln Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 49
 cagctgcagc tgcaggagtc gggcccaggg ctggtgaggc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtaatt actggtgggg ctggatccgc 120
 cagcccccag ggaaggggct ggagtggatt ggtagtatct attatagcgg gatcacctac 180
 tacaaccggt ccctcaagag tcgagtcacc atatccgcgg acacgtctaa ggaccagttc 240

tccctgaagc tgaggctctgt gaccgccgcg gacacggctg tgtattactg tgcgaaattg 300
 gagtggctgc gcttggactt ctggggccag ggaaccacgg tcaccgtctc ctca 354

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 50

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Asn Tyr Trp Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asp Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Lys Leu Glu Trp Leu Arg Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 51
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 51
ggtaggctcca tcagcagtag taattactgg

30

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 52

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser Asn Tyr Trp
1 5 10

<210> 53
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 53
atctattata gcgggatcac c

21

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 54

Ile Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr
1 5

<210> 55
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 55
gcgaaattgg agtggctgcg cttggacttc

30

<210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 56

Ala Lys Leu Glu Trp Leu Arg Leu Asp Phe
 1 5 10

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 57
 gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca ggggtattagt agctgggttag tctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagtcc ccaagctcct gatctatgct gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatta 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaaaagtt tccctctcac cttcggccaa 300
 gggacacgac tggagattaa a 321

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 58

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Leu Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Lys Ser Phe Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 59
 cagggtatta gtagctgg

18

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 60

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 61
 gctgcatcc

9

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 62

Ala Ala Ser
 1

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 63
 caacaggcta aaagtttccc tctcacc

27

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 64

Gln Gln Ala Lys Ser Phe Pro Leu Thr
 1 5

<210> 65
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 65
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt cgcaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtgggagtt atatgggtctg atggaagtga taaaaagtat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

cttcttatga acagcctgag agacgatgac acggctgtgt atcactgtgc gagagagggg 300
 gggttccttt atagcagctc gtcccacttt gactactggg gccaggggaac cctgggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 66
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 66

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

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

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

Gly Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Asp Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Leu Met Asn Ser Leu Arg Asp Asp Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Phe Leu Tyr Ser Ser Ser Ser His Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 67

ggattcacct tcagtagcta tggc

24

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 68

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1

5

<210> 69

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 69

atatggtctg atggaagtga taaa

24

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 70

Ile Trp Ser Asp Gly Ser Asp Lys

1

5

<210> 71

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 71

gcgagagagg gggggttcct ttatagcagc tcgtcccact ttgactac

48

<210> 72
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 72

Ala	Arg	Glu	Gly	Gly	Phe	Leu	Tyr	Ser	Ser	Ser	Ser	His	Phe	Asp	Tyr
1				5				10						15	

<210> 73
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 73

gccatccaga	tgaccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	ggacaagtca	gggcattaga	aatgatttag	gctggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaaactcct	gatctttgct	gcatccagtt	tacaaagtgg	ggtcccatca	180
aggttcagcg	gcagtggatc	tggcacagat	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagcct	240
gaagattttg	caatttatta	ctgtctacaa	gattacaagt	accatttcac	tttcggcgga	300
gggaccaagg	tggagatcaa	a				321

<210> 74
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 74

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Thr	Ser	Gln	Gly	Ile	Arg	Asn	Asp
			20					25					30		

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Tyr Lys Tyr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 75
 cagggcatta gaaatgat

18

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 76

Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 77
 gctgcatcc

9

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 78

Ala Ala Ser
 1

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 79
 ctacaagatt acaagtaccc attcact

27

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 80

Leu Gln Asp Tyr Lys Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 81
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 81
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctgggtt caccttcagt tcctatggcc tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcagatg atggaagtta taaattctat 180

gcagactcca tgaagggccg attcaccatc tctagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaata acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaagatcgg 300
 ggctgcagtg gctgggtacta ctttgactac tggggccagg gaaccctggg cactgtctcc 360
 tca 363

<210> 82
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 82

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

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

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

Ala Val Ile Ser Asp Asp Gly Ser Tyr Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Met
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Arg Gly Arg Ser Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 83

gggttcacct tcagttccta tggc

24

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 84

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1

5

<210> 85

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 85

atatcagatg atggaagtta taaa

24

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 86

Ile Ser Asp Asp Gly Ser Tyr Lys

1

5

<210> 87

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 87
gcgaaagatc ggggtcgcag tggctggtac tactttgact ac

42

<210> 88
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 88

Ala Lys Asp Arg Gly Arg Ser Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 89
gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
agggtcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tatgatagtt attctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 90

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Ser Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 91
 cagagtatta gtagctgg

18

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 92

Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 93
aaggcgtct

9

<210> 94
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 94

Lys Ala Ser
1

<210> 95
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 95
caacagtatg atagttattc tcggacg

27

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 96

Gln Gln Tyr Asp Ser Tyr Ser Arg Thr
1 5

<210> 97
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 97
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagac ttggtacagc ctggagggtc cctgagactc

60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatgaaa tgaactgggt ccgccaggct

120

ccaggggaagg gtctggagtg ggtttcattc attagtata gtagtagtaa catatactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa gtcactgtat 240
cttcaaataa ccagcctgag ggccgaggac acggctgttt attactgtgc gagagaagcc 300
attggcagca cctcctttga caactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 98
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 98

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

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

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

Ser Phe Ile Ser Asp Ser Ser Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Ile Gly Ser Thr Ser Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

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

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 99

ggattcacct tcagtagtta tgaa

24

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 100

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Glu

1

5

<210> 101

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 101

attagtgata gtagtagtaa cata

24

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 102

Ile Ser Asp Ser Ser Ser Asn Ile

1

5

<210> 103

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 103
gcgagagaag ccattggcag cacctccttt gacaac

36

<210> 104
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 104

Ala Arg Glu Ala Ile Gly Ser Thr Ser Phe Asp Asn
1 5 10

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 105
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagtttag cctggtacca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggcgcct catctatagt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
gaagattttg caatttatta ctgtcatcaa tataataact ggcctctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 106

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 107
 cagagtgtta gcagcagt

18

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 108

Gln Ser Val Ser Ser Ser
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 109
agtgcaccc

9

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 110

Ser Ala Ser
1

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 111
catcaatata ataactggcc tctcact

27

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 112

His Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 113
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 113
gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttgggtccagc ctgggggggtc cctgagactc

60

tcctgtgcag cctctggggtt caccgtcagt agcaactcca tgagctgggt ccgccaggct

120

ccaggggagg ggctggagtg ggtctcagtt attttttagcg gtggtatcac atactactca 180
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agacacaatt ccaagaacac gctgtatctt 240
caaatgaaca gcctgagaac tgaggacacg gccgtatatt actgtgcgcg tcattctaac 300
tggaactttg atgcttttga tatctggggc caagggacaa tggtcaccgt ctcttca 357

<210> 114
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 114

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

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

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

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg His Ser Asn Trp Asn Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

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

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 115

gggttcaccg tcagtagcaa ctcc

24

<210> 116

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 116

Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn Ser

1

5

<210> 117

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 117

atatttagcg gtggtatcac a

21

<210> 118

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 118

Ile Phe Ser Gly Gly Ile Thr

1

5

<210> 119

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 119
gcgcgtcatt ctaactggaa ctttgatgct tttgatatc

39

<210> 120
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 120

Ala Arg His Ser Asn Trp Asn Phe Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 121
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagctttgac acctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct acatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg gaacttacta ttgtcaacag agttacagta tcccgtacac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 122

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Phe Asp Thr Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 123
 cagagctttg acacctat

18

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 124

Gln Ser Phe Asp Thr Tyr
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 125
gctacatcc

9

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 126

Ala Thr Ser
1

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 127
caacagagtt acagtatccc gtacact

27

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 128

Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Tyr Thr
1 5

<210> 129
<211> 354
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 129
caggtgcagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaggaagc ctggggcctc agtgaaggctc

60

tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactatc tacactgggt gcgacaggcc

120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggattg atcaacccta atactggtgg cacaaacttt 180
gcacagaaat ttcagggcag ggtcaccatg accagggact cgtcaatcag cgcagcctac 240
atggaactga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagacaacac 300
tggaaccgtt attttgacaa ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 130
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 130

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

Gly Leu Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Asn Phe Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Ser Ser Ile Ser Ala Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gln His Trp Asn Arg Tyr Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

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

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 131

ggatacacct tcaccggcta ctat

24

<210> 132

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 132

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr

1

5

<210> 133

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 133

atcaacccta atactggtgg caca

24

<210> 134

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 134

Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr

1

5

<210> 135

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 135
gcgagacaac actggaaccg ttattttgac aac

33

<210> 136
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 136

Ala Arg Gln His Trp Asn Arg Tyr Phe Asp Asn
1 5 10

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 137
gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcct ctgttgaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gagggttggt aactgggttg cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatccaagag gcgtccagta tagaaagtgg ggtcccatca 180
agggtcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctta tcgtcagcag cctgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attcgtggac gttcggccac 300
gggaccaagg tggaatcaa a 321

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 138

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Gln Glu Ala Ser Ser Ile Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile Val Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 139

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 139

cagagtgttg gtaactgg

18

<210> 140

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 140

Gln Ser Val Gly Asn Trp
 1 5

<210> 141

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 141
gaggcgtcc

9

<210> 142
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 142

Glu Ala Ser
1

<210> 143
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 143
caacagtata atagttattc gtggacg

27

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 144

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Trp Thr
1 5

<210> 145
<211> 348
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 145
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc

60

acctgctctg tctctggtgg ctccatcact aattacttct ggacctggat ccggcagtc

120

ccaggggaagg gactggaatg gattgggtat atctattaca gtgggggcac caactataac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca atagacacgt ccaagaacca attctccctg 240
 aatatgaatt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtctatt actgtgcggg gagctactac 300
 tacggtgtgg acgtctgggg ccaagggacc acggtcaccg tctcctca 348

<210> 146
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 146

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Asn Tyr
 20 25 30

Phe Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Asn Met Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

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

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 147

ggtggctcca tcactaatta cttc

24

<210> 148

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 148

Gly Gly Ser Ile Thr Asn Tyr Phe

1

5

<210> 149

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 149

atctattaca gtgggggcac c

21

<210> 150

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 150

Ile Tyr Tyr Ser Gly Gly Thr

1

5

<210> 151

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 151
gcggggagct actactacgg tgtggacgtc

30

<210> 152
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 152

Ala Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly Val Asp Val
1 5 10

<210> 153
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 153
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtattaaa agcttcttag cctgggtaccg acagaaacct 120
ggccaggctc ccagactcct catctatgat gcatccaaca ggcccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcaacag cctagagtct 240
gaagattttg cagttttattt ctgtcagcag cgtaacaact ggccattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 154
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 154

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Lys Ser Phe
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Pro Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Arg Asn Asn Trp Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 155
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 155
 cagagtatta aaagcttc

18

<210> 156
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 156

Gln Ser Ile Lys Ser Phe
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 157
gatgcatcc

9

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 158

Asp Ala Ser
1

<210> 159
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 159
cagcagcgta acaactggcc attcact

27

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 160

Gln Gln Arg Asn Asn Trp Pro Phe Thr
1 5

<210> 161
<211> 375
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 161
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtcaagc ctggagggtc cctgagactc

60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgaactggat ccgccaggct

120

ccaggaaagg ggctagagtg gatttcactc attagtagta gtggtagtgc catatattac 180
tcagactctg tgaagggccg attcaccata tccagggaca atgccaggaa atcactgtat 240
ctgcaagtga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gagagatcgg 300
ggggagtgagg ccctcggagc ctactactac ggtttggacg tctggggcca agggaccacg 360
gtcaccgtct cctca 375

<210> 162
<211> 125
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 162

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

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

Tyr Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ser Leu Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Ile Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Arg Gly Glu Trp Ala Leu Gly Ala Tyr Tyr Tyr Gly Leu
100 105 110

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

<210> 163
<211> 24

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 163
 ggattcacct tcagtgacta ctac

24

<210> 164
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 164
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
 1 5

<210> 165
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 165
 attagtagta gtggtagtgc cata

24

<210> 166
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 166
 Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Ile
 1 5

<210> 167
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>

<223> Tổng hợp

<400> 167

gcgagagatc ggggggagtg ggccctcgga gcctactact acggtttgga cgtc

54

<210> 168

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 168

Ala	Arg	Asp	Arg	Gly	Glu	Trp	Ala	Leu	Gly	Ala	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Leu
1				5					10					15	

Asp Val

<210> 169

<211> 336

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 169

gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca gaggcctccta catagtgatg gatacaacta tttggattgg 120

tacctgcaga agtcagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 180

tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240

agcagaatgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaactccg 300

tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaa 336

<210> 170

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 170

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ser Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 171
 cagagcctcc tacatagtga tggatacaac tat

33

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 172

Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Tyr Asn Tyr
 1 5 10

<210> 173
 <211> 9

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 173
 ttgggttct

9

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 174

Leu Gly Ser
 1

<210> 175
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 175
 atgcaagctc tacaaactcc gtacact

27

<210> 176
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 176

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 177
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 177

```
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgctgac actactggag ctggatccgc      120
cagcagccag ggaagggcct ggaatggatt gggtagattt cttatagagg gacaacctac      180
tacaacccga ccctcgagag tcgtgttagc atttcagtag acacgtttta gaatcaattc      240
tccctgatgt tgcactccgt gactgtcgcg gacacggccg tgtattattg tgcgaaagta      300
ctccaagggc tcgtcagatt cagggactac ggtttcgacg tctggggcca agggaccacg      360
gtcaccgtct cctca                                     375
```

<210> 178

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 178

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1              5              10             15
```

```
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ala
20              25             30
```

```
Asp His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35              40             45
```

```
Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Thr
50              55             60
```

```
Leu Glu Ser Arg Val Ser Ile Ser Val Asp Thr Phe Lys Asn Gln Phe
65              70             75             80
```

```
Ser Leu Met Leu His Ser Val Thr Val Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85              90             95
```

```
Cys Ala Lys Val Leu Gln Gly Leu Val Arg Phe Arg Asp Tyr Gly Phe
100             105            110
```

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

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 179
 ggtggctcca tcagcagtc tgatcactac

30

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 180

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ala Asp His Tyr
 1 5 10

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 181
 atttcttata gagggacaac c

21

<210> 182
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 182

Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Thr
 1 5

<210> 183
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 183
 gcgaaagtac tccaagggtc cgtcagattc agggactacg gtttcgacgt c 51

<210> 184
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 184

Ala	Lys	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Val	Arg	Phe	Arg	Asp	Tyr	Gly	Phe	Asp
1				5				10						15	

Val

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 185
 gacatccagt tgaccagtc tccacccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggccagtca ggacattagc agttatttag cctgggtatca gcaaaatccc 120
 gggaaatccc ctaaactcct gatctatgat gcttttactt tacacactgg ggtcccatca 180
 aggttttagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaggattttg caacttttta ctgtcaacac ctttatagtt ttccattcac tttcgggcct 300
 gggaccaaag tggatatcaa a 321

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

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 186

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Pro Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Phe Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Phe Tyr Cys Gln His Leu Tyr Ser Phe Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 187

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 187

caggacatta gcagttat

18

<210> 188

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 188

Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
1 5

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 189
gatgctttt

9

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 190

Asp Ala Phe
1

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 191
caacaccttt atagttttcc attcact

27

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 192

Gln His Leu Tyr Ser Phe Pro Phe Thr
1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 193
 gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcgggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagg aattatgcca tgcactgggt ccgacaagct 120
 ccaggggagg gcctggagtg ggtcgcagcc atttatcgga atagtgattc catagactat 180
 gcggactctg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca acgccaagaa ctccctatat 240
 ctgcaaatga acagtctgaa aactgaggac acggcgttgt attactgtgc aaaagatgag 300
 ggatttttgg agtactttga ctcttggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctctca 357

<210> 194
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 194

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

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

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

Ala Ala Ile Tyr Arg Asn Ser Asp Ser Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Glu Gly Phe Leu Glu Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 195
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 195
 ggattcacct ttaggaatta tgcc

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 196

Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr Ala
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 197
 atttatcgga atagtgattc cata

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 198

Ile Tyr Arg Asn Ser Asp Ser Ile
1 5

<210> 199
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 199
gcaaaagatg agggattttt ggagtacttt gactcc

36

<210> 200
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 200

Ala Lys Asp Glu Gly Phe Leu Glu Tyr Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 201
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 201
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagcctcc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagcttct tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctac ggtgtatcca gcaggttcat tggcatccca 180
gacaggttca gtggcggtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcac cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatggta ggccaccgtg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaa 324

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

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 202

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

Glu Arg Ala Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Val Ser Ser Arg Phe Ile Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 203

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 203

cagagtgtta gcagcagctt c

21

<210> 204

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 204

Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe
1 5

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 205
ggtgtatcc

9

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 206

Gly Val Ser
1

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 207
cagcagtatg gtaggtcacc gtggacg

27

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 208

Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 209
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 209
 cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgctgactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agatatgcc a tacattgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg gactggaatg ggtggcagtt atatcatatg atggagatga taaatactat 180
 ggagactccg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca attccaagac catggtgtat 240
 ctgcacatga acagcctgag aactgaggac acggctgtgt attattgtgc gaaagatgga 300
 tatagtctct acgggaagga ctactttgac tattggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 210

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asp Asp Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Thr Met Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Asp Gly Tyr Ser Leu Tyr Gly Lys Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 211
 ggattcacct tcagtagata tgcc

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 212

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Ala
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 213
 atatcatatg atggagatga taaa

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 214

Ile Ser Tyr Asp Gly Asp Asp Lys
1 5

<210> 215

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 215

gcgaaagatg gatatagtct ctacgggaag gactactttg actat

45

<210> 216

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 216

Ala Lys Asp Gly Tyr Ser Leu Tyr Gly Lys Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 217

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 217

gaaattgtgt tgacacagtc tccaggcacc ctgcctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtattacc aacagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctgaccagg ctcccagact cctcatctat ggtgcgtcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtga gtctgggaca gactttactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatgtta ggtcaccgtg gacgttcggc 300

caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 218

<211> 108

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 218

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Thr Asn Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Val Arg Ser Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 219
 cagagtatta ccaacagcta c

21

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 220

Gln Ser Ile Thr Asn Ser Tyr
1 5

<210> 221

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 221

ggtgcgtcc

9

<210> 222

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 222

Gly Ala Ser

1

<210> 223

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 223

cagcagtatg ttaggtcacc gtggacg

27

<210> 224

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 224

Gln Gln Tyr Val Arg Ser Pro Trp Thr

1

5

<210> 225
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 225
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cctcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgttg tctatggtga gtctttcggg aattaccatt ggaattggat ccgccagttc 120
 ccagggaagc ggctggagtg gattggggaa atcaatcaaa atggacacac caattacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtggacacgt ccaagatcca attttcctg 240
 agactgaact ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt tctgtgagag aggccataac 300
 tacgtaaatt cctacttcgg tttggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 226
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 226

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Val Val Tyr Gly Glu Ser Phe Gly Asn Tyr
 20 25 30

His Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Gln Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ile Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Arg Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Gly His Asn Tyr Val Asn Ser Tyr Phe Gly Leu Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 227
ggtgagtctt tcggttaatta ccat

24

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 228

Gly Glu Ser Phe Gly Asn Tyr His
1 5

<210> 229
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 229
atcaatcaaa atggacacac c

21

<210> 230
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 230

Ile Asn Gln Asn Gly His Thr
1 5

<210> 231

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 231

gcgagaggcc ataactacgt aaattcctac ttcggtttgg acgtc

45

<210> 232

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 232

Ala Arg Gly His Asn Tyr Val Asn Ser Tyr Phe Gly Leu Asp Val
1 5 10 15

<210> 233

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 233

gaaattgtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca ggaccagtca gagtgtgaagc atcagcttag cctggtacca gcggaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctttggt tcatccacca gggccactgg tgtcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240

gaagattttg cagttttatta ctgtcagcag tataataact ggccgtacac ttttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 234
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 234

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Gln Ser Val Ser Ile Ser
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Phe Gly Ser Ser Thr Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 235
 cagagtgtaa gcatcagc

18

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

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 236

Gln Ser Val Ser Ile Ser
1 5

<210> 237

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 237

ggttcatcc

9

<210> 238

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 238

Gly Ser Ser

1

<210> 239

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 239

cagcagtata ataactggcc gtacact

27

<210> 240

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 240

Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 241
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 241
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcgcc gccactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacactt acactggtgg cacaaactat 180
gggcagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcac cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgttt attactgtgc gcgagatcgg 300
cggaactgga acttcgtctt tgaatattgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 242
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 242

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Ala His
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Gly Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

40211

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

Ala Arg Asp Arg Arg Asn Trp Asn Phe Val Phe Glu Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 243
ggatacacct tcgccgccca ctat

24

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 244

Gly Tyr Thr Phe Ala Ala His Tyr
1 5

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 245
atcaacactt acactggtgg caca

24

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

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 246

Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Gly Thr
1 5

<210> 247

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 247

gcgcgagatc ggcggaactg gaacttcgtc tttgaatat

39

<210> 248

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 248

Ala Arg Asp Arg Arg Asn Trp Asn Phe Val Phe Glu Tyr
1 5 10

<210> 249

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 249

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcagttgcc gggcaagtca gaacattaag aactatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaaactcct gatctatgaa gcatctaatt tgcaaagtgg ggcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctggaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agtttttagta ttccgtggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 250
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 250

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Lys Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Glu Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 251
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 251
 cagaacatta agaactat

18

<210> 252
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 252

Gln Asn Ile Lys Asn Tyr
1 5

<210> 253

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 253

gaagcatct

9

<210> 254

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 254

Glu Ala Ser

1

<210> 255

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 255

caacagagtt ttagtattcc gtggacg

27

<210> 256

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 256

Gln Gln Ser Phe Ser Ile Pro Trp Thr
1 5

<210> 257
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 257
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcac gcctactatt tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagt gatgggattg ctcaaccctt atactggtgg ctcatactat 180
acacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcga cacagcctac 240
atggaaactga acagtctgag atctgacgac acggccatct attactgtgc gagagataag 300
aggagctact acatccctta tgcttttgaa atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360
tcttca 366

<210> 258
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 258

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ala Tyr
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Lys Arg Ser Tyr Tyr Ile Pro Tyr Ala Phe Glu Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<223> Tổng hợp

```
<400> 259
ggatacacct tcatgccta ctat
```

24

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

<220>
<223> Tổng hợp

$\langle 400 \rangle$ 260

Gly Tyr Thr Phe Ile Ala Tyr Tyr
1 5

```
<210> 261
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Tổng hợp

```
<400> 261
ctcaaccctt atactggtgg ctca
```

24

```
<210> 262
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 262

Leu Asn Pro Tyr Thr Gly Gly Ser
1 5

<210> 263
<211> 45
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 263
gcgagagata agaggagcta ctacatccct tatgcttttg aaatc

45

<210> 264
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 264

Ala Arg Asp Lys Arg Ser Tyr Tyr Ile Pro Tyr Ala Phe Glu Ile
1 5 10 15

<210> 265
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 265
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgta 180
aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
caaggacac gactggagat taaa 324

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 266

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 267
 cagagcatta gcagctat

18

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 268

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 269
gctgcatcc

9

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 270

Ala Ala Ser
1

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 271
caacagagtt acagtacccc tccgatcacc

30

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 272

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

<210> 273

<211> 369

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 273

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggttcagc ctggggtgtc cctgagactc 60
 tcctgtgtag cctctggatt cacctttagc aattatgaca taacctggat cgcagatt 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaaga atcagtggtg gtggtggaag tacatatttc 180
 gcagactccg tgaagggtcg gttcatcatc tccagagaca attccaaaaa tacggtgtat 240
 atgcaaatga acagtttgag agccgaagac tcggccgtat attactgtgc gagaagagat 300
 tccgtcttat ttagtatgaa cagttggctc gaccctggg gccagggaac cctggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 274

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 274

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

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

Asp Ile Thr Trp Ile Arg Gln Ile Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Phe Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Asp Ser Val Leu Phe Ser Met Asn Ser Trp Leu Asp Pro
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 275

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 275

ggattcacct ttagcaatta tgac

24

<210> 276

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 276

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Asp
1 5

<210> 277

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 277

atcagtggtgta gtggtggaag taca

24

<210> 278

<211> 8

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 278

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 279
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 279
 gcgagaagag attccgtctt atttagtatg aacagttggc tcgacccc

48

<210> 280
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 280

Ala Arg Arg Asp Ser Val Leu Phe Ser Met Asn Ser Trp Leu Asp Pro
 1 5 10 15

<210> 281
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 281
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgttcgg gatctggata caggtttacc aactactgga tcgcctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatgggtctc attcatcctg atgactctga tattagatac 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccttt tcagtcgaca agtccatcaa caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctcgac accgccatgt attactgtac gcgacaagac 300

ggaatactat ggtctcataa tgcctgggtc gacccctggg gccaggggaac cctgggtcacc 360
gtctcctca 369

<210> 282
<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 282

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ser Gly Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Leu Ile His Pro Asp Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Gln Asp Gly Ile Leu Trp Ser His Asn Ala Trp Phe Asp Pro
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 283
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 283
ggatacaggt ttaccaacta ctgg

24

<210> 284
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 284

Gly Tyr Arg Phe Thr Asn Tyr Trp
1 5

<210> 285
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 285
attcatcctg atgactctga tatt

24

<210> 286
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 286

Ile His Pro Asp Asp Ser Asp Ile
1 5

<210> 287
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 287
acgcgacaag acggaatact atggtctcat aatgcctggg tcgacccc

48

<210> 288
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 288

Thr	Arg	Gln	Asp	Gly	Ile	Leu	Trp	Ser	His	Asn	Ala	Trp	Phe	Asp	Pro
1				5					10					15	

<210> 289
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 289

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cctctggata	caccttcatt	agttacaata	tcttctgggt	gcgacaggcc	120
actggtcagg	gccttgattg	gatgggatgg	atgaaccctt	tcagaaataa	cgcaggttat	180
gcacagaagt	ttcagggcag	agtcaccgtg	acctgggaca	cctccatcag	cacagcctac	240
atggaactgt	ccagcctgag	ctctgaggac	acggccatat	attactgtgc	gagagaacat	300
ggcagtagct	ggggcttctt	tgactactgg	ggccagggaa	ccctgggtcac	cgtctcctca	360

<210> 290
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 290

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ile	Ser	Tyr
			20					25					30		

Asn	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Thr	Gly	Gln	Gly	Leu	Asp	Trp	Met
		35					40					45			

Gly Trp Met Asn Pro Phe Arg Asn Asn Ala Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Trp Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Ser Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu His Gly Ser Ser Trp Gly Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 291
 ggatacacct tcattagtta caat

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 292

Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr Asn
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 293
atgaaccct tcagaaataa cgca

24

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 294

Met Asn Pro Phe Arg Asn Asn Ala
1 5

<210> 295
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 295
gcgagagaac atggcagtag ctggggcttc ttgactac

39

<210> 296
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 296

Ala Arg Glu His Gly Ser Ser Trp Gly Phe Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 297
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 297
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc

60

ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa

120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gtcaccttg gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 298
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 298

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 299
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 299
cagagtgtta gcagcagcta c

21

<210> 300
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 300

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 301
ggtgcatcc

9

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 302

Gly Ala Ser
1

<210> 303
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 303
cagcagtatg gtagctcacc ttggacg

27

<210> 304
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 304

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 305
 <211> 483
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Bet v1

<400> 305
 atgggtgtgt ttaattatga gactgagacc acctctgtta tcccagcagc tcgactgttc 60
 aaggccttta tccttgatgg cgataacctc tttccaaagg ttgcaccca agccattagc 120
 agtggtgaaa acattgaagg aaatggaggg cctggaacca ttaagaagat cagctttccc 180
 gaaggcctcc ctttcaagta cgtgaaggac agagttgatg aggtggacca cacaaacttc 240
 aaatacaatt acagcgtgat cgagggcggt cccataggcg acacattgga gaagatctcc 300
 aacgagataa agatagtggc aaccctgat ggaggatcca tcttgaagat cagcaacaag 360
 taccacacca aaggtgacca tgaggtgaag gcagagcagg ttaaggcaag taaagaaatg 420
 ggcgagacac ttttgagggc cgttgagagc tacctcttgg cacactccga tgcctacaac 480
 taa 483

<210> 306
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Bet v1 (M1-N160 of accession number CAB02159)

<400> 306

Met Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala
 1 5 10 15

Ala Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro
 20 25 30

Lys Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn
 35 40 45

Gly Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro
 50 55 60

Phe Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe
 65 70 75 80

Lys Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu
 85 90 95

Glu Lys Ile Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly
 100 105 110

Ser Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu
 115 120 125

Val Lys Ala Glu Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu
 130 135 140

Leu Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn
 145 150 155 160

<210> 307

<211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AA 23-43 of Bet v1

<400> 307

Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys Val Ala Pro Gln Ala
 1 5 10 15

Ile Ser Ser Val Glu
 20

<210> 308

<211> 13

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> AA 44-56 of Bet v1

<400> 308

Asn	Ile	Glu	Gly	Asn	Gly	Gly	Pro	Gly	Thr	Ile	Lys	Lys
1				5					10			

<210> 309
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> AA 2-19 of Bet v1

<400> 309

Gly	Val	Phe	Asn	Tyr	Glu	Thr	Glu	Thr	Thr	Ser	Val	Ile	Pro	Ala	Ala
1			5					10						15	

Arg Leu

<210> 310
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> AA 57-70 of Bet v1

<400> 310

Ile	Ser	Phe	Pro	Glu	Gly	Leu	Pro	Phe	Lys	Tyr	Val	Lys	Asp
1				5					10				

<210> 311
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> AA 81-89 of Bet v1

<400> 311

Lys	Tyr	Asn	Tyr	Ser	Val	Ile	Glu	Gly
1				5				

<210> 312
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mutant Bet v 1-MMH w S85A (1-159: Bet v1 (G2-N160 of accession number CAB02159) with Myc-Myc hexahistidine tag

 <400> 312

 Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala Ala
 1 5 10 15

 Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro Lys
 20 25 30

 Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn Gly
 35 40 45

 Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Leu Pro Phe
 50 55 60

 Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe Lys
 65 70 75 80

 Tyr Asn Tyr Ala Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu Glu
 85 90 95

 Lys Ile Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly Ser
 100 105 110

 Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu Val
 115 120 125

 Lys Ala Glu Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu Leu
 130 135 140

 Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn Glu
 145 150 155 160

 Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile
 165 170 175

Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
180 185

<210> 313
<211> 413
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> hFceR1alpha-mFc

<400> 313

Val Pro Gln Lys Pro Lys Val Ser Leu Asn Pro Pro Trp Asn Arg Ile
1 5 10 15

Phe Lys Gly Glu Asn Val Thr Leu Thr Cys Asn Gly Asn Asn Phe Phe
20 25 30

Glu Val Ser Ser Thr Lys Trp Phe His Asn Gly Ser Leu Ser Glu Glu
35 40 45

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

Glu Tyr Lys Cys Gln His Gln Gln Val Asn Glu Ser Glu Pro Val Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Val Phe Ser Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Glu Val
85 90 95

Val Met Glu Gly Gln Pro Leu Phe Leu Arg Cys His Gly Trp Arg Asn
100 105 110

Trp Asp Val Tyr Lys Val Ile Tyr Tyr Lys Asp Gly Glu Ala Leu Lys
115 120 125

Tyr Trp Tyr Glu Asn His Asn Ile Ser Ile Thr Asn Ala Thr Val Glu
130 135 140

Asp Ser Gly Thr Tyr Tyr Cys Thr Gly Lys Val Trp Gln Leu Asp Tyr
145 150 155 160

Glu Ser Glu Pro Leu Asn Ile Thr Val Ile Lys Ala Pro Arg Glu Lys

				165						170					175
Tyr	Trp	Leu	Gln	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro
			180					185					190		
Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile
		195					200					205			
Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile
	210					215					220				
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln
225					230					235					240
Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln
				245					250					255	
Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu
			260					265					270		
Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys
		275					280					285			
Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys
	290					295					300				
Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro
305					310					315					320
Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr
				325					330					335	
Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys
			340					345					350		
Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
	355						360					365			
Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val
	370					375					380				
Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn

40211

385

390

395

400

His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
405 410

<210> 314

<211> 160

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Bet v 1 amino acid sequence from Uniprot: P15494

<400> 314

Met Gly Val Phe Asn Tyr Glu Thr Glu Thr Thr Ser Val Ile Pro Ala
1 5 10 15

Ala Arg Leu Phe Lys Ala Phe Ile Leu Asp Gly Asp Asn Leu Phe Pro
20 25 30

Lys Val Ala Pro Gln Ala Ile Ser Ser Val Glu Asn Ile Glu Gly Asn
35 40 45

Gly Gly Pro Gly Thr Ile Lys Lys Ile Ser Phe Pro Glu Gly Phe Pro
50 55 60

Phe Lys Tyr Val Lys Asp Arg Val Asp Glu Val Asp His Thr Asn Phe
65 70 75 80

Lys Tyr Asn Tyr Ser Val Ile Glu Gly Gly Pro Ile Gly Asp Thr Leu
85 90 95

Glu Lys Ile Ser Asn Glu Ile Lys Ile Val Ala Thr Pro Asp Gly Gly
100 105 110

Ser Ile Leu Lys Ile Ser Asn Lys Tyr His Thr Lys Gly Asp His Glu
115 120 125

Val Lys Ala Glu Gln Val Lys Ala Ser Lys Glu Met Gly Glu Thr Leu
130 135 140

Leu Arg Ala Val Glu Ser Tyr Leu Leu Ala His Ser Asp Ala Tyr Asn
145 150 155 160

<210> 315
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> AA 81-96 of Bet v1

<400> 315

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

<210> 316
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H4H17038P2 HC

<400> 316

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

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

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

Ser Phe Ile Ser Asp Ser Ser Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Ile Gly Ser Thr Ser Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 317

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H4H17038P2 LC

<400> 317

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu

40211

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 318

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H4H16987P HC

<400> 318

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

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

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

Ser Val Ile Phe Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Arg His Ser Asn Trp Asn Phe Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 319

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H4H16987P LC

<400> 319

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

40211

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

<210> 320

<211> 443
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H4H16992P HC

<400> 320

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Asn Tyr
 20 25 30

Phe Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Asn Met Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Gly Ser Tyr Tyr Tyr Gly Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 321
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> H4H16992P LC

<400> 321

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Lys Ser Phe
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Pro Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Arg Asn Asn Trp Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

40211

145					150					155					160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165					170					175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
			180					185					190		
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
		195					200					205			
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210														
<210>	322														
<211>	447														
<212>	PRT														
<213>	Trình tự nhân tạo														
<220>															
<223>	H4H17082P2	HC													
<400>	322														
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ile	Ser	Tyr
			20					25					30		
Asn	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Thr	Gly	Gln	Gly	Leu	Asp	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Trp	Met	Asn	Pro	Phe	Arg	Asn	Asn	Ala	Gly	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Ser	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Glu	His	Gly	Ser	Ser	Trp	Gly	Phe	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105						110	

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 323

<211> 215

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> H4H17082P2 LC

<400> 323

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

40211

65					70					75				80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser
				85					90				95	Pro
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val
			100					105					110	Ala
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys
		115					120					125		Ser
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg
	130					135					140			Glu
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn
145					150					155				160
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser
			165						170					175
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys
			180					185					190	Val
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr
		195					200					205		Lys
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
	210					215								