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

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

(11) **1-0047735**

(51)[2020.01] **C07K 16/08**; A61K 39/395; C07K 16/10; A61P 31/20; A61K 31/522; A61P 31/14

(13) **B**

(21) 1-2021-04162
(22) 18/12/2019
(86) PCT/US2019/067216 18/12/2019
(87) WO2020/132091 25/06/2020
(30) 62/782,274 19/12/2018 US; 62/860,085 11/06/2019 US
(45) 25/06/2025 447
(43) 25/01/2022 406A
(73) HUMABS BIOMED SA (CH)
Via dei Gaggini 3, 6500 Bellinzona, Switzerland
(72) CORTI, Davide (IT).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ PHÂN LẬP GẮN KẾT HBSAG, DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2021-04162

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, có thể gắn kết với vùng vòng kháng nguyên của kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg) và có thể vô hiệu hóa sự nhiễm của cả virut viêm gan B (HBV) và virut viêm gan delta (HDV). Sáng chế cũng đề cập đến epitop mà kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên gắn kết, cũng như đề cập đến protein dung hợp bao gồm mảnh gắn kết kháng nguyên, và axit nucleic mã hóa và tế bào sản xuất kháng thể và mảnh kháng thể như vậy.

Kiểu gen	EC_{50} (ng/ml)
A	2,34
B	2,22
C	0,92
D	1,10
E	1,12
F	1,93
G	1,43
H	1,93

FIG. 4

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực liệu pháp miễn dịch đối với virut viêm gan B (hepatitis B virus - HBV) và chống lại virut viêm gan delta (hepatitis delta virus - HDV), và việc sử dụng chúng. Các protein gắn kết chống viêm gan B được đề cập trong bản mô tả này, ví dụ, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, có khả năng gắn kết với epitop nằm trong vùng vòng kháng nguyên của miền S của các protein vỏ HBV (HBsAg). Theo các phương án nhất định, protein gắn kết chống viêm gan B có thể gắn kết với kiểu gen HBsAg đã biết bất kỳ hoặc tất cả các kiểu gen HBsAg đã biết, cũng như các biến thể của HBsAg, và có thể vô hiệu hóa sự nhiễm HBV. Sáng chế cũng đề cập đến các axit nucleic mã hóa và các tế bào chủ biểu hiện, các protein gắn kết như vậy. Ngoài ra, sáng chế mô tả phương pháp sử dụng các kháng thể và mảnh kháng thể được đề cập trong bản mô tả này trong chẩn đoán, dự phòng và điều trị bệnh, cũng như trong các phương pháp sàng lọc.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Về cơ bản, HBV bao gồm (i) vỏ chứa ba protein bề mặt liên quan (kháng nguyên bề mặt viêm gan B, HBsAg) và lipit và (ii) nucleocapsit khối hai mươi mặt bao quanh bộ gen ADN của virut và ADN polymeraza. Capsit HBV được hình thành trong dịch bào tương của tế bào bị nhiễm trong quá trình đóng gói phức hợp sao chép tiền gen ARN và đạt được khả năng nảy chồi trong quá trình tổng hợp bộ gen ADN của virut bằng cách phiên mã ngược tiền gen trong lòng của hạt. Ba protein vỏ HBV S-HBsAg, M-HBsAg, và L-HBsAg tạo ra nếp gấp xuyên màng phức tạp ở lưới nội chất, và tạo thành các homo và heterodime liên kết với disulfua. Trong quá trình nảy chồi ở màng nội bào, miền tuyến tính ngắn trong vùng preS của dịch bào tương tương tác với các vị trí gắn kết trên bề mặt capsit. Các virion sau đó được tiết vào máu. Ngoài ra, các protein bề mặt có thể nảy chồi khi không có capsit và hình thành các hạt dưới virut (SVP) mà cũng được tiết ra với lượng dư 3–4 log so với virion. Mức HbsAg cao có thể làm cạn kiệt đáp ứng tế bào T đặc hiệu với HBsAg, và được đề xuất là yếu tố quan trọng đối với sự dung

nạp miễn dịch với virut ở bệnh nhân mắc viêm gan B mãn tính. (CHB) (Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF, Pathologie Biologie, 2010;58:258–66).

Virut viêm gan B gây nhiễm trùng gan cấp tính và mãn tính có thể đe dọa tính mạng. Viêm gan B cấp tính được đặc trưng bởi virut trong máu, có và không có triệu chứng, với nguy cơ xuất hiện viêm gan tối cấp (Liang TJ, Block TM, McMahon BJ, Ghany MG, Urban S, Guo JT, Locarnini S, Zoulim F, Chang KM, Lok AS. Present or future therapies of hepatitis B: From discovery to cure. Hepatology. 2015 Aug 3. doi: 10.1002/hep.28025. [Epub ahead of print]). Mặc dù đã có vắc-xin hiệu quả chống lại viêm gan B từ năm 1982, WHO vẫn báo cáo rằng 240 triệu người bị nhiễm viêm gan B mãn tính và hơn 780.000 người chết mỗi năm do các biến chứng của viêm gan B. Khoảng một phần ba số bệnh nhân mắc viêm gan B mãn tính (chronic hepatitis B - CHB) phát triển thành xơ gan, suy gan và ung thư biểu mô tế bào gan, chiếm 600.000 ca tử vong mỗi năm (Liang TJ, Block TM, McMahon BJ, Ghany MG, Urban S, Guo JT, Locarnini S, Zoulim F, Chang KM, Lok AS. Present or future therapies of hepatitis B: From discovery to cure. Hepatology. 2015 Aug 3. doi: 10.1002/hep.28025. [Epub ahead of print]).

Đối với bệnh nhân nhiễm HBV, các biến chứng nặng có thể phát triển do nhiễm đồng thời và bội nhiễm HDV. Theo WHO, viêm gan D lây nhiễm cho khoảng 15 triệu người trên toàn thế giới. HDV được coi là vệ tinh dưới virut vì nó chỉ có thể lan truyền khi có HBV. HDV là một trong những virut động vật nhỏ nhất đã biết (40 nm), theo đó bộ gen của nó chỉ là 1,6 kb và mã hóa cho HDAg S và L. Tất cả các protein khác cần thiết cho sự sao chép bộ gen của HDV, bao gồm ARN polymeraza, được cung cấp bởi tế bào chủ, và vỏ HDV được cung cấp bởi HBV. Khi được đưa vào tế bào cho phép virut xâm nhiễm, bộ gen ARN HDV sao chép và liên kết với nhiều bản sao của các protein đã mã hóa HDV để lắp ráp phức hợp ribonucleoprotein (RNP). RNP được xuất ra khỏi tế bào bởi các protein vỏ HBV, mà có khả năng lắp ráp các túi lipoprotein nảy chồi vào lumen của ngăn tiền Golgi trước khi được tiết ra. Ngoài ra, các protein vỏ HBV cũng cung cấp cơ chế để hướng đích HDV đến tế bào chưa bị nhiễm, do đó đảm bảo sự lây lan của HDV.

Các biến chứng do HDV gây ra bao gồm khả năng suy gan cao hơn trong các trường hợp nhiễm trùng cấp tính và tiến triển nhanh thành xơ gan, kèm theo tăng khả

năng phát triển ung thư gan trong các trường hợp nhiễm trùng mãn tính. Kết hợp với virut viêm gan B, viêm gan D có tỷ lệ tử vong cao nhất trong số các bệnh viêm gan, ở mức 20% (Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. Gut. 2000 Mar;46(3):420-6). Liệu pháp duy nhất được chấp thuận cho nhiễm HDV mãn tính là interferon-alpha. Tuy nhiên, việc điều trị HDV bằng interferon-alpha tương đối kém hiệu quả và không được dung nạp tốt. Việc điều trị bằng interferon-alpha dẫn đến đáp ứng virut kéo dài sáu tháng sau khi điều trị ở một phần tư số bệnh nhân. Ngoài ra, các chất tương tự nucleotit (NA) đã được thử nghiệm rộng rãi ở viêm gan delta, nhưng chúng dường như không hiệu quả. Việc điều trị kết hợp sử dụng NA với interferon cũng tỏ ra đáng thất vọng (Zaigham Abbas, Minaam Abbas Management of hepatitis delta: Need for novel therapeutic Options. World J Gastroenterol 2015 August 28; 21(32): 9461-9465). Theo đó, các lựa chọn điều trị mới là điều cần thiết.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất các protein gắn kết chống viêm gan B, ví dụ, các kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, có khả năng gắn kết với epitop nằm trong vùng vòng kháng nguyên của miền S của các protein vỏ HBV (HBsAg).

Theo các phương án nhất định, các protein gắn kết chống viêm gan B có thể gắn kết với kiểu gen HBsAg đã biết bất kỳ hoặc tất cả các kiểu gen HBsAg đã biết, cũng như các biến thể của HBsAg, và có thể vô hiệu hóa sự nhiễm HBV.

Sáng chế cũng đề xuất các axit nucleic mã hóa và các tế bào chủ biểu hiện các protein gắn kết như vậy.

Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp sản xuất các kháng thể, mảnh liên kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế trong các điều kiện và trong khoảng thời gian thích hợp để tạo ra kháng thể, mảnh liên kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp này.

Sáng chế còn đề xuất các tế bào chủ tái tổ hợp biểu hiện dị loài kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất các dược phẩm chứa kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên hoặc protein dung hợp theo sáng chế, các axit nucleic theo sáng chế, các vectơ theo sáng chế và/hoặc các tế bào theo sáng chế.

Mô tả vắt tắt các hình vẽ

Các hình vẽ được cung cấp trong bản mô tả này nhằm minh họa chi tiết hơn vấn đề được nêu trong sáng chế. Các hình vẽ này không nhằm hạn chế sáng chế dưới hình thức bất kỳ.

Fig. 1 thể hiện sự gắn kết của HBC34-V7 và hai kháng thể đã được thao tác di truyền theo sáng chế ("HBC34-V34"; "HBC34-V35") ở các nồng độ đã được chỉ định với HBsAg adw (panen phía trên) và HBsAg adr (panen phía dưới), như được xác định trong thử nghiệm ELISA dựa trên kháng nguyên trực tiếp. Tất cả các kháng thể được sản sinh là IgG1 (g1m17, 1 alotyp).

Fig. 2A-2K thể hiện sự gắn kết của HBC34-V7, HBC34-V34, và HBC34-V35 với tất cả các kiểu gen HBsAg đã biết ((A)-(J), tương ứng) và với đối chứng giả (K). Các trình tự đại diện kiểu gen là vòng bên ngoài kháng nguyên HBsAg, như được thể hiện trong Ví dụ 5 của Công bố đơn PCT số WO 2017/060504, được sử dụng. Việc nhuộm được thực hiện bằng FACS. Nồng độ kháng thể được chỉ ra trên trục x của đồ thị.

Fig. 3A-3V thể hiện sự gắn kết (3A-3R) *in vitro và* trung hòa (3S-3V) của một số kháng thể HBC với HBsAg. Fig. 3A và 3B thể hiện sự gắn kết của HBC34-V7 và HBC34-V35 với vùng Fc kiểu hoang và biến thể với HBsAg adw trong thử nghiệm ELISA dựa trên kháng nguyên trực tiếp (2 thí nghiệm; dữ liệu từ "Thí nghiệm 1" được thể hiện trong Fig. 3A, và dữ liệu từ "Thí nghiệm 2" được thể hiện trong Fig. 3B). Đường cong gắn kết kháng nguyên được thể hiện trong panen phía trên của mỗi hình vẽ. Giá trị EC_{50} (được xác định bằng cách so khớp đường cong bằng cách sử dụng lăng kính Graphpad) được thể hiện trong panen phía giữa của mỗi hình vẽ. Việc gắn kết với đĩa không được phủ (đối chứng) được thể hiện trong panen phía dưới của mỗi hình vẽ. Các vùng Fc: "HBC34v7" và "HBC34-V35" = Fc kiểu hoang; "HBC34-V35-MLNS" = Fc với M428L/N434S. "HBC34-V35-MLNS-GAALIE" = Fc với

M428L/N434S/G236A/A330L/I332E. Ba lô HBC34-V35 được thử nghiệm. Hai lô HBC34-V35-MLNS, và hai lô HBC34-v35-MLNS-GAALIE được thử nghiệm. Một lô HBC34-V7 được sử dụng. Fig. 3C-3H thể hiện sự gắn kết của HBC34-V35, HBC34-V35-MLNS, và HBC34-V35-MLNS-GAALIE với tế bào Expi293 biểu hiện HBsAg từ từ toàn bộ mười kiểu gen HBV đã biết hoặc đối chứng giả. Mức gắn kết được xác định bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy. Dữ liệu được biểu diễn dưới dạng cường độ huỳnh quang trung bình (trục y) của các quần thể đã được chuyển nhiễm như được xác định bằng cách đưa ra tín hiệu thu được với các tế bào đã được chuyển nhiễm giả. Đối với mỗi HbsAg, các mẫu pha loãng tuần tự của ba vật phẩm thử nghiệm được thử nghiệm (12 điểm, 1 trong 3, bắt đầu từ 10 µg/ml). Fig. 3I-3R thể hiện gắn kết của HBC34-V35, HBC34-V35-MLNS, và HBC34-V35-MLNS-GAALIE với các tế bào Expi293 biểu hiện HBsAg từ mười chín (19) biến thể HBsAg và mẫu đối chứng giả. Mức gắn kết được xác định bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy. Dữ liệu được biểu diễn dưới dạng cường độ huỳnh quang trung bình của các quần thể đã được chuyển nhiễm như được xác định bằng cách đưa ra tín hiệu thu được với các tế bào đã được chuyển nhiễm giả. Đối với mỗi HBsAg, các mẫu pha loãng tuần tự của ba vật phẩm thử nghiệm được thử nghiệm (12 điểm, 1 trong 3, bắt đầu từ 10 µg/ml). Nồng độ kháng thể là như được thể hiện trên trục x. Fig. 3S và 3U thể hiện khả năng trung hòa của các kháng thể HBC đã được chỉ định chống lại HBV kiểu gen D như được đánh giá bằng cách đo các mức HBsAg (phía trên) và HbeAg (phía dưới) trong dịch nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy tế bào của tế bào HepG2 nhiễm HBVD biểu hiện NTCP. Dữ liệu là giá trị trung bình ± SD từ một trong hai thí nghiệm độc lập. Fig. 3T và 3V thể hiện các giá trị EC_{50}. Giá trị trung bình và khoảng hình học (trong ngoặc đơn) của các giá trị EC_{50} được xác định từ hai thí nghiệm độc lập.

Fig. 4 thể hiện mức trung hòa (giá trị EC_{50}), bởi HBC34-V35-MLNS-GAALIE, của các kiểu gen HBV riêng lẻ bằng cách sử dụng hệ thống sao chép giả HDV.

Fig. 5-8 thể hiện hiệu quả của HBC34-V35 đối với các nồng độ HBAg huyết thanh trong mô hình chuột nhắt *in vivo* nhiễm HBV. Chuột nhắt SCID nhiễm HBV kiểu gen C được cấy ghép các tế bào gan sơ cấp của người và được dùng HBC34-V35 ở 1, 5, và 15 mg/kg, hoặc PBS (đối chứng), như được mô tả trong Ví dụ 5. Fig. 5 thể hiện nồng độ HBV ADN huyết thanh trước và sau khi điều trị. Fig. 6 thể hiện nồng độ HBsAg

huyết thanh trước và sau khi điều trị. Fig. 7 thể hiện nồng độ HBeAg huyết thanh trước và sau khi điều trị. Fig. 8 thể hiện nồng độ HBcrAg huyết thanh trước và sau khi điều trị. "Tmt" = Điều trị.

Fig. 9A-9F thể hiện gắn kết của HBC34-V35-MLNS và HBC34-V35-MLNS-GAALIE với FcRs của người. (A)-(E) Gắn kết với FcγRs, như được đánh giá bằng phép đo giao thoa lớp sinh học (BLI). FcγRs của người được gắn đuôi His ((A) alen FcγRIIa H131; (B) alen FcγRIIa R131; (C) alen FcγRIIIa F158; (D) alen FcγRIIIa V158; (E) FcγRIIb) ở 2 µg/ml được bắt giữ trên cảm biến kháng penta-His trong 6 phút. Sau đó, các cảm biến đã nạp FcγR được tiếp xúc trong 5 phút với dung dịch đệm động học (pH 7,1) chứa 2 µg/ml mỗi mAb (phần bên trái của đồ thị) với sự có mặt 1 µg/ml của mảnh affiniPure $F(ab')_2$ kháng IgG người của dê, mảnh $F(ab')_2$ đặc hiệu (để liên kết chéo các mAb của người thông qua mảnh Fab), tiếp theo là bước phân ly trong cùng dung dịch đệm thêm trong 4 phút (phần bên phải của đồ thị). Các đặc điểm liên kết và phân ly được đo theo thời gian thực khi thay đổi mẫu giao thoa bằng cách sử dụng Octet® RED96 (FortéBio). (F) Gắn kết *in vitro* của kháng thể HBC34 với FcRn ở các độ pH khác nhau, như được xác định bằng cách sử dụng phép đo giao thoa lớp sinh học (BLI). Thời điểm 0 giây thể hiện sự chuyển đổi từ dung dịch đệm đường cơ sở sang dung dịch đệm chứa kháng thể. Thời điểm 300 giây (đường chấm thẳng đứng) thể hiện sự chuyển đổi sang dung dịch đệm trắng ở độ pH tương ứng. Các đường cong biểu thị các đặc điểm liên kết và phân ly của sự thay đổi mẫu giao thoa.

Fig. 10 thể hiện gắn kết của HBC34-V35-MLNS và HBC34-V35-MLNS-GAALIE với C1q của người, như được đo bằng Octet®. Các cảm biến kháng Fab (CH1) người được sử dụng để bắt giữ, thông qua mảnh Fab, IgG1 đầy đủ của HBC34v35-MLNS và HBC34-V35-MLNS-GAALIE mAb ở 10 µg/ml trong 10 phút. Các cảm biến được nạp IgG sau đó được tiếp xúc trong 4 phút với dung dịch đệm động học (độ pH 7,1) chứa 3 µg/ml C1q của người đã được tinh chế (phần bên trái của đồ thị), tiếp theo là bước phân ly trong cùng dung dịch đệm thêm trong 4 phút (phần bên phải của đồ thị). Các đặc điểm liên kết và phân ly được đo theo thời gian thực khi thay đổi mẫu giao thoa bằng cách sử dụng Octet® RED96 (FortéBio).

Fig. 11A và 11B thể hiện sự hoạt hóa *in vitro* của FcγRIIIA của người bằng cách sử dụng phương pháp hoạt hóa liên kết với thụ thể của gen chỉ thị Luciferaza qua trung

gian NFAT trong tế bào Jurkat đã được thao tác di truyền. Sự hoạt hóa FcγRIIIa được thử nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm phân tích sinh học đã được xác thực, có sẵn trên thị trường, trong đó HBsAg tái tổ hợp (Engerix B) được sử dụng làm kháng nguyên đích. Các mẫu pha loãng tuần tự của HBC34-V35-MLNS và HBC34-V35-MLNS-GAALIE và mAb đối chứng (Ctr) được ủ với 0,2 µg/ml HBsAg ở 37°C trong 25 phút. Tế bào hiệu ứng Jurkat (Promega) biểu hiện và alen ái lực thấp FcγRIIIa F158 (A) hoặc alen ái lực cao FcγRIIIa V158 (B) được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm thử nghiệm và sau đó được bổ sung vào đĩa thử nghiệm. Sau khi ủ ở 37°C trong 24 giờ, chất phản ứng thử nghiệm Bio-Glo-™ Luciferaza (Promega) được bổ sung vào, và sự phát quang được định lượng bằng cách sử dụng thiết bị đo phát quang (Bio-Tek).

Fig. 12A và 12B thể hiện sự hoạt hóa *in vitro* của FcγRIIA của người bằng cách sử dụng phương pháp hoạt hóa liên kết với thụ thể của gen chỉ thị luciferaza qua trung gian NFAT trong tế bào Jurkat đã được thao tác di truyền. Sự hoạt hóa FcγRIIA của người được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm phân tích sinh học đã được xác thực, có sẵn trên thị trường trong đó HBsAg tái tổ hợp (Engerix B) được sử dụng làm kháng nguyên đích. Các mẫu pha loãng tuần tự của HBC34v35-MLNS và HBC34-V35-MLNS-GAALIE và mAb đối chứng (Ctr) được ủ với 2 µg/ml (A) và 0,2 µg/ml (B) HBsAg ở 37°C trong 25 phút. Tế bào hiệu ứng Jurkat (Promega) biểu hiện alen ái lực cao FcγRIIa H131 được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm thử nghiệm và sau đó được bổ sung vào đĩa thử nghiệm. Sau khi ủ ở 37°C trong 23 giờ, chất phản ứng thử nghiệm Bio-Glo-™ Luciferaza (Promega) được bổ sung vào, và sự phát quang được định lượng bằng cách sử dụng thiết bị đo phát quang (Bio-Tek).

Fig. 13A-13B thể hiện sự hoạt hóa *in vitro* của F*c*γRIIb của người bằng cách sử dụng phương pháp hoạt hóa liên kết với thụ thể của gen chỉ thị luciferaza qua trung gian NFAT trong tế bào Jurkat đã được thao tác di truyền. Sự hoạt hóa FcγRIIb của người được thử nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm phân tích sinh học đã được xác thực, có sẵn trên thị trường, trong đó HBsAg tái tổ hợp (Engerix B) được sử dụng làm kháng nguyên đích. Các mẫu pha loãng tuần tự của HBC34-V35-MLNS và HBC34-V35-MLNS-GAALIE và mAb đối chứng (Ctr) được ủ với 1 µg/ml HBsAg ở 37°C trong 15 phút. Tế bào hiệu ứng Jurkat (Promega) biểu hiện FcγRIIb được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm thử nghiệm và sau đó được bổ sung vào đĩa thử nghiệm. Sau khi ủ ở

37°C trong 20 giờ, chất phản ứng thử nghiệm Bio-Glo-™ Luciferaza (Promega) được bổ sung vào, và sự phát quang được định lượng bằng cách sử dụng thiết bị đo phát quang (Bio-Tek). Trong Fig. 13B, mAb đối chứng từ Fig. 13A được ký hiệu là "Ctr mAb1". mAb đối chứng thứ hai, được ký hiệu là "Ctr mAb2", là phiên bản của HBC34-V35 bao gồm IgG1 Fc với các đột biến sau đây giúp tăng cường gắn kết với FcγRIIb: G237D/P238D/H268D/P271G/A330R (Mimoto *et al.*, Prot *Eng Des Sel.* 26(10):589-598 (2013)).

Fig. 14A và 14B thể hiện tác dụng diệt *in vitro* tế bào gan của người PLC/PRF/5 bởi các tế bào NK sơ cấp của người với sự có mặt của HBC34-V35-MLNS và HBC34-V35-MLNS-GAALIE. (A) ADCC được thử nghiệm bằng cách sử dụng tế bào NK mới được phân lập từ một thể cho đã được xác định kiểu gen trước để biểu hiện FcγRIIIa (F/V) ái lực cao (V158) và thấp (F158) dị hợp tử. Các mẫu pha loãng tuần tự của HBC34-V35, HBC34-V35-MLNS, HBC34-V35-MLNS-GAALIE, kháng HBV mAb 17.1.41, và mAb đối chứng được bổ sung vào dòng tế bào gan tiết HBsAg PLC/PRF/5 (còn được gọi là tế bào Alexander). Tế bào PLC/PRF/5 được ủ cùng với kháng thể ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Tế bào NK được bổ sung vào đĩa thử nghiệm (tỷ lệ tế bào hiệu ứng so với tế bào đích là 10: 1) và được ủ ở 37°C trong 4 giờ. Sự chết tế bào được xác định bằng cách đo mức giải phóng lactat dehydrogenaza (LDH). (B) Nhuộm tế bào u gan của người PLC/PRF/5 bằng HBC34-V35 và 17.1.41 mAb như được đánh giá bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy. Tế bào được rửa rộng, cố định bằng formaldehyt (4%) hoặc cố định và làm tăng tính thấm (saponin 0,5%) trước khi nhuộm với các nồng độ khác nhau của HBC34-V35 và 17.1.41 mAb. Gắn kết các mAb của người này (trong trường hợp của HBC34-V35, của người đã được thao tác di truyền) được phát hiện bằng cách sử dụng phương pháp đo tế bào dòng chảy bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu với mảnh Fcγ, kháng IgG người của dê, mảnh AffiniPure $F(ab')_2$, Alexa Fluor® 647.

Fig. 15A và 15B thể hiện sự hoạt hóa *in vitro* tế bào NK sơ cấp của người với sự có mặt của HBC34-V35-MLNS và HBC34-V35-MLNS-GAALIE và HBsAg. Sự hoạt hóa các tế bào NK được thử nghiệm bằng cách sử dụng các tế bào mới được phân lập từ hai thể nhận đã được xác định kiểu gen trước để biểu hiện FcγRIIIa ái lực (A) cao đồng hợp tử (V158) hoặc (B) ái lực thấp (F158). Các mẫu pha loãng tuần tự của HBC34-V35, HBC34-V35-MLNS-GAALIE, và HBC34v35-LALA mAb được ủ với tế bào NK trong

4 giờ. Sự hoạt hóa tế bào NK được đo bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy bằng cách nhuộm tế bào NK với kháng CD107a mAb, là chất đánh dấu chức năng để xác định hoạt tính của tế bào NK.

CD107a, cũng được gọi là LAMP-1, là chất đánh dấu cho quá trình mất hạt của tế bào NK.

Fig. 16 thể hiện kết quả từ các nghiên cứu tương tác thuốc *in vitro* giữa HBC34-V35-MLNS-GAALIE và polymeraza/chất ức chế transcriptaza đảo Entecavir (ETV).

Mô tả chi tiết sáng chế

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

Trong toàn bộ bản mô tả, trừ khi có quy định khác, thuật ngữ "bao gồm" và các biến thể của chúng, như "bao gồm "và "gồm", được sử dụng đồng nghĩa với, ví dụ, "có", "chứa", "bao gồm", "gồm" và dạng tương tự và sẽ được hiểu là ngụ ý bao gồm thành phần đã nêu, tỷ lệ, số nguyên (bao gồm, nếu thích hợp, một phần của chúng, ví dụ, một phần mười và một phần trăm của số nguyên), nồng độ hoặc bước nhưng không loại trừ thành phần, tỷ lệ, số nguyên, nồng độ hoặc bước bất kỳ khác không được nêu. Khoảng nồng độ, khoảng phần trăm, khoảng tỷ lệ và khoảng số nguyên bất kỳ đều phải được hiểu là bao gồm giá trị của số nguyên bất kỳ nằm trong khoảng được trích dẫn và khi thích hợp, bao gồm các phân số của chúng (như một phần mười và một phần trăm của số nguyên), trừ khi có quy định khác. Ngoài ra, khoảng số bất kỳ được trích dẫn trong bản mô tả này liên quan đến đặc điểm vật lý bất kỳ như tiểu đơn vị polyme, kích thước hoặc độ dày, phải được hiểu là bao gồm số nguyên bất kỳ nằm trong khoảng được trích dẫn, trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ "gồm" để chỉ phương án của thuật ngữ "bao gồm", trong đó thành viên, số nguyên và bước khác bất kỳ không được nêu đều bị loại trừ. Trong phạm vi của sáng chế, thuật ngữ "bao gồm" bao hàm thuật ngữ "chứa". Thuật ngữ "chủ yếu gồm" không tương đương với "bao gồm" và đề cập đến các nguyên liệu và các bước cụ thể của yêu cầu bảo hộ, hoặc các nguyên liệu hoặc bước không ảnh hưởng đáng kể đến các đặc điểm cơ bản của đối tượng được yêu cầu bảo hộ.

Ngoài ra, cần hiểu rằng các hợp chất riêng lẻ, và các nhóm hợp chất, thu được từ sự kết hợp khác nhau của các cấu trúc và nhóm thế được đề cập trong bản mô tả này, được bộc lộ trong đơn sáng chế ở mức độ tương tự như thể mỗi hợp chất hoặc nhóm hợp chất được đặt ra riêng lẻ. Do đó, việc lựa chọn các cấu trúc cụ thể và các nhóm thế cụ thể nằm trong phạm vi của sáng chế.

Các thuật ngữ "một" và tương tự được sử dụng trong ngữ cảnh mô tả phần mô tả (bao gồm cả trong ngữ cảnh của yêu cầu bảo hộ) phải được hiểu là bao hàm cả số ít và số nhiều, trừ khi có quy định khác trong bản mô tả này hoặc trái ngược rõ ràng theo ngữ cảnh. Việc sử dụng phương án thay thế (ví dụ, "hoặc") phải được hiểu là một trong hai, cả hai hoặc kết hợp bất kỳ của các phương án thay thế. Việc đề cập các khoảng giá trị trong bản mô tả này đóng vai trò như phương pháp viết tắt để đề cập riêng đến từng giá trị tách biệt trong khoảng này. Trừ khi có quy định khác trong bản mô tả này, mỗi giá trị riêng lẻ được đưa vào sáng chế như thể nó được trích dẫn riêng lẻ trong bản mô tả này. Không có ngôn ngữ nào trong phần mô tả nên được hiểu là chỉ ra yếu tố bất kỳ không được xác nhận là cần thiết cho việc thực hành của đối tượng được bộc lộ trong bản mô tả này.

Từ "chủ yếu" không loại trừ "hoàn toàn"; ví dụ, chế phẩm "chủ yếu không chứa Y" có thể hoàn toàn không chứa Y. Theo các phương án nhất định, "chủ yếu" để chỉ lượng, tác dụng hoặc hoạt tính nhất định của chế phẩm, phương pháp và cách sử dụng theo sáng chế so với của chế phẩm, phương pháp và cách sử dụng tham chiếu và mô tả sự giảm lượng, tác dụng hoặc hoạt tính không lớn hơn 50%, như không lớn hơn 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, hoặc 1%, hoặc nhỏ hơn, của lượng, tác dụng và hoạt tính của chế phẩm, phương pháp và cách sử dụng tham chiếu.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "khoảng" có nghĩa là ± 20% khoảng, giá trị và cấu trúc được chỉ định, trừ khi có quy định khác.

"Tùy ý" hoặc "một cách tùy ý" có nghĩa là phần tử, thành phần, sự kiện hoặc tình huống được mô tả sau đó có thể xảy ra hoặc có thể không xảy ra, và mô tả này bao gồm các trường hợp, trong đó phần tử, thành phần, sự kiện và hoàn cảnh đó xảy ra và các trường hợp mà trong đó chúng không xảy ra.

Thuật ngữ "bệnh" như được sử dụng trong bản mô tả này thường đồng nghĩa và được sử dụng thay thế cho nhau với thuật ngữ "rối loạn" và "tình trạng bệnh" (như trong

tình trạng bệnh lý), trong đó tất cả đều phản ánh tình trạng bất thường của cơ thể người hoặc động vật hoặc của một trong các bộ phận của nó làm suy yếu hoạt động bình thường, thường được biểu hiện bằng cách phân biệt các dấu hiệu và triệu chứng, và khiến người hoặc động vật bị ảnh hưởng bị giảm thời gian sống hoặc chất lượng cuộc sống.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ "điều trị" đối tượng hoặc bệnh nhân được dự định bao gồm việc phòng ngừa, dự phòng, làm suy giảm, cải thiện và trị liệu. Lợi ích của việc điều trị bao gồm cải thiện kết quả lâm sàng; giảm bớt và thuyên giảm các triệu chứng liên quan đến bệnh; giảm sự xuất hiện của các triệu chứng; cải thiện chất lượng cuộc sống; kéo dài hơn tình trạng không bệnh; giảm mức độ của bệnh; ổn định trạng thái bệnh tật; làm chậm sự phát triển của bệnh; thuyên giảm; sống sót; kéo dài thời gian sống; hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng. Các thuật ngữ "đối tượng" hoặc "bệnh nhân" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này để chỉ tất cả các động vật có vú, bao gồm cả người. Ví dụ về các đối tượng này bao gồm người, bò, chó, mèo, ngựa, dê, cừu, lợn và thỏ. Theo một phương án, bệnh nhân là người.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "axit amin" để chỉ các axit amin tổng hợp và tự nhiên, cũng như các chất tương tự axit amin và chất giả axit amin mà có chức năng tương tự như các axit amin tự nhiên. Các axit amin tự nhiên là các axit amin được mã hóa bởi mã di truyền, cũng như các axit amin được cải biến sau đó, ví dụ, hydroxyprolin, γ-carboxyglutamat, và O-phosphoserin. Các chất tương tự axit amin dùng để chỉ các hợp chất có cùng cấu trúc hóa học cơ bản với axit amin tự nhiên, tức là α-cacbon liên kết với hydro, nhóm carboxyl, nhóm amino và nhóm R, ví dụ, homoserin, norleuxin, methionin sulfoxit, methionin metyl sulfoni. Các chất tương tự như vậy có các nhóm R được cải biến (ví dụ, norleuxin) hoặc khung peptit được cải biến, nhưng vẫn giữ nguyên cấu trúc hóa học cơ bản giống như axit amin tự nhiên. Chất giả axit amin dùng để chỉ các hợp chất hóa học có cấu trúc khác với cấu trúc hóa học chung của axit amin, nhưng có chức năng tương tự như axit amin tự nhiên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "peptit", "polypeptit" và "protein" và các biến thể của các thuật ngữ này, để chỉ phân tử bao gồm ít nhất hai axit amin liên kết với nhau bằng liên kết peptit (bình thường hoặc được cải biến). Ví dụ, peptit, polypeptit hoặc protein có thể bao gồm hoặc được cấu tạo từ nhiều axit amin

được chọn từ 20 axit amin được xác định bởi mã di truyền hoặc chất tương tự axit amin hoặc giả axit amin, mỗi phân tử được liên kết với ít nhất một phân tử khác bằng liên kết peptit. Peptit, polypeptit và protein có thể bao gồm và được cấu tạo từ các L-axit amin và/hoặc D-axit amin (hoặc các chất tương tự và chất giả của chúng). Các thuật ngữ "peptit", "polypeptit", "protein" cũng bao gồm "chất bắt chước peptit" được định nghĩa là các chất tương tự peptit chứa các phần tử cấu trúc không phải là peptit, các peptit này có khả năng bắt chước hoặc kháng lại (các) hoạt động sinh học của peptit mẹ tự nhiên. Theo các phương án nhất định, chất giả peptit thiếu các đặc điểm như liên kết peptit có thể phân cắt được bằng enzym.

Peptit, polypeptit hoặc protein có thể bao gồm các axit amin khác với 20 axit amin được xác định bằng mã di truyền ngoài các axit amin này hoặc nó có thể bao gồm các axit amin khác với 20 axit amin được xác định bằng mã di truyền. Theo các phương án nhất định, peptit, polypeptit hoặc protein trong phạm vi của sáng chế có thể bao gồm các axit amin được cải biến bằng các quá trình tự nhiên, như các quá trình trưởng thành sau dịch mã, hoặc bằng các quá trình hóa học (ví dụ, các quá trình tổng hợp), đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm các quá trình được đề cập trong bản mô tả này. Các cải biến như vậy có thể xuất hiện ở bất kỳ đâu trong polypeptit; ví dụ, trong khung peptit; trong chuỗi axit amin; hoặc ở đầu cùng carboxy và amino. Peptit hoặc polypeptit có thể được phân nhánh, như sau quá trình ubiquitin hóa, và có thể là vòng, có hoặc không phân nhánh. Các thuật ngữ "peptit", "polypeptit" và "protein" cũng bao gồm các peptit, polypeptit và protein đã được cải biến. Ví dụ, các cải biến peptit, polypeptit hoặc protein có thể bao gồm axetyl hóa, axyl hóa, ADP-ribosyl hóa, amit hóa, cố định cộng hóa trị nucleotit hoặc dẫn xuất nucleotit, cố định cộng hóa trị lipit hoặc dẫn xuất lipit,cố định cộng hóa trị phosphatidylinositol, liên kết chéo cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị, tạo vòng, hình thành liên kết disulfua, khử metyl hóa, glycosyl hóa bao gồm peg hóa, hydroxyl hóa, iot hóa, metyl hóa, myristoyl hóa, oxy hóa, quá trình phân giải protein, phosphoryl hóa, prenyl hóa, raxemic hóa, seneloyl hóa, sulfat hóa, cộng axit amin như arginyl hóa hoặc ubiquitin hóa. Các cải biến như vậy đã được mô tả trong tài liệu (xem Proteins Structure and Molecular Properties (1993) xuất bản lần thứ 2, T. E. Creighton, New York; Post-translational Covalent Modifications of Proteins (1983) B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York; Seifter et al. (1990) Analysis for protein modifications

and nonprotein cofactors, Meth. Enzymol. 182: 626-646 và Rattan et al., (1992) Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging, Ann NY Acad Sci, 663: 48-62). Theo đó, các thuật ngữ "peptit", "polypeptit", "protein" có thể bao gồm, ví dụ, lipopeptit, lipoprotein, glycopeptit, glycoprotein và các dạng tương tự. Các biến thể của protein, peptit và polypeptit theo sáng chế cũng được dự kiến. Theo các phương án nhất định, các protein, peptit, và polypeptit biến thể bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin đồng nhất ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 99,9% với trình tự axit amin của trình tự axit amin xác định hoặc tham chiếu như được đề cập trong bản mô tả này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "(poly)peptit" và "protein" có thể được sử dụng thay thế cho nhau để chỉ polyme của các gốc axit amin, như nhiều monome axit amin được liên kết bởi liên kết peptit.

"Phân tử axit nucleic" hoặc "polynucleotit" hoặc "axit nucleic" để chỉ hợp chất polyme bao gồm các nucleotit được liên kết cộng hóa trị, mà có thể được tạo thành từ các tiểu đơn vị tự nhiên (ví dụ, bazơ purin hoặc pyrimidin) hoặc các tiểu đơn vị không tự nhiên (ví dụ, vòng morpholin). Các bazơ purin bao gồm adenin, guanin, hypoxanthine và xanthine, và bazơ pyrimidin bao gồm uraxil, thymin, và xytosin. Các monome axit nucleic có thể được liên kết bằng các liên kết phosphodieste hoặc các dạng tương tự của các liên kết đó. Các dạng tương tự của các liên kết phosphodieste bao gồm phosphorothioat, phosphorodithioat, phosphoroselenoat, phosphorodiselenoat, phosphoroanilothioat, phosphoranilidat, phosphoramidat, hoặc các dạng tương tự.

Phân tử axit nucleic bao gồm axit polyribonucleic (ARN), axit polydeoxyribonucleic (ADN), bao gồm cADN, ADN bộ gen, và ADN tổng hợp, bất kỳ trong số đó có thể là sợi đơn hoặc sợi kép. Nếu sợi đơn, phân tử axit nucleic có thể là sợi mã hóa hoặc không mã hóa (sợi đối nghĩa). Các polynucleotit (bao gồm các oligonucleotit), và các mảnh của chúng có thể được tạo ra, ví dụ, bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và bằng kỹ thuật dịch mã *in vitro*, hoặc được tạo ra bởi bất kỳ trong số các kỹ thuật nối, cắt, tác động bằng endonucleaza và tác động bằng exonucleaza.

Phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin bao gồm tất cả các trình tự nucleotit mã hóa cùng một trình tự axit amin. Một số phiên bản của các trình tự nucleotit cũng có thể bao gồm (các) intron ở mức độ mà (các) intron này có thể bị loại bỏ thông qua các

cơ chế đồng phiên mã và sau phiên mã. Các trình tự nucleotit khác nhau có thể mã hóa cùng một trình tự axit amin do sự dư thừa hoặc thoái hóa của mã di truyền, hoặc bằng cách nối, hoặc bằng cả hai.

Các biến thể của phân tử axit nucleic theo sáng chế cũng được dự tính. Các phân tử axit nucleic biến thể có tỷ lệ đồng nhất ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 99,9% với phân tử axit nucleic của polynucleotit xác định hoặc tham chiếu như được đề cập trong bản mô tả này, hoặc phân tử lai với polynucleotit trong các điều kiện lai nghiêm ngặt là natri clorua 0,015M, natri xitrat 0,0015M ở nhiệt độ khoảng 65-68°C hoặc natri clorua 0,015M, natri xitrat 0,0015M, và formamit 50% ở nhiệt độ khoảng 42°C. Các biến thể của phân tử axit nucleic duy trì khả năng mã hóa protein dung hợp hoặc miền gắn kết của chúng có chức năng được đề cập trong bản mô tả này, như gắn kết đặc hiệu phân tử đích.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "biến thể trình tự" để chỉ trình tự bất kỳ có một hoặc nhiều thay đổi so với trình tự tham chiếu, theo đó trình tự tham chiếu là trình tự bất kỳ đã công bố và/hoặc các trình tự được liệt kê trong "Bảng trình tự và Số SEQ ID" (danh mục trình tự), tức là SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 139. Do đó, thuật ngữ "biến thể trình tự" bao gồm biến thể trình tự nucleotit và biến thể trình tự axit amin. Theo các phương án nhất định, biến thể trình tự trong ngữ cảnh của trình tự nucleotit, trình tự tham chiếu cũng là trình tự nucleotit, trong khi đó theo các phương án nhất định đối với biến thể trình tự trong ngữ cảnh của trình tự axit amin, trình tự tham chiếu cũng là trình tự axit amin. "Biến thể trình tự" như được sử dụng trong bản mô tả này có thể có tỷ lệ đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, và ít nhất 99% với trình tự tham chiếu.

"Tỷ lệ phần trăm đồng nhất trình tự" để chỉ mối quan hệ giữa hai hoặc nhiều trình tự, như được xác định bằng cách so sánh các trình tự. Các phương pháp để xác định tỷ lệ phần trăm đồng nhất trình tự có thể được thiết kế để tạo ra sự phù hợp tốt nhất giữa các trình tự được so sánh. Ví dụ, các trình tự có thể được sắp thẳng hàng nhằm mục đích so sánh tối ưu (ví dụ, các khoảng trống có thể được đưa vào một hoặc cả hai trình tự axit amin hoặc trình tự axit nucleic thứ nhất và thứ hai để có sự sắp thẳng hàng tối ưu). Ngoài ra, các trình tự không tương đồng có thể được bỏ qua nhằm mục đích so sánh. Tỷ lệ

phần trăm đồng nhất trình tự được đề cập trong bản mô tả này được tính toán trên độ dài của trình tự tham chiếu, trừ khi có quy định khác. Có thể tìm thấy các phương pháp xác định tỷ lệ đồng nhất và tương đồng trình tự trong các chương trình máy tính có sẵn công khai. Sự xếp sắp hàng trình tự và tính toán tỷ lệ phần trăm đồng nhất có thể được thực hiện bằng chương trình BLAST (ví dụ, BLAST 2.0, BLASTP, BLASTN, và BLASTX). Thuật toán toán học được sử dụng trong các chương trình BLAST có thể được tìm thấy trong Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997. Trong ngữ cảnh theo sáng chế, sẽ hiểu rằng khi phần mềm phân tích trình tự được sử dụng để phân tích, kết quả của phân tích này là dựa trên "giá trị mặc định" của chương trình được tham chiếu. "Giá trị mặc định" có nghĩa là tập hợp giá trị hoặc tham số bất kỳ tải ban đầu bằng phần mềm khi được khởi tạo lần đầu.

"Biến thể trình tự" trong ngữ cảnh của trình tự axit nucleic (nucleotit) có trình tự bị thay đổi, trong đó một hoặc nhiều nucleotit trong trình tự tham chiếu được xóa bỏ, hoặc được thay thế, hoặc một hoặc nhiều nucleotit được gắn xen vào trình tự của trình tự nucleotit tham chiếu. Các nucleotit được đề cập đến ở đây bằng ký hiệu chuẩn một chữ cái (A, C, G, hoặc T). Do sự suy biến của mã di truyền, "biến thể trình tự" của trình tự nucleotit có thể dẫn đến sự thay đổi trình tự axit amin tham chiếu tương ứng, tức là trong "biến thể trình tự" axit amin hoặc không. Theo các phương án nhất định, biến thể trình tự nucleotit không dẫn đến biến thể trình tự axit amin (ví dụ, đột biến câm). Theo một số phương án, biến thể trình tự nucleotit dẫn đến một hoặc nhiều đột biến "không câm" được dự tính. Theo một số phương án, biến thể trình tự nucleotit theo sáng chế mã hóa trình tự axit amin có tỷ lệ đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 85 %, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin tham chiếu. Trình tự nucleotit và amino như được bộc lộ trong bản mô tả này cũng để chỉ các phiên bản được tối ưu hóa codon của trình tự nucleotit hoặc axit amin tham chiếu hoặc kiểu hoang. Theo các phương án bất kỳ được đề cập trong bản mô tả này, polynucleotit theo sáng chế có thể được tối ưu hóa codon cho tế bào chủ chứa polynucleotit (xem, ví dụ, Scholten et al., Clin. Immunol. 119:135-145 (2006). Việc tối ưu hóa codon có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật và công cụ đã biết, ví dụ, bằng cách sử dụng công cụ GenScript® OptimumGene™, hoặc công cụ tổng hợp gen GeneArt (Thermo Fisher Scientific). Trình

tự được tối ưu hóa codon bao gồm các trình tự được tối ưu hóa codon một phần (tức là ít nhất một được tối ưu hóa codon để biểu hiện trong tế bào chủ) và các trình tự được tối ưu hóa codon hoàn toàn.

"Biến thể trình tự" trong ngữ cảnh của trình tự axit amin có trình tự thay đổi trong đó một hoặc nhiều axit amin được xóa bỏ, thay thế, hoặc gắn xen so với trình tự axit amin tham chiếu. Do các thay đổi này, biến thể trình tự như vậy có trình tự axit amin có tỷ lệ đồng nhất ít nhất 80%, ít nhất 85 %, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin tham chiếu. Ví dụ, trên mỗi 100 axit amin của trình tự tham chiếu trình tự biến thể mà có không nhiều hơn 10 thay đổi, tức là sự kết hợp bất kỳ của đột biến mất đoạn, gắn xen hoặc thay thế, có "tỷ lệ đồng nhất ít nhất 90%" với trình tự tham chiếu.

"Các thay thế thế bảo toàn" để chỉ các thay thế axit amin không ảnh hưởng đáng kể hoặc làm thay đổi các đặc điểm gắn kết của protein cụ thể. Nói chung, các thay thế bảo toàn là các thay thế trong đó gốc axit amin được thay thế được thế bằng gốc axit amin có chuỗi bên tương tự. Các đột biến thế bảo toàn bao gồm sự thay thế được tìm thấy trong một trong các nhóm sau đây: Nhóm 1: Alanin (Ala hoặc A), Glyxin (Gly hoặc G), Serin (Ser hoặc S), Threonin (Thr hoặc T); Nhóm 2: Axit aspartic (Asp hoặc D), Axit glutamic (Glu hoặc Z); Nhóm 3: Asparagin (Asn hoặc N), Glutamin (Gln hoặc Q); Nhóm 4: Arginin (Arg hoặc R), Lysin (Lys hoặc K), Histidin (His hoặc H); Nhóm 5: Isoleuxin (Ile hoặc I), Leuxin (Leu hoặc L), Methionin (Met hoặc M), Valin (Val hoặc V); và Nhóm 6: Phenylalanin (Phe hoặc F), Tyrosin (Tyr hoặc Y), Tryptophan (Trp hoặc W). Ngoài ra hoặc theo cách khác, các axit amin có thể được nhóm thành các nhóm thay thế bảo toàn theo chức năng, cấu trúc hóa học hoặc thành phần tương tự (ví dụ, có tính axit, bazơ, béo, thơm hoặc chứa lưu huỳnh). Ví dụ, nhóm béo có thể bao gồm, nhằm mục đích thay thế, Gly, Ala, Val, Leu, và Ile. Các nhóm thay thế bảo toàn khác bao gồm: chứa lưu huỳnh: Met và Xystein (Cys hoặc C); có tính axit: Asp, Glu, Asn, và Gln; gốc béo nhỏ, không phân cực hoặc hơi phân cực: Ala, Ser, Thr, Pro và Gly; gốc phân cực, tích điện âm và các amit của chúng: Asp, Asn, Glu, và Gln; các gốc phân cực, tích điện dương: His, Arg, và Lys; gốc béo lớn, không phân cực: Met, Leu, Ile, Val, và Cys; và

gốc thơm lớn: Phe, Tyr, và Trp. Thông tin bổ sung có thể được tìm thấy trong Creighton (1984) Proteins, W.H. Freeman or Company.

Các đột biến gắn xen trình tự axit amin có thể bao gồm các dung hợp đầu cùng amino- và/hoặc carboxyl có chiều dài thay đổi từ một gốc đến các polypeptit chứa một trăm gốc hoặc nhiều hơn, cũng như các gắn xen bên trong trình tự của một hoặc nhiều gốc axit amin. Ví dụ về các gắn xen đầu cùng bao gồm dung hợp với các đầu cùng N hoặc C của trình tự axit amin với phân tử chỉ thị hoặc enzym.

Nói chung, các thay đổi trong biến thể trình tự không loại bỏ hoặc làm giảm đáng kể chức năng mong muốn của trình tự tham chiếu tương ứng. Ví dụ, tốt hơn là trình tự biến thể theo sáng chế không làm giảm đáng kể hoặc loại bỏ hoàn toàn chức năng của trình tự kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, để gắn kết với cùng epitop và/hoặc để vô hiệu hóa đủ sự nhiễm HBV và HDV so với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên có (hoặc được mã hóa bởi) trình tự tham chiếu. Hướng dẫn để xác định nucleotit và gốc axit amin nào, tương ứng, có thể được thay thế, gắn xen hoặc xóa bỏ mà không làm mất cấu trúc hoặc chức năng mong muốn có thể được tìm thấy bằng cách sử dụng, ví dụ, các chương trình máy tính đã biết.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, trình tự axit nucleic hoặc trình tự axit amin "có nguồn gốc từ" axit nucleic, peptit, polypeptit hoặc protein được chỉ định đề cập đến nguồn gốc của axit nucleic, peptit, polypeptit hoặc protein này. Trình tự axit nucleic hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự cụ thể có thể có trình tự axit amin gần như đồng nhất với trình tự hoặc một phần của trình tự này, mà từ đó thu được nó, nhờ đó "gần như đồng nhất" bao gồm các biến thể trình tự như được mô tả trên đây. Trình tự axit nucleic hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ peptit hoặc protein cụ thể, có thể có nguồn gốc từ miền tương ứng trong peptit hoặc protein cụ thể này. Trong ngữ cảnh này, "tương ứng" đề cập đến việc có cùng chức năng hoặc đặc điểm cần quan tâm. Ví dụ, "miền ngoại bào" tương ứng với "miền ngoại bào" khác (của protein khác), hoặc "miền xuyên màng" tương ứng với "miền xuyên màng" khác (của protein khác). Do đó, các phần "tương ứng của peptit, protein và axit nucleic có thể dễ dàng được nhận ra đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tương tự, trình tự "có nguồn gốc từ" trình tự khác (ví dụ, "nguồn") có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này là có nguồn gốc trong trình tự nguồn.

Trình tự axit nucleic hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ axit nucleic, peptit, polypeptit hoặc protein khác có thể giống với axit nucleic, peptit, polypeptit hoặc protein ban đầu (mà từ đó thu được nó). Tuy nhiên, trình tự axit nucleic hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ axit nucleic, peptit, polypeptit hoặc protein khác cũng có thể có một hoặc nhiều đột biến so với axit nucleic, peptit, polypeptit hoặc protein ban đầu (mà từ đó thu được nó), cụ thể là trình tự axit nucleic hoặc trình tự axit amin có nguồn gốc từ axit nucleic, peptit, polypeptit hoặc protein khác có thể là biến thể trình tự chức năng như được mô tả trên đây về axit nucleic, peptit, polypeptit hoặc protein ban đầu (mà từ đó thu được nó). Ví dụ, trong peptit/protein, một hoặc nhiều gốc axit amin có thể được thay thế bằng gốc axit amin khác, hoặc một hoặc nhiều gắn xen hoặc xóa bỏ gốc axit amin có thể xảy ra.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "đột biến" để chỉ thay đổi trong trình tự axit nucleic và/hoặc trong trình tự axit amin so với trình tự tham chiếu, ví dụ, trình tự bộ gen, trình tự kiểu hoang, hoặc trình tự tham chiếu tương ứng. Đột biến, ví dụ, so với trình tự bộ gen tham chiếu, có thể là, ví dụ, đột biến soma (xảy ra tự nhiên), đột biến tự phát, đột biến cảm ứng, ví dụ, gây ra bởi các enzym, hóa chất hoặc bức xạ, hoặc đột biến thu được bằng cách gây đột biến điểm (các phương pháp sinh học phân tử để tạo ra những thay đổi cụ thể và có chủ ý trong trình tự axit nucleic và/hoặc trong trình tự axit amin). Do đó, các thuật ngữ "đột biến" hoặc "gây đột biến" cũng sẽ được hiểu là bao gồm việc tác động bằng vật lý hoặc gây ra đột biến, ví dụ, trong trình tự axit nucleic hoặc trong trình tự axit amin. Đột biến bao gồm thay thế, xóa bỏ và gắn xen một hoặc nhiều nucleotit hoặc axit amin cũng như đảo ngược một số nucleotit hoặc axit amin liên tiếp. Để đạt được đột biến trong trình tự axit amin, đột biến có thể được đưa vào trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin này để biểu hiện polypeptit đã đột biến (tái tổ hợp). Đột biến có thể đạt được, ví dụ, bằng cách thay đổi (ví dụ, bằng cách gây đột biến điểm) codon (ví dụ, bằng cách thay đổi một, hai hoặc ba bazơ nucleotit trong đó) của phân tử axit nucleic mã hóa một axit amin để tạo ra codon mã hóa axit amin khác, hoặc mã hóa cùng axit amin, hoặc bằng cách tổng hợp biến thể trình tự.

Thuật ngữ "được đưa vào" trong ngữ cảnh gắn xen phân tử axit nucleic vào tế bào, nghĩa là "chuyển nhiễm", hoặc "biến nạp" hoặc "tải nạp" và bao gồm việc đưa phân tử axit nucleic vào tế bào nhân chuẩn hoặc tế bào tiền nhân trong đó phân tử axit nucleic

này có thể được đưa vào bộ gen của tế bào (ví dụ, nhiễm sắc thể, plasmit, plastit hoặc ADN ty thể), được chuyển hóa thành đơn vị sao chép tự trị, và được biểu hiện tạm thời (ví dụ, mARN đã được chuyển nhiễm).

Thuật ngữ "tái tổ hợp", như được sử dụng trong bản mô tả này (ví dụ, kháng thể tái tổ hợp, protein tái tổ hợp, axit nucleic tái tổ hợp, hoặc các dạng tương tự, để chỉ phân tử bất kỳ (kháng thể, protein, axit nucleic, hoặc các dạng tương tự) được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng phương tiện tái tổ hợp, và không xảy ra một cách tự nhiên. "Tái tổ hợp" có thể được sử dụng đồng nghĩa với "được thao tác di truyền" hoặc "không phải tự nhiên" và có thể đề cập đến sinh vật, vi sinh vật, tế bào, phân tử axit nucleic, hoặc vectơ bao gồm ít nhất một cải biến di truyền hoặc đã được cải biến bằng cách đưa vào phân tử axit nucleic ngoại sinh, trong đó các thay đổi hoặc cải biến như vậy được đưa vào bằng kỹ thuật di truyền (tức là, sự can thiệp của con người). Cải biến di truyền bao gồm, ví dụ, các biến đổi đưa vào các phân tử axit nucleic có thể biểu hiện mã hóa protein, protein dung hợp hoặc enzym, hoặc các đột biến bổ sung, xóa bỏ, thay thế các phân tử axit nucleic khác hoặc sự phá vỡ chức năng khác của vật liệu di truyền của tế bào. Các cải biến bổ sung bao gồm, ví dụ, các vùng điều hòa không mã hóa trong đó các cải biến làm thay đổi sự biểu hiện của polynucleotit, gen hoặc operon.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "dị loài" hoặc "không nội sinh" hoặc "ngoại sinh" đề cập đến gen, protein, hợp chất, phân tử axit nucleic, hoặc hoạt tính bất kỳ không phải là tự nhiên đối với tế bào chủ hoặc đối tượng, hoặc gen, protein, hợp chất, phân tử axit nucleic, hoặc hoạt tính bất kỳ là tự nhiên đối với tế bào chủ và đối tượng đã được thay đổi. Dị loài, không nội sinh, hoặc ngoại sinh bao gồm gen, protein, hợp chất, hoặc phân tử axit nucleic đã được gây đột biến hoặc thay đổi theo cách khác sao cho cấu trúc, hoạt tính, hoặc cả hai là khác nhau giữa gen, protein, hợp chất, hoặc phân tử axit nucleic tự nhiên và biến đổi. Theo các phương án nhất định, gen, protein, hoặc phân tử axit nucleic dị loài, không nội sinh, hoặc ngoại sinh có thể không phải là nội sinh đối với tế bào chủ hoặc đối tượng, mà thay vào đó, axit nucleic mã hóa gen, protein, hoặc phân tử axit nucleic này có thể đã được bổ sung vào tế bào chủ bằng cách liên hợp, biến nạp, chuyển nhiễm, điện chuyển, hoặc các phương pháp tương tự, trong đó phân tử axit nucleic đã được bổ sung có thể tích hợp vào bộ gen tế bào chủ hoặc có thể tồn tại dưới dạng vật chất di truyền ngoài nhiễm sắc thể (ví dụ, dưới dạng plasmit hoặc vectơ tự sao

chép khác). Thuật ngữ "tương đồng" hoặc "thể tương đồng" để chỉ gen, protein, hợp chất, phân tử axit nucleic, hoặc hoạt tính được tìm thấy trong hoặc có nguồn gốc từ tế bào chủ, loài hoặc chủng. Ví dụ, polynucleotit hoặc gen dị loài hoặc ngoại sinh mã hóa polypeptit có thể tương đồng với polynucleotit hoặc gen tự nhiên và mã hóa polypeptit hoặc hoạt tính tương đồng, nhưng polynucleotit hoặc polypeptit này có thể có cấu trúc, trình tự, mức biểu hiện đã được thay đổi hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng. Polynucleotit hoặc gen không nội sinh, cũng như polypeptit hoặc hoạt tính đã được mã hóa, có thể có nguồn gốc từ loài giống nhau, loài khác nhau, hoặc kết hợp của chúng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "nội sinh" hoặc "tự nhiên" để chỉ polynucleotit, gen, protein, hợp chất, phân tử, hoặc hoạt tính thường có mặt trong tế bào chủ hoặc đối tượng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "tế bào", "dòng tế bào", và "môi trường nuôi cấy tế bào" được sử dụng thay thế cho nhau và tất cả các tên gọi như vậy bao gồm cả thế hệ con cháu. Do đó, các cụm từ "thể biến nạp" và "tế bào đã được biến nạp" bao gồm tế bào sơ cấp của đối tượng và các môi trường nuôi cấy có nguồn gốc từ đó bất kể số lần chuyển. Cũng hiểu rằng tất cả các thế hệ con cháu có thể không giống nhau chính xác về thành phần ADN, do đột biến cố ý và vô ý. Các thế hệ con cháu có chức năng, kiểu hình hoặc hoạt động sinh học giống nhau hoặc gần như giống nhau như được sàng lọc trong tế bào đã được biến nạp ban đầu được bao gồm. Khi các tên gọi riêng được dự định, nó sẽ rõ ràng từ ngữ cảnh.

Sáng chế đề xuất, một phần, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, và protein dung hợp có khả năng trung hòa virut viêm gan B và virut viêm gan delta. Các phương án của kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, và protein dung hợp theo sáng chế có thể được sử dụng trong các phương pháp ngăn ngừa, điều trị, hoặc làm suy giảm hoặc chẩn đoán HBV và HDV. Theo các phương án đặc biệt, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, và protein dung hợp được đề cập trong bản mô tả này gắn kết với hai hoặc nhiều kiểu gen khác nhau của kháng nguyên bề mặt virut viêm gan B và với hai hoặc nhiều đột biến gây nhiễm khác nhau của kháng nguyên bề mặt virut viêm gan B. Theo các phương án cụ thể, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, và protein dung hợp được đề cập trong bản mô tả này gắn kết với tất cả các kiểu gen đã biết của kháng nguyên bề mặt

virut viêm gan B và với tất cả các đột biến gây nhiễm đã biết của kháng nguyên bề mặt virut viêm gan B.

Kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, có khả năng gắn kết với vùng vòng kháng nguyên của HBsAg và có khả năng vô hiệu hóa sự nhiễm virut viêm gan B và virut viêm gan delta.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, và trừ khi có quy định khác rõ ràng, "kháng thể" để chỉ kháng thể nguyên vẹn bao gồm ít nhất hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được nối với nhau bằng liên kết disulfua (mặc dù sẽ hiểu rằng các kháng thể chuỗi nặng, mà thiếu chuỗi nhẹ, vẫn được bao hàm trong thuật ngữ "kháng thể"), cũng như phần gắn kết kháng nguyên bất kỳ hoặc mảnh của kháng thể nguyên vẹn có hoặc giữ được khả năng gắn kết với phân tử đích kháng nguyên được nhận biết bởi kháng thể nguyên vẹn này như, ví dụ, mảnh scFv, Fab, hoặc $F(ab')_2$. Do đó, thuật ngữ "kháng thể" trong bản mô tả này được sử dụng theo nghĩa rộng nhất và bao gồm kháng thể đơn dòng và kháng thể đa dòng, bao gồm kháng thể nguyên vẹn và mảnh kháng thể chức năng (gắn kết kháng nguyên) của chúng, bao gồm mảnh gắn kết kháng nguyên (Fab), mảnh $F(ab')_2$, mảnh Fab', mảnh Fv, mảnh IgG tái tổ hợp (rIgG), mảnh kháng thể chuỗi đơn, bao gồm mảnh biến thể chuỗi đơn (scFv), và mảnh kháng thể miền đơn (ví dụ, sdAb, sdFv, nanobody). Thuật ngữ này bao hàm các dạng đã được thao tác di truyền và/hoặc các dạng đã được cải biến khác của globulin miễn dịch, như kháng thể nội (intrabody), kháng thể chứa peptit hoạt động sinh học (peptibody), kháng thể khảm, kháng thể người hoàn toàn, kháng thể được làm tương thích với người, và kháng thể dị liên hợp, kháng thể đa đặc hiệu, ví dụ, đặc hiệu kép, dime của đoạn globulin miễn dịch (diabody), trime của đoạn globulin miễn dịch (triabody), và tetrame của đoạn globulin miễn dịch (tetrabody), di-scFv nối tiếp, tri-scFv nối tiếp. Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ "kháng thể" nên được hiểu là bao hàm mảnh kháng thể chức năng của chúng. Thuật ngữ này cũng bao hàm kháng thể nguyên vẹn hoặc có chiều dài đầy đủ, bao gồm kháng thể thuộc lớp hoặc phân lớp bất kỳ của chúng, bao gồm IgG và các phân lớp của chúng, IgM, IgE, IgA, và IgD.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "mảnh gắn kết kháng nguyên", "mảnh", và "mảnh kháng thể" được sử dụng thay thế cho nhau để chỉ mảnh

bất kỳ của kháng thể theo sáng chế vẫn giữ được hoạt tính gắn kết kháng nguyên của kháng thể. Ví dụ về mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể chuỗi đơn, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv hoặc scFv.

Kháng thể người là đã biết (ví dụ, van Dijk, M. A., và van de Winkel, J. G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Kháng thể người có thể được tạo ra ở động vật chuyển gen (ví dụ, chuột nhắt) có khả năng, khi được chủng ngừa, tạo ra nguồn đầy đủ hoặc chọn các kháng thể người khi không có quá trình sản xuất globulin miễn dịch nội sinh. Việc chuyển mảng gen globulin miễn dịch dòng mầm của người ở chuột nhắt đột biến dòng mầm như vậy sẽ dẫn đến sự sản xuất kháng thể người khi gây nhiễm bằng kháng nguyên (xem, ví dụ, Jakobovits, A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., *Nature* 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., *Year Immunol.* 7 (1993) 3340). Kháng thể người cũng có thể được sản xuất trong các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn (Hoogenboom, H. R., và Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388; Marks, J. D., et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597). Các kỹ thuật của Cole et al. và Boerner et al. cũng có sẵn để sản xuất kháng thể đơn dòng của người (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); và Boerner, P., et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). Kháng thể đơn dòng của người có thể được sản xuất bằng cách sử dụng kỹ thuật làm bất tử tế bào EBV-B cải tiến như được mô tả trong Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R, Lanzavecchia A. (2004): An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. Nat Med. 10(8):871-5. Thuật ngữ "kháng thể người" như được sử dụng trong bản mô tả này cũng bao gồm kháng thể như vậy mà được cải biến, ví dụ, trong vùng biến đổi, để tạo ra các đặc điểm theo kháng thể và mảnh kháng thể theo sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vùng biến đổi" (vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L), vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H)) để chỉ mỗi polypeptit vùng biến đổi của cặp chuỗi nhẹ và chuỗi nặng mà trong hầu hết các trường hợp, có liên quan trực tiếp đến việc gắn kết kháng thể với kháng nguyên.

Kháng thể theo sáng chế có thể là isotyp bất kỳ (ví dụ, IgA, IgG, IgM, IgE, IgD; tức là bao gồm chuỗi nặng α, γ, μ, ε, hoặc δ). Trong isotyp IgG, ví dụ, các kháng thể có thể là phân lớp IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4. Theo các phương án cụ thể, kháng thể theo

sáng chế là kháng thể IgG1. Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được đề xuất trong bản mô tả này có thể bao gồm chuỗi nhẹ κ hoặc λ. Theo các phương án nhất định, kháng thể đặc hiệu với HBsAg được đề cập trong bản mô tả này thuộc isotyp IgG và có thể phong bế quá trình giải phóng HBV và HBsAg từ tế bào đã bị nhiễm. Theo đó, theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế có thể gắn kết nội bào và do đó phong bế quá trình giải phóng các hạt virut (virion) HBV và HBsAg.

Các thuật ngữ "VL" và "VH" để chỉ vùng gắn kết biến đổi lần lượt từ chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể. Vùng gắn kết biến đổi được tạo thành từ các vùng con rời rạc, được xác định rõ ràng, được gọi là "vùng quyết định bổ sung" (CDR) và "vùng khung" (FR). Các thuật ngữ "vùng quyết định bổ sung" và "CDR" đồng nghĩa với "vùng siêu biến" hoặc "HVR", và là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để chỉ trình tự của axit amin trong TCR hoặc vùng biến đổi kháng thể, mà tạo ra tính đặc hiệu kháng nguyên và/hoặc ái lực gắn kết và được tách biệt bằng trình tự khung. Nói chung, có ba CDR trong mỗi vùng biến đổi của protein gắn kết globulin miễn dịch; ví dụ, đối với kháng thể, vùng VH và VL bao gồm sáu CDR HCDR1, HCDR2, HCDR3; LCDR1, LCDR2, LCDR3; cũng được gọi lần lượt trong bản mô tả này là CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, và CDRL3). Như được sử dụng trong bản mô tả này, "biến thể" của CDR để chỉ biến thể chức năng của trình tự CDR có đến 1-3 đột biến thay thế, xóa bỏ axit amin, hoặc các kết hợp của chúng.

Trình tự globulin miễn dịch có thể được sắp thẳng hàng cho sơ đồ đánh số (ví dụ, Kabat, EU, Hệ thống thông tin di truyền miễn dịch quốc tế (International Immunogenetics Information System: IMGT) và Aho), mà có thể cho phép các vị trí gốc tương đương được chú thích và để các phân tử khác nhau được so sánh bằng cách sử dụng công cụ phần mềm phân loại thụ thể và đánh số thụ thể kháng nguyên (ANARCI) (2016, Bioinformatics 15:298-300). Cần hiểu rằng theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể bao gồm tất cả hoặc một phần chuỗi nặng (HC), chuỗi nhẹ (LC), hoặc cả hai. Ví dụ, monome kháng thể IgG nguyên vẹn có chiều dài đầy đủ thường bao gồm VH, CH1, CH2, CH3, VL, và CL. Các thành phần Fc được mô tả thêm trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm CDRH1, CDRH2,

CDRH3, CDRL1, CDRL2, và CDRL3 theo bất kỳ một trong số các trình tự VH và VL được bộc lộ ở đây, tương ứng.

Bảng 1 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH), vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL), CDR, chuỗi nặng (HC), và chuỗi nhẹ (LC) của kháng thể được lấy làm ví dụ nhất định theo sáng chế.

Mô tả trình tự kháng thể	**SEQ ID NO:**	**Trình tự axit amin**
HBC34-V35 VH; HBC34-V34 VH; HBC23-LC40A VH; HBC23-LC40S VH; HBC34-LC40A VH; HBC34-LC40S VH	41	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAAS GRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATI NQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNAKN SLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGN SGGMDVWGQGTTVSVSS
HBC34v31_LC40A VH HBC34v31_LC40S VH HBC34v32_LC40A VH HBC34v32_LC40S VH HBC34v33_LC40A VH HBC34v32_LC40S VH	67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG RIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVANIN QDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNAKNS LFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGNS GGMDVWGQGTTVTVSS
HBC34-V35 VL	89	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKL GNKNVAWFQHKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTV L
HBC34-V34 VL	90	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKL GNKNVSWFQHKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTV L
HBC34-V23-VL _C40S	110	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKL GNKNASWYQQKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEADYYCQTFDSTTVVFGGGTKLT VL
HBC34-V23-VL _C40A	111	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKL GNKNAAWYQQKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEADYYCQTFDSTTVVFGGGTKLT VL
HBC34-V31-VL _C40S	112	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKL GNKNVSWFQHKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA

Mô tả trình tự kháng thể	SEQ ID NO:	Trình tự axit amin
		MDEAAYFCQTWDSTTVVFGGGTRLT VL
HBC34-V31-VL_C40A	113	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKL GNKNVAWFQHKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEAAYFCQTWDSTTVVFGGGTRLT VL
HBC34-V32-VL_C40S	114	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKL GNKNVSWFQHKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTV L
HBC34-V32-VL _C40A	115	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKL GNKNVAWFQHKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTV L
HBC34-V33-VL_C40S	116	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKL GNKNASWYQQKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEADYYCQTFDSTTVVFGGGTKLT VL
HBC34-V33-VL _C40A	117	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKL GNKNAAWYQQKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEADYYCQTFDSTTVVFGGGTKLT VL
HBC34-VL_C40S	118	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKL GNKNVSWFQHKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEAAYFCQTWDSTTVVFGGGTRLT VL
HBC34-VL_C40A	119	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKL GNKNVAWFQHKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEAAYFCQTWDSTTVVFGGGTRLT VL
HBC34-V35 CDRH1; HBC34-V34 CDRH1; HBC34-V23_LC40S CDRH1; HBC34-V23_LC40CDRH1; HBC34-V31_LC40S CDRH1; HBC34-V31_LC40CDRH1; HBC34-V32_LC40S CDRH1; HBC34-V32_LC40CDRH1; HBC34-V33_LC40S CDRH1; HBC34-V33_LC40CDRH1; HBC34_LC40S CDRH1;	34	GRIFRSFY

Mô tả trình tự kháng thể	SEQ ID NO:	Trình tự axit amin
HBC34_LC40CDRH1		
HBC34-V35 CDRH2; HBC34-V34 CDRH2; HBC34-V23_LC40S CDRH2; HBC34-V23_LC40CDRH2; HBC34-V31_LC40S CDRH2; HBC34-V31_LC40CDRH2; HBC34-V32_LC40S CDRH2; HBC34-V32_LC40CDRH2; HBC34-V33_LC40S CDRH2; HBC34-V33_LC40CDRH2; HBC34_LC40S CDRH2; HBC34_LC40CDRH2 **(CDRH2 ngắn)**	35	NQDGSEK
HBC34-V35 CDRH2; HBC34-V34 CDRH2; HBC34-V23_LC40S CDRH2; HBC34-V23_LC40CDRH2; HBC34-V31_LC40S CDRH2; HBC34-V31_LC40CDRH2; HBC34-V32_LC40S CDRH2; HBC34-V32_LC40CDRH2; HBC34-V33_LC40S CDRH2; HBC34-V33_LC40CDRH2; HBC34_LC40S CDRH2; HBC34_LC40CDRH2 **(CDRH2 dài)**	66	INQDGSEK
HBC34-V35 CDRH3; HBC34-V34 CDRH3; HBC34-V23_LC40S CDRH3; HBC34-V23_LC40CDRH3; HBC34-V31_LC40S CDRH3; HBC34-V31_LC40CDRH3; HBC34-V32_LC40S CDRH3; HBC34-V32_LC40CDRH3; HBC34-V33_LC40S CDRH3; HBC34-V33_LC40CDRH3; HBC34_LC40S CDRH3; HBC34_LC40CDRH3	36	AAWSGNSGGMDV
HBC34-V35 CDRL1; HBC34-V34 CDRL1; HBC34-V23_LC40S CDRL1; HBC34-V23_LC40CDRL1; HBC34-V31_LC40S CDRL1; HBC34-V31_LC40CDRL1; HBC34-V32_LC40S CDRL1; HBC34-V32_LC40CDRL1; HBC34-V33_LC40S CDRL1;	37	KLGNKN

Mô tả trình tự kháng thể	SEQ ID NO:	Trình tự axit amin
HBC34-V33_LC40CDRL1; HBC34_LC40S CDRL1; HBC34_LC40CDRL1		
HBC34-V35 CDRL2; HBC34-V34 CDRL2; HBC34-V23_LC40S CDRL2; HBC34-V23_LC40CDRL2; HBC34-V31_LC40S CDRL2; HBC34-V31_LC40CDRL2; HBC34-V32_LC40S CDRL2; HBC34-V32_LC40CDRL2; HBC34-V33_LC40S CDRL2; HBC34-V33_LC40CDRL2; HBC34_LC40S CDRL2; HBC34_LC40CDRL2 (CDRL2 ngắn)	38	EVK
HBC34-V35 CDRL2; HBC34-V34 CDRL2; HBC34-V23_LC40S CDRL2; HBC34-V23_LC40CDRL2; HBC34-V31_LC40S CDRL2; HBC34-V31_LC40CDRL2; HBC34-V32_LC40S CDRL2; HBC34-V32_LC40CDRL2; HBC34-V33_LC40S CDRL2; HBC34-V33_LC40CDRL2; HBC34_LC40S CDRL2; HBC34_LC40CDRL2 (LCDR2 dài)	39	VIYEVKYRP
HBC34-V35 CDRL3; HBC34-V34 CDRL3; HBC34-V23_LC40S CDRL3; HBC34-V23_LC40CDRL3; HBC34-V32_LC40S CDRL3; HBC34-V32_LC40CDRL3; HBC34-V33_LC40S CDRL3; HBC34-V33_LC40CDRL3;	58	QTFDSTTVV
HBC34_LC40S CDRL3; HBC34_LC40CDRL3; HBC34-V31_LC40S CDRL3; HBC34-V31_LC40CDRL3;	40	QTWDSTTVV
HC của HBC34-V35-MLNS-GAALIE và HBC34-V34-MLNS-GAALIE (g1M17, 1)	91	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAAS GRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATI NQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNAKN SLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGN SGGMDVWGQGTTVSVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG

Mô tả trình tự kháng thể	SEQ ID NO:	Trình tự axit amin
		LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKS LSLSPGK
HC của HBC34-V35-MLNS và HBC34-V34-MLNS	92	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAAS GRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATI NQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNAKN SLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGN SGGMDVWGQGTTVSVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKS LSLSPGK
LC của HBC34-V35	93	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKL GNKNVAWFQHKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTV LGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATL VCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE CS
LC của HBC34-V34	94	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKL GNKNVSWFQHKPGQSPVLVIYEVKY RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEAAYFCQTFDSTTVVFGGGTRLTV LGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATL VCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE CS

Mô tả trình tự kháng thể	SEQ ID NO:	Trình tự axit amin
HBC24 VH	95	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG STFTKYAMSWVRQAPGKGLEWVASI SGSVPGFGIDTYYADSVKGRFTISRDT SKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKD VGVIGSYYYYAMDVWGQGTAVTVSS
HBC24 VL	96	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQ GLSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYSAS TRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYAYSPRWTFGQGTKV EIK
HBC24 CDRH1	97	GSTFTKYA
HBC24 CDRH2	98	ISGSVPGF
HBC24 CDRH3	99	LYYCAKDVGVIGSYYYYAMDV
HBC24 CDRL1	100	QGLSSSY
HBC24 CDRL2	101	SAS
HBC24 CDRL3	102	QQYAYSPRWT
HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35 HC (VH-bản lề-CH1-CH2-CH3) (kiểu hoang)	129	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAAS GRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATI NQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNAKN SLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGN SGGMDVWGQGTTVSVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
WT hIgG1 Fc	137	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
HBC34-V7, HBC34-V23, HBC34-V34, HBC34-V35, HBC34_C40S,	138	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAAS GRIFRSFYMSWVRQAPGKGLEWVATI NQDGSEKLYVDSVKGRFTISRDNAKN SLFLQMNNLRVEDTAVYYCAAWSGN SGGMDVWGQGTTVSVSSASTKGPSV

Mô tả trình tự kháng thể	SEQ ID NO:	Trình tự axit amin
HBC34_C40A, HBC34-V23_C40S, HBC34-V23_C40A HC với đột biến GAALIE trong Fc hIgG1		FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

Các mảnh của kháng thể được đề cập trong bản mô tả này có thể thu được từ các kháng thể bằng các phương pháp bao gồm phân cắt bằng enzym, như pepsin hoặc papain, và/hoặc bằng cách phân cắt các liên kết disulfua bằng cách khử hóa học. Theo cách khác, các mảnh của các kháng thể có thể thu được bằng cách tách dòng vô tính và biểu hiện một phần của các trình tự của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ. Sáng chế bao hàm các mảnh Fv chuỗi đơn (scFv) có nguồn gốc từ các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể như được đề cập trong bản mô tả này, bao gồm, ví dụ, scFv chứa các CDR từ kháng thể theo sáng chế, monome và dime chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, kháng thể chuỗi nặng miền đơn, kháng thể chuỗi nhẹ miền đơn, cũng như kháng thể chuỗi đơn, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được nối bằng liên kết peptit.

Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, bao gồm kháng thể đã được tinh chế, kháng thể đơn dòng, kháng thể chuỗi đơn, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv hoặc scFv.

Các kháng thể và các mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể, theo các phương án, là đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép, đặc hiệu ba, đặc hiệu bốn, hoặc các dạng tương tự), và có thể được đề xuất ở dạng đa đặc hiệu bất kỳ, như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế là kháng thể đa đặc hiệu, như kháng thể đặc hiệu kép hoặc đặc hiệu ba. Các dạng cho kháng thể đặc hiệu kép được bộc lộ trong, ví dụ, Spiess et al., Mol. Immunol. 67(2):95 (2015), và trong Brinkmann và Kontermann, mAbs 9(2):182-212 (2017), các dạng đặc hiệu kép này và phương pháp sản xuất chúng được đưa vào bản

mô tả bằng cách viện dẫn và bao gồm, ví dụ, dạng ăn khớp tế bào T đặc hiệu kép (BiTE), DART, các cụm núm trong lỗ (KIH), các cụm scFv-CH3-KIH, kháng thể chuỗi nhẹ chung KIH, TandAbs, thể ba, tiểu thể TriBi, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, $F(ab')_2$-scFv2, HCabs thể bốn, kháng thể nội, CrossMab, Fab tác động kép (DAF) (hai trong một hoặc bốn trong một), DutaMabs, DT-IgG, cặp tích điện, trao đổi nhánh Fab, thể SEED, Triomab, cụm LUZ-Y, Fcab, thể κλ, Fab trực giao, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody, và DVI-IgG (bốn trong một). Kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể đa đặc hiệu có thể bao gồm miền gắn kết đặc hiệu HBV và/hoặc HDV theo sáng chế kết hợp với miền gắn kết đặc hiệu HBV và/hoặc HDV khác theo sáng chế, hoặc kết hợp với miền gắn kết khác gắn kết đặc hiệu với HBV và/hoặc HDV (ví dụ, ở cùng epitop hoặc epitop khác), hoặc với miền gắn kết gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên khác.

Mảnh kháng thể theo sáng chế có thể tạo ra các tương tác đơn giá hoặc đa giá và được chứa trong nhiều cấu trúc khác nhau như được mô tả trên đây. Ví dụ, phân tử scFv có thể được tổng hợp để tạo ra "trime của mảnh globulin miễn dịch" ba giá hoặc "tetrame của mảnh globulin miễn dịch" bốn giá. Các phân tử scFv có thể bao gồm miền của vùng Fc tạo thành các tiểu thể hai giá. Ngoài ra, trình tự của sáng chế có thể là thành phần của các phân tử đa đặc hiệu trong đó trình tự của sáng chế hướng đích epitop theo sáng chế và các vùng khác của phân tử gắn kết với các đích khác. Các phân tử được lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Fab2 đặc hiệu kép, Fab3 đặc hiệu ba, scFv đặc hiệu kép, và thể kép (Holliger and Hudson, 2005, *Nature Biotechnology* 9: 1126-1136).

Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng như các dạng được đề cập trong bản mô tả này, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở scFv, có thể, theo các phương án nhất định, được bao gồm trong protein dung hợp có khả năng gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên như được đề cập trong bản mô tả này. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "protein dung hợp" để chỉ protein mà, trong chuỗi đơn, có ít nhất hai miền hoặc môtip riêng biệt, trong đó miền hoặc môtip này không được tìm thấy tự nhiên cùng nhau, hoặc trong sự sắp xếp đã cho, trong protein. Polynucleotit mã hóa protein dung hợp có thể được xây dựng bằng cách sử dụng PCR, được thao tác di truyền tái tổ

hợp, hoặc các phương pháp tương tự, hoặc protein dung hợp như vậy có thể được tổng hợp.

Theo một số phương án, protein dung hợp có khả năng biểu hiện ở bề mặt của tế bào chủ, ví dụ, tế bào T, tế bào NK hoặc tế bào NK-T. Theo các phương án nhất định, protein dung hợp bao gồm (i) thành phần ngoại bào bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng (ví dụ, scFv); (ii) thành phần xuyên màng (ví dụ, miền xuyên màng từ CD4, CD8, CD27, CD28, hoặc biến thể chức năng hoặc một phần của nó, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng); và (iii) thành phần nội bào bao gồm miền truyền tín hiệu từ protein đồng kích thích, hoặc biến thể chức năng hoặc một phần của nó (ví dụ, miền truyền tín hiệu từ CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD2, CD5, ICAM-1 (CD54), LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), GITR, CD30, CD40, BAFF-R, HVEM, LIGHT, MKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, phối tử gắn kết đặc hiệu với CD83, hoặc biến thể chức năng của chúng, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng), và/hoặc miền hiệu ứng (ví dụ, từ CD3ε, CD3δ, CD3ζ, CD25, CD79A, CD79B, CARD11, DAP10, FcRα, FcRβ, FcRγ, Fyn, HVEM, ICOS, Lck, LAG3, LAT, LRP, NKG2D, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, Wnt, ROR2, Ryk, SLAMF1, Slp76, pTα, TCRα, TCRβ, TRIM, Zap70, PTCH2, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng).

Theo các phương án nhất định, protein dung hợp bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm phân tử thụ thể kháng nguyên khảm (CAR), có thể được biểu hiện trên bề mặt tế bào của tế bào chủ như tế bào T, tế bào NK và tế bào NK-T để sử dụng trong liệu pháp miễn dịch tế bào. Phân tử CAR và nguyên tắc thiết kế được mô tả trong, ví dụ, Sadelain et al., Cancer Discov., 3(4):388 (2013); Harris hoặc Kranz, Trends Pharmacol. Sci., 37(3):220 (2016); Stone et al., Cancer Immunol. Immunother., 63(11):1163 (2014); Xu et al., 2018 Oncotarget 9:13991; Orroulla et al., 2018 Curr. Pharm. Biotechnol. Volume 19 (April 2018); Wu et al., 2016 Expert Opin. Biol. Ther. 16:1469; Ren et al., 2017 Protein Cell 8:634; mà các phân tử CAR, thiết kế CAR và nguyên tắc thiết kế CAR được đưa toàn bộ nội dung vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn .

Trong toàn bộ bản mô tả, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, và protein dung hợp có thể được gọi riêng lẻ hoặc chung (ví dụ, trong kết hợp bất kỳ) là "protein gắn kết".

Protein gắn kết theo sáng chế có thể được đề xuất ở dạng tinh chế. Ví dụ, kháng thể có thể có mặt trong thành phần mà gần như không chứa các polypeptit khác, ví dụ, trong đó ít hơn 90% (theo khối lượng), thường ít hơn 60% và thường xuyên hơn là, ít hơn 50% thành phần này được tạo thành từ các polypeptit khác.

Protein gắn kết theo sáng chế có thể sinh miễn dịch ở vật chủ là người và/hoặc ở vật chủ không phải là người (hoặc dị loài); ví dụ, ở chuột nhắt. Ví dụ, kháng thể có thể có idiotop sinh miễn dịch ở vật chủ không phải là người, mà không phải ở vật chủ là người. Kháng thể theo sáng chế để sử dụng ở người bao gồm các kháng thể thường không được phân lập từ vật chủ như chuột nhắt, dê, thỏ, chuột cống, động vật có vú không phải linh trưởng, hoặc các loài tương tự, và trong một số trường hợp không thu được bằng cách làm tương thích với người hoặc từ chuột nhắt ngoại lai. Cũng được dự tính trong bản mô tả này là các dạng biến thể của kháng thể theo sáng chế, được thao tác di truyền để làm giảm khả năng sinh miễn dịch đã biết hoặc tiềm tàng và/hoặc các nguy cơ tiềm năng khác, hoặc để tạo ra cấu trúc và/hoặc chức năng mong muốn của kháng thể ở động vật không phải là người, như chuột nhắt (ví dụ, kháng thể "đã được làm tương thích với loài gặm nhấm" trong đó một hoặc nhiều gốc, trình tự hoặc môtip axit amin của người được thay thế bằng gốc, trình tự, hoặc môtip đã được làm giảm hoặc loại bỏ khả năng sinh miễn dịch hoặc nguy cơ khác, hoặc có cấu trúc và/hoặc chức năng mong muốn, ở chuột nhắt; ví dụ, cho các nghiên cứu mô hình bằng cách sử dụng chuột nhắt).

Trình tự axit amin của kháng thể đã được làm tương thích với loài gặm nhấm được lấy làm ví dụ theo sáng chế được cung cấp trong Bảng 2.

Mô tả trình tự kháng thể đã được làm tương thích với loài gặm nhấm	**SEQ ID NO.**	**Trình tự axit amin**
HBC34-V7-mu (IgG2a) HC	122	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFY MSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSV KGRFTISRDNAKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYC AAWSGNSGGMDVWGQGTTVSVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLT WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSS TWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPC PPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIV TCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQT

		HREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV NNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEE MTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTE LNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVE RNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
HBC34-V7-mu (IgG2a) LC	123	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVC WFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNS GNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTVVFG GGTRLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSEELETNKATL VCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQGMETTQP SKQSNNKYMASSYLTLTARAWERHSSYSCQVT HEGHTVEKSLSRADCS
HBC34-V35-mu (IgG2a) HC	124	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRSFY MSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYVDSV KGRFTISRDNAKNSLFLQMNNLRVEDTAVYYC AAWSGNSGGMDVWGQGTTVSVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLT WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSS TWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPC PPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIV TCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQT HREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV NNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEE MTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTE LNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVE RNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
HBC34-V35-mu (IgG2a) LC	125	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNVA WFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGSNS GNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTVVFG GGTRLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSEELETNKATL VCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQGMETTQP SKQSNNKYMASSYLTLTARAWERHSSYSCQVT HEGHTVEKSLSRADCS
HBC24-mu (IgG2a) HC	126	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTKYA MSWVRQAPGKGLEWVASISGSVPGFGIDTYYA DSVKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDVGVIGSYYYYAMDVWGQGTAVTVS SAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKG YFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIE PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDV LMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVE VHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMS GKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQV YVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLR VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSR TPGK
HBC24-mu (IgG2a) LC	127	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGLSSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYSASTRATGIPDRFSGSG

		SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAYSPRWTF GQGTKVEIKADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV VCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWT DQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEA THKTSTSPIVKSFNRNEC

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "kháng thể trung hòa" (hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp) là kháng thể có thể vô hiệu hóa, tức là, ngăn ngừa, ức chế, làm giảm, cản trở hoặc can thiệp, khả năng của mầm bệnh trong việc khởi phát và/hoặc kéo dài sự nhiễm ở vật chủ (ví dụ, sinh vật chủ hoặc tế bào chủ). Các thuật ngữ "kháng thể làm trung hòa" và "kháng thể vô hiệu hóa" hoặc "các kháng thể vô hiệu hóa" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này. Các kháng thể này có thể được sử dụng một mình, hoặc kết hợp (ví dụ, kết hợp hai hoặc nhiều trong số các kháng thể theo sáng chế, hoặc kháng thể theo sáng chế kết hợp với tác nhân khác, mà có thể là hoặc có thể không phải là tác nhân kháng thể, bao gồm kháng thể có khả năng vô hiệu hóa sự nhiễm HBV B và/hoặc D), làm tác nhân dự phòng hoặc điều trị theo dạng bào chế thích hợp, kết hợp với chủng ngừa chủ động, làm công cụ chẩn đoán, hoặc làm công cụ sản xuất như được đề cập trong bản mô tả này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "gắn kết đặc hiệu" hoặc "đặc hiệu với" để chỉ sự liên kết hoặc kết hợp của protein gắn kết (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng) hoặc miền gắn kết với phân tử đích với ái lực hoặc Ka (tức là, hằng số liên kết cân bằng của tương tác gắn kết cụ thể với các đơn vị là 1/M) bằng hoặc lớn hơn 10^5 M^{-1} (bằng tỷ lệ của tốc độ kết hợp [K_{on}] so với tốc độ phân ly [K_{off}] cho phản ứng kết hợp này), trong khi không liên kết hoặc kết hợp đáng kể với phân tử hoặc thành phần bất kỳ khác trong mẫu. Các protein gắn kết hoặc miền gắn kết có thể được phân loại là protein gắn kết hoặc miền gắn kết "ái lực cao" hoặc là protein gắn kết hoặc miền gắn kết "ái lực thấp". Protein gắn kết hoặc miền gắn kết "ái lực cao" để chỉ các protein gắn kết hoặc miền gắn kết có Ka ít nhất là 10^7 M^{-1}, ít nhất là 10^8 M^{-1}, ít nhất là 10^9 M^{-1}, ít nhất là 10^{10} M^{-1}, ít nhất là 10^{11} M^{-1}, ít nhất là 10^{12} M^{-1}, và ít nhất là 10^{13} M^{-1}. Protein gắn kết hoặc miền gắn kết "ái lực thấp" để chỉ các protein gắn kết hoặc miền gắn kết có Ka lên đến 10^7 M^{-1}, lên đến 10^6 M^{-1}, hoặc lên đến 10^5 M^{-1}. Theo cách khác, ái lực có thể được định nghĩa là hằng số phân ly cân bằng (Kd) của tương tác liên kết cụ

thể với các đơn vị là M (ví dụ, 10^{-5} M đến 10^{-13} M). Các thuật ngữ "gắn kết" hoặc "gắn kết đặc hiệu" và các thuật ngữ tương tự không bao gồm sự gắn không đặc hiệu.

Khả năng gắn kết của protein gắn kết có thể được xác định hoặc đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm thích hợp như, ví dụ, phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR), ví dụ, hệ thống Biacore™; các xét nghiệm loại trừ động học như KinExA®; và phép đo giao thoa BioLayer (ví dụ, bằng cách sử dụng nền ForteBio® Octet); phép đo nhiệt lượng chuẩn độ đẳng nhiệt (ITC), và các phương pháp tương tự, ELISA gắn kết với kháng nguyên (ví dụ, trực tiếp hoặc gián tiếp) với kỹ thuật chụp ảnh bằng, ví dụ, mật độ quang ở 450nm, hoặc bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy, hoặc các phương pháp tương tự.

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết theo sáng chế có thể gắn kết với vùng vòng kháng nguyên của HBsAg. Lớp vỏ của virut viêm gan B thường chứa ba "protein vỏ HBV" (còn được gọi là "HBsAg", "kháng nguyên bề mặt viêm gan B"): protein S (đối với "protein nhỏ", còn được gọi là S-HBsAg), protein M (đối với "protein trung bình", còn được gọi là M-HBsAg) và protein L (đối với "protein lớn", còn được gọi là L-HBsAg). S-HBsAg, M-HBsAg và L-HBsAg có chung đầu cùng C giống nhau (còn được gọi là "miền S", 226 axit amin), tương ứng với protein S (S-HBsAg) và điều này rất quan trọng đối với sự lắp ráp và gây nhiễm của virut. S-HBsAg, M-HBsAg và L-HBsAg được tổng hợp trong lưới nội chất (ER), được lắp ráp và tiết ra dưới dạng các hạt thông qua bộ máy Golgi. Miền S bao gồm bốn miền xuyên màng (TM) được dự đoán, nhờ đó cả đầu cùng N cũng như đầu cùng C của miền S được tiếp xúc với lumen. Cả hai miền xuyên màng TM1 và TM2 đều được cho là cần thiết cho sự tích hợp protein đồng dịch mã vào màng ER và các miền xuyên màng TM3 và TM4 được đặt ở đầu cùng C thứ ba của miền S. "Vùng vòng kháng nguyên" của HBsAg được đặt giữa các miền xuyên màng TM3 và TM4 được dự đoán của miền S của HBsAg, nhờ đó vùng vòng kháng nguyên bao gồm axit amin 101 – 172 của miền S, chứa tổng số 226 axit amin (Salisse J. và Sureau C., 2009, Journal of Virology 83: 9321-9328). Yếu tố quyết định khả năng gây nhiễm nằm ở vùng vòng kháng nguyên của protein vỏ HBV. Cụ thể là, các gốc từ 119 đến 125 của HBsAg chứa môtip CXXC, được coi là quan trọng đối với sự gây nhiễm của HBV và HDV (Jaoude GA, Sureau C, Journal of Virology, 2005;79:10460–6).

Khi các vị trí trong trình tự axit amin của miền S của HbsAg được đề cập trong bản mô tả này, các vị trí như vậy được thực hiện liên quan đến trình tự axit amin như được theo SEQ ID NO: 3 (thể hiện dưới đây) và đến biến thể trình tự tự nhiên và nhân tạo của chúng.

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLG QNSQSPTSNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLP VCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGK FLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSP FLPLLPIFFCLWVYI

(SEQ ID NO: 3; axit amin 101 – 172 được thể hiện bằng đường gạch chân)

Ví dụ, cụm từ "axit amin 101 – 172 của miền S" để chỉ gốc axit amin từ các vị trí 101 – 172 của polypeptit theo SEQ ID NO: 3. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng các đột biến hoặc các biến thể (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự thay thế, sự xóa bỏ và/hoặc sự bổ sung, ví dụ, HBsAg có kiểu gen khác hoặc thể đột biến HbsAg khác như được đề cập trong bản mô tả này) có thể xảy ra tự nhiên trong trình tự axit amin của miền S của HBsAg hoặc được đưa nhân tạo vào trình tự axit amin của miền S của HBsAg mà không ảnh hưởng đến các đặc tính sinh học của nó. Do đó, như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "miền S của HBsAg" bao hàm tất cả các polypeptit như vậy bao gồm, ví dụ, polypeptit theo SEQ ID NO: 3 và các đột biến tự nhiên hoặc nhân tạo của nó. Ngoài ra, khi các mảnh trình tự của miền S của HBsAg được đề cập trong bản mô tả này (ví dụ, axit amin 101 – 172 hoặc axit amin 120 -130 của miền S của HBsAg), chúng bao gồm không chỉ các mảnh trình tự tương ứng của SEQ ID NO: 3, mà cả các mảnh trình tự tương ứng của các đột biến tự nhiên hoặc nhân tạo của nó. Ví dụ, cụm từ "các gốc axit amin từ các vị trí 101 – 172 của miền S của HBsAg" bao hàm các gốc axit amin từ các vị trí 101 – 172 của SEQ ID NO: 3 và các mảnh tương ứng của các thể đột biến của nó (các thể đột biến tự nhiên hoặc nhân tạo). Như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ "các mảnh trình tự tương ứng" và "các mảnh tương ứng" để chỉ các mảnh nằm ở các vị trí tương đương của các trình tự khi các trình tự này được sắp thẳng hàng tối ưu, cụ thể là, các trình tự này được sắp thẳng hàng để có được tỷ lệ đồng nhất cao nhất.

Protein M (M-HBsAg) tương ứng với protein S được mở rộng bởi miền tận cùng N gồm 55 axit amin được gọi là "tiền S2". Protein L (L-HBsAg) tương ứng với protein M được mở rộng bởi miền tận cùng N gồm 108 axit amin được gọi là "tiền S1" (kiểu gen D). Các miền tiền S1 và tiền S2 của protein L có thể có mặt ở mặt trong của các hạt virut (ở phía tế bào chất của ER), và được cho là đóng một vai trò quan trọng trong quá trình lắp ráp virut, hoặc ở mặt ngoài (ở phía lòng ống (luminal) của ER), có sẵn cho sự tương tác với các tế bào đích và quan trọng đối với sự gây nhiễm của virut. Ngoài ra, protein bề mặt HBV (HBsAg) không chỉ được kết hợp vào các vỏ hạt virut mà còn có thể tự phát nảy chồi từ các màng ngăn trung gian ER-Golgi để tạo thành các "hạt dưới virut" rỗng (SVP) được giải phóng khỏi tế bào bằng cách tiết.

Theo một số phương án, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp gắn kết với vùng vòng kháng nguyên của HBsAg, và có khả năng gắn kết với tất cả S-HBsAg, M-HBsAg và L-HBsAg.

Theo một số phương án, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp vô hiệu hóa sự gây nhiễm với virut viêm gan B và virut viêm gan delta. Theo một số phương án, kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, làm giảm khả năng gây nhiễm virut của virut viêm gan B và virut viêm gan delta.

Để nghiên cứu và định lượng khả năng gây nhiễm của virut (hoặc "trung hòa") trong phòng thí nghiệm, "các thử nghiệm trung hòa" tiêu chuẩn có thể được sử dụng. Đối với thử nghiệm trung hòa, virut động vật thường được nhân giống trong tế bào và/hoặc dòng tế bào. Thử nghiệm trung hòa trong đó tế bào nuôi cấy được ủ với một lượng cố định của HBV hoặc HDV với sự có mặt (hoặc không có mặt) của kháng thể (hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên hoặc protein dung hợp) cần được thử nghiệm có thể được sử dụng. Trong thử nghiệm như vậy, mức kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg) hoặc kháng nguyên e viêm gan B (HBeAg) được tiết vào dịch nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy tế bào có thể được sử dụng và/hoặc sự nhuộm HBcAg có thể được đánh giá để đưa ra kết quả. Đối với HDV, ví dụ, phương pháp nhuộm miễn dịch huỳnh quang kháng nguyên delta có thể được đánh giá.

Theo phương án cụ thể của thử nghiệm trung hòa HBV, tế bào đã nuôi cấy, ví dụ, tế bào HepaRG, như tế bào HepaRG biệt hóa, được ủ với một lượng cố định của HBV với sự có mặt hoặc không có mặt của kháng thể cần được thử nghiệm. Theo

phương án này, việc ủ có thể được thực hiện, ví dụ, trong 16 giờ ở 37°C. Việc ủ này có thể được thực hiện trong môi trường (ví dụ, có bổ sung PEG 8000 4%). Sau khi ủ, tế bào có thể được rửa và nuôi cấy thêm. Để đo khả năng gây nhiễm của virut, mức kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg) và kháng nguyên e viêm gan B (HBeAg) được tiết vào dịch nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy, ví dụ, từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 11 sau gây nhiễm, có thể được xác định bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch gắn kết enzym (ELISA). Ngoài ra, việc nhuộm HBcAg có thể được đánh giá bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang. Theo một phương án của thử nghiệm trung hòa HDV, về cơ bản, thử nghiệm giống như đối với HBV có thể được sử dụng, với sự khác biệt là huyết thanh từ cá thể mang HDV có thể được sử dụng làm chất cấy gây nhiễm HDV trên các tế bào HepaRg đã biệt hóa (thay vì HBV). Để phát hiện, phương pháp nhuộm huỳnh quang miễn dịch kháng nguyên delta có thể được sử dụng làm giá trị đọc.

Các phương án của protein gắn kết theo sáng chế có hiệu lực trung hòa cao. Theo các phương án nhất định, nồng độ của kháng thể như được đề cập trong bản mô tả này cần thiết để trung hòa 50% virut viêm gan B (HBV) và virut viêm gan delta (HDV), là, ví dụ, khoảng 10 µg/ml hoặc thấp hơn. Theo các phương án khác, nồng độ của protein gắn kết cần thiết để trung hòa 50% HBV và HDV là khoảng 5 µg/ml. Theo các phương án khác, nồng độ của protein gắn kết như được đề cập trong bản mô tả này cần thiết để trung hòa 50% HBV và HDV là khoảng 1 µg/ml. Theo các phương án khác nữa, nồng độ của protein gắn kết cần thiết để trung hòa 50% HBV và HDV là khoảng 750 ng/ml. Theo các phương án khác nữa, nồng độ của protein gắn kết như được đề cập trong bản mô tả này cần thiết để trung hòa 50% HBV và HDV là 500 ng/ml hoặc thấp hơn. Theo các phương án này, nồng độ của protein gắn kết như được đề cập trong bản mô tả này cần thiết để trung hòa 50% HBV và HDV có thể được chọn từ 450 ng/ml hoặc thấp hơn, 400 ng/ml hoặc thấp hơn, 350 ng/ml hoặc thấp hơn, 300 ng/ml hoặc thấp hơn, 250 ng/ml hoặc thấp hơn, 200 ng/ml hoặc thấp hơn, 175 ng/ml hoặc thấp hơn, 150 ng/ml hoặc thấp hơn, 125 ng/ml hoặc thấp hơn, 100 ng/ml hoặc thấp hơn, 90 ng/ml hoặc thấp hơn, 80 ng/ml hoặc thấp hơn, 70 ng/ml hoặc thấp hơn, 60 ng/ml hoặc thấp hơn hoặc 50 ng/ml hoặc thấp hơn.

Kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế, mà có thể trung hòa cả HBV và HDV, là hữu ích trong việc phòng ngừa và điều trị viêm gan B và viêm gan

D. Sự nhiễm HDV thường xảy ra đồng thời với hoặc sau khi nhiễm HBV (ví dụ, việc cấy HDV khi không có mặt HBV không gây viêm gan D vì HDV đòi hỏi sự hỗ trợ của HBV để tự nhân lên) và viêm gan D thường được quan sát thấy ở các cá thể mang HBV mãn tính.

Các phương án của protein gắn kết theo sáng chế tăng cường thải trừ HBsAg và HBV. Theo các phương án cụ thể, protein gắn kết tăng cường thải trừ cả HBV và các hạt dưới virut của virut viêm gan B (SVP). Sự thải trừ HBsAg hoặc các hạt dưới virut có thể được đánh giá bằng cách đo mức HbsAg, ví dụ, trong mẫu máu, ví dụ, từ bệnh nhân mắc viêm gan B. Tương tự, sự thải trừ HBV có thể được đánh giá bằng cách đo mức HBV, ví dụ, trong mẫu máu, ví dụ, từ bệnh nhân mắc viêm gan B.

Trong huyết thanh của bệnh nhân bị nhiễm HBV, ngoài các hạt gây nhiễm (HBV), thường có lượng dư thừa (thường từ 1.000 đến 100.000 lần) của các hạt dưới virut rỗng (SVP) chỉ chứa protein vỏ HBV (HBsAg) ở dạng hình cầu tương đối nhỏ hơn và dạng sợi có chiều dài thay đổi. Các hạt dưới virut đã được chỉ ra là tăng cường mạnh sự sao chép virut nội bào và sự biểu hiện gen của HBV (Bruns M. et al. 1998 J Virol 72(2): 1462–1468). Điều này cũng phù hợp trong ngữ cảnh của sự gây nhiễm huyết thanh chứa HBV, vì khả năng gây nhiễm phụ thuộc không chỉ vào số lượng virut mà cả số lượng SVP (Bruns M. et al. 1998 J Virol 72(2): 1462–1468). Ngoài ra, lượng dư thừa của các hạt dưới virut có thể hoạt động như mồi nhử bằng cách hấp thụ kháng thể trung hòa và nhờ đó trì hoãn việc loại bỏ gây nhiễm. Trong một số trường hợp, việc đạt được sự mất kháng nguyên bề mặt viêm gan B (HBsAg) được coi là kết quả điều trị lý tưởng và là kết quả gần nhất để chữa khỏi viêm gan B mãn tính (CHB).

Các phương án của protein gắn kết theo sáng chế có thể tăng cường thải trừ HbsAg. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết này có thể tăng cường thải trừ các hạt dưới virut của virut viêm gan B. Theo một số phương án, protein gắn kết này có thể được sử dụng để điều trị viêm gan B mãn tính.

Theo các phương án bất kỳ được mô tả ở đây, protein gắn kết theo sáng chế có khả năng gắn kết HBsAg có kiểu gen được chọn từ các kiểu gen HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I, và J, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng.

Theo các phương án nhất định, các protein gắn kết theo sáng chế có khả năng gắn kết với 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 kiểu gen HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I, và J.

Ví dụ về kiểu gen HBsAg khác nhau bao gồm các kiểu gen sau: số truy cập GenBank J02203 (HBV-D, ayw3); số truy cập GenBank FJ899792.1 (HBV-D, adw2); số truy cập GenBank AM282986 (HBV-A); số truy cập GenBank D23678 (HBV-B1 Japan); số truy cập GenBank AB117758 (HBV-C1 Cambodia); số truy cập GenBank AB205192 (HBV-E Ghana); số truy cập GenBank X69798 (HBV-F4 Brazil); số truy cập GenBank AF160501 (HBV-G USA); số truy cập GenBank AY090454 (HBV-H Nicaragua); số truy cập GenBank AF241409 (HBV-I Vietnam); và số truy cập GenBank AB486012 (HBV-J Borneo). Trình tự axit amin được lấy làm ví dụ của vùng vòng kháng nguyên của miền S của HBsAg có các kiểu gen khác nhau được đề cập trong bản mô tả này (ví dụ, SEQ ID NO: 5 – 15).

Theo một số phương án, protein gắn kết có khả năng gắn kết với một hoặc nhiều, và trong một số trường hợp ít nhất 6 trong số 10 kiểu gen HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I, và J. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết có khả năng gắn kết với ít nhất 8 trong số 10 kiểu gen HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I, và J. Theo một số phương án, protein gắn kết có khả năng gắn kết với tất cả 10 trong số 10 kiểu gen HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I, và J. HBV được biệt hóa thành một vài kiểu gen, theo trình tự bộ gen. Đến nay, đã xác định được tám kiểu gen đã biết (A-H) của bộ gen HBV. Ngoài ra, hai kiểu gen khác, I và J, cũng đã được xác định (Sunbul M., 2014, World J Gastroenterol 20(18): 5427–5434). Kiểu gen này đã được biết là ảnh hưởng đến sự tiến triển của bệnh và sự khác biệt giữa các kiểu gen đáp lại phương pháp điều trị kháng virut đã được xác định.

Theo một số phương án, protein gắn kết theo sáng chế có khả năng gắn kết với 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 hoặc 18 thể đột biến HBsAg có các đột biến trong vùng vòng kháng nguyên, với (các) thể đột biến được chọn từ một hoặc nhiều trong số HBsAg Y100C/P120T, HBsAg P120T, HBsAg P120T/S143L, HBsAg C121S, HBsAg R122D, HBsAg R122I, HBsAg T123N, HBsAg Q129H, HBsAg Q129L, HBsAg M133H, HBsAg M133L, HBsAg M133T, HBsAg K141E, HBsAg P142S, HBsAg S143K, HBsAg D144A, HBsAg G145R và HBsAg N146A. Các thể đột biến này là các thể đột biến tự nhiên dựa trên miền S của kiểu gen HBsAg D, số truy cập Genbank FJ899792 (SEQ ID NO: 4). (Các) gốc axit amin đột biến trong mỗi thể đột biến được lưu ý trong bản mô tả này được chỉ ra theo tên.

SEQ ID NO: 4:

MENVTSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCL GQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGML PVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFG KFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSTLS PFLPLLPIFFCLWVYI

(vùng vòng kháng nguyên, tức là axit amin 101 – 172, được thể hiện bằng đường gạch chân).

Trình tự axit amin của vùng vòng kháng nguyên của miền S của HBsAg của các thể đột biến khác nhau được thể hiện trong SEQ ID NO: 16 – 33.

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết như được bộc lộ trong bản mô tả này có khả năng gắn kết với một hoặc nhiều, và trong một số trường hợp ít nhất là 12 thể đột biến HBsAg gây nhiễm được chọn từ HBsAg Y100C/P120T, HBsAg P120T, HBsAg P120T/S143L, HBsAg C121S, HBsAg R122D, HBsAg R122I, HBsAg T123N, HBsAg Q129H, HBsAg Q129L, HBsAg M133H, HBsAg M133L, HBsAg M133T, HBsAg K141E, HBsAg P142S, HBsAg S143K, HBsAg D144A, HBsAg G145R và HBsAg N146A. Theo một số phương án như vậy, protein gắn kết có khả năng gắn kết với ít nhất 15 thể đột biến HBsAg gây nhiễm được chọn từ HBsAg Y100C/P120T, HBsAg P120T, HBsAg P120T/S143L, HBsAg C121S, HBsAg R122D, HBsAg R122I, HBsAg T123N, HBsAg Q129H, HBsAg Q129L, HBsAg M133H, HBsAg M133L, HBsAg M133T, HBsAg K141E, HBsAg P142S, HBsAg S143K, HBsAg D144A, HBsAg G145R và HBsAg N146A. Theo một số phương án, protein gắn kết có khả năng gắn kết với mỗi thể đột biến HBsAg gây nhiễm sau: HBsAg Y100C/P120T; HBsAg P120T; HBsAg P120T/S143L; HBsAg C121S; HBsAg R122D; HBsAg R122I; HBsAg T123N; HBsAg Q129H; HBsAg Q129L; HBsAg M133H; HBsAg M133L; HBsAg M133T; HBsAg K141E; HBsAg P142S; HBsAg S143K; HBsAg D144A; HBsAg G145R; và HBsAg N146A.

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết (ví dụ, bao gồm kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng) có khả năng làm giảm nồng độ huyết thanh của HBV ADN ở động vật có vú nhiễm HBV. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết có khả năng làm giảm nồng độ huyết thanh của HBsAg ở động vật có vú nhiễm

HBV. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết có khả năng làm giảm nồng độ huyết thanh của HBeAg ở động vật có vú nhiễm HBV. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết có khả năng làm giảm nồng độ huyết thanh của HBcrAg ở động vật có vú nhiễm HBV. Theo một số phương án, protein gắn kết có khả năng làm giảm nồng độ huyết thanh của HBV ADN, HBsAg, HBeAg, và/hoặc HBcrAg ở động vật có vú trong khoảng 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, hoặc nhiều ngày hơn sau khi dùng một liều duy nhất của protein gắn kết này.

Thuật ngữ "epitop" hoặc "epitop kháng nguyên" bao gồm phân tử, cấu trúc, trình tự axit amin bất kỳ, hoặc quyết định protein được nhận biết và gắn kết đặc hiệu bởi phân tử gắn kết cùng nguồn gốc, như globulin miễn dịch, thụ thể kháng nguyên khảm, hoặc phân tử, miền hoặc protein gắn kết khác. Các quyết định epitop thường chứa các nhóm bề mặt hoạt động hóa học của phân tử, như axit amin hoặc chuỗi bên đường, và có thể có các đặc điểm cấu trúc ba chiều cụ thể, cũng như các đặc điểm điện tích cụ thể.

Theo một số phương án, protein gắn kết có khả năng gắn kết với epitop bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, hoặc ít nhất bốn axit amin của vùng vòng kháng nguyên của HbsAg. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết có khả năng gắn kết ít nhất hai axit amin được chọn từ axit amin 115 – 133 của miền S của HbsAg, axit amin 120 – 133 của miền S của HbsAg, hoặc axit amin 120 – 130 của miền S của HbsAg. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết có khả năng gắn kết ít nhất ba axit amin được chọn từ axit amin 115 – 133 của miền S của HbsAg, axit amin 120 – 133 của miền S của HbsAg, hoặc axit amin 120 – 130 của miền S của HbsAg. Theo một số phương án, protein gắn kết có khả năng gắn kết ít nhất bốn axit amin được chọn từ axit amin 115 – 133 của miền S của HbsAg, axit amin 120 – 133 của miền S của HbsAg, hoặc axit amin 120 – 130 của miền S của HbsAg. Như được sử dụng trong bản mô tả này, vị trí của axit amin (ví dụ, 115 – 133, 120 – 133, 120 - 130) để chỉ miền S của HBsAg như được mô tả trên đây, mà có mặt trong tất cả ba protein vỏ HBV S-HBsAg, M-HBsAg, và L-HBsAg, nhờ đó S-HBsAg thường tương ứng với miền S của HBsAg.

Thuật ngữ "được tạo ra bởi" như được sử dụng trong bản mô tả này trong ngữ cảnh của epitop, có nghĩa là epitop mà protein gắn kết gắn kết vào có thể là tuyến tính (liên tục) hoặc cấu dạng (không liên tục). Epitop tuyến tính hoặc tuần tự là epitop được nhận biết bởi kháng thể theo trình tự axit amin tuyến tính của nó, hoặc cấu trúc bậc một.

Epitop cấu dạng có thể được nhận biết theo hình dạng ba chiều và cấu trúc protein. Theo đó, nếu epitop là epitop tuyến tính và bao gồm nhiều hơn một axit amin nằm ở các vị trí được chọn từ các vị trí axit amin 115 –133 hoặc từ các vị trí axit amin 120 –133 của miền S của HBsAg, các axit amin được bao gồm trong epitop có thể nằm ở các vị trí liền kề của cấu trúc bậc một (ví dụ, là các axit amin liên tiếp trong trình tự axit amin). Trong trường hợp của epitop cấu dạng (cấu trúc 3D), trình tự axit amin thường tạo thành cấu trúc 3D làm epitop và, do đó các axit amin tạo thành epitop có thể nằm ở và có thể không nằm ở các vị trí liền kề của cấu trúc bậc một (tức là, có thể là và có thể không phải là các axit amin liên tiếp trong trình tự axit amin).

Theo các phương án nhất định, epitop mà protein gắn kết gắn kết vào là epitop cấu dạng. Theo một số phương án, protein gắn kết gắn kết với epitop bao gồm ít nhất hai axit amin của vùng vòng kháng nguyên của HBsAg, trong đó ít nhất hai axit amin được chọn từ axit amin 120 – 133 hoặc từ axit amin 120 – 130, của miền S của HbsAg, và trong đó ít nhất hai axit amin không nằm ở các vị trí liền kề (của cấu trúc bậc một). Theo các phương án nhất định, protein gắn kết gắn kết với epitop bao gồm ít nhất ba axit amin của vùng vòng kháng nguyên của HBsAg, trong đó ít nhất ba axit amin được chọn từ axit amin 120 – 133 hoặc từ axit amin 120 – 130, của miền S của HbsAg, và trong đó ít nhất hai trong số ba axit amin không nằm ở các vị trí liền kề (của cấu trúc bậc một). Theo một số phương án, protein gắn kết gắn kết với epitop bao gồm ít nhất bốn axit amin của vùng vòng kháng nguyên của HBsAg, trong đó ít nhất bốn axit amin được chọn từ axit amin 120 – 133 hoặc từ axit amin 120 – 130, của miền S của HbsAg, và trong đó ít nhất hai trong số bốn axit amin không nằm ở các vị trí liền kề (của cấu trúc bậc một).

Các axit amin mà kháng thể theo sáng chế, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp gắn kết (tức là, axit amin tạo thành epitop), mà không nằm ở các vị trí liền kề của cấu trúc bậc một, trong một số trường hợp được cách nhau bởi một hoặc nhiều axit amin, mà kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp không gắn kết vào. Theo một số phương án, ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, hoặc ít nhất năm axit amin có thể nằm giữa hai axit amin không nằm ở các vị trí liền kề bao gồm bởi epitop.

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết gắn kết với epitop bao gồm ít nhất axit amin P120, C121, R122 và C124 của miền S của HBsAg. Theo các phương án khác, protein gắn kết theo sáng chế gắn kết với epitop chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 88:

PCRXC

trong đó X là axit amin bất kỳ hoặc không là axit amin; X là axit amin bất kỳ; X là T, Y, R, S, hoặc F; X là T, Y hoặc R; và X là T hoặc R.

Theo các phương án khác, protein gắn kết theo sáng chế gắn kết với epitop chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 80:

TGPCRTC

hoặc với trình tự axit amin có chung tỷ lệ đồng nhất trình tự ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc ít nhất 95% với SEQ ID NO: 80.

Theo các phương án khác, protein gắn kết theo sáng chế gắn kết với epitop chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 85:

STTSTGPCRTC

hoặc với trình tự axit amin có chung tỷ lệ đồng nhất trình tự ít nhất 80%, ít nhất 90% hoặc ít nhất 95% với SEQ ID NO: 85.

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết theo sáng chế gắn kết với epitop chứa trình tự axit amin bao gồm ít nhất là các axit amin 145 – 151 của miền S của HBsAg:

GNCTCIP

(SEQ ID NO: 81).

Theo các phương án khác nữa, protein gắn kết theo sáng chế gắn kết với epitop chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 80 và trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 81.

Theo các phương án khác, protein gắn kết theo sáng chế gắn kết với epitop chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 85 và/hoặc trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 87.

Như được mô tả trên đây, epitop mà protein gắn kết theo sáng chế gắn kết vào có thể là tuyến tính (liên tục) hoặc cấu dạng (không liên tục). Theo một số phương án, protein gắn kết theo sáng chế gắn kết với epitop cấu dạng, và theo các phương án nhất định, epitop cấu dạng chỉ có mặt trong điều kiện không khử.

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết theo sáng chế, gắn kết với epitop tuyến tính. Theo các phương án nhất định, epitop tuyến tính có mặt trong cả hai điều kiện, điều kiện không khử và điều kiện khử.

Theo các phương án cụ thể, protein gắn kết theo sáng chế gắn kết với epitop trong vòng kháng nguyên của HBsAg được tạo ra bởi trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 1:

X_1 X_2 X_3 TC X_4 X_5 X_6A X_7G

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

Theo một số phương án, X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6 và X_7 là axit amin được thay thế bảo toàn so với axit amin 120 – 130 của SEQ ID NO: 3. Theo một số phương án, X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6 và X_7 là axit amin được thay thế bảo toàn so với axit amin 20 – 30 của SEQ ID bất kỳ trong số các SEQ ID NO 5 – 33.

Theo các phương án cụ thể, X_1 của SEQ ID NO: 1 là axit amin nhỏ. Axit amin "nhỏ", như được sử dụng trong bản mô tả này, để chỉ axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm alanin, axit aspartic, asparagin, xystein, glyxin, prolin, serin, threonin và valin. Theo các phương án nhất định, X_1 là prolin, serin hoặc threonin.

Theo các phương án nhất định, X_2 của SEQ ID NO: 1 là axit amin nhỏ. Theo các phương án nhất định, X_2 có thể được chọn từ xystein hoặc threonin.

Theo một số phương án, X_3 của SEQ ID NO: 1 là axit amin tích điện hoặc axit amin béo. Axit amin "tích điện", như được sử dụng trong bản mô tả này, để chỉ axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm arginin, lysin, axit aspartic, axit glutamic và histidin. Axit amin "béo", như được sử dụng trong bản mô tả này, để chỉ axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm alanin, glyxin, isoleuxin, leuxin, và valin. Theo các phương án nhất định, X_3 được chọn từ arginin, lysin, axit aspartic hoặc isoleuxin.

Theo một số phương án, X_4 của SEQ ID NO: 1 là axit amin nhỏ và/hoặc axit amin kỵ nước. "Axit amin" kỵ nước, như được sử dụng trong bản mô tả này, để chỉ axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm alanin, isoleuxin, leuxin, phenylalanin, valin, tryptophan, tyrosin, methionin, prolin và glyxin. Theo các phương án nhất định, X_4 được chọn từ methionin hoặc threonin.

Theo một số phương án, X_5 của SEQ ID NO: 1 là axit amin nhỏ và/hoặc axit amin kỵ nước. Theo các phương án nhất định, X_5 được chọn từ threonin, alanin hoặc isoleuxin.

Theo một số phương án, X_6 của SEQ ID NO: 1 là axit amin nhỏ và/hoặc axit amin kỵ nước. Theo các phương án nhất định, X_6 được chọn từ threonin, prolin hoặc leuxin.

Theo một số phương án, X_7 của SEQ ID NO: 1 là axit amin phân cực hoặc axit amin béo. Axit amin "phân cực", như được sử dụng trong bản mô tả này, để chỉ axit amin bất kỳ được chọn từ nhóm bao gồm axit aspartic, asparagin, arginin, axit glutamic, histidin, lysin, glutamin, tryptophan, tyrosin, serin, và threonin. Theo các phương án nhất định, X_7 là glutamin, histidin hoặc leuxin.

Theo một số phương án, protein gắn kết theo sáng chế gắn kết với epitop trong vòng kháng nguyên của HBsAg được tạo ra bởi trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 2:

X_1 X_2 X_3 TC X_4 X_5 X_6A X_7G

trong đó

X_1 là P, T hoặc S,

X_2 là C hoặc S,

X_3 là R, K, D hoặc I,

X_4 là M hoặc T,

X_5 là T, A hoặc I,

X_6 là T, P hoặc L, và

X_7 là Q, H hoặc L

(SEQ ID NO: 2).

Liên quan đến epitop được tạo ra bởi các trình tự axit amin theo SEQ ID NO: 1 hoặc 2, lưu ý rằng thuật ngữ "được tạo ra bởi" như được sử dụng trong bản mô tả này không nhằm ngụ ý rằng protein gắn kết theo sáng chế nhất thiết gắn kết với mỗi và mọi axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2. Cụ thể là, protein gắn kết có thể chỉ gắn kết với một số axit amin của SEQ ID NO: 1 hoặc 2, do đó các gốc axit amin khác có thể hoạt động như "phần đệm".

Theo các phương án cụ thể, protein gắn kết theo sáng chế gắn kết với epitop trong vòng kháng nguyên của HBsAg được tạo ra bởi một hoặc nhiều, hai hoặc nhiều, ba hoặc nhiều, hoặc bốn hoặc nhiều axit amin của trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO 5 – 33 thể hiện dưới đây trong Bảng 3.

Theo một số phương án, protein gắn kết theo sáng chế gắn kết với vùng vòng kháng nguyên của HBsAg có trình tự axit amin theo một hoặc nhiều trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO 5 – 33 thể hiện dưới đây trong Bảng 3, hoặc với biến thể trình tự của chúng. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết theo sáng chế gắn kết với tất cả các biến thể vòng kháng nguyên của HBsAg có trình tự axit amin theo bất kỳ trong số SEQ ID NO 5 – 33 thể hiện dưới đây trong Bảng 3.

Bảng 3: Trình tự axit amin được lấy làm ví dụ của vùng vòng kháng nguyên của miền S của HBsAg (các gốc 101-172 của miền S của HBsAg – ngoại trừ SEQ ID NO: 16, mà đề cập đến các gốc 100-172 của miền S của HBsAg để bao gồm đột biến liên quan) của các kiểu gen và thể đột biến khác nhau như được sử dụng trong bản mô tả này.

Tên	SEQ ID NO.	Trình tự axit amin
J02203 (D, ayw3)	5	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW
FJ899792 (D, adw2)	6	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW
AM282986 (A)	7	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQGNS MFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWE WASVRFSW
D23678 (B1)	8	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGTS MFPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWE WASVRFSW
AB117758 (C1)	9	QGMLPVCPLLPGTSTTSTGPCKTCTIPAQGTS MFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWE WASVRFSW
AB205192 (E)	10	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTLAQGTS MFPSCCCSKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW
X69798 (F4)	11	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTS MFPSCCCSKPSDGNCTCIPIPSSWALGKYLWE WASARFSW
AF160501 (G)	12	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWE WASVRFSW
AY090454 (H)	13	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTS MFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKYLWE WASARFSW
AF241409 (I)	14	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWE WASARFSW

Tên	SEQ ID NO.	Trình tự axit amin
AB486012 (J)	15	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCRTCTITAQGTS MFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFAKFLWE WASVRFSW
HBsAg Y100C/P120T	16	CQGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGT SMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLW EWASARFSW
HBsAg P120T	17	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW
HBsAg P120T/S143L	18	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPLDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW
HBsAg C121S	19	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPSRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW
HBsAg R122D	20	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCDTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW
HBsAg R122I	21	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCITCTTPAQGTSM YPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEW ASARFSW
HBsAg T123N	22	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRNCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW
HBsAg Q129H	23	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAHGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW
HBsAg Q129L	24	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPALGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW
HBsAg M133H	25	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS HYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW
HBsAg M133L	26	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTSL YPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEW ASARFSW
HBsAg M133T	27	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTST YPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEW ASARFSW
HBsAg K141E	28	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTEPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW
HBsAg P142S	29	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKSSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW
HBsAg S143K	30	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPKDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW

Tên	SEQ ID NO.	Trình tự axit amin
HBsAg D144A	31	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSAGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW
HBsAg G145R	32	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDRNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW
HBsAg N146A	33	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGACTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW

Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, bao gồm: (i) vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) có tỷ lệ đồng nhất ít nhất 90% (tức là, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc cao hơn) với trình tự axit amin theo SEQ ID NO:41 hoặc 67; và (ii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) có tỷ lệ đồng nhất ít nhất 90% với trình tự axit amin theo bất kỳ một trong số SEQ ID NO:42; 59; 65; 89, 90, hoặc 111-120, với điều kiện axit amin ở vị trí 40 của VL theo cách đánh số IMGT không phải là xystein, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với vùng vòng kháng nguyên của HBsAg và vô hiệu hóa sự nhiễm virut viêm gan B và virut viêm gan delta.

Theo các phương án khác nữa, (i) V_H có tỷ lệ đồng nhất ít nhất 95% với trình tự axit amin theo SEQ ID NO:41 hoặc 67; và/hoặc (ii) V_L có tỷ lệ đồng nhất ít nhất 95% với trình tự axit amin theo bất kỳ một trong số SEQ ID NO:42, 59, 65, 89, 90, hoặc 111-120.

Theo các phương án nhất định, axit amin ở vị trí 40 của V_L là alanin. Theo các phương án khác, axit amin ở vị trí 40 của V_L là serin. Theo các phương án khác nữa, axit amin ở vị trí 40 của V_L là glyxin.

Theo các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể bao gồm trình tự CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, và CDRL3 theo SEQ ID NO: (i) 34-36, 37, 38, và 40, tương ứng; (ii) 34, 66, 36, 37, 38, và 40, tương ứng; (iii) 34-36, 37, 39, và 40, tương ứng; (iv) 34, 66, 36, 37, 39, và 40, tương ứng; (v) 34-36, 37, 38, và 58, tương ứng; (vi) 34, 66, 36, 37, 38, và 58, tương ứng; (vii) 34-36, 37, 39, và 58, tương ứng; và (vii) 34, 66, 36, 37, 39, và 58, tương ứng.

Theo một số phương án, V_L của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm hoặc chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:89. Theo một số phương án, V_L của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm hoặc chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:90. Theo các phương án khác, V_L của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm hoặc chứa trình tự axit amin theo bất kỳ một trong số SEQ ID NO: 111-120. Theo các phương án nhất định, V_H bao gồm hoặc chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:41. Theo các phương án khác, V_H bao gồm hoặc chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:67.

Theo các phương án cụ thể, V_H bao gồm hoặc chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:41 và V_L bao gồm hoặc chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:89. Theo các phương án khác, V_H bao gồm hoặc chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:41 và V_L bao gồm hoặc chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:90. Theo các phương án nhất định, V_H bao gồm hoặc chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:41 và V_L bao gồm hoặc chứa trình tự axit amin theo bất kỳ một trong số SEQ ID NO:111-120. Theo các phương án khác, V_H bao gồm hoặc chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:67 và V_L bao gồm hoặc chứa trình tự axit amin theo bất kỳ một trong số SEQ ID NO:89, 90, và 111-120.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, bao gồm: (i) vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) có tỷ lệ đồng nhất ít nhất 90% với trình tự axit amin theo SEQ ID NO:95; và (ii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) có tỷ lệ đồng nhất ít nhất 90% với trình tự axit amin theo SEQ ID NO:96, trong đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó gắn kết với vùng vòng kháng nguyên của HBsAg và vô hiệu hóa sự nhiễm virut viêm gan B và virut viêm gan delta.

Theo các phương án khác nữa, (i) V_H có tỷ lệ đồng nhất ít nhất 95% với trình tự axit amin theo SEQ ID NO:95; và/hoặc (ii) V_L có tỷ lệ đồng nhất ít nhất 95% với trình tự axit amin theo SEQ ID NO:96.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm trình tự CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, và CDRL3 theo SEQ ID NO:97-102, tương ứng.

Theo các phương án cụ thể, V_H bao gồm hoặc chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:95; và V_L bao gồm hoặc chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:96.

Gốc Fc

Theo một số phương án, protein gắn kết (ví dụ, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó) theo sáng chế bao gồm gốc Fc. Theo các phương án nhất định, gốc Fc có thể có nguồn gốc từ người, ví dụ, từ IgG1, IgG2, IgG3, và/hoặc IgG4 của người, hoặc từ lớp Ig hoặc isotyp khác. Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên có thể bao gồm gốc Fc thu được từ IgG1 của người.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "gốc Fc" để chỉ trình tự bao gồm, chứa, chủ yếu chứa, hoặc thu được từ một phần của chuỗi nặng globulin miễn dịch bắt đầu ở vùng bản lề ngay phía trên của vị trí phân cắt papain (ví dụ, gốc 216 trong IgG tự nhiên, lấy gốc đầu tiên của vùng ổn định chuỗi nặng là 114) và kết thúc ở đầu cùng C của chuỗi nặng globulin miễn dịch. Theo đó, gốc Fc có thể là gốc Fc hoàn chỉnh hoặc một phần (ví dụ, một miền) của nó. Theo các phương án nhất định, gốc Fc hoàn chỉnh bao gồm miền bản lề, miền CH2 và miền CH3 (ví dụ, các vị trí axit amin EU 216-446). Gốc lysin bổ sung (K) đôi khi có mặt ở đầu cùng C của gốc Fc, nhưng thường được phân cắt từ kháng thể trưởng thành. Các vị trí axit amin trong gốc Fc đã được đánh số theo hệ thống đánh số EU của Kabat, xem, ví dụ, Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 1983 và 1987. Các vị trí axit amin của gốc Fc cũng có thể được đánh số theo hệ thống đánh số IMGT (bao gồm đánh số duy nhất cho miền C và đánh số exon) và hệ thống đánh số Kabat.

Theo một số phương án, gốc Fc bao gồm ít nhất một trong số: miền bản lề (ví dụ, vùng bản lề trên, giữa và/hoặc dưới), miền CH2, miền CH3, hoặc biến thể, một phần, hoặc mảnh của chúng. Theo một số phương án, gốc Fc bao gồm ít nhất là miền bản lề, miền CH2 hoặc miền CH3. Theo các phương án khác nữa, gốc Fc là gốc Fc hoàn chỉnh. Trình tự axit amin của gốc Fc được lấy làm ví dụ thuộc isotyp IgG1 của người được cung cấp trong SEQ ID NO:137. Gốc Fc cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều đột biến gắn xen, xóa bỏ, hoặc thay thế axit amin so với gốc Fc xuất hiện trong tự nhiên. Ví dụ, ít nhất một trong số miền bản lề, miền CH2, hoặc miền CH3, hoặc một phần của chúng, có thể bị xóa bỏ. Ví dụ, gốc Fc có thể bao gồm hoặc chứa: (i) miền bản lề (hoặc một phần của nó) được dung hợp với miền CH2 (hoặc một phần của nó), (ii) miền bản lề (hoặc một phần của nó) được dung hợp với miền CH3 (hoặc một phần của nó), (iii) miền CH2 (hoặc một phần của nó) được dung hợp với miền CH3 (hoặc một phần của nó), (iv)

miền bản lề (hoặc một phần của nó), (v) miền CH2 (hoặc một phần của nó), hoặc (vi) miền CH3 hoặc một phần của nó.

Gốc Fc theo sáng chế có thể được cải biến sao cho nó thay đổi về trình tự axit amin so với gốc Fc hoàn chỉnh của phân tử globulin miễn dịch xuất hiện trong tự nhiên, trong khi vẫn giữ lại hoặc tăng cường ít nhất một chức năng mong muốn được tạo ra bởi gốc Fc xuất hiện trong tự nhiên, và/hoặc làm giảm chức năng không mong muốn của gốc Fc xuất hiện trong tự nhiên. Các chức năng như vậy bao gồm, ví dụ, gắn kết thụ thể Fc (FcR), điều biến thời gian bán thải của kháng thể (ví dụ, bằng cách gắn kết với FcRn), chức năng ADCC, gắn kết protein A, gắn kết protein G, và gắn kết bổ thể. Các phần của gốc Fc xuất hiện trong tự nhiên có liên quan đến các chức năng này đã được mô tả trong tình trạng kỹ thuật.

Ví dụ, để hoạt hóa thác bổ thể, phức hợp protein C1q có thể gắn kết với ít nhất hai phân tử của IgG1 hoặc một phân tử của IgM khi (các) phân tử globulin miễn dịch được gắn vào đích kháng nguyên (Ward, E. S., and Ghetie, V., *Ther. Immunol.* 2 (1995) 77-94). Burton, D. R., đã mô tả (*Mol. Immunol.* 22 (1985) 161-206) là vùng chuỗi nặng bao gồm các gốc axit amin 318 đến 337 có liên quan đến việc cố định bổ thể. Duncan, A. R., và Winter, G. (*Nature* 332 (1988) 738-740), bằng cách sử dụng kỹ thuật gây đột biến điểm, đã báo cáo rằng Glu318, Lys320 và Lys322 tạo ra vị trí gắn kết với C1q. Vai trò của gốc Glu318, Lys320 và Lys 322 trong sự gắn kết của C1q được xác nhận bởi khả năng của peptit tổng hợp ngắn chứa các gốc này trong việc ức chế sự dung giải qua trung gian bổ thể.

Ví dụ, sự gắn kết FcR có thể được gây ra bởi sự tương tác của gốc Fc (của kháng thể) với thụ thể Fc (FcR), là các thụ thể bề mặt tế bào đặc hiệu trên tế bào bao gồm tế bào tạo máu. Các thụ thể Fc thuộc siêu họ globulin miễn dịch, và được chỉ ra là gây ra cả việc loại bỏ các mầm bệnh được phủ kháng thể nhờ sự thực bào các phức hợp miễn dịch, và dung giải hồng cầu và nhiều đích tế bào khác (ví dụ, tế bào khối u) được phủ bằng kháng thể tương ứng, thông qua tác dụng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC; Van de Winkel, J. G., and Orerson, C. L., *J. Leukoc. Biol.* 49 (1991) 511-524). Các FcR được xác định bởi tính đặc hiệu của chúng đối với các lớp globulin miễn dịch; các thụ thể Fc đối với các kháng thể IgG được gọi là FcγR, đối với IgE là FcεR, đối với IgA là FcαR và v.v. và các thụ thể Fc sơ sinh được gọi là FcRn. Sự

gắn kết thụ thể Fc được mô tả, ví dụ, trong Ravetch, J. V., và Kinet, J. P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492; Capel, P. J., et al., *Immunomethods* 4 (1994) 25-34; de Haas, M., et al., *J Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341; và Gessner, J. E., et al., *Ann. Hematol.* 76 (1998) 231-248.

Sự liên kết chéo của các thụ thể bởi miền Fc của kháng thể IgG tự nhiên (FcγR) hoạt hóa nhiều chức năng hiệu ứng khác nhau bao gồm thực bào, tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể, và giải phóng các chất trung gian gây viêm, cũng như thải trừ phức hợp miễn dịch và điều hòa sản xuất kháng thể. Gốc Fc tạo ra liên kết chéo của các thụ thể (ví dụ, FcγR) được dự tính trong bản mô tả này. Ở người, ba lớp FcγR đã được mô tả cho đến nay là: (i) FcγRI (CD64), gắn kết với IgG monome với ái lực cao và được biểu hiện trên đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính và bạch cầu ái toan; (ii) FcγRII (CD32), gắn kết với IgG tạo phức với ái lực trung bình đến thấp, được biểu hiện rộng rãi, đặc biệt là trên bạch cầu, được cho là nhân tố trung tâm trong miễn dịch qua trung gian kháng thể, và có thể được chia thành FcγRIIA, FcγRIIB và FcγRIIC, thực hiện các chức năng khác nhau trong hệ miễn dịch, nhưng liên kết với ái lực thấp tương tự với IgG-Fc, và miền ngoại bào của các thụ thể này có tính tương đồng cao; và (iii) FcγRIII (CD16), gắn kết với IgG với ái lực trung bình đến thấp và đã được tìm thấy ở hai dạng: FcγRIIIA, đã được tìm thấy trên tế bào NK, đại thực bào, bạch cầu ái toan, và một số bạch cầu đơn nhân và tế bào T, và được cho là gây ra ADCC; và FcγRIIIB, được biểu hiện nhiều trên bạch cầu trung tính.

FcγRIIA được tìm thấy trên nhiều tế bào tham gia vào việc tiêu diệt (ví dụ, đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính) và dường như có thể hoạt hóa quá trình tiêu diệt. FcγRIIB dường như đóng một vai trò trong các quá trình ức chế và được tìm thấy trên tế bào B, đại thực bào và trên tế bào mast và bạch cầu ái toan. Điều quan trọng là, đã được chỉ ra là 75% của toàn bộ FcγRIIB được tìm thấy trong gan (Ganesan, L. P. et al., 2012: "FcγRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes," Journal of Immunology 189: 4981–4988). FcγRIIB được biểu hiện nhiều trên nội mô xoang gan, được gọi là LSEC, và trong tế bào Kupffer trong gan và LSEC là vị trí chính của sự thải trừ các phức hợp miễn dịch nhỏ (Ganesan, L. P. et al., 2012: FcγRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes. Journal of Immunology 189: 4981–4988).

Theo một số phương án, kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này và mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng bao gồm gốc Fc để gắn kết với FcγRIIb, đặc biệt là vùng Fc, như, ví dụ, kháng thể typ IgG. Ngoài ra, có thể thao tác di truyền gốc Fc để tăng cường gắn kết FcγRIIB bằng cách đưa vào các đột biến S267E và L328F như được mô tả bởi Chu, S. Y. et al., 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcgammaRIIb with Fc-engineered antibodies. Molecular Immunology 45, 3926–3933. Nhờ đó, sự thải trừ phức hợp miễn dịch có thể được tăng cường (Chu, S., et al., 2014: Accelerated Clearance of IgE In Chimpanzees Is Mediated By Xmab7195, An Fc-Engineered Antibody With Enhanced Affinity For Inhibitory Receptor FcγRIIb. Am J Respir Crit, American Thoracic Society International Conference Abstracts). Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, bao gồm gốc Fc đã được thao tác di truyền với các đột biến S267E và L328F, đặc biệt là như được mô tả bởi Chu, S. Y. et al., 2008: Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcgammaRIIb with Fc-engineered antibodies. Molecular Immunology 45, 3926–3933.

Trên các tế bào B, FcγRIIB dường như hoạt động để kìm hãm tiếp quá trình sản xuất globulin miễn dịch và chuyển isotyp sang, ví dụ, lớp IgE. Trên đại thực bào, FcγRIIB được cho là ức chế quá trình thực bào như được gây ra qua FcγRIIA. Trên bạch cầu ái toan và tế bào mast, dạng B có thể giúp kìm hãm sự hoạt hóa các tế bào này thông qua gắn kết IgE với thụ thể riêng biệt của nó.

Đối với sự gắn kết FcγRI, cải biến ở IgG tự nhiên của ít nhất một trong số E233-G236, P238, D265, N297, A327 và P329 làm giảm sự gắn kết với FcγRI. Các gốc IgG2 ở các vị trí 233-236, được thay thế vào các vị trí tương ứng IgG1 và IgG4, làm giảm sự gắn kết của IgG1 và IgG4 với FcγRI 10^3 lần và triệt tiêu đáp ứng của bạch cầu đơn nhân người đối với các tế bào hồng cầu nhạy với kháng thể (Armour, K. L., et al. *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2613-2624).

Đối với gắn kết FcγRII, đã phát hiện thấy gắn kết với FcγRIIA bị giảm, ví dụ, đối với đột biến IgG của ít nhất một trong số E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 và K414.

Hai dạng alen của FcγRIIA người là biến thể "H131", gắn kết với IgG1 Fc với ái lực cao, và biến thể "R131", gắn kết với IgG1 Fc với ái lực thấp. Xem, ví dụ, Bruhns *et al.*, *Blood 113*:3716-3725 (2009).

Đối với gắn kết FcγRIII, đã phát hiện thấy gắn kết với FcγRIIIA bị giảm, ví dụ, đối với đột biến của ít nhất một trong số E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 và D376. Việc lập bản đồ các vị trí gắn kết trên IgG1 người đối với các thụ thể Fc, các vị trí đột biến đề cập trên đây, và các phương pháp đo gắn kết với FcγRI và FcγRIIA, được mô tả trong Shields, R. L., et al., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604.

Hai dạng alen của FcγRIIIA người là biến thể "F158", gắn kết với IgG1 Fc với ái lực thấp, và biến thể "V158", gắn kết với IgG1 Fc với ái lực cao. Xem, ví dụ, Bruhns *et al.*, *Blood 113*:3716-3725 (2009).

Đối với gắn kết với FcγRII, hai vùng của IgG Fc tự nhiên dường như có liên quan đến các tương tác giữa các FcγRII và các IgG, cụ thể là (i) vị trí bản lề dưới của Fc IgG, đặc biệt là các gốc axit amin L, L, G, G (234 – 237, đánh số EU), và (ii) vùng liền kề của miền CH2 của IgG Fc, đặc biệt là vòng và các sợi trong miền CH2 phía trên liền kề với vùng bản lề dưới, ví dụ, trong vùng của P331 (Wines, B.D., et al., J. Immunol. 2000; 164: 5313 – 5318). Ngoài ra, FcγRI dường như gắn kết với cùng một vị trí trên IgG Fc, trong khi đó FcRn và Protein A gắn kết với vị trí khác trên IgG Fc, mà dường như ở mặt phân cách CH2-CH3 (Wines, B.D., et al., J. Immunol. 2000; 164: 5313 – 5318).

Cũng được dự tính là các đột biến làm tăng ái lực gắn kết của gốc Fc theo sáng chế với (tức là, một hoặc nhiều) thụ thể Fcγ (ví dụ, so với gốc Fc tham chiếu hoặc kháng thể chứa chúng nhưng không bao gồm (các) đột biến này). Xem, ví dụ, Delillo và Ravetch, Cell 161(5):1035-1045 (2015) và Ahmed et al., J. Struc. Biol. 194(1):78 (2016), các đột biến Fc và kỹ thuật của chúng được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn.

Theo phương án bất kỳ trong số các phương án được bộc lộ trong bản mô tả này, protein gắn kết có thể bao gồm gốc Fc chứa đột biến được chọn từ G236A; S239D; A330L; và I332E; hoặc sự kết hợp bao gồm hai hoặc nhiều đột biến bất kỳ trong số chúng; ví dụ, S239D/I332E; S239D/A330L/I332E; G236A/S239D/I332E;

G236A/A330L/I332E (trong bản mô tả này cũng được gọi là "GAALIE"); hoặc G236A/S239D/A330L/I332E. Theo một số phương án, gốc Fc không bao gồm S239D.

Theo các phương án nhất định, gốc Fc có thể bao gồm hoặc chứa ít nhất một phần của gốc Fc có liên quan đến sự gắn kết với FcRn gắn kết. Theo các phương án nhất định, gốc Fc bao gồm một hoặc nhiều cải biến axit amin mà cải thiện ái lực gắn kết đối với (ví dụ, tăng cường gắn kết với) FcRn (ví dụ, ở độ pH khoảng 6,0) và, theo một số phương án, nhờ đó kéo dài thời gian bán thải *in vivo* của phân tử bao gồm gốc Fc (ví dụ, so với gốc Fc tham chiếu hoặc kháng thể mà theo cách khác là giống nhưng không bao gồm (các) cải biến này). Theo các phương án nhất định, gốc Fc bao gồm hoặc thu được từ IgG Fc và đột biến kéo dài thời gian bán thải bao gồm bất kỳ một hoặc nhiều trong số: M428L; N434S; N434H; N434A; N434S; M252Y; S254T; T256E; T250Q; P257I Q311I; D376V; T307A; E380A (đánh số EU). Theo các phương án nhất định, đột biến kéo dài thời gian bán thải bao gồm M428L/N434S (trong bản mô tả này cũng được gọi là "MLNS"). Theo các phương án nhất định, đột biến kéo dài thời gian bán thải bao gồm M252Y/S254T/T256E. Theo các phương án nhất định, đột biến kéo dài thời gian bán thải bao gồm T250Q/M428L. Theo các phương án nhất định, đột biến kéo dài thời gian bán thải bao gồm P257I/Q311I. Theo các phương án nhất định, đột biến kéo dài thời gian bán thải bao gồm P257I/N434H. Theo các phương án nhất định, đột biến kéo dài thời gian bán thải bao gồm D376V/N434H. Theo các phương án nhất định, đột biến kéo dài thời gian bán thải bao gồm T307A/E380A/N434A.

Theo một số phương án, protein gắn kết bao gồm gốc Fc chứa các đột biến thay thế M428L/N434S. Theo một số phương án, protein gắn kết bao gồm gốc Fc chứa các đột biến thay thế G236A/A330L/I332E. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm gốc (ví dụ, IgG) Fc chứa đột biến G236A, đột biến A330L, và đột biến I332E (GAALIE), và không chứa đột biến S239D (ví dụ, bao gồm S tự nhiên ở vị trí 239). Theo các phương án đặc biệt, protein gắn kết bao gồm gốc Fc chứa các đột biến thay thế: M428L/N434S và G236A/A330L/I332E, và tùy ý không chứa S239D. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm gốc Fc chứa các đột biến thay thế: M428L/N434S và G236A/S239D/A330L/I332E.

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết theo sáng chế bao gồm: các CDR và/hoặc miền biến đổi và/hoặc chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ theo bất kỳ một trong số

các kháng thể kháng HBV được lấy làm ví dụ được bộc lộ trong bản mô tả này và/hoặc trong Công bố đơn PCT số WO 2017/060504 (bao gồm các kháng thể HBC34, HBC34-V7, HBC34-V23, HBC34-V31, HBC34-V32, HBC34-V33, HBC34-V34, HBC34-V35, (bao gồm các biến thể được bộc lộ trong bản mô tả này của các kháng thể HBC chứa đột biến thay thế ở vị trí 40 trong chuỗi nhẹ (ví dụ, thay thế xystein tự nhiên bằng alanin, serin, hoặc axit amin tương tự) và HBC24); và gốc Fc chứa đột biến G236A, đột biến A330L, và đột biến I332E (GAALIE), trong đó gốc Fc tùy ý còn bao gồm đột biến M428L/N434S (MLNS). Theo các phương án nhất định, gốc Fc không chứa S239D.

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm: trình tự axit amin CDRH1 theo SEQ ID NO:34, trình tự axit amin CDRH2 theo SEQ ID NO:35 hoặc 66, trình tự axit amin CDRH3 theo SEQ ID NO:36, trình tự axit amin CDRL1 theo SEQ ID NO:37, trình tự axit amin CDRL2 theo SEQ ID NO:38 hoặc 39, và trình tự axit amin CDRL3 theo SEQ ID NO:58 hoặc 40; và gốc Fc chứa đột biến GAALIE. Theo các phương án nhất định, gốc Fc không chứa đột biến S239D. Theo các phương án nhất định, gốc Fc còn chứa đột biến MLNS.

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm: trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng (VH) theo bất kỳ một trong số SEQ ID NO:41 hoặc 67 và trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) theo bất kỳ một trong số SEQ ID NO:42, 59, 65, 89, 90, và 111-120; và gốc Fc chứa đột biến GAALIE. Theo các phương án nhất định, gốc Fc còn bao gồm đột biến MLNS.

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm trình tự axit amin chuỗi nặng theo SEQ ID NO:138 hoặc 91 hoặc 92 và/hoặc trình tự axit amin chuỗi nhẹ theo bất kỳ một trong số SEQ ID NO:93 hoặc 94. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm các trình tự axit amin chuỗi nặng theo SEQ ID NO: 91 và trình tự axit amin chuỗi nhẹ theo SEQ ID NO:93. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm trình tự axit amin chuỗi nặng theo SEQ ID NO: 91 và trình tự axit amin chuỗi nhẹ theo SEQ ID NO:94. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm trình tự axit amin chuỗi nặng theo SEQ ID NO: 92 và trình tự axit amin chuỗi nhẹ theo SEQ ID NO:93. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm trình tự axit amin chuỗi nặng theo SEQ ID NO: 92 và trình tự axit amin chuỗi nhẹ theo SEQ ID NO:94.

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm: trình tự axit amin CDRH1 theo SEQ ID NO:97, trình tự axit amin CDRH2 theo SEQ ID NO:98, trình tự axit amin CDRH3 theo SEQ ID NO:99, trình tự axit amin CDRL1 theo SEQ ID NO:100, trình tự axit amin CDRL2 theo SEQ ID NO:100, và trình tự axit amin CDRL3 theo SEQ ID NO:102; và gốc Fc chứa đột biến GAALIE. Theo các phương án nhất định, gốc Fc còn chứa đột biến MLNS.

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm: trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nặng (VH) theo SEQ ID NO:95 và trình tự axit amin miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) theo SEQ ID NO:96; và gốc Fc chứa đột biến GAALIE. Theo các phương án nhất định, gốc Fc còn chứa đột biến MLNS.

Theo bất kỳ trong các phương án theo sáng chế, protein gắn kết theo sáng chế bao gồm gốc Fc chứa đột biến GAALIE và có sự gắn kết được tăng cường với FcγRIIa người và/hoặc FcγRIIIa người, so với polypeptit tham chiếu (tức là, polypeptit, mà có thể là protein gắn kết, bao gồm gốc Fc không chứa đột biến GAALIE).

Theo các phương án nhất định, polypeptit tham chiếu bao gồm gốc Fc là gốc Fc kiểu hoang (ví dụ, thuộc cùng isotyp) hoặc là gốc Fc chứa một hoặc nhiều đột biến thay thế (hoặc gắn xen hoặc xóa bỏ), với điều kiện đột biến thay thế không phải là và không bao gồm GAALIE. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm kháng thể HBC34-V35 với đột biến GAALIE (và tùy ý các đột biến thay thế khác, như, ví dụ, MLNS), và polypeptit tham chiếu là HBC34-V35 (bao gồm gốc Fc kiểu hoang). Theo các phương án nhất định, polypeptit tham chiếu không chứa đột biến thay thế đã biết hoặc được cho là tác động đến sự gắn kết với FcγRIIa của người và/hoặc với FcγRIIIa người.

Gắn kết giữa các polypeptit, như gắn kết giữa gốc Fc (hoặc protein gắn kết chứa chúng) và thụ thể Fcγ người, như FcγRIIA người, FcγRIIIA người, hoặc Fc FcγRIIB người, hoặc protein bổ thể, như C1q, có thể được xác định hoặc phát hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, thử nghiệm phép đo giao thoa lớp sinh học (BLI) có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị Octet® RED96 (ForteBio, Fremont, California USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất để xác định sự liên kết và sự phân ly trong thời gian thực giữa polypeptit cần quan tâm thứ nhất (ví dụ, HBC34v35 chứa đột biến GAALIE) và polypeptit cần quan tâm thứ hai (ví dụ,

FcγRIIA (H131), FcγRIIA (R131), FcγRIIIA (F158), FcγRIIIA (V158), hoặc FcγRIIb) được bắt giữ trên cơ chất cảm biến.

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm gốc Fc chứa đột biến GAALIE và có sự gắn kết được tăng cường với FcγRIIA người (H131), FcγRIIA người (R131), FcγRIIIA người (F158), FcγRIIIA người (V158), hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng, so với polypeptit tham chiếu bao gồm gốc Fc không chứa đột biến GAALIE. Theo các phương án nhất định, sự gắn kết đã được tăng cường được xác định bằng mức tăng (ví dụ, một hoặc nhiều trong số: tín hiệu đỉnh cao hơn; tốc độ liên kết lớn hơn; tốc độ phân ly chậm hơn; diện tích dưới đường cong lớn hơn) về sự dịch chuyển tín hiệu so với protein gắn kết tham chiếu trong thử nghiệm BLI. Theo các phương án nhất định, thử nghiệm BLI bao gồm việc sử dụng thiết bị Octet(R) RED96 (ForteBio, Fremont, California, Mỹ). Theo các phương án khác nữa, thử nghiệm BLI bao gồm FcγR người được gắn đuôi được bắt giữ trên cảm biến kháng đuôi penta và được tiếp xúc với protein gắn kết. Theo một số phương án, protein gắn kết bao gồm IgG Fab và thử nghiệm BLI còn bao gồm việc cho FcγR người đã được bắt giữ tiếp xúc với protein gắn kết khi có mặt mảnh gắn kết Fab kháng IgG để liên kết chéo các protein gắn kết này thông qua mảnh Fab.

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm gốc Fc chứa đột biến GAALIE và có sự gắn kết được tăng cường với FcγRIIA người (H131), FcγRIIA người (R131), FcγRIIIA người (F158), và/hoặc FcγRIIIA người (V158) so với polypeptit tham chiếu, trong đó sự gắn kết đã được tăng cường có thể bao gồm sự dịch chuyển tín hiệu (nanomet) trong thử nghiệm BLI lớn hơn 1,5, 2, 2,5, 3, hoặc nhiều lần so với sự dịch chuyển tín hiệu được quan sát thấy bằng cách sử dụng protein gắn kết tham chiếu.

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm gốc Fc chứa đột biến GAALIE và có sự gắn kết được tăng cường với FcγRIIA người (H131), FcγRIIA người (R131), FcγRIIIA người (F158), và FcγRIIIA người (V158), so với polypeptit tham chiếu.

Theo bất kỳ trong các phương án theo sáng chế, protein gắn kết bao gồm gốc Fc chứa đột biến GAALIE và có sự gắn kết giảm với FcγRIIB người, so với polypeptit tham chiếu. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm gốc Fc chứa đột biến GAALIE và không gắn kết với FcγRIIB của người, như được xác định, ví dụ, bởi

sự không có mặt của dịch chuyển tín hiệu có ý nghĩa thống kê so với đường cơ sở trong thử nghiệm BLI.

Theo bất kỳ trong số các phương án theo sáng chế, protein gắn kết bao gồm gốc Fc chứa đột biến GAALIE và có sự gắn kết giảm với C1q người (protein bổ thể), so với polypeptit tham chiếu. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm gốc Fc chứa đột biến GAALIE và không gắn kết với C1q người, như được xác định bởi sự không có mặt của dịch chuyển tín hiệu có ý nghĩa thống kê so với đường cơ sở trong thử nghiệm BLI.

Theo bất kỳ trong số các phương án theo sáng chế, protein gắn kết bao gồm gốc Fc chứa đột biến GAALIE và hoạt hóa FcγRIIA người, FcγRIIIA người, hoặc cả hai, đến mức độ lớn hơn so với polypeptit tham chiếu (tức là, polypeptit, mà có thể là protein gắn kết đặc hiệu với HbsAg, bao gồm gốc Fc không chứa đột biến GAALIE). Theo các phương án nhất định, polypeptit tham chiếu bao gồm gốc Fc là gốc Fc kiểu hoang hoặc chứa một hoặc nhiều đột biến thay thế, với điều kiện đột biến thay thế này không phải là GAALIE. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm kháng thể HBC34-V35 với đột biến GAALIE (và tùy ý các đột biến thay thế khác, như, ví dụ, MLNS), và polypeptit tham chiếu là HBC34-V35 với gốc Fc kiểu hoang.

Sự hoạt hóa FcγR người có thể được xác định hoặc phát hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, thử nghiệm báo cáo sinh học đã được xác thực và có sẵn trên thị trường bao gồm ủ protein gắn kết đặc hiệu với HBsAg với HBsAg tái tổ hợp (Engerix B, GlaxoSmithKline) với sự có mặt của tế bào hiệu ứng Jurkat (Promega; Cat. no: G9798) biểu hiện ổn định (i) FcγR cần quan tâm và (ii) gen chỉ thị luciferaza đom đóm dưới sự kiểm soát của yếu tố đáp ứng NFAT. Sự gắn kết của Fc với FcγR biểu hiện trên bề mặt tế bào điều khiển sự biểu hiện của gen chỉ thị luciferaza qua trung gian NFAT. Sự phát quang sau đó được đo bằng thiết bị đo phát quang (ví dụ, Bio-Tek) bằng cách sử dụng chất phản ứng thử nghiệm Bio-Glo-^{TM} Luciferaza (Promega) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sự hoạt hóa được thể hiện bằng giá trị trung bình của các đơn vị phát quang tương đối (RLU) trên nền bằng cách áp dụng công thức sau: (RLU tại nồng độ [x] của protein gắn kết (ví dụ, mAb) – RLU của nền).

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm gốc Fc chứa đột biến GAALIE hoạt hóa FcγRIIA người (H131), FcγRIIA người (R131), FcγRIIIA người (F158), và/hoặc FcγRIIIA người (V158) đến mức độ lớn hơn so với polypeptit tham chiếu. Theo các phương án nhất định, mức hoạt hóa cao hơn để chỉ sự phát quang đỉnh cao hơn và/hoặc diện tích phát quang dưới đường cong lớn hơn, như được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm báo cáo sinh học phát quang như được mô tả ở đây. Theo các phương án nhất định, protein gắn kết bao gồm gốc Fc chứa đột biến GAALIE và hoạt hóa FcγRIIA người (H131), FcγRIIA người (R131), và FcγRIIIA người (F158) đến mức độ lớn hơn so với polypeptit tham chiếu, trong đó mức hoạt hóa cao hơn bao gồm RLU đỉnh lớn hơn 1,5, 2, 2,5, 3, hoặc nhiều lần so với RLU đỉnh quan sát được bằng cách sử dụng protein gắn kết tham chiếu.

Theo bất kỳ trong số các phương án theo sáng chế, protein gắn kết bao gồm gốc Fc chứa đột biến GAALIE không hoạt hóa FcγRIIB người, như được xác định bởi sự không có mặt của RLU có ý nghĩa thống kê và/hoặc có thể đo được trong thử nghiệm báo cáo sinh học phát quang như được mô tả trên đây.

Theo bất kỳ trong số các phương án theo sáng chế, protein gắn kết bao gồm gốc Fc chứa đột biến GAALIE và hoạt hóa tế bào tiêu diệt tự nhiên của người (NK) khi có mặt HBsAg đến mức độ lớn hơn so với polypeptit tham chiếu. Theo các phương án nhất định, sự hoạt hóa tế bào NK được xác định bằng mức biểu hiện CD107a (ví dụ, bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy). Theo các phương án nhất định, tế bào NK bao gồm tế bào chứa kiểu gen V158/V158 đồng hợp tử, F158/F158 đồng hợp tử, hoặc kiểu gen V158/F158 FcγRIIIa dị hợp tử.

Cần hiểu rằng protein gắn kết bất kỳ bao gồm gốc Fc chứa đột biến GAALIE theo sáng chế có thể thực hiện hoặc sở hữu một hoặc nhiều dấu hiệu bất kỳ được đề cập trong bản mô tả này; ví dụ, gắn kết tăng cường với FcγRIIA người và/hoặc FcγRIIIA người so với polypeptit tham chiếu; gắn kết giảm với FcγRIIB người so với polypeptit tham chiếu (và/hoặc không gắn kết với FcγRIIB người); gắn kết giảm với C1q người so với polypeptit tham chiếu (và/hoặc không có gắn kết với C1q người); hoạt hóa FcγRIIA, FcγRIIIA người, hoặc cả hai, đến mức độ lớn hơn so với polypeptit tham chiếu; không hoạt hóa FcγRIIB người; và/hoặc hoạt hóa tế bào tiêu diệt tự nhiên của người (NK) khi

có mặt HBsAg đến mức độ lớn hơn so với polypeptit tham chiếu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu với HBsAg và bao gồm gốc Fc không chứa đột biến GAALIE).

Theo các phương án nhất định, protein gắn kết theo sáng chế bao gồm gốc Fc chứa đột biến GAALIE và: (i) có sự gắn kết tăng cường với FcγRIIA người, FcγRIIIA người, hoặc cả hai, so với polypeptit tham chiếu bao gồm gốc Fc không chứa G236A/A330L/I332E, trong đó FcγRIIA người tùy ý là H131 hoặc R131, và/hoặc FcγRIIIA người tùy ý là F158 hoặc V158; (ii) có sự gắn kết giảm với FcγRIIB người, so với polypeptit tham chiếu bao gồm gốc Fc không chứa G236A/A330L/I332E; (iii) không gắn kết với FcγRIIB người; (iv) có sự gắn kết giảm với C1q người, so với polypeptit tham chiếu bao gồm gốc Fc không chứa G236A/A330L/I332E; (v) không gắn kết với C1q người; (vi) hoạt hóa FcγRIIA, FcγRIIIA người, hoặc cả hai, ở một mức độ lớn hơn polypeptit tham chiếu bao gồm gốc Fc không chứa G236A/A330L/I332E, trong đó FcγRIIA người tùy ý là H131 hoặc R131, và/hoặc FcγRIIIA người tùy ý là F158 hoặc V158; (vii) không hoạt hóa FcγRIIB người; (viii) hoạt hóa tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK) của người khi có mặt HBsAg ở một mức độ lớn hơn polypeptit tham chiếu bao gồm gốc Fc không chứa G236A/A330L/I332E, trong đó polypeptit tham chiếu tùy ý là kháng thể gắn kết với HB Ag, tùy ý với HBsAg; (ix) có HBsAg EC_{50} nằm trong khoảng từ 12,75 ng/mL đến khoảng 19,9 ng/mL, hoặc từ khoảng 12,75 ng/mL đến khoảng 12,84 ng/mL, hoặc khoảng 12,79 ng/mL, hoặc từ khoảng 16,22 ng/mL đến khoảng 19,9 ng/mL, hoặc khoảng 17,97 ng/mL, và/hoặc (b) có HBeAg EC_{50} từ khoảng 10,78 ng/mL đến khoảng 13,72 ng/mL, hoặc từ khoảng 10,78 ng/mL đến khoảng 10,93 ng/mL, hoặc khoảng 10,85 ng/mL, hoặc từ khoảng 11,59 ng/mL đến khoảng 13,72 ng/mL, hoặc khoảng 12,61 ng/mL, trong đó HBV tùy ý là HBV Kiểu gen D, và trong đó EC_{50} tùy ý được xác định *in vitro* bằng cách đo HBsAg hoặc HBeAg, tương ứng, được tiết ra bởi các tế bào HepG2 biểu hiện quá mức NTCP và bị nhiễm HBV, vào ngày 7 sau khi dùng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên cho tế bào HepG2; (x) có HBsAg EC_{50} từ khoảng 10,43 ng/mL đến khoảng 22,41 ng/mL, hoặc khoảng 13,81 ng/mL đến khoảng 16,56 ng/mL, hoặc khoảng 15,12 ng/mL, hoặc từ khoảng 12,24 ng/mL đến khoảng 22,41 ng/mL, hoặc khoảng 16,56 ng/mL, hoặc từ khoảng 10,43 ng/mL đến khoảng 20,08 ng/mL, hoặc khoảng 14,47 ng/mL, và/hoặc (b) có HBeAg EC_{50} từ khoảng 10,39 ng/mL đến khoảng 13,99 ng/mL, hoặc từ khoảng 10,63 ng/mL đến khoảng 10,66 ng/mL, hoặc khoảng 10,64

ng/mL, hoặc từ khoảng 10,39 ng/mL đến khoảng 10,60 ng/mL, hoặc khoảng 10,49 ng/mL, hoặc từ khoảng 13,25 ng/mL đến khoảng 13,99 ng/mL, hoặc khoảng 13,61 ng/mL, trong đó HBV tùy ý là HBV kiểu gen D, và trong đó EC_{50} tùy ý là được xác định *in vitro* bằng cách đo HBsAg hoặc HBeAg, tương ứng, được tiết ra bởi các tế bào HepG2 biểu hiện quá mức NTCP và bị nhiễm HBV, vào ngày 7 sau khi dùng kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên cho tế bào HepG2; (xi) có khả năng gắn kết với biến thể HBsAg chứa HBsAg-Y100C/P120T, HBsAg-P120T, HBsAg-P120S/S143L, HBsAg-C121S, HBsAg-R122D, HBsAg-R122I, HBsAg-T123N, HBsAg-Q129H, HBsAg-Q129L, HBsAg-M133H, HBsAg-M133L, HBsAg-M133T, HBsAg-K141E, HBsAg-P142S, HBsAg-S143K, HBsAg-D144A, HBsAg-G145R, HBsAg-N146A, hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng; (xii) có sự gắn kết được cải thiện với biến thể HBsAg chứa HBsAg-Y100C/P120T, HBsAg-P120T, HBsAg-P120S/S143L, HBsAg-C121S, HBsAg-R122D, HBsAg-R122I, HBsAg-T123N, HBsAg-Q129H, HBsAg-Q129L, HBsAg-M133H, HBsAg-M133L, HBsAg-M133T, HBsAg-K141E, HBsAg-P142S, HBsAg-S143K, HBsAg-D144A, HBsAg-G145R, HBsAg-N146A, hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng, so với kháng thể tham chiếu hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên gắn kết với HBsAg và bao gồm gốc Fc không chứa G236A/A330L/I332E; và/hoặc (xiii) có khả năng trung hòa (a) HBV có kiểu gen A với EC_{50} là khoảng 2,34 ng/mL; (b) HBV có kiểu gen B với EC_{50} là khoảng 2,22 ng/mL; (c) HBV có kiểu gen C với EC_{50} là khoảng 0,92 ng/mL; (d) HBV có kiểu gen D với EC_{50} là khoảng 1,10 ng/mL; (e) HBV có kiểu gen E với EC_{50} là khoảng 1,12 ng/mL; (f) HBV có kiểu gen F với EC_{50} là khoảng 1,93 ng/mL; (g) HBV có kiểu gen G với EC_{50} là khoảng 1,43 ng/mL; và/hoặc (h) HBV có kiểu gen H với EC_{50} là khoảng 1,93 ng/mL, trong đó EC_{50} tùy ý là được xác định bằng cách sử dụng HDV tái tổ hợp được thao tác di truyền để biểu hiện HBsAg có kiểu gen HBV.

Ngoài ra hoặc theo cách khác, gốc Fc của protein gắn kết theo sáng chế có thể bao gồm ít nhất một phần đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này cần thiết cho sự gắn kết Protein A; và/hoặc gốc Fc của kháng thể theo sáng chế bao gồm ít nhất một phần của phân tử Fc đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này cần thiết cho sự gắn kết protein G. Theo một số phương án, chức năng được giữ lại bao gồm thải trừ HBsAg và HBVg. Theo đó, theo các phương án nhất định, gốc Fc bao gồm ít nhất một phần đã biết trong lĩnh vực

kỹ thuật này cần thiết cho sự gắn kết FcγR. Như nêu trên, gốc Fc do đó ít nhất có thể bao gồm (i) vị trí bản lề dưới của IgG Fc tự nhiên, cụ thể là các gốc axit amin L, L, G, G (234 – 237, đánh số EU), và (ii) vùng liền kề của miền CH2 của IgG Fc tự nhiên, cụ thể là vòng và các sợi trong miền CH2 phía trên liền kề với vùng bản lề dưới, ví dụ, trong vùng của P331, ví dụ, vùng có ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 axit amin liên tiếp trong miền CH2 phía trên của IgG Fc tự nhiên xung quanh P331, ví dụ, giữa các axit amin 320 và 340 (đánh số EU) của IgG Fc tự nhiên.

Theo một số phương án, protein gắn kết theo sáng chế bao gồm vùng Fc. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vùng Fc" để chỉ một phần của globulin miễn dịch được tạo ra bởi hai hoặc nhiều gốc Fc của chuỗi nặng của kháng thể. Ví dụ, vùng Fc có thể là vùng Fc monome hoặc "chuỗi đơn" (tức là, vùng scFc). Vùng Fc chuỗi đơn được tạo bởi các gốc Fc được liên kết trong mạch polypeptit đơn (ví dụ, được mã hóa trong một trình tự axit nucleic liền kề duy nhất). Vùng scFc được lấy làm ví dụ được bộc lộ trong WO 2008/143954 A2, và được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Vùng Fc có thể là hoặc bao gồm vùng Fc dime. "Vùng Fc dime" hoặc "dcFc" để chỉ dime được tạo ra bởi các gốc Fc gồm hai chuỗi nặng globulin miễn dịch riêng biệt. Vùng Fc dime có thể là homodime gồm hai gốc Fc giống nhau (ví dụ, vùng Fc của globulin miễn dịch xuất hiện tự nhiên) hoặc heterodime gồm hai gốc Fc không giống nhau (ví dụ, một monome Fc của vùng Fc dime bao gồm ít nhất một cải biến axit amin (ví dụ, cải biến thay thế, xóa bỏ, gắn xen, hoặc cải biến hóa học) mà không có mặt trong monome Fc còn lại, hoặc một monome Fc có thể được cắt cụt so với monome còn lại).

Các phương án cụ thể bao gồm các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên có chuỗi nặng (ví dụ, VH-bản lề-CH1-CH2-CH3) theo SEQ ID NO:91 hoặc SEQ ID NO:92 hoặc SEQ ID NO:138, và các kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên có chuỗi nhẹ (tức là, VL-CL) theo SEQ ID NO:93 hoặc SEQ ID NO:94. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm chuỗi nặng theo SEQ ID NO:91 và chuỗi nhẹ theo SEQ ID NO:93. Theo các phương án khác, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm chuỗi nặng theo SEQ ID NO:92 và chuỗi nhẹ theo SEQ ID NO:94.

Theo các phương án khác, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm chuỗi nặng theo SEQ ID NO:91 và chuỗi nhẹ theo SEQ ID NO:94. Theo các phương án

khác, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm chuỗi nặng theo SEQ ID NO:92 và chuỗi nhẹ theo SEQ ID NO:93. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm hoặc gồm chuỗi nặng theo SEQ ID NO:129. Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm hoặc chứa chuỗi nặng theo SEQ ID NO:138, và tùy ý chuỗi nhẹ theo một trình tự bất kỳ của SEQ ID NO:93 hoặc 94. Các trình tự này được cung cấp trong Danh mục trình tự.

Gốc Fc theo sáng chế có thể bao gồm các trình tự Fc hoặc các vùng thuộc lớp và/hoặc phân lớp giống hoặc khác nhau. Ví dụ, các gốc Fc có thể có nguồn gốc từ globulin miễn dịch (ví dụ, globulin miễn dịch người) thuộc phân lớp IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4, hoặc từ sự kết hợp bất kỳ của chúng. Theo các phương án nhất định, các gốc Fc của vùng Fc thuộc lớp và phân lớp giống nhau. Tuy nhiên, vùng Fc (hoặc một hoặc nhiều gốc Fc của vùng Fc) cũng có thể là dạng khảm, nhờ đó vùng Fc khảm có thể bao gồm các gốc Fc có nguồn gốc từ các lớp và/hoặc phân lớp globulin miễn dịch khác nhau. Ví dụ, ít nhất hai trong số các gốc Fc của vùng Fc dime hoặc chuỗi đơn có thể là từ các lớp và/hoặc phân lớp globulin miễn dịch khác nhau. Theo các phương án nhất định, vùng Fc dime có thể bao gồm các trình tự từ hai hoặc nhiều isotyp hoặc phân lớp khác nhau; ví dụ, thể SEED ("các miền đã được thao tác di truyền trao đổi sợi"), xem Davis *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel. 23*(4):195 (2010).

Ngoài ra hoặc theo cách khác, các vùng Fc khảm có thể bao gồm một hoặc nhiều gốc Fc khảm. Ví dụ, vùng hoặc gốc Fc khảm và có thể bao gồm một hoặc nhiều phần có nguồn gốc từ globulin miễn dịch thuộc phân lớp thứ nhất (ví dụ, phân lớp IgG1, IgG2, hoặc IgG3) trong khi phần còn lại của vùng hoặc gốc Fc thuộc phân lớp khác. Ví dụ, vùng hoặc gốc Fc của polypeptit Fc có thể bao gồm miền CH2 và/hoặc CH3 có nguồn gốc từ globulin miễn dịch thuộc phân lớp thứ nhất (ví dụ, phân lớp IgG1, IgG2 hoặc IgG4) và vùng bản lề từ globulin miễn dịch thuộc phân lớp thứ hai (ví dụ, phân lớp IgG3). Ví dụ, vùng hoặc gốc Fc có thể bao gồm bản lề và/hoặc miền CH2 có nguồn gốc từ globulin miễn dịch thuộc phân lớp thứ nhất (ví dụ, phân lớp IgG4) và miền CH3 từ globulin miễn dịch thuộc phân lớp thứ hai (ví dụ, phân lớp IgG1, IgG2, hoặc IgG3). Ví dụ, vùng Fc khảm có thể bao gồm gốc Fc (ví dụ, gốc Fc hoàn chỉnh) từ globulin miễn dịch cho phân lớp thứ nhất (ví dụ, phân lớp IgG4) và gốc Fc từ globulin miễn dịch thuộc phân lớp thứ hai (ví dụ, phân lớp IgG1, IgG2 hoặc IgG3). Ví dụ, vùng hoặc gốc Fc có

thể bao gồm miền CH2 từ globulin miễn dịch IgG4 và miền CH3 từ globulin miễn dịch IgG1. Ví dụ, vùng hoặc gốc Fc có thể bao gồm miền CH1 và miền CH2 từ phân tử IgG4 và miền CH3 từ phân tử IgG1. Ví dụ, vùng hoặc gốc Fc có thể bao gồm một phần của miền CH2 từ phân lớp cụ thể của kháng thể, ví dụ, các vị trí EU 292-340 của miền CH2. Ví dụ, vùng hoặc gốc Fc có thể bao gồm các axit amin ở các vị trí 292-340 của CH2 có nguồn gốc từ gốc IgG4 và phần còn lại của CH2 có nguồn gốc từ gốc IgG1 (theo cách khác, 292-340 của CH2 có thể có nguồn gốc từ gốc IgG1 và phần còn lại của CH2 có nguồn gốc từ gốc IgG4).

Cũng cần hiểu rằng kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc vùng hoặc gốc Fc bất kỳ theo sáng chế có thể thuộc alotyp và/hoặc haplotyp bất kỳ. Ví dụ, các alotyp globulin miễn dịch G của người bao gồm các dạng được bộc lộ trong Jefferis và LeFranc, *mAbs 1*(4):1-7 (2009), các alotyp này (bao gồm G1m (1(a); 2(x); 3(f); và 17(z)); G2m (23(n)); G3m (21(g1); 28(g5); 11(b0); 5(b2); 13(b3); 14(b4); 10(b5); 15(s); 16(t); 6(c3); 24(c5); 26(u); và 27(v)); A2m (1 và 2); và Km (1; 2; và 3) và các haplotyp, và các trình tự axit amin thu được, và dạng kết hợp của chúng, được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn. Theo các phương án nhất định, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc vùng hoặc gốc Fc theo sáng chế bao gồm IgG1 alotyp g1m17, k1.

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

Theo một số phương án của protein gắn kết được bộc lộ trong bản mô tả này, gốc Fc, hoặc vùng Fc, bao gồm hoặc chứa trình tự axit amin có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch của người (ví dụ, từ vùng Fc hoặc gốc Fc từ phân tử IgG người). Tuy nhiên, các polypeptit có thể bao gồm một hoặc nhiều axit amin từ các loài động vật có vú khác. Ví dụ, gốc Fc của động vật linh trưởng hoặc vị trí gắn kết của động vật linh trưởng có thể được bao gồm trong polypeptit theo sáng chế. Theo cách khác, một hoặc nhiều axit amin của loài gặm nhấm có thể có mặt trong gốc Fc hoặc trong vùng Fc.

Phân tử axit nucleic

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic bao gồm polynucleotit mã hóa kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế

Bảng 4 thể hiện trình tự nucleotit mã hóa V_H-, V_L-, CH-, CL-, HC-, và LC theo sáng chế:

Mô tả trình tự nucleotit của kháng thể	**SEQ ID NO:**	**Trình tự nuclecotit**
V_H của HBC34-V7, HBC34-V35, và HBC34-V34 (được tối ưu hóa codon)	103	GAGCTGCAGCTGGTGGAGTCCGGCGGC GGCTGGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCAGA GGCTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCAGGAT CTTCCGGTCCTTTTACATGTCTTGGGTGC GGCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGGAGT GGGTGGCTACCATCAACCAGGACGGCTC CGAGAAGCTGTATGTGGATAGCGTGAA GGGCAGATTCACAATCTCTCGCGACAAC GCCAAGAACTCCCTGTTTCTGCAGATGA ACAATCTGAGGGTGGAGGATACCGCCGT GTACTATTGCGCCGCTTGGTCTGGCAAT AGCGGCGGCATGGACGTGTGGGGACAG GGCACCACCGTGTCCGTGTCCAGC
HBC34-V34 V_L (được tối ưu hóa codon)	104	AGCTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCG TGTCCGTGTCCCCTGGACAGACCGTGTC CATCCCATGCAGCGGCGACAAGCTGGGC AACAAGAACGTGTCCTGGTTTCAGCATA AGCCTGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCAT CTACGAGGTGAAGTATAGGCCCAGCGG CATCCCTGAGCGGTTCTCTGGCTCCAAC AGCGGCAATACAGCCACCCTGACAATCT CTGGCACACAGGCTATGGACGAGGCCG CTTATTTCTGCCAGACCTTTGATTCCACC ACAGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAGAC TGACAGTGCTG

Mô tả trình tự nucleotit của kháng thể	SEQ ID NO:	Trình tự nuclecotit
HBC34-V35 V_L (được tối ưu hóa codon)	105	AGCTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCG TGTCCGTGTCCCCTGGACAGACCGTGTC CATCCCATGCAGCGGCGACAAGCTGGGC AACAAGAACGTGGCCTGGTTTCAGCATA AGCCTGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCAT CTACGAGGTGAAGTATAGGCCCAGCGG CATCCCTGAGCGGTTCTCTGGCTCCAAC AGCGGCAATACAGCCACCCTGACAATCT CTGGCACACAGGCTATGGACGAGGCCG CTTATTTCTGCCAGACCTTTGATTCCACC ACAGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAGAC TGACAGTGCTG
HBC34-V7 V_L (được tối ưu hóa codon)	110	AGCTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCG TGTCCGTGTCCCCTGGACAGACCGTGTC CATCCCATGCAGCGGCGACAAGCTGGGC AACAAGAACGTGTGCTGGTTTCAGCATA AGCCTGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCAT CTACGAGGTGAAGTATAGGCCCAGCGG CATCCCTGAGCGGTTCTCTGGCTCCAAC AGCGGCAATACAGCCACCCTGACAATCT CTGGCACACAGGCTATGGACGAGGCCG CTTATTTCTGCCAGACCTTTGATTCCACC ACAGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAGAC TGACAGTGCTG
HBC24 V_H (kiểu hoang)	106	gaggtgcagttgttggagtctgggggaggcttggtacagcctgg ggggtccctgagactctcctgtgcagcctctGGATCCACT TTTACCAAATATGCCatgagctgggtccgtcaggct ccagggaaggggctggagtgggtcgcaagtATTAGTGG AAGTgttcctggttttGGTATTGACACAtactacgca gactccgttaagggccggttcaccatctccagagacacttccaag aacaccctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacac ggccttatattactgtGCGAAAGATGTCGGGGTTA TCGGGTCATACTATTACTACGCTATGGA CGTCtggggtcaa
HBC24 V_L (kiểu hoang)	107	aaattgtgttgacgcagtctccaggcaccctgtctttgtctccaggg gaaagagccaccctctcctgcagggccagtCAGGGTCTT AGCAGCAGTTACttagcctggtaccagcagaaacctg gccaggctcccaggctcctcatctatAGTGCGTCCaccag ggccactggcatcccagacaggttcagtggcagtgggtctggga cagacttcactctcaccatcagcagactggagcctgaagattttgc agtgtattactgtCAACAGTATGCTTACTCACCT CGGTGGACGttcggccaagggaccaaggtggagatcaa ac
HBC24 V_H (được tối ưu hóa codon)	108	GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGC GGCCTGGTGCAGCCCGGCGGCTCCCTGA GGCTGTCTTGCGCCGCCTCTGGCAGCAC CTTCACAAAGTATGCAATGTCTTGGGTG CGCCAGGCACCAGGCAAGGGCCTGGAG

Mô tả trình tự nucleotit của kháng thể	SEQ ID NO:	Trình tự nuclecotit
		TGGGTGGCCTCCATCTCTGGCAGCGTGC CTGGCTTCGGCATCGACACCTACTATGC CGATTCCGTGAAGGGCCGGTTTACAATC AGCAGAGACACCTCCAAGAACACACTG TATCTGCAGATGAATTCTCTGCGGGCCG AGGACACCGCCCTGTACTATTGTGCCAA GGATGTGGGCGTGATCGGCAGCTACTAT TACTATGCAATGGACGTGTGGGGACAGG GAACAGCAGTGACAGTGAGCTCC
HBC24 V_L (được tối ưu hóa codon)	109	GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGGCA CACTGTCCCTGTCCCCTGGAGAGAGAGC CACCCTGTCCTGCAGAGCCTCTCAGGGC CTGAGCTCCTCTTACCTGGCCTGGTATC AGCAGAAGCCTGGACAGGCCCCTCGGCT GCTGATCTACTCTGCCTCCACCAGAGCA ACAGGCATTCCTGACCGCTTCTCCGGAT CTGGAAGCGGCACAGACTTCACCCTGAC AATCAGCCGGCTGGAGCCTGAGGACTTC GCCGTGTACTATTGTCAGCAGTACGCCT ATTCCCCAAGGTGGACCTTTGGCCAGGG CACAAAGGTGGAGATCAAG
HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35 CH1-bản lề-CH2-CH3 (được tối ưu hóa codon)	130	GCCTCCACAAAGGGCCCAAGCGTGTTTC CACTGGCTCCCTCTTCCAAGTCTACCTCC GGCGGCACAGCCGCTCTGGGATGTCTGG TGAAGGATTACTTCCCAGAGCCCGTGAC CGTGTCTTGGAACTCCGGCGCCCTGACC AGCGGAGTGCATACATTTCCAGCTGTGC TGCAGAGCTCTGGCCTGTACTCTCTGTC CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCTTCCAGC CTGGGCACCCAGACATATATCTGCAACG TGAATCACAAGCCAAGCAATACAAAGG TGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGTCTT GTGATAAGACCCATACATGCCCTCCATG TCCAGCTCCAGAGCTGCTGGGCGGCCCA AGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTA AGGATACCCTGATGATCTCCAGAACCCC CGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAGGATCCTGAGGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCTAAGACCAAGCCCAGGGAGG AGCAGTACAACTCTACCTATCGGGTGGT GTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGAT TGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGC AAGGTGTCTAATAAGGCCCTGCCCGCTC CTATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAA GGGCCAGCCTAGAGAGCCACAGGTGTA CACACTGCCTCCATCTCGCGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGTC

Mô tả trình tự nucleotit của kháng thể	SEQ ID NO:	Trình tự nuclecotit
		TGGTGAAGGGCTTCTATCCTTCCGACAT CGCTGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCA GCCAGAGAACAATTACAAGACCACACC CCCTGTGCTGGACAGCGATGGCTCTTTC TTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACA AGTCTCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTT TAGCTGTTCTGTGATGCATGAGGCCCTG CACAATCATTATACACAGAAGTCCCTGA GCCTGTCTCCTGGCAAG
HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35 HC (VH-CH1-bản lề-CH2-CH3) (được tối ưu hóa codon)	131	GAGCTGCAGCTGGTGGAGTCCGGCGGC GGCTGGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCAGA GGCTGAGCTGTGCCGCTTCTGGCAGGAT CTTCCGGTCCTTTTACATGTCTTGGGTGC GGCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGGAGT GGGTGGCTACCATCAACCAGGACGGCTC CGAGAAGCTGTATGTGGATAGCGTGAA GGGCAGATTCACAATCTCTCGCGACAAC GCCAAGAACTCCCTGTTTCTGCAGATGA ACAATCTGAGGGTGGAGGATACCGCCGT GTACTATTGCGCCGCTTGGTCTGGCAAT AGCGGCGGCATGGACGTGTGGGGACAG GGCACCACCGTGTCCGTGTCCAGCGCCT CCACAAAGGGCCCAAGCGTGTTTCCACT GGCTCCCTCTTCCAAGTCTACCTCCGGC GGCACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGA AGGATTACTTCCCAGAGCCCGTGACCGT GTCTTGGAACTCCGGCGCCCTGACCAGC GGAGTGCATACATTTCCAGCTGTGCTGC AGAGCTCTGGCCTGTACTCTCTGTCCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCTTCCAGCCTG GGCACCCAGACATATATCTGCAACGTGA ATCACAAGCCAAGCAATACAAAGGTGG ACAAGAAGGTGGAGCCCAAGTCTTGTG ATAAGACCCATACATGCCCTCCATGTCC AGCTCCAGAGCTGCTGGGCGGCCCAAGC GTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAGG ATACCCTGATGATCTCCAGAACCCCCGA GGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CACGAGGATCCTGAGGTGAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCTAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGC AGTACAACTCTACCTATCGGGTGGTGTC CGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGG CTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAG GTGTCTAATAAGGCCCTGCCCGCTCCTA TCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAAGG GCCAGCCTAGAGAGCCACAGGTGTACA CACTGCCTCCATCTCGCGATGAGCTGAC

Mô tả trình tự nucleotit của kháng thể	SEQ ID NO:	Trình tự nuclecotit
		CAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGTCTG GTGAAGGGCTTCTATCCTTCCGACATCG CTGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGC CAGAGAACAATTACAAGACCACACCCC CTGTGCTGGACAGCGATGGCTCTTTCTTT CTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CTCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTAG CTGTTCTGTGATGCATGAGGCCCTGCAC AATCATTATACACAGAAGTCCCTGAGCC TGTCTCCTGGCAAGTGATGAGGTACCGT GCGACGGCCGGCAAGCCCCCGCTCCCCG GGCTCTCGCGGTCGTACGAGGAAAGCTT
HBC34-V7 CL (được tối ưu hóa codon)	132	GGACAGCCAAAGGCTGCTCCATCTGTGA CCCTGTTTCCACCCTCTTCCGAGGAGCT GCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGC CTGATCTCTGACTTCTACCCTGGAGCTGT GACAGTGGCTTGGAAGGCTGATAGCTCT CCCGTGAAGGCTGGCGTGGAGACAACA ACCCCTAGCAAGCAGTCTAACAATAAGT ACGCCGCTTCCAGCTATCTGTCTCTGAC ACCAGAGCAGTGGAAGTCCCACCGCTCT TATTCCTGCCAGGTGACCCATGAGGGCA GCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCA CCGAGTGTTCT
HBC34-V7 LC (VL-CL) (được tối ưu hóa codon)	133	AGCTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCG TGTCCGTGTCCCCTGGACAGACCGTGTC CATCCCATGCAGCGGCGACAAGCTGGGC AACAAGAACGTGTGCTGGTTTCAGCATA AGCCTGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCAT CTACGAGGTGAAGTATAGGCCCAGCGG CATCCCTGAGCGGTTCTCTGGCTCCAAC AGCGGCAATACAGCCACCCTGACAATCT CTGGCACACAGGCTATGGACGAGGCCG CTTATTTCTGCCAGACCTTTGATTCCACC ACAGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAGAC TGACAGTGCTGGGACAGCCAAAGGCTG CTCCATCTGTGACCCTGTTTCCACCCTCT TCCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCC ACCCTGGTGTGCCTGATCTCTGACTTCTA CCCTGGAGCTGTGACAGTGGCTTGGAAG GCTGATAGCTCTCCCGTGAAGGCTGGCG TGGAGACAACAACCCCTAGCAAGCAGT CTAACAATAAGTACGCCGCTTCCAGCTA TCTGTCTCTGACACCAGAGCAGTGGAAG TCCCACCGCTCTTATTCCTGCCAGGTGA CCCATGAGGGCAGCACCGTGGAGAAGA CAGTGGCCCCCACCGAGTGTTCT

Mô tả trình tự nucleotit của kháng thể	SEQ ID NO:	Trình tự nuclecotit
HBC34-V34, HBC34-V35 CL (được tối ưu hóa codon)	134	GGACAGCCAAAGGCTGCTCCATCTGTGA CCCTGTTTCCACCCTCTTCCGAGGAGCT GCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGC CTGATCTCTGACTTCTACCCTGGAGCTGT GACAGTGGCTTGGAAGGCTGATAGCTCT CCCGTGAAGGCTGGCGTGGAGACAACA ACCCCTAGCAAGCAGTCTAACAATAAGT ACGCCGCTTCCAGCTATCTGTCTCTGAC ACCAGAGCAGTGGAAGTCCCACCGCTCT TATTCCTGCCAGGTGACCCATGAGGGCA GCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCA CCGAGTGTTCT
HBC34-V34 LC (VL-CL) (được tối ưu hóa codon)	135	AGCTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCG TGTCCGTGTCCCCTGGACAGACCGTGTC CATCCCATGCAGCGGCGACAAGCTGGGC AACAAGAACGTGTCCTGGTTTCAGCATA AGCCTGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCAT CTACGAGGTGAAGTATAGGCCCAGCGG CATCCCTGAGCGGTTCTCTGGCTCCAAC AGCGGCAATACAGCCACCCTGACAATCT CTGGCACACAGGCTATGGACGAGGCCG CTTATTTCTGCCAGACCTTTGATTCCACC ACAGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAGAC TGACAGTGCTGGGACAGCCAAAGGCTG CTCCATCTGTGACCCTGTTTCCACCCTCT TCCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCC ACCCTGGTGTGCCTGATCTCTGACTTCTA CCCTGGAGCTGTGACAGTGGCTTGGAAG GCTGATAGCTCTCCCGTGAAGGCTGGCG TGGAGACAACAACCCCTAGCAAGCAGT CTAACAATAAGTACGCCGCTTCCAGCTA TCTGTCTCTGACACCAGAGCAGTGGAAG TCCCACCGCTCTTATTCCTGCCAGGTGA CCCATGAGGGCAGCACCGTGGAGAAGA CAGTGGCCCCCACCGAGTGTTCT
HBC34-V35 LC (VL-CL) (được tối ưu hóa codon)	136	AGCTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCG TGTCCGTGTCCCCTGGACAGACCGTGTC CATCCCATGCAGCGGCGACAAGCTGGGC AACAAGAACGTGGCCTGGTTTCAGCATA AGCCTGGCCAGTCCCCCGTGCTGGTCAT CTACGAGGTGAAGTATAGGCCCAGCGG CATCCCTGAGCGGTTCTCTGGCTCCAAC AGCGGCAATACAGCCACCCTGACAATCT CTGGCACACAGGCTATGGACGAGGCCG CTTATTTCTGCCAGACCTTTGATTCCACC ACAGTGGTGTTCGGCGGCGGCACCAGAC TGACAGTGCTGGGACAGCCAAAGGCTG CTCCATCTGTGACCCTGTTTCCACCCTCT

Mô tả trình tự nucleotit của kháng thể	SEQ ID NO:	Trình tự nuclecotit
		TCCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCC ACCCTGGTGTGCCTGATCTCTGACTTCTA CCCTGGAGCTGTGACAGTGGCTTGGAAG GCTGATAGCTCTCCCGTGAAGGCTGGCG TGGAGACAACAACCCCTAGCAAGCAGT CTAACAATAAGTACGCCGCTTCCAGCTA TCTGTCTCTGACACCAGAGCAGTGGAAG TCCCACCGCTCTTATTCCTGCCAGGTGA CCCATGAGGGCAGCACCGTGGAGAAGA CAGTGGCCCCCACCGAGTGTTCT

Do sự dư thừa của mã di truyền, sáng chế cũng bao gồm các biến thể trình tự của các trình tự axit nucleic này và cụ thể là các biến thể trình tự này mà mã hóa cùng các trình tự axit amin.

Theo các phương án nhất định, polynucleotit hoặcà phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit có chung tỷ lệ đồng nhất ít nhất 80% với trình tự nucleotit theo một trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 103-110 và 130-136, trong đó trình tự nucleotit được tối ưu hóa codon để biểu hiện bởi tế bào chủ.

Theo các phương án cụ thể, phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm hoặc chứa trình tự axit nucleic theo bất kỳ một trong số SEQ ID NO: 103-110 và 130-136.

Theo các phương án nhất định, polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa V_H theo SEQ ID NO:103 và trình tự nucleotit mã hóa V_L theo SEQ ID NO:105. Theo các phương án khác, polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa V_H theo SEQ ID NO:103, và trình tự nucleotit mã hóa V_L theo SEQ ID NO:104. Theo các phương án khác, polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa V_H theo SEQ ID NO: 108, và trình tự nucleotit mã hóa V_L theo SEQ ID NO: 109.

Sáng chế cũng đề xuất polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, trong đó polynucleotit này bao gồm hoặc chứa trình tự nucleotit mã hóa V_H theo SEQ ID NO:103 và trình tự nucleotit mã hóa V_L theo SEQ ID NO:110, trong đó kháng thể đã được mã hóa hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên gắn kết với vùng vòng kháng nguyên của HBsAg và vô hiệu hóa sự nhiễm với virut viêm gan B và virut viêm gan delta.

Theo các phương án theo sáng chế, polynucleotit có thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa CH1-bản lề-CH2-CH3 theo SEQ ID NO:130, và/hoặc bao gồm trình tự nucleotit

mã hóa HC (VH-CH1-bản lề-CH3-CH3) theo SEQ ID NO:131. Theo một số phương án, polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa CL theo SEQ ID NO:132 và/hoặc bao gồm trình tự nucleotit mã hóa LC (VL-CL) theo SEQ ID NO:133. Theo các phương án khác, polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa CL theo SEQ ID NO:134 và/hoặc bao gồm trình tự nucleotit mã hóa LC (VL-CL) theo SEQ ID NO:135 hoặc SEQ ID NO:136.

Vectơ

Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là các vectơ, ví dụ, vectơ biểu hiện, chứa phân tử axit nucleic theo sáng chế.

Thuật ngữ "vectơ" để chỉ cấu trúc bao gồm phân tử axit nucleic. Vectơ trong phạm vi của sáng chế thích hợp để kết hợp hoặc giữ trình tự axit nucleic mong muốn. Vectơ như vậy có thể là vectơ cất giữ, vectơ biểu hiện, vectơ tách dòng vô tính, vectơ chuyển v.v. Vectơ cất giữ là vectơ cho phép cất giữ thuận tiện phân tử axit nucleic. Do đó, vectơ này có thể chứa trình tự tương ứng, ví dụ, với kháng thể mong muốn hoặc mảnh kháng thể của chúng theo sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "vectơ biểu hiện" để chỉ cấu trúc ADN chứa phân tử axit nucleic được liên kết điều khiển được với trình tự kiểm soát thích hợp có khả năng gây ra sự biểu hiện phân tử axit nucleic trong vật chủ thích hợp. Trình tự kiểm soát này bao gồm trình tự khởi động (ví dụ, trình tự khởi động dị loài) để thực hiện quá trình phiên mã, trình tự điều khiển tùy ý để kiểm soát quá trình phiên mã đó, trình tự mã hóa các vị trí gắn kết ribosom mARN thích hợp, và trình tự kiểm soát sự kết thúc quá trình phiên mã và dịch mã. Bất kỳ trong số các yếu tố của vectơ biểu hiện tham gia vào quá trình phiên mã của phân tử axit nucleic cần quan tâm có thể là dị loài với vectơ này. Vectơ này có thể là plasmit, hạt thể thực khuẩn, virut hoặc đơn giản là trình tự gắn xen bộ gen tiềm năng. Khi được biến nạp vào vật chủ thích hợp, vectơ này có thể sao chép và hoạt động độc lập với bộ gen của vật chủ, hoặc trong một số trường hợp có thể tích hợp vào chính bộ gen. Trong bản mô tả sáng chế, "plasmit", "plasmit biểu hiện", "virut" và "vectơ" thường được sử dụng thay thế cho nhau.

Vectơ tách dòng vô tính thường là vectơ chứa vị trí tách dòng vô tính, có thể được sử dụng để đưa trình tự axit nucleic vào vectơ. Vectơ tách dòng vô tính có thể là, ví dụ, plasmit vectơ hoặc vectơ thể thực khuẩn.

Vectơ chuyển có thể là vectơ thích hợp để chuyển phân tử axit nucleic vào tế bào hoặc cơ quan, ví dụ, vectơ virut. Vectơ trong ngữ cảnh này của sáng chế có thể là, ví dụ, vectơ ARN hoặc vectơ ADN. Vectơ có thể là phân tử ADN. Ví dụ, vectơ theo nghĩa này của sáng chế bao gồm vị trí tách dòng vô tính, vùng đánh dấu chọn lọc, như yếu tố kháng kháng sinh, và trình tự thích hợp để nhân lên của vectơ, như gốc sao chép. Theo một số phương án, vectơ trong phạm vi của sáng chế là vectơ plasmit. Theo các phương án nhất định, vectơ bao gồm vectơ lentivirut hoặc vectơ retrovirut.

Tế bào

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế cũng đề xuất tế bào (còn được gọi là "tế bào chủ") biểu hiện kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế; hoặc bao gồm vectơ hoặc polynucleotit theo sáng chế.

Ví dụ về các tế bào này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào nhân chuẩn, ví dụ, tế bào nấm men, tế bào động vật, tế bào côn trùng, tế bào thực vật; và tế bào tiền nhân, bao gồm *E. coli*. Theo một số phương án, tế bào này là tế bào động vật có vú. Theo các phương án nhất định, tế bào này là dòng tế bào động vật có vú như tế bào CHO (ví dụ, tế bào DHFR-CHO (Urlaub *et al., PNAS* 77:4216 (1980), CHO-KSV), tế bào thận phôi người (ví dụ, tế bào HEK293T), tế bào PER.C6, tế bào Y0, tế bào Sp2/0, tế bào NS0, tế bào gan người, ví dụ, tế bào gan RG, tế bào u tủy hoặc tế bào thể lai. Ví dụ khác về dòng tế bào chủ động vật có vú bao gồm tế bào sertoli chuột nhắt (ví dụ, tế bào TM4); dòng CV1 thận khỉ được biến nạp bằng SV40 (COS-7); tế bào thận chuột lang con (BHK); tế bào thận của khỉ xanh châu Phi (VERO-76); tế bào thận khỉ (CV1); tế bào ung thư biểu mô cổ tử cung của người (HELA); tế bào phổi của người (W138); tế bào gan người (Hep G2); tế bào thận chó (MDCK; tế bào gan chuột trâu (BRL 3A); khối u tuyến vú chuột nhắt (MMT 060562); tế bào TRI; tế bào *MRC* 5; và tế bào FS4. Dòng tế bào chủ động vật có vú thích hợp để sản xuất kháng thể cũng bao gồm các dòng tế bào được mô tả trong, ví dụ, Yazaki và Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003).

Theo các phương án nhất định, tế bào chủ là tế bào tiền nhân, như *E. coli.* Sự biểu hiện của các peptit trong tế bào tiền nhân như *E. coli* được thiết lập tốt (xem, ví dụ, Pluckthun, A. *Bio/Technology 9:*545-551 (1991). Ví dụ, kháng thể có thể được tạo ra trong vi khuẩn, cụ thể là khi glycosyl hóa và chức năng hiệu ứng Fc là không cần thiết. Để biểu hiện mảnh kháng thể và polypeptit ở vi khuẩn, xem, ví dụ, các patent Mỹ số 5,648,237; 5,789,199; và 5,840,523.

Tế bào côn trùng hữu ích để biểu hiện protein gắn kết theo sáng chế là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, ví dụ, tế bào *Spodoptera frugipera* Sf9, tế bào Trichoplusia ni BTI-TN5B1-4, và tế bào *Spodoptera frugipera* SfSWT01 "Mimic™". Xem, ví dụ, Palmberger *et al., J. Biotechnol. 153*(3-4):160-166 (2011). Nhiều chủng baculovirut đã được xác định có thể được sử dụng kết hợp với tế bào côn trùng, cụ thể là để chuyển nhiễm tế bào *Spodoptera frugiperda.*

Vi sinh vật nhân chuẩn như nấm sợi hoặc nấm men cũng là vật chủ thích hợp để tách dòng vô tính hoặc biểu hiện vectơ mã hóa protein, và bao gồm các chủng nấm và nấm men với con đường glycosyl hóa "đã được làm tương thích với người", gây ra sự sản xuất kháng thể với mẫu glycosyl hóa một phần và hoàn toàn của người. Xem Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004); Li *et al., Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Tế bào thực vật cũng có thể được sử dụng làm vật chủ để biểu hiện protein gắn kết theo sáng chế. Ví dụ, công nghệ PLANTIBODIES™ (được mô tả trong, ví dụ, các patent Mỹ số 5,959,177; 6,040,498; 6,420,548; 7,125,978; và 6,417,429) dùng thực vật chuyển gen để sản xuất kháng thể.

Theo một số phương án, protein dung hợp được biểu hiện trên bề mặt tế bào bởi tế bào miễn dịch, ví dụ, tế bào T, tế bào NK, hoặc tế bào NK-T, hoặc typ phụ bất kỳ của chúng.

Hệ biểu hiện protein bất kỳ tương thích với sáng chế có thể được sử dụng để sản xuất protein gắn kết theo sáng chế. Hệ biểu hiện thích hợp bao gồm các động vật chuyển gen được mô tả trong Gene Expression Systems, Academic Press, eds. Fernandez et al., 1999.

Theo các phương án cụ thể, tế bào có thể được chuyển nhiễm với vectơ theo sáng chế với vectơ biểu hiện. Thuật ngữ "chuyển nhiễm" để chỉ việc đưa phân tử axit nucleic,

như phân tử ADN hoặc ARN (ví dụ, mARN), vào tế bào, như vào tế bào nhân chuẩn. Trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ "chuyển nhiễm" bao gồm phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để đưa phân tử axit nucleic vào tế bào, như vào tế bào nhân chuẩn, bao gồm vào tế bào động vật có vú. Các phương pháp như vậy bao gồm, ví dụ, điện chuyển, chuyển gen bằng bao gói trong liposom, ví dụ, dựa trên lipit cation và/hoặc liposom, kết tủa canxi phosphat, chuyển nhiễm dựa trên hạt nano, chuyển nhiễm dựa trên virut, hoặc chuyển nhiễm trên cơ sở các polyme cation, như DEAE-dextran hoặc polyetylenimin v.v. Theo các phương án nhất định, việc đưa vào không phải là bằng virut.

Ngoài ra, tế bào theo sáng chế có thể được chuyển nhiễm ổn định hoặc tạm thời với vectơ theo sáng chế, ví dụ, để biểu hiện kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế. Theo các phương án như vậy, các tế bào chuyển nhiễm ổn định với vectơ như được đề cập trong bản mô tả này mã hóa protein gắn kết. Theo cách khác, tế bào có thể được chuyển nhiễm tạm thời với vectơ theo sáng chế mã hóa protein gắn kết theo sáng chế. Theo bất kỳ trong số các phương án theo sáng chế, polynucleotit có thể là dị loài với tế bào chủ.

Theo khía cạnh liên quan, sáng chế đề xuất các phương pháp sản xuất kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp, trong đó các phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế trong điều kiện và trong một thời gian đủ để sản xuất kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp.

Theo đó, sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ tái tổ hợp biểu hiện dị loài kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế. Ví dụ, tế bào có thể là của loài khác với loài mà từ đó kháng thể này thu được toàn bộ hoặc một phần (ví dụ, tế bào CHO biểu hiện kháng thể người hoặc kháng thể người đã được thao tác di truyền). Theo một số phương án, typ tế bào của tế bào chủ không biểu hiện kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên về bản chất. Ngoài ra, tế bào chủ có thể tạo ra cải biến sau dịch mã (PTM; ví dụ, glysocyl hóa và fucosyl hóa) trên kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên mà không có mặt ở trạng thái tự nhiên của kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên này (hoặc ở trạng thái tự nhiên của kháng thể bố mẹ mà từ đó kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên được thao tác di truyền hoặc được tạo ra). PTM như vậy có thể dẫn đến sự khác biệt về chức năng (ví dụ, khả năng gây miễn dịch giảm). Theo đó,

kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế mà được sản xuất bởi tế bào chủ như được bộc lộ trong bản mô tả này có thể bao gồm một hoặc nhiều cải biến sau dịch mã mà khác với kháng thể này (hoặc kháng thể bố mẹ) ở trạng thái tự nhiên của nó (ví dụ, kháng thể người được tạo ra bởi tế bào CHO có thể chứa nhiều cải biến sau dịch mã hơn, cải biến này khác biệt với kháng thể khi được phân lập từ người và/hoặc được sản xuất bởi tế bào B hoặc tế bào huyết tương tự nhiên của người.

Các dấu hiệu bổ sung tùy ý của kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp

Kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, và protein dung hợp theo sáng chế có thể được tạo cặp, ví dụ, với thuốc để phân phối đến vị trí điều trị hoặc được tạo cặp với nhãn phát hiện được để tạo điều kiện cho việc chụp ảnh vị trí chứa tế bào cần quan tâm. Phương pháp tạo cặp kháng thể với thuốc và nhãn phát hiện được là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như là phương pháp chụp ảnh bằng cách sử dụng nhãn phát hiện được. Kháng thể đã được dán nhãn có thể được sử dụng trong nhiều loại thử nghiệm khác nhau, sử dụng nhiều loại nhãn khác nhau. Việc phát hiện sự hình thành phức hợp kháng thể-kháng nguyên giữa kháng thể (hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên hoặc protein dung hợp) theo sáng chế và epitop cần quan tâm trên HBsAg, cụ thể là trên vùng vòng kháng nguyên của HBsAg, có thể được tạo điều kiện thuận lợi bằng cách gắn chất có thể phát hiện được vào kháng thể. Các phương pháp phát hiện thích hợp bao gồm việc sử dụng nhãn như hạt nhân phóng xạ, enzym, đồng enzym, chất phát huỳnh quang, chất phát quang hóa học, thể nhiễm sắc, cơ chất enzym hoặc đồng yếu tố, chất ức chế enzym, các phức hợp nhóm giả, các gốc tự do, hạt, thuốc nhuộm, và các phương pháp tương tự. Ví dụ về các enzym thích hợp bao gồm peroxidaza cây cải ngựa, phosphataza kiềm, β-galactosidaza, hoặc axetylcholinesteraza; ví dụ về các phức hợp nhóm giả thích hợp bao gồm streptavidin/biotin và avidin/biotin; ví dụ về vật liệu huỳnh quang phù hợp bao gồm umbelliferone, fluoresxein, fluoresxein isothioxyanat, rhodamin, diclotriazinylamin fluoresxein, dansyl clorua hoặc phycoerythrin; ví dụ về vật liệu phát quang là luminol; ví dụ về vật liệu phát quang sinh học bao gồm luciferaza, luciferin, và aequorin; và ví dụ về vật liệu phóng xạ thích hợp bao gồm 125I, 131I, 35S, hoặc 3H. Chất phản ứng đã được gắn nhãn như vậy có thể được sử dụng trong nhiều loại thử nghiệm đã biết, như

thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, thử nghiệm miễn dịch enzym, ví dụ, ELISA, thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, và các thử nghiệm tương tự. Kháng thể đã được gắn nhãn, mảnh gắn kết kháng nguyên, và protein dung hợp theo sáng chế do đó có thể được sử dụng trong các thử nghiệm ví dụ như được mô tả trong US 3,766,162; US 3,791,932; US 3,817,837; và US 4,233,402.

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

Các kỹ thuật để liên hợp gốc điều trị như vậy với kháng thể là đã biết. Xem, ví dụ, Arnon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy, " in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), pp. 243-256; ed. Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery, " in Controlled Drug Delivery, ed. Robinson et al. (2d ed; Marcel Dekker, Inc.), pp. 623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, ed. Pinchera et al. pp. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, ed. Baldwin et al. (Academic Press, New York, 1985), pp. 303-316; và Thorpe et al. (1982) Immunol. Rev. 62:119-158.

Theo cách khác, kháng thể, mảnh kháng thể, hoặc protein dung hợp, có thể được liên hợp với kháng thể thứ hai, hoặc mảnh kháng thể của nó, (hoặc protein dung hợp thứ hai) để tạo ra thể liên hợp khác loại như được mô tả trong US 4,676,980. Ngoài ra, các cầu nối có thể được sử dụng giữa nhãn và kháng thể theo sáng chế, ví dụ, như được mô

tả trong US 4,831,175. Kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, và protein dung hợp có thể được dán nhãn trực tiếp bằng iốt phóng xạ, indi, yttri hoặc hạt phóng xạ khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, như được mô tả trong US 5,595,721. Việc điều trị có thể bao gồm sự kết hợp của việc điều trị bằng kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, và/hoặc protein dung hợp đã được liên hợp và không được liên hợp, được dùng đồng thời hoặc lần lượt ví dụ, như được mô tả trong WO00/52031; WO00/52473.

Kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, và protein dung hợp như được đề cập trong bản mô tả này cũng có thể được gắn vào nền rắn. Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế, mảnh kháng thể chức năng của chúng, hoặc protein dung hợp, có thể được cải biến hóa học bằng cách liên hợp cộng hóa trị với polyme để, ví dụ, làm tăng thời gian bán thải tuần hoàn của chúng. Ví dụ về polyme, và phương pháp gắn chúng vào peptit, được thể hiện trong US 4,766,106; US 4,179,337; US 4,495,285 và US 4,609,546. Theo một số phương án, các polyme có thể được chọn từ polyol đã được polyoxyetyl hóa và polyetylen glycol (PEG). PEG hòa tan trong nước ở nhiệt độ phòng và có công thức chung: $R(O\text{-}CH_2\text{-}CH_2)_nO\text{-}R$, trong đó R có thể là hydro, hoặc nhóm bảo vệ như nhóm alkyl hoặc alkanol. Theo các phương án nhất định, nhóm bảo vệ có thể có từ 1 đến 8 nguyên tử cacbon. Ví dụ, nhóm bảo vệ có thể là metyl. Kí hiệu n là số nguyên dương. Theo một phương án, n nằm trong khoảng từ 1 đến 1.000. Theo phương án khác, n nằm trong khoảng từ 2 đến 500. Theo một số phương án, PEG có khối lượng phân tử trung bình được chọn trong khoảng từ 1.000 đến 40.000, từ 2.000 đến 20.000, và từ 3.000 đến 12.000. Ngoài ra, PEG có thể có ít nhất một nhóm hydroxy, ví dụ, PEG có thể có nhóm hydroxy tận cùng. Ví dụ, nó là nhóm hydroxy tận cùng được hoạt hóa để phản ứng với nhóm amino tự do trên chất ức chế. Tuy nhiên, người ta sẽ hiểu rằng loại và lượng của nhóm phản ứng có thể thay đổi để đạt được PEG/kháng thể được liên hợp cộng hóa trị theo sáng chế.

Polyol đã được polyoxyetyl hóa hòa tan trong nước cũng có thể được sử dụng trong ngữ cảnh của kháng thể và mảnh gắn kết kháng nguyên được đề cập trong bản mô tả này. Chúng bao gồm sorbitol đã được polyoxyetyl hóa, glucoza đã được polyoxyetyl hóa, glyxerol đã được polyoxyetyl hóa (POG), và các nhóm tương tự. Theo một phương án, POG được sử dụng. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết bất kỳ, vì khung glyxerol của glyxerol đã được polyoxyetyl hóa là giống với khung xuất hiện tự nhiên ở, ví dụ, động

vật và người trong mono-, di-, triglyxerit, sự phân nhánh này không nhất thiết được coi là tác nhân lạ trong cơ thể. POG có thể có khối lượng phân tử nằm trong cùng khoảng với PEG. Hệ phân phối thuốc khác có thể được sử dụng để làm tăng thời gian bán thải tuần hoàn là liposom. Các phương pháp điều chế hệ phân phối liposom là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các hệ thống phân phối thuốc khác là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả trong, ví dụ, Poznansky et al. (1980) và Poznansky (1984).

Kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, và protein dung hợp theo sáng chế có thể được đề xuất ở dạng tinh chế. Thông thường, kháng thể, mảnh gắn kết, hoặc protein dung hợp sẽ có mặt trong chế phẩm mà gần như không chứa các polypeptit khác, ví dụ, trong đó ít hơn 90% (theo khối lượng), thường ít hơn 60% và thông thường hơn là ít hơn 50% chế phẩm được tạo thành từ các polypeptit khác.

Kháng thể, protein dung hợp, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên theo sáng chế có thể gây miễn dịch ở vật chủ không phải là người (hoặc dị loài), ví dụ, ở chuột nhắt. Cụ thể là, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp có thể có idiotop gây miễn dịch ở vật chủ không phải là người, mà không phải ở vật chủ là người. Cụ thể là, các phân tử như vậy theo sáng chế để sử dụng ở người bao gồm các phân tử không thể dễ dàng được phân lập từ vật chủ như chuột, dê, thỏ, chuột cống, động vật có vú không phải là linh trưởng, v.v. và thường không thể thu được bằng cách làm tương thích với người hoặc từ chuột nhắt ngoại lai.

Sản xuất kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, và protein dung hợp

Kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, và protein dung hợp theo sáng chế có thể được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, phương pháp chung để tạo ra kháng thể đơn dòng bằng cách sử dụng công nghệ lai hóa là đã biết (Kohler, G. and Milstein, C., 1975; Kozbar et al. 1983). Theo một phương án, phương pháp bất tử EBV thay thế được mô tả trong WO2004/076677 được sử dụng.

Theo một phương án, kháng thể được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong WO 2004/076677. Trong các phương pháp như vậy, tế bào B sản xuất kháng thể được biến nạp với EBV và chất hoạt hóa tế bào B đa dòng. Các chất kích thích tăng trưởng và biệt hóa tế bào bổ sung có thể tùy ý được bổ sung trong bước biến nạp

để tăng cường thêm hiệu quả. Các chất kích thích này có thể là xytokin như IL-2 và IL-15. Theo một khía cạnh, IL-2 được bổ sung trong bước làm bất tử để cải thiện thêm hiệu quả của việc làm bất tử, nhưng việc sử dụng nó không phải là bắt buộc. Tế bào B đã được làm bất tử được sản xuất bằng cách sử dụng các phương pháp này sau đó có thể được nuôi cấy bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và kháng thể được phân lập từ đó.

Một phương pháp khác để sản xuất kháng thể được mô tả trong WO 2010/046775. Trong phương pháp như vậy, tế bào huyết tương được nuôi cấy với số lượng hạn chế, và dưới dạng các tế bào huyết tương đơn trong đĩa nuôi cấy vi giếng (microwell). Kháng thể có thể được phân lập từ môi trường nuôi cấy tế bào huyết tương. Ngoài ra, từ môi trường nuôi cấy tế bào huyết tương, ARN có thể được chiết và PCR có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Vùng VH và VL của kháng thể có thể được khuếch đại bằng RT-PCR (PCR transcriptaza ngược), được giải trình tự và tách dòng vô tính vào vectơ biểu hiện mà sau đó được chuyển nhiễm vào tế bào HEK293T hoặc các tế bào chủ khác. Việc tách dòng vô tính axit nucleic trong vectơ biểu hiện, việc chuyển nhiễm tế bào chủ, việc nuôi cấy tế bào chủ đã được chuyển nhiễm và việc phân lập kháng thể đã được tạo ra có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Kháng thể có thể được tinh chế tiếp, nếu muốn, bằng cách sử dụng phương pháp lọc, ly tâm và các phương pháp sắc ký khác nhau như HPLC hoặc sắc ký ái lực. Kỹ thuật tinh chế kháng thể, ví dụ, kháng thể đơn dòng, bao gồm kỹ thuật sản xuất kháng thể cấp độ dược phẩm, là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

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

Hệ tế bào chủ/vectơ thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng để biểu hiện trình tự ADN mã hóa kháng thể hoặc phân tử protein dung hợp theo sáng chế hoặc mảnh của chúng. Vi khuẩn, ví dụ, E. coli, và các hệ thống vi sinh vật khác có thể được sử dụng,

một phần, để biểu hiện mảnh kháng thể như các mảnh Fab và $F(ab')_2$, và đặc biệt là các mảnh Fv và mảnh kháng thể chuỗi đơn, ví dụ, Fv chuỗi đơn. Các hệ biểu hiện tế bào chủ nhân chuẩn, ví dụ, của động vật có vú có thể được sử dụng để sản xuất các phân tử kháng thể lớn hơn, bao gồm các phân tử kháng thể hoàn chỉnh. Tế bào chủ động vật có vú thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tế bào chủ và dòng tế bào được lấy làm ví dụ được bộc lộ trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng đề xuất quy trình sản xuất kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc phân tử protein dung hợp theo sáng chế bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ chứa vectơ mã hóa axit nucleic theo sáng chế trong điều kiện thích hợp để biểu hiện protein từ ADN mã hóa phân tử kháng thể theo sáng chế, và phân lập phân tử kháng thể này.

Phân tử kháng thể hoặc mảnh kháng thể có thể chỉ bao gồm polypeptit của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, trong trường hợp này chỉ trình tự mã hóa polypeptit chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ cần được sử dụng để chuyển nhiễm tế bào chủ. Để sản xuất các sản phẩm chứa cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, dòng tế bào có thể được chuyển nhiễm với hai vectơ, vectơ thứ nhất mã hóa polypeptit chuỗi nhẹ và vectơ thứ hai mã hóa polypeptit chuỗi nặng. Theo cách khác, một vectơ duy nhất có thể được sử dụng, vectơ này bao gồm các trình tự mã hóa polypeptit chuỗi nhẹ và chuỗi nặng.

Theo cách khác, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, và protein dung hợp theo sáng chế có thể được sản xuất bằng cách (i) biểu hiện trình tự axit nucleic theo sáng chế trong tế bào chủ, ví dụ, bằng cách sử dụng vectơ theo sáng chế, và (ii) phân lập sản phẩm mong muốn đã được biểu hiện. Ngoài ra, phương pháp này có thể bao gồm (iii) tinh chế kháng thể đã phân lập, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp. Tế bào B đã được biến nạp và tế bào huyết tương đã được nuôi cấy có thể được sàng lọc đối với các tế bào sản xuất kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp có tính đặc hiệu và chức năng mong muốn.

Việc sàng lọc có thể được thực hiện bằng thử nghiệm miễn dịch bất kỳ, ví dụ, ELISA, bằng cách nhuộm mô hoặc tế bào (bao gồm tế bào đã được chuyển nhiễm), bằng thử nghiệm trung hòa hoặc bằng một trong số các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để xác định tính đặc hiệu hoặc chức năng mong muốn. Thử nghiệm này có thể chọn lọc trên cơ sở nhận biết đơn giản một hoặc nhiều kháng nguyên, hoặc có thể chọn lọc trên cơ sở bổ sung là chức năng mong muốn, ví dụ, để chọn lọc các

kháng thể trung hòa mà không phải chỉ kháng thể gắn kết kháng nguyên, để chọn lọc các kháng thể có thể thay đổi đặc điểm của các tế bào đích, như các thác truyền tín hiệu của chúng, hình dạng của chúng, tốc độ phát triển của chúng, khả năng ảnh hưởng đến các tế bào khác của chúng, đáp ứng của chúng đối với sự ảnh hưởng bởi các tế bào khác hoặc bởi các chất phản ứng khác hoặc bởi sự thay đổi điều kiện, trạng thái biệt hóa của chúng, hoặc các yếu tố tương tự.

Sau đó, các dòng vô tính tế bào B đã được biến nạp riêng lẻ có thể được sản xuất từ môi trường nuôi cấy tế bào B đã được biến nạp dương tính. Bước tách dòng vô tính để tách các dòng vô tính riêng lẻ khỏi hỗn hợp các tế bào dương tính có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp pha loãng giới hạn, vi thao tác, lắng đọng tế bào đơn lẻ bằng cách phân loại tế bào hoặc phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

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

Dòng vô tính tế bào B đã được làm bất tử hoặc các tế bào chủ đã được chuyển nhiễm được đề cập trong bản mô tả này có thể được sử dụng theo nhiều cách khác nhau, ví dụ, dưới dạng nguồn kháng thể đơn dòng, dưới dạng nguồn axit nucleic (ADN hoặc mARN) mã hóa kháng thể đơn dòng cần quan tâm, để nghiên cứu, v.v.

Dược phẩm

Sáng chế cũng đề xuất dược phẩm chứa kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp, theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế và/hoặc tế bào theo sáng chế.

Dược phẩm có thể cũng chứa chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá dược dược dụng. Mặc dù chất mang hoặc tá dược có thể tạo điều kiện cho việc sử dụng, nó không nên tự kích thích sự sản xuất kháng thể có hại cho cá thể tiếp nhận dược phẩm. Nó cũng không nên độc hại. Chất mang thích hợp có thể là các đại phân tử lớn, chuyển hóa chậm như protein, polypeptit, liposom, polysaccarit, axit polylactic, axit polyglycolic, polyme axit amin, copolyme axit amin và hạt virus bất hoạt. Nói chung, chất mang dược dụng

trong dược phẩm theo sáng chế có thể là thành phần có hoạt tính hoặc thành phần không hoạt động.

Muối dược dụng có thể được sử dụng là, ví dụ, muối axit vô cơ, như hydroclorua, hydrobromua, phosphat và sulfat, hoặc muối của axit hữu cơ, như axetat, propionat, malonat và benzoat.

Chất mang dược dụng trong dược phẩm có thể chứa thêm chất lỏng như nước, nước muối, glyxerol và etanol. Ngoài ra, các chất bổ trợ, như chất thấm ướt hoặc chất nhũ hóa hoặc chất đệm pH, có thể có mặt trong dược phẩm như vậy. Các chất mang như vậy cho phép dược phẩm được bào chế dưới dạng viên nén, viên tròn, viên bao đường, viên nang, chất lỏng, gel, xi-rô, huyền phù và hỗn dịch để đối tượng uống.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế ở nhiều dạng khác nhau. Ví dụ, dược phẩm có thể được bào chế dưới dạng thuốc tiêm, dung dịch lỏng hoặc hỗn dịch. Các dạng rắn thích hợp để hòa tan trong, hoặc tạo huyền phù trong, tá dược dạng lỏng trước khi tiêm cũng có thể được bào chế (ví dụ, chế phẩm đông khô, tương tự như Synagis™ và Herceptin™, để hoàn nguyên bằng nước vô khuẩn chứa chất bảo quản). Dược phẩm có thể được bào chế để dùng khu trú, ví dụ, dưới dạng thuốc mỡ, kem hoặc bột. Dược phẩm có thể được bào chế để dùng qua đường miệng, ví dụ, dưới dạng viên nén hoặc viên nang, dạng xịt hoặc dạng siro (được tạo hương vị tùy ý). Dược phẩm có thể được bào chế để dùng cho phổi, ví dụ, dưới dạng ống hít, bằng cách sử dụng bột mịn hoặc dạng xịt. Dược phẩm có thể được bào chế dưới dạng viên thuốc đạn hoặc thuốc đặt âm đạo. Dược phẩm có thể được bào chế để dùng cho mũi, tai hoặc mắt, ví dụ, dưới dạng giỏ giọt. Dược phẩm có thể là dạng kit, được thiết kế sao cho dược phẩm kết hợp được hoàn nguyên ngay trước khi dùng cho đối tượng. Ví dụ, kháng thể đông khô có thể được đề xuất ở dạng kit với nước vô khuẩn và dung dịch đệm vô khuẩn.

Theo các phương án cụ thể, thành phần hoạt chất trong dược phẩm theo sáng chế là phân tử kháng thể, mảnh kháng thể hoặc biến thể hoặc dẫn xuất của chúng, cụ thể là thành phần hoạt chất trong dược phẩm là kháng thể, mảnh kháng thể, protein dung hợp, hoặc biến thể và dẫn xuất của chúng, như được đề cập trong bản mô tả này. Do đó, nó có thể dễ bị thoái biến trong đường tiêu hóa. Do đó, nếu dược phẩm để dùng bằng đường tiêu hóa, dược phẩm này có thể chứa tác nhân bảo vệ kháng thể tránh khỏi bị thoái biến nhưng giải phóng kháng thể này khi nó đã được hấp thụ từ đường tiêu hóa.

Phần thảo luận kỹ về chất mang dược dụng có sẵn trong Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, ISBN: 0683306472.

Dược phẩm theo sáng chế có thể có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 8,5, và theo một số phương án giá trị này có thể nằm trong khoảng từ 6 đến 8. Theo các phương án khác, độ pH của dược phẩm như được đề cập trong bản mô tả này có thể là khoảng 7. Độ pH có thể được duy trì bằng cách sử dụng dung dịch đệm. Dược phẩm có thể vô khuẩn và/hoặc không có chất gây sốt. Dược phẩm có thể đẳng trương đối với người. Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được cung cấp trong các đồ chứa kín.

Sáng chế đề xuất dược phẩm có mặt ở một vài dạng dùng; các dạng này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dạng thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, bằng cách tiêm hoặc truyền, ví dụ, bằng cách tiêm liều lớn và nhanh hoặc truyền liên tục. Trong trường hợp sản phẩm dùng để tiêm hoặc truyền, nó có thể ở dạng huyền phù, dung dịch hoặc nhũ tương trong tá dược dầu hoặc nước và nó có thể chứa tác nhân bào chế, như chất tạo huyền phù, chất bảo quản, chất ổn định và/hoặc chất phân tán. Theo cách khác, phân tử kháng thể có thể ở dạng khô, để hoàn nguyên trước khi sử dụng với chất lỏng vô khuẩn thích hợp. Tá dược lỏng thường được hiểu là nguyên liệu thích hợp để bảo quản, vận chuyển và/hoặc sử dụng hợp chất, như dược chất, cụ thể là kháng thể theo sáng chế. Ví dụ, tá dược lỏng có thể là chất lỏng có thể chấp nhận được về mặt sinh lý, thích hợp để bảo quản, vận chuyển và/hoặc sử dụng dược chất, cụ thể là kháng thể theo sáng chế. Sau khi bào chế, dược phẩm theo sáng chế có thể được dùng trực tiếp cho đối tượng. Theo một phương án, dược phẩm được điều chỉnh để dùng cho động vật có vú, ví dụ, đối tượng người.

Dược phẩm được đề cập trong bản mô tả này có thể được dùng bằng một số đường dùng bất kỳ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đường miệng, trong tĩnh mạch, trong bắp, trong động mạch, nội tủy, trong phúc mạc, nội tủy mạc, trong não thất, qua da, qua da, khu trú, dưới da, trong mũi, đường ruột, dưới lưỡi, trong âm đạo hoặc trực tràng. Kim tiêm không gây thủng da (hypospray) có thể cũng được sử dụng để dùng dược phẩm theo sáng chế. Theo các phương án cụ thể, dược phẩm có thể được bào chế để dùng qua đường miệng, ví dụ, dưới dạng viên nén, viên nang và dạng tương tự, để dùng khu trú, hoặc dưới dạng thuốc tiêm, ví dụ, dưới dạng dung dịch lỏng hoặc huyền

phù. Các dạng rắn thích hợp để hòa tan trong, hoặc tạo huyền phù trong, tá dược lỏng trước khi tiêm cũng có thể được sử dụng, ví dụ, dược phẩm ở dạng đông khô.

Để tiêm, ví dụ, tiêm trong tĩnh mạch, tiêm qua da hoặc tiêm dưới da, hoặc tiêm tại vị trí bị đau, hoạt chất có thể được cung cấp dưới dạng dung dịch nước có thể chấp nhận được qua đường tiêm, không chứa pyrogen và có độ pH, tính đẳng trương và độ ổn định thích hợp. Chất bảo quản, chất ổn định, chất đệm, chất chống oxy hóa và/hoặc các chất phụ gia khác có thể được bao gồm, theo yêu cầu.

Dù là polypeptit, peptit, hoặc phân tử axit nucleic, tế bào, hoặc hợp chất dược dụng khác theo sáng chế được cấp cho cá thể, việc sử dụng thường ở "lượng hữu hiệu để phòng ngừa" hoặc "lượng hữu hiệu điều trị" hoặc "lượng hữu hiệu" (như trường hợp có thể), lượng này đủ để thể hiện lợi ích cho cá thể (ví dụ, cải thiện kết quả lâm sàng; giảm bớt hoặc cải thiện các triệu chứng liên quan đến căn bệnh; giảm sự xuất hiện của các triệu chứng; chất lượng cuộc sống được cải thiện; tình trạng không bệnh kéo dài hơn; giảm mức độ bệnh tật, ổn định trạng thái bệnh tật; làm chậm tiến triển của bệnh; sự thuyên giảm; sống sót; hoặc sống lâu theo cách có ý nghĩa thống kê). Lượng thực tế được sử dụng, và tốc độ và thời gian sử dụng, sẽ phụ thuộc vào bản chất và mức độ nghiêm trọng của tình trạng đang được điều trị. Để tiêm, dược phẩm theo sáng chế có thể được đề xuất, ví dụ, trong ống tiêm đã được nạp sẵn.

Dược phẩm như được bộc lộ trong bản mô tả này có thể cũng được sử dụng qua đường miệng ở dạng liều được chấp nhận sử dụng qua đường miệng bất kỳ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, viên nang, viên nén, huyền phù nước hoặc dung dịch. Trong trường hợp của viên nén để sử dụng qua đường miệng, các chất mang thường được sử dụng bao gồm lactoza và bột ngô. Các chất làm trơn, như magie stearat, cũng thường được bổ sung vào. Để sử dụng qua đường miệng ở dạng viên nang, chất pha loãng hữu ích bao gồm lactoza và bột bắp khô. Khi huyền phù nước được yêu cầu để sử dụng qua đường miệng, hoạt chất, tức là phân tử liên hợp giữa thuốc và chất vận chuyển theo sáng chế như được mô tả trên đây, được kết hợp với các chất nhũ hóa và chất tạo huyền phù. Nếu muốn, một số chất làm ngọt, tạo hương vị hoặc chất tạo màu cũng có thể được bổ sung vào.

Các dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được sử dụng khu trú, cụ thể là khi đích điều trị bao gồm các vùng hoặc cơ quan có thể dễ dàng tiếp cận bằng cách sử dụng

khu trú, ví dụ, bao gồm bệnh về da hoặc mô biểu mô bất kỳ khác có thể tiếp cận được. Các dạng bào chế khu trú thích hợp được bào chế sẵn cho từng vùng hoặc cơ quan này. Để sử dụng khu trú, dược phẩm có thể được bào chế thành thuốc mỡ thích hợp, chứa dược phẩm theo sáng chế, cụ thể là các thành phần của nó như được mô tả trên đây, được tạo huyền phù hoặc được hòa tan trong một hoặc nhiều chất mang. Chất mang để sử dụng khu trú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dầu khoáng, thạch dầu mỏ lỏng, thạch dầu mỏ trắng, propylen glycol, polyoxyetylen, hợp chất polyoxypropylen, sáp nhũ hóa và nước. Theo cách khác, dược phẩm có thể được bào chế thành kem lỏng và kem phù hợp. Trong ngữ cảnh của sáng chế, chất mang thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dầu khoáng, sorbitan monostearat, polysorbate 60, sáp xetyl este, rượu xetearylic, 2-octyldodecanol, rượu benzylic và nước.

Liều lượng có thể được thể hiện theo khối lượng cơ thể. Do đó, liều được thể hiện bằng [g, mg, hoặc đơn vị khác]/kg (hoặc g, mg, v.v.) thường đề cập đến [g, mg, hoặc đơn vị khác] "trên mỗi kg (hoặc g, mg, v.v.) khối lượng cơ thể", ngay cả khi thuật ngữ "khối lượng cơ thể" không được đề cập rõ ràng.

Theo các phương án cụ thể, trong một liều đơn, ví dụ, liều hàng ngày, hàng tuần hoặc hàng tháng, lượng của kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, trong dược phẩm không vượt quá 1 g. Theo các phương án nhất định, một liều đơn này không vượt quá liều được chọn từ 500 mg, 250 mg, 100 mg, và 50 mg.

Theo một số phương án, dược phẩm và kit như được đề cập trong bản mô tả này còn chứa:

(i) chất ức chế polymeraza, trong đó chất ức chế polymeraza tùy ý bao gồm Lamivudine, Adefovir, Entecavir, Telbivudine, Tenofovir, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng;

(ii) interferon, trong đó interferon này tùy ý bao gồm IFNbeta và/hoặc IFNalpha;

(iii) chất ức chế điểm kiểm tra, trong đó chất ức chế điểm kiểm tra này tùy ý bao gồm kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, kháng thể kháng PD-L1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó, và/hoặc kháng thể kháng CTLA4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của nó;

(iv) chất chủ vận của phân tử điểm kiểm tra miễn dịch kích thích; hoặc

(v) kết hợp bất kỳ của (i)-(iv).

Theo một số phương án, kit bao gồm dược phẩm hoặc sự kết hợp như được đề cập trong bản mô tả này, và còn bao gồm hướng dẫn sử dụng thành phần này để ngăn ngừa, điều trị, làm suy giảm, và/hoặc chẩn đoán tình trạng nhiễm viêm gan B và/hoặc nhiễm viêm gan D.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế (ví dụ, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, tế bào chủ, axit nucleic, vectơ, hoặc dược phẩm) được sử dụng kết hợp với chất ức chế PD-1, ví dụ, kháng thể đặc hiệu với PD-1 hoặc mảnh gắn kết của chúng, như pidilizumab, nivolumab, pembrolizumab, MEDI0680 (trước đây là AMP-514), AMP-224, BMS-936558 hoặc kết hợp bất kỳ của chúng.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với kháng thể đặc hiệu với PD-L1 hoặc mảnh gắn kết của chúng, như BMS-936559, durvalumab (MEDI4736), atezolizumab (RG7446), avelumab (MSB0010718C), MPDL3280A, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế LAG3, như LAG525, IMP321, IMP701, 9H12, BMS-986016, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế CTLA4. Theo các phương án đặc biệt, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với kháng thể đặc hiệu với CTLA4 hoặc mảnh gắn kết của chúng, như ipilimumab, tremelimumab, protein dung hợp CTLA4-Ig (ví dụ, abatacept, belatacept), hoặc kết hợp bất kỳ của chúng.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với kháng thể đặc hiệu với B7-H3 hoặc mảnh gắn kết của chúng, như enoblituzumab (MGA271), 376,96, hoặc cả hai. Mảnh gắn kết kháng thể B7-H3 có thể là scFv hoặc protein dung hợp của chúng, như được mô tả trong, ví dụ, Dangaj et al., Cancer Res. 73:4820, 2013, cũng như các mảnh gắn kết được mô tả trong patent Mỹ số 9,574.000 và Công bố đơn PCT số WO /201640724A1 và WO 2013/025779A1.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế CD244.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế BLTA, HVEM, CD160, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Kháng thể kháng CD-160 được mô tả trong, ví dụ, Công bố đơn PCT số WO 2010/084158.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế TIM3.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế Gal9.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế truyền tín hiệu tradenosin, như thụ thể adenosin mồi.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế A2aR.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế KIR, như lirilumab (BMS-986015).

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế xytokin ức chế (thông thường là xytokin khác với TGFβ) hoặc sự phát triển hoặc hoạt tính của Treg.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế IDO, như levo-1-metyl tryptophan, epacadostat (INCB024360; Liu *et al.*, *Blood 115*:3520-30, 2010), ebselen (Terentis *et al.* , *Biochem. 49*:591-600, 2010), indoximod, NLG919 (Mautino *et al.*, American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting 2013; Apr 6-10, 2013), 1-metyl-tryptophan (1-MT)-tira-pazamin, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế arginaza, như N(omega)-Nitro-L-arginin metyl este (L-NAME), N-omega-hydroxy-nor-l-arginin (nor-NOHA), L-NOHA, axit 2(S)-amino-6-boronohexanoic (ABH), S-(2-boronoetyl)-L-xystein (BEC), hoặc kết hợp bất kỳ của chúng.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế VISTA, như CA-170 (Curis, Lexington, Mass.).

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế TIGIT như, ví dụ, COM902 (Compugen, Toronto, Ontario Canada), chất ức chế CD155, như, ví dụ, COM701 (Compugen), hoặc cả hai.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế PVRIG, PVRL2, hoặc cả hai. Kháng thể kháng PVRIG được mô tả trong, ví dụ, Công bố đơn PCT số WO 2016/134333. Kháng thể kháng PVRL2 được mô tả trong, ví dụ, Công bố đơn PCT số WO 2017/021526.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế LAIR1.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với chất ức chế CEACAM-1, CEACAM-3, CEACAM-5, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng kết hợp với tác nhân làm tăng hoạt tính (tức là, chất chủ vận) của phân tử điểm kiểm tra miễn dịch kích thích. Ví dụ, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất chủ vận CD137 (4-1BB) (như, ví dụ, urelumab), chất chủ vận CD134 (OX-40) (như, ví dụ, MEDI6469, MEDI6383, hoặc MEDI0562), lenalidomide, pomalidomide, chất chủ vận CD27 (như, ví dụ, CDX-1127), chất chủ vận CD28 (như, ví dụ, TGN1412, CD80, hoặc CD86), chất chủ vận CD40 (như, ví dụ, CP-870,893, rhuCD40L, hoặc SGN-40), chất chủ vận CD122 (như, ví dụ, IL-2) chất chủ vận của GITR (như, ví dụ, kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người được mô tả trong Công bố đơn quốc tế số WO 2016/054638), chất chủ vận của ICOS (CD278) (như, ví dụ, GSK3359609, mAb 88.2, JTX-2011, Icos 145-1, Icos 314-8, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng). Theo các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này, phương pháp có thể bao gồm bước sử dụng dược phẩm theo sáng chế với một hoặc nhiều chất chủ vận của phân tử điểm kiểm tra miễn dịch kích thích, bao gồm chất chủ vận bất kỳ nêu trên, dạng đơn lẻ hoặc trong tổ hợp bất kỳ.

Kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế có thể có mặt trong cùng một dược phẩm dưới dạng thành phần hoạt chất bổ sung hoặc, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế có thể được bao gồm trong dược phẩm thứ nhất và thành phần hoạt chất bổ sung có thể được bao gồm trong dược phẩm thứ hai khác với dược phẩm thứ nhất.

Sử dụng

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sử dụng kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, protein dung hợp, axit nucleic, vectơ, tế bào hoặc dược phẩm, hoặc kit theo sáng chế trong (i) phòng bệnh, điều trị hoặc làm thuyên giảm tình trạng viêm gan B và/hoặc viêm gan D; hoặc trong (ii) chẩn đoán viêm gan B và/hoặc viêm gan D (ví dụ, ở đối tượng người).

Phương pháp chẩn đoán (ví dụ, *in vitro*, *ex vivo*) có thể bao gồm bước cho kháng thể, mảnh kháng thể (ví dụ, mảnh gắn kết kháng nguyên), hoặc protein dung hợp tiếp xúc với mẫu. Các mẫu như vậy có thể được phân lập từ đối tượng, ví dụ, mẫu mô phân lập được lấy từ, ví dụ, đường mũi, hốc xoang, tuyến nước bọt, phổi, gan, tuyến tụy, thận, tai, mắt, nhau thai, đường tiêu hóa, tim, buồng trứng, tuyến yên, tuyến thượng thận, tuyến giáp, não, da hoặc máu. Các phương pháp chẩn đoán cũng có thể bao gồm việc phát hiện phức hợp kháng nguyên/kháng thể hoặc kháng nguyên/protein dung hợp, cụ thể là sau khi cho kháng thể, mảnh kháng thể, hoặc protein dung hợp tiếp xúc với mẫu. Bước phát hiện như vậy thường được thực hiện trên bàn thí nghiệm, tức là không có sự tiếp xúc bất kỳ với cơ thể người hoặc động vật. Ví dụ về các phương pháp phát hiện là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, ví dụ, ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym).

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng (i) kháng thể, mảnh kháng thể, protein dung hợp, hoặc biến thể và dẫn xuất của chúng theo sáng chế, (ii) tế bào chủ (mà có thể là tế bào B đã được làm bất tử) theo sáng chế, (iii) axit nucleic hoặc vectơ theo sáng chế hoặc (iv) dược phẩm theo sáng chế trong (a) sản xuất thuốc để ngăn ngừa, điều trị hoặc làm thuyên giảm tình trạng viêm gan B và/hoặc viêm gan D hoặc để (b) chẩn đoán viêm gan B và/hoặc viêm gan D.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế để sử dụng làm thuốc để ngăn ngừa hoặc điều trị viêm gan B và/hoặc viêm gan D. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị cho đối tượng và/hoặc chẩn đoán ở đối tượng. Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị

cho đối tượng (ví dụ, đối tượng người), bao gồm bước cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu của dược phẩm như được đề cập trong bản mô tả này. Theo một số phương án, đối tượng có thể là người. Một cách để kiểm tra hiệu quả của phương pháp điều trị bằng thuốc bao gồm theo dõi các triệu chứng bệnh sau khi sử dụng dược phẩm. Việc điều trị có thể là phác đồ một liều duy nhất hoặc phác đồ nhiều liều.

Theo một phương án, kháng thể, mảnh kháng thể, protein dung hợp, tế bào chủ (ví dụ, dòng vô tính tế bào B đã được làm bất tử, hoặc tế bào T, tế bào NK-T, hoặc tế bào NK biểu hiện protein dung hợp), hoặc dược phẩm theo sáng chế được sử dụng cho đối tượng cần điều trị bệnh như vậy. Đối tượng như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đối tượng đặc biệt có nguy cơ hoặc dễ bị viêm gan B và/hoặc viêm gan D.

Kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, protein dung hợp, polynucleotit, vectơ, tế bào chủ, dược phẩm, và kết hợp của chúng, theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong kit để ngăn ngừa, điều trị, làm thuyên giảm, và/hoặc chẩn đoán viêm gan B và/hoặc viêm gan D. Theo một số phương án, kit còn bao gồm hướng dẫn sử dụng thành phần này để ngăn ngừa, điều trị, làm thuyên giảm, và/hoặc chẩn đoán nhiễm viêm gan B và/hoặc nhiễm viêm gan D. Ngoài ra, epitop trong vùng vòng kháng nguyên của HBsAg, có khả năng gắn kết kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế như được đề cập trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong kit để theo dõi hiệu quả của các quy trình sử dụng bằng cách phát hiện sự có mặt hoặc xác định hiệu giá của kháng thể kháng HBV bảo vệ.

Theo các phương án nhất định, dược phẩm hoặc kit theo sáng chế còn bao gồm: (i) chất ức chế polymeraza, trong đó chất ức chế polymeraza tùy ý bao gồm Lamivudine, Adefovir, Entecavir, Telbivudine, Tenofovir, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng; (ii) interferon, trong đó interferon tùy ý bao gồm IFNbeta và/hoặc IFNalpha; (iii) chất ức chế điểm kiểm tra, trong đó chất ức chế điểm kiểm tra tùy ý bao gồm kháng thể kháng PD-1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, kháng thể kháng PD-L1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, và/hoặc kháng thể kháng CTLA4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng; (iv) chất chủ vận của phân tử điểm kiểm tra miễn dịch kích thích; hoặc (v) kết hợp bất kỳ của (viii)-(xii).

Theo một số phương án, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo

sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế được sử dụng để điều trị hoặc làm thuyên giảm tình trạng nhiễm viêm gan B mãn tính.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế (i) vô hiệu hóa sự nhiễm HBV, (ii) gắn kết với L-HBsAg (protein vỏ HBV lớn, có mặt trong hạt HBV gây nhiễm), nhờ đó ngăn ngừa sự lây lan của HBV, (iii) gắn kết với S-HBsAg, nhờ đó tăng cường thải trừ các hạt dưới virut (SVP) và/hoặc (iv) có thể tạo ra sự chuyển hóa huyết thanh, tức là đáp ứng miễn dịch chủ động đối với virut.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế, hoặc dược phẩm theo sáng chế, có thể được sử dụng để ngăn ngừa (tái) nhiễm viêm gan B sau khi ghép gan đặc biệt là đối với suy gan do viêm gan B.

Theo các phương án khác nữa, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, hoặc protein dung hợp theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế được đề xuất trong bản mô tả này, tế bào theo sáng chế, hoặc dược phẩm theo sáng chế, có thể được sử dụng để ngăn ngừa/phòng ngừa viêm gan B ở đối tượng chưa được gây miễn dịch. Ví dụ, đây là trong trường hợp (giả định) vô tình tiếp xúc với HBV (dự phòng sau phơi nhiễm). Thuật ngữ "đối tượng chưa được gây miễn dịch" bao gồm các đối tượng chưa bao giờ được chủng ngừa và do đó chưa được gây miễn dịch, và đối tượng không thể hiện đáp ứng miễn dịch (ví dụ, kháng thể kháng viêm gan B không đo được) sau khi chủng ngừa.

Theo một số phương án, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế, hoặc dược phẩm theo sáng chế, được sử dụng trong phòng viêm gan B ở bệnh nhân chạy thận nhân tạo.

Theo một số phương án, kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế được sử dụng để ngăn ngừa viêm gan B ở trẻ sơ sinh. Theo các phương án như vậy, kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng khi sinh hoặc càng sớm càng

tốt sau khi sinh. Việc sử dụng có thể được lặp lại cho đến khi chuyển hóa huyết thanh sau chủng ngừa.

Ngoài ra, sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế để chẩn đoán (ví dụ, *in vitro*, *ex vivo*, hoặc *in vivo*) viêm gan B và/hoặc viêm gan D.

Ngoài ra, việc sử dụng kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế trong việc xác định mẫu máu đã phân lập có bị nhiễm virut viêm gan B và/hoặc virut viêm gan delta hay không được đề xuất.

Như được mô tả trên đây, phương pháp chẩn đoán có thể bao gồm bước cho kháng thể, mảnh kháng thể, hoặc protein dung hợp tiếp xúc với với mẫu. Các mẫu như vậy có thể được phân lập từ đối tượng, ví dụ, mẫu mô phân lập được lấy từ, ví dụ, đường mũi, hốc xoang, tuyến nước bọt, phổi, gan, tuyến tụy, thận, tai, mắt, nhau thai, đường tiêu hóa, tim, buồng trứng, tuyến yên, tuyến thượng thận, tuyến giáp, não, da hoặc máu. Phương pháp chẩn đoán cũng có thể bao gồm việc phát hiện phức hợp kháng nguyên/kháng thể, cụ thể là sau khi cho kháng thể hoặc mảnh kháng thể tiếp xúc với mẫu. Bước phát hiện như vậy thường được thực hiện ở bàn thí nghiệm, tức là không có tiếp xúc bất kỳ với cơ thể người hoặc động vật. Ví dụ về các phương pháp phát hiện là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, ví dụ, ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym).

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị, ngăn ngừa và/hoặc làm thuyên giảm tình trạng viêm gan B và/hoặc viêm gan D ở đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế. Theo các phương án nhất định, phương pháp này còn bao gồm bước cho đối tượng sử dụng một hoặc nhiều trong số: (vii) chất ức chế polymeraza, trong đó chất ức chế polymeraza tùy ý bao gồm Lamivudine, Adefovir, Entecavir, Telbivudine, Tenofovir, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng; (viii) interferon, trong đó interferon tùy ý bao gồm IFNbeta và/hoặc IFNalpha; (ix) chất ức chế điểm kiểm tra, trong đó chất ức chế điểm kiểm tra tùy ý bao gồm kháng thể kháng PD-1 hoặc

mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, kháng thể kháng PD-L1 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng, và/hoặc kháng thể kháng CTLA4 hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng; (x) chất chủ vận của phân tử điểm kiểm tra miễn dịch kích thích; hoặc (xi) tổ hợp bất kỳ của (vii)-(x).

Theo một số phương án, tình trạng nhiễm viêm gan B là nhiễm viêm gan B mãn tính. Theo một số phương án, đối tượng đã được ghép gan. Theo một số phương án, đối tượng này không được chủng ngừa chống lại viêm gan B. Theo các phương án nhất định, đối tượng này là trẻ sơ sinh. Theo một số phương án, đối tượng đang trải qua hoặc đã trải qua quá trình chạy thận nhân tạo.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị cho đối tượng đã được ghép gan bao gồm bước cho đối tượng đã được ghép gan sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp theo sáng chế, axit nucleic theo sáng chế, vectơ theo sáng chế, tế bào theo sáng chế hoặc dược phẩm theo sáng chế.

Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của epitop ở cấu trúc thích hợp trong vắc-xin kháng viêm gan-B và/hoặc kháng viêm gan-D, trong đó phương pháp này bao gồm: (i) cho vắc-xin tiếp xúc với kháng thể, mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc protein dung hợp bất kỳ theo sáng chế; và (ii) xác định phức hợp bao gồm kháng nguyên và kháng thể, hoặc bao gồm kháng nguyên và mảnh gắn kết kháng nguyên, hoặc bao gồm kháng nguyên và protein dung hợp, đã được tạo ra.

Thuật ngữ "vắc-xin" như được sử dụng trong bản mô tả này thường được hiểu là nguyên liệu dự phòng hoặc điều trị cung cấp ít nhất một kháng nguyên, như chất gây miễn dịch. Kháng nguyên hoặc chất gây miễn dịch có thể có nguồn gốc từ nguyên liệu bất kỳ thích hợp để chủng ngừa. Ví dụ, kháng nguyên hoặc chất gây miễn dịch có thể có nguồn gốc từ mầm bệnh, như từ hạt vi khuẩn, hạt virut, khối u (bao gồm khối u rắn hoặc lỏng), hoặc mô ung thư khác. Kháng nguyên hoặc chất gây miễn dịch kích thích hệ miễn dịch thu được của cơ thể để tạo ra đáp ứng miễn dịch thu được. Theo các phương án nhất định, "kháng nguyên" hoặc "chất gây miễn dịch" để chỉ chất có thể được nhận biết bởi hệ miễn dịch, ví dụ, bởi hệ miễn dịch thu được, và có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với kháng nguyên, ví dụ, bằng cách tạo thành kháng thể và/hoặc tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên như là một phần của đáp ứng miễn dịch thu được. Theo một số phương án, kháng nguyên có thể là hoặc có thể bao gồm peptit hoặc protein

mà có thể được trình diện bởi phức hợp MHC (ví dụ, MHC lớp I; MHC lớp II) cho tế bào T. Theo các phương án nhất định, kháng nguyên bao gồm kháng nguyên HBV và/hoặc HBD; ví dụ, kháng nguyên HBsAg.

Trong một số trường hợp, các yếu tố của kháng thể, mảnh kháng thể, protein dung hợp, axit nucleic, tế bào, dược phẩm, việc sử dụng, và các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này được mô tả hoặc liệt kê có tham chiếu đến các phương án hoặc các ví dụ. Tuy nhiên, cần hiểu rằng các phương án và các ví dụ được đề cập trong bản mô tả này có thể được kết hợp theo nhiều cách khác nhau để tạo ra các phương án bổ sung.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Trong phần sau, các ví dụ cụ thể minh họa các phương án và khía cạnh khác nhau của sáng chế được trình bày. Tuy nhiên, sáng chế sẽ không bị giới hạn phạm vi bởi các phương án cụ thể được đề cập trong bản mô tả này.

Ví dụ 1: Sản xuất và thử nghiệm kháng thể đã được thao tác di truyền

Phân tích một số biến thể kháng thể HBC34 từ Công bố đơn PCT số WO 2017/060504 đã cho thấy axit amin xystein ở vị trí 40 (đánh số IMGT) trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ không được bắt cặp và đại diện cho một nguy cơ tiềm ẩn. Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, gốc xystein chưa bắt cặp có khả năng phản ứng và có khả năng gây ra sự kết tụ thông qua sự xáo trộn nội phân tử hoặc sự hình thành disulfua giữa các phân tử. Các biến thể của HBC34-V7 (WO 2017/060504) được thao tác di truyền trong đó axit amin xystein ở vị trí 40 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thay thế bằng serin (nhờ đó tạo ra "HBC34-V34") hoặc bằng alanin (nhờ đó tạo ra "HBC34-V35"). Trình tự nucleotit mã hóa các kháng thể biến thể bổ sung này được tối ưu hóa codon, và kháng thể được thể hiện là IgG1 (g1m17, 1 alotyp) trong tế bào ExpiCHO™ (ThermoFisher). Các trình tự nucleotit được tối ưu hóa codon mã hóa các miền VH và VL của HBC34-V35 được cung cấp lần lượt trong SEQ ID NO: 103 và 104.

Khả năng gắn kết kháng nguyên của HBC34-V34 và HBC34-V35 được khảo sát bằng cách sử dụng ELISA gắn kết kháng nguyên trực tiếp. HBC34-V7 được sử dụng làm mẫu so sánh. Như được thể hiện trên Fig. 1, cả HBC34-V34 và HBC34-V35 đã gắn

kết hiệu quả với hai kháng nguyên HBsAg tái tổ hợp ("adw", panen phía trên; "adr", panen phía dưới), và HBC34-V35 có mức gắn kết rất giống với HBC34-V7 bố mẹ.

Kháng thể biến thể được kiểm tra về mức gắn kết với tất cả các kiểu gen HBsAg ((A)-(J)) đã biết. Nói ngắn gọn, tế bào biểu mô của người (tế bào Hep2) được chuyển nhiễm với plasmit biểu hiện HBsAg của mỗi kiểu gen trong số 10 kiểu gen HBV A, B, C, D, E, F, G, H, I, và J. Tất cả các kháng thể được thử nghiệm ở nhiều nồng độ để nhuộm các tế bào được làm tăng tính thấm đã được chuyển nhiễm tạm thời. Hai ngày sau khi chuyển nhiễm, tế bào Hep2 được thu gom, cố định và làm tăng tính thấm với saponin để nhuộm miễn dịch với HBC34 và năm biến thể đã chọn. HBC34-V7 được bao gồm làm mẫu so sánh. Mức gắn kết của kháng thể với tế bào đã được chuyển nhiễm được phân tích bằng cách sử dụng Becton Dickinson FACSCanto2™ (BD Biosciences) với phần mềm FlowJo (TreeStar). Như được thể hiện trên các Fig. 2A-2J, HBC34-V34 và HBC34-V35 đã nhận diện tất cả 10 kiểu gen HBV HBsAg. HBC34-V35 đã cho thấy sự nhuộm màu mạnh hơn so với HBC34-V34.

Các dữ liệu này cho thấy rằng các biến thể kháng thể HBC34-V34 và HBC34-V35 nhận biết và gắn kết rộng rãi với HBsAG ở mức tương đương với HBC34-V7.

Ví dụ 2: Kháng thể kháng HBsAg với các vùng Fc cải biến gắn kết hiệu quả với kháng nguyên

Các cải biến trong vùng Fc có thể cung cấp lợi thế cho kháng thể điều trị. HBC34-V35 được thể hiện là IgG1 với Fc kiểu hoang, hoặc với Fc chứa đột biến "MLNS" (M428L/N434S) hoặc với Fc chứa MLNS kết hợp với đột biến "GAALIE" (G239A/A330L/I332E). Mỗi cấu trúc được thử nghiệm để gắn kết với HBsAg (adw) tái tổ hợp trong hai thử nghiệm ELISA gắn kết kháng nguyên riêng biệt. Ba (3) lô HBC34-v35 (Fc kiểu hoang) được thử nghiệm. Hai (2) lô HBC34-V35-MLNS và hai (2) lô HBC34-V35-MLNS- GAALIE được thử nghiệm. HBC34v7 (một lô) được thử nghiệm làm mẫu so sánh.

Như được thể hiện trên Fig. 3A và 3B, các đột biến Fc được đưa vào không ảnh hưởng đến hoạt tính gắn kết kháng nguyên của HBC34-V35. Giá trị EC_{50} hơi khác nhau giữa các cấu trúc khác nhau và hai thử nghiệm, và nói chung là thấp.

Sự gắn kết của HBC34-V35 chứa các đột biến MLNS hoặc MLNS và GAALIE với tế bào EXPI293 biểu hiện kiểu gen HBsAg (A)-(J) hoặc các biến thể HBsAg được đánh giá. HBC34-V35 với IgG1 Fc kiểu hoang được sử dụng làm mẫu so sánh. Dữ liệu cho thấy sự gắn kết với kiểu gen HBsAg được thể hiện trên các Fig. 3C-3H. Dữ liệu cho thấy sự gắn kết với các biến thể HBsAg được thể hiện trên các Fig. 3I-3R.

Ví dụ 3: Hoạt tính trung hòa in vitro của kháng thể

Khả năng trung hòa của HBC34, HBC34-V35, HBC34-V35-MLNS, và HBC34-V35-MLNS-GAALIE được so sánh bằng cách đo các mức HBsAg (A) và HBeAg (B) trong dịch nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy tế bào của tế bào HepG2 bị nhiễm HBV biểu hiện NTCP. Dữ liệu được thể hiện trên các Fig. 3S-3V, và thể hiện giá trị trung bình ± SD từ một trong hai thí nghiệm độc lập.

Ví dụ 4: Khả năng trung hòa kiểu gen Pan của HBC34-V35 MLNS-GAALIE được đánh giá trong hệ giả HDV

Để xác nhận phạm vi trung hòa của HBC34-V35-MLNS-GAALIE chống lại virut HBV, các thử nghiệm trung hòa được thực hiện với HBC34-V35-MLNS-GAALIE chống lại tám kiểu gen HBV phổ biến của người. Hệ *in vitro* tận dụng virut viêm gan D (HDV) được thao tác di truyền để biểu hiện HBV HBsAg đại diện cho các kiểu gen khác nhau được sử dụng. Một cách ngắn gọn, do cả HBV và HDV đều có chung protein vỏ, con đường xâm nhập virut của chúng thông qua các heparan sulfat proteoglycan và NTCP là giống hệt nhau, và HDV có thể được sử dụng làm hệ thống mô hình để nghiên cứu sự xâm nhập của virut gây ra bởi HBsAg (Tu 2018; Lempp 2016). Ngoài ra, HDV có thể được tạo vỏ/tạo typ giả với HBsAg có các kiểu gen HBV khác nhau và sau đó được sử dụng trong các nghiên cứu gây nhiễm (Freitas 2014).

HBC34-V35-MLNS-GAALIE đã cho thấy khả năng trung hòa đối với tất cả các kiểu gen đã được thử nghiệm có giá trị EC_{50} tương tự, nằm trong khoảng từ 0,92 ng/mL (kiểu gen C) đến 2,34 ng/mL (kiểu gen A). Các kết quả này cho thấy rằng HBC34-V35-MLNS-GAALIE có thể trung hòa virut gây nhiễm mang HBsAg từ tất cả tám kiểu gen HBV được thử nghiệm, hỗ trợ hoạt tính trung hòa kiểu gen pan *in vivo* của HBC34-V35-MLNS-GAALIE (Fig. 4).

Ví dụ 5: Thải trừ kháng nguyên HB và ức chế sự xâm nhập virut trong mô hình *in vivo*

Chuột nhắt thiếu hụt miễn dịch có tế bào gan người đã được cấy ghép được sử dụng để thử nghiệm hiệu quả của kháng thể kháng HBV theo sáng chế trong việc thải trừ HBsAg. Một cách ngắn gọn, các tế bào gan người sơ cấp được cấy vào chuột nhắt SCID có các tế bào gan trước đó đã bị phá hủy bằng enzym. Các con chuột bị thiếu hụt tế bào T và B. Mô hình này rất hữu ích cho việc nghiên cứu tình trạng nhiễm HBV bao gồm xâm nhập, lây lan, điều hòa cADN, đáp ứng miễn dịch nội tại tế bào gan và tích hợp virut vào bộ gen vật chủ.

Các con chuột nhắt được cấy bằng cách tiêm tĩnh mạch đuôi với HBV, kiểu gen C, ở $1,0X10^7$ bộ gen virut trên mỗi con chuột ở ngày -28. Điều trị ở ngày 0 sau khi đo HBV ban đầu. Chuột nhắt nhiễm HBV (n = 4 cho mỗi nhóm điều trị) được sử dụng PBS (đối chứng) hoặc HBC34-V35 (1, 5, hoặc 15 mg/kg trong phúc mạc, 2x/tuần). Kháng thể được làm tương thích với loài gặm nhấm ngoại trừ các vùng Fab gắn kết kháng nguyên.

Các mẫu huyết tương và huyết thanh được lấy định kỳ trong suốt quá trình nghiên cứu, và tải lượng virut, HBV ADN (bằng PCR), và HB Ag (HBsAg, HBeAg, HBcrAg) được đo. Chuột bị giết ở tuần thứ 6.

Như được thể hiện trên các Fig. 5-8, điều trị với liều thử nghiệm HBC34-V35 cao nhất làm giảm tải lượng virut và virut xâm nhập vào tế bào gan.

Ví dụ 6: Nghiên cứu chức năng hiệu ứng *in vitro*

Các nghiên cứu *in vitro* được thực hiện để kiểm tra khả năng của kháng thể HBC34 với Fc cải biến để: (1) gắn kết với FcR của người và với bổ thể; (2) hoạt hóa FcγRIIa, FcγRIIb, và FcγRIIIa; và (3) thúc đẩy ADCC và hoạt hóa tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK) của người. Các vật phẩm, dòng tế bào, và chất phản ứng thử nghiệm đã sử dụng là như được mô tả trong các Bảng 5-7 dưới đây.

Các từ viết tắt sau được sử dụng trong ví dụ này: GLP = Thực hành thí nghiệm tốt; ADCC = Tác dụng gây độc tế bào tế bào phụ thuộc vào kháng thể; ADCP = Thực bào tế bào phụ thuộc vào kháng thể; Fc = Mảnh có thể kết tinh; HBsAg = Kháng nguyên bề mặt viêm gan B; mAb = Kháng thể đơn dòng; PBS = Nước muối được đệm phosphat;

UHPL-SEC = Sắc ký loại trừ kích thước chất lỏng hiệu năng cực cao; ATCC = Bộ sưu tập môi trường nuôi cấy Mỹ; FcγRs = (các) thụ thể Fc gamma; tế bào CHO = Tế bào buồng trứng chuột lang Trung Quốc; RLU = Đơn vị phát quang tương đối; BLI = Phép đo giao thoa lớp sinh học.

Bảng 5. Vật phẩm thử nghiệm

Vật phẩm thử nghiệm	**HBC34-V35-MLNS**
• Isotyp	• IgG1λ
• Khối lượng phân tử tương đối	• ≈150 kDa
• Nồng độ	• 3,47 mg/ml
• Nguồn	• Trong nhà
• Điều kiện xử lý và bảo quản	• bảo quản ngắn hạn 4°C, bảo quản lâu dài -80°C
• Dung dịch đệm bào chế	• PBS, pH 7,2
Vật phẩm thử nghiệm	**HBC34-V35-MLNS-GAALIE**
• Isotyp	• IgG1λ
• Khối lượng phân tử tương đối	• ≈150 kDa
• Nồng độ	• 2,1 mg/ml / 0,86 mg/ml
• Nguồn	• Trong nhà
• Điều kiện xử lý và bảo quản	• bảo quản ngắn hạn 4°C, bảo quản lâu dài -80°C
• Dung dịch đệm bào chế	• PBS, pH 7,2
Vật phẩm thử nghiệm	**HBC34-V35-LALA**
• Isotyp	• IgG1λ
• Khối lượng phân tử tương đối	• ≈150 kDa
• Nồng độ	• 1,2 mg/ml
• Nguồn	• Trong nhà
• Điều kiện xử lý và bảo quản	• bảo quản ngắn hạn 4°C, bảo quản lâu dài -80°C
• Dung dịch đệm bào chế	• PBS, pH 7,2
Vật phẩm thử nghiệm	**mAb 17.1.41**
• Isotyp	• IgG1κ
• Khối lượng phân tử tương đối	• ≈150 kDa
• Nồng độ	• 4,4 mg/ml
• Nguồn	• Trong nhà
• Điều kiện xử lý và bảo quản	• bảo quản ngắn hạn 4°C, bảo quản lâu dài -80°C
• Dung dịch đệm bào chế	• PBS, pH 7,2

Bảng 6. Dòng tế bào

Dòng tế bào	**PLC/PRF/5**
• Số mục lục	• #4325-FC-050
• Nồng độ	• 100 µg/ml

• Nguồn	• R&D Systems, dòng tế bào u tủy của chuột nhắt, có nguồn gốc từ NS0, với nhãn 6-His tận cùng C
• Độ ổn định	• Ổn định ở -20 đến 80°C
• Điều kiện xử lý và bảo quản	• Ổn định ở -80°C cho đến khi sử dụng, 1 tháng, 2 đến 8°C trong điều kiện vô khuẩn sau khi hoàn nguyên
• Dung dịch đệm bào chế	• PBS
Dòng tế bào	**Jurkat-FcγRIIIA (F158)**
• Nguồn gốc mô	• Dòng tế bào lympho T bất tử của người; tế bào Jurkat biểu hiện ổn định thụ thể FcγRIIIa, biến thể F158 (ái lực thấp), và phần tử đáp ứng NFAT điều khiển sự biểu hiện của luciferaza đom đóm dưới dạng các tế bào hiệu ứng
• Nguồn	• Promega (Số mục lục: G9798)
• Môi trường thử nghiệm	• RPMI1640 có bổ sung huyết thanh Ig thấp 4%
Dòng tế bào	**Jurkat-FcγRIIIA (V158)**
• Nguồn gốc mô	• Dòng tế bào lympho T bất tử của người; tế bào Jurkat biểu hiện ổn định thụ thể FcγRIIIa, biến thể V158 (ái lực cao), và phần tử đáp ứng NFAT điều khiển sự biểu hiện của luciferaza đom đóm dưới dạng tế bào hiệu ứng
• Nguồn	• Promega (Số mục lục: G7018)
• Môi trường thử nghiệm	• RPMI1640 có bổ sung huyết thanh IgG thấp 4%
Dòng tế bào	**Jurkat-FcγRIIA (H131)**
• Nguồn gốc mô	• Dòng tế bào lympho T bất tử của người; tế bào Jurkat biểu hiện ổn định thụ thể FcγRIIa, biến thể H131 (ái lực cao), và phần tử đáp ứng NFAT điều khiển sự biểu hiện của luciferaza đom đóm dưới dạng tế bào hiệu ứng
• Nguồn	• Promega (Số mục lục: G9995)
• Môi trường thử nghiệm	• RPMI1640 có bổ sung huyết thanh bò thai IgG thấp 4%
Dòng tế bào	**Jurkat-FcγRIIB**
• Nguồn gốc mô	• Dòng tế bào lympho T bất tử của người; tế bào Jurkat biểu hiện ổn định thụ thể FcγRIIb, và phần tử đáp ứng NFAT điều khiển sự biểu hiện của luciferaza đom đóm dưới dạng tế bào hiệu ứng
• Nguồn	• Promega (Số mục lục: CS1781E02)
• Môi trường thử nghiệm	• RPMI1640 có bổ sung 4% huyết thanh bò thai IgG thấp
Dòng tế bào	**Tế bào NK của người mới được phân lập**
• Nguồn gốc mô	• Máu toàn phần (EDTA) từ động vật cho HM_WB019 (được tạo kiểu gen cho FcgRIIIa F/V), được tinh chế bằng kit phân

	lập NK MACSxpress® từ Miltenyi Biotec (#130-098-185)
• Nguồn	• Trong nhà
• Môi trường thử nghiệm	• AIM-V
• Môi trường sinh trưởng	• RPMI1640 có bổ sung 10% huyết thanh bò thai IgG thấp, Glutamax
• Điều kiện sinh trưởng	• 37°C, 5% CO_2
Dòng tế bào	**Tế bào NK của người mới được phân lập**
• Nguồn gốc mô	• Máu toàn phần (EDTA) từ động vật cho HM_WB002 (được tạo kiểu gen đối với FcgRIIIa V/V), được tinh chế bằng kit phân lập NK MACSxpress® từ Miltenyi Biotec (#130-098-185)
• Nguồn	• Trong nhà
• Môi trường thử nghiệm	• AIM-V
• Môi trường sinh trưởng	• RPMI1640 có bổ sung 10% huyết thanh bò thai IgG thấp, Glutamax
• Điều kiện sinh trưởng	• 37°C, 5% CO_2
Dòng tế bào	**Tế bào NK của người mới được phân lập**
• Nguồn gốc mô	• Máu toàn phần (EDTA) từ động vật cho HM_WB018 (được tạo kiểu gen cho FcgRIIIa F/F), được tinh chế bằng kit phân lập NK MACSxpress® từ Miltenyi Biotec (#130-098-185)
• Nguồn	• Trong nhà
• Môi trường thử nghiệm	• AIM-V
• Môi trường sinh trưởng	• RPMI1640 có bổ sung huyết thanh thai bò IgG thấp 10%, Glutamax
• Điều kiện sinh trưởng	• 37°C, 5% CO_2

Bảng 7. Các chất phản ứng khác

Chất phản ứng	**FcγRIIIa của người tái tổ hợp (V158)**
• Số mục lục	• #4325-FC-050
• Nồng độ	• 100 µg/ml
• Nguồn	• R&D Systems, dòng tế bào u tủy của chuột nhắt, có nguồn gốc từ NS0, với nhãn 6-His tận cùng C
• Độ ổn định	• Ổn định ở -20 đến 80°C
• Điều kiện xử lý và bảo quản	• Ổn định ở -80°C cho đến khi sử dụng, 1 tháng, 2 đến 8°C trong điều kiện vô khuẩn sau khi hoàn nguyên
• Dung dịch đệm bào chế	• PBS
Chất phản ứng	**FcγRIIIa của người tái tổ hợp (F158)**
• Số mục lục	• 10389-H08H
• Nồng độ	• 200 µg/ml (khi được hoàn nguyên)
• Nguồn	• Sino Biological, có nguồn gốc từ HEK293, với nhãn 6-His tận cùng C

• Độ ổn định	• Ổn định ở -20 đến 80°C
• Điều kiện xử lý và bảo quản	• Ổn định ở -80°C cho đến khi sử dụng
• Dung dịch đệm bào chế	• PBS
Chất phản ứng	**FcγRIIa của người tái tổ hợp (H131)**
• Số mục lục	• 10374-H08C1
• Nồng độ	• 200 µg/ml (khi được hoàn nguyên)
• Nguồn	• Sino Biological, có nguồn gốc từ CHO, với nhãn 6-His tận cùng C
• Độ ổn định	• Ổn định ở -20 đến 80°C
• Điều kiện xử lý và bảo quản	• Ổn định ở -80°C cho đến khi sử dụng
• Dung dịch đệm bào chế	• PBS
Chất phản ứng	**FcγRIIa của người tái tổ hợp (H131)**
• Số mục lục	• 10374-H08B
• Nồng độ	• 200 µg/ml (khi được hoàn nguyên)
• Nguồn	• Sino Biological, có nguồn gốc từ tế bào côn trùng, với nhãn 6-His tận cùng C
• Độ ổn định	• Ổn định ở -20 đến 80°C
• Điều kiện xử lý và bảo quản	• Ổn định ở -80°C cho đến khi sử dụng
• Dung dịch đệm bào chế	• PBS
Chất phản ứng	**FcγRIIb của người tái tổ hợp**
• Số mục lục	• 10259-H08C
• Nồng độ	• 200 µg/ml (khi được hoàn nguyên)
• Nguồn	• Sino Biological, có nguồn gốc từ CHO, với nhãn 6-His tận cùng C
• Độ ổn định	• Ổn định ở -20 đến 80°C
• Điều kiện xử lý và bảo quản	• Ổn định ở -80°C cho đến khi sử dụng
Chất phản ứng	**Thành phần C1q bổ thể của người**
• Số mục lục	• 204873
• Nồng độ	• 1,17 mg/ml
• Nguồn	• Sigma-Aldrich, được điều chế từ huyết thanh của người
• Độ ổn định	• Ổn định ở -80°C
• Điều kiện xử lý và bảo quản	• Ổn định ở -80°C cho đến khi sử dụng
• Dung dịch đệm bào chế	• 10 mM HEPES với NaCl 0,3 M, pH 7,2
Chất phản ứng	**Nguồn**
PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Thụy Sỹ
Môi trường AIM-V	Gibco
Môi trường F-12K của Ham	Gibco
Kit phân lập NK MACSxpress®	Miltenyi Biotec GmbH, Đức
Kit phát hiện tác dụng gây độc tế bào (LDH)	Roche Diagnostics GmbH, Thụy Sỹ
Đĩa đáy tròn 96 giếng	Corning
Đĩa đáy bằng 96 giếng màu trắng	PerkinElmer
Đĩa đáy tròn 384 giếng	Corning
Đĩa đáy bằng 384 giếng	Corning
Quang phổ kế	Bio-Tek

Môi trường RMPI	Gibco
Glucoza cao DMEM với Glutamin ổn định	Bioconcept
FBS	GE Healthcare
Glutamax	Gibco
Trypsin-EDTA (0,05%), đỏ phenol	Gibco
Đồ thị phần mềm Prism7	Phần mềm Pad, Inc., La Jolla, CA
Triton X-100	Sigma
Dung dịch đệm thử nghiệm ADCC	Promega
Chất phản ứng thử nghiệm Bio-Glo-TM Luciferaza	Promega
Thử nghiệm sinh học ADCC	Promega
Dung dịch đệm rửa	PBS, FBS 1%
Dung dịch formaldehyt, nồng độ 37%	Sigma (Số mục lục: F1635-500ML)
Saponin	Sigma (Số mục lục: S7900-100G)
Dung dịch đệm thấm	Saponin 0,5%, PBS, FBS 1%
Ab thứ cấp 647 Alexa Fluor®	Mảnh $F(ab')_2$ tinh chế ái lực kháng IgG người của dê, đặc hiệu mảnh Fcγ (Jackson ImmunoResearch, Số mục lục: 109-606-098)
Ab thứ cấp kháng CD107 PE	Kháng CD107 PE (BioLegend, Số mục lục: 328608, dòng vô tính H4A3, IgG1 của chuột nhắt, kappa)

Quy trình thử nghiệm

Đo mức gắn kết với thụ thể Fc của người

Sự gắn kết của HBC34-V35-MLNS và HBC34-V35-MLNS-GAALIE với các FcγR của người được đo trên thiết bị Octet® (BLI, thiết bị đo giao thoa lớp sinh học; FortéBio). Nói ngắn gọn, các FcγR của người được gắn đuôi His (alen FcγRIIa H131, alen FcγRIIa R131, alen FcγRIIAa F158, alen FcγRIIIa V158 và FcγRIIb) ở 2 µg/ml được bắt giữ trên các cảm biến kháng penta-His trong 6 phút. Sau đó, các cảm biến đã nạp FcγR được tiếp xúc trong 4 phút với dung dịch đệm động học (pH 7,1) chứa 2 µg/ml của mỗi mAb với sự có mặt 1 µg/ml của mảnh $F(ab')_2$ tinh chế ái lực kháng IgG người của dê, đặc hiệu với mảnh $F(ab')_2$ (để liên kết chéo các mAb của người thông qua mảnh Fab), tiếp theo là bước phân ly trong cùng dung dịch đệm trong 4 phút nữa (phần bên phải của đồ thị). Các đặc điểm liên kết và phân ly được đo trong thời gian thực khi thay đổi mẫu giao thoa bằng cách sử dụng Octet® RED96 (FortéBio). Mức gắn kết của HBC34-V35-MLNS-GAALIE, HBC34-V35-MLNS, hoặc HBC34-V35 trong dung dịch với FcRn của người đã được cố định được đo bằng Octet trong thời gian thực ở pH=6,0 hoặc pH=7,4.

Đo mức gắn kết với protein bổ thể của người C1q

Gắn mức kết của HBC34-V35-MLNS và HBC34-V35-MLNS-GAALIE với bổ thể của người được đo trên thiết bị Octet® (BLI, thiết bị đo giao thoa lớp sinh học; FortéBio). Một cách ngắn gọn, cảm biến kháng Fab người (đặc hiệu CH1) được sử dụng để bắt giữ, thông qua mảnh Fab, IgG1 đầy đủ của HBC34-V35-MLNS và HBC34-V35-MLNS-GAALIE mAb ở 10 µg/ml trong 10 phút. Các cảm biến đã nạp IgG sau đó được tiếp xúc trong 4 phút với dung dịch đệm động học (pH 7,1) chứa 3 µg/ml C1q của người đã được tinh chế (phần bên trái của đồ thị), tiếp theo là bước phân ly trong cùng dung dịch đệm thêm 4 phút nữa (phần bên phải của đồ thị). Các đặc điểm liên kết và phân ly được đo trong thời gian thực khi thay đổi mẫu giao thoa bằng cách sử dụng Octet® RED96 (FortéBio).

Tạo ra tế bào NK người từ máu toàn phần

Tế bào NK mới được phân lập từ máu EDTA toàn phần bằng cách sử dụng kit phân lập NK MACSxpress® theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Một cách ngắn gọn, máu chống đông được trộn trong ống 50 ml với 15 ml hỗn hợp phân lập NK và được ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng bằng cách sử dụng một máy quay với tốc độ khoảng 12 vòng mỗi phút. Sau đó, ống được đặt trong từ trường của thiết bị tách MACSxpress® trong 15 phút. Các tế bào được gắn nhãn từ tính bám vào thành ống trong khi các tế bào hồng cầu đã kết tụ lắng xuống đáy. Các tế bào NK đích sau đó được thu lại từ dịch nổi bề mặt trong khi ống vẫn ở bên trong thiết bị tách MACSxpress®. Tế bào NK được ly tâm, xử lý bằng nước cất để loại bỏ hồng cầu còn sót lại, ly tâm lần nữa và cuối cùng là tái tạo huyền phù trong môi trường AIM-V.

Xác định mức tiêu diệt tế bào NK phụ thuộc vào kháng thể

Các MAb được pha loãng tuần tự 10 lần trong môi trường AIM-V từ 100 µg/ml đến 0,001 µg/ml. Tế bào đích (PLC/PRF/5; MacNab, et al., British Journal of Cancer, 34(5), 1976) được bổ sung trong đĩa đáy tròn 384 giếng ở 7,5 x 10^3 tế bào/giếng trong 23 µl, sau đó kháng thể đã pha loãng tuần tự được bổ sung vào mỗi giếng (23 µl trong mỗi giếng), và hỗn hợp kháng thể/tế bào được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi

ủ, tế bào NK của người được bổ sung ở mật độ tế bào là 7,5 x 10^4/giếng trong 23 µl, thu được tỷ lệ giữa tế bào đáp ứng và tế bào đích là 10:1. Các giếng đối chứng cũng được bao gồm được sử dụng để đo sự dung giải tối đa (chứa tế bào đích với 23 µl Triton x-100 3%) và sự dung giải tự phát (chứa tế bào đích và tế bào đáp ứng mà không có kháng thể). Các đĩa được ủ trong 4 giờ ở 37°C với 5% CO_2. Mức chết tế bào được xác định bằng cách đo mức giải phóng lactat dehydrogenaza (LDH) bằng cách sử dụng kit phát hiện LDH theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nói ngắn gọn, các đĩa được ly tâm trong 4 phút ở 400 x g, và 35 µl dịch nổi bề mặt được chuyển vào đĩa đáy bằng 384 giếng. Chất phản ứng LDH được điều chế và 35 µl được bổ sung vào mỗi giếng. Bằng cách sử dụng giao thức động học, độ hấp thụ ở 490 nm và 650 nm được đo mỗi 2 phút một lần trong 8 phút. Tỷ lệ phần trăm dung giải đặc hiệu được xác định bằng cách áp dụng công thức sau: (mức giải phóng đặc hiệu - mức giải phóng tự phát) / (mức giải phóng tối đa - mức giải phóng tự phát)x 100.

Xác định mức hoạt hóa tế bào NK phụ thuộc vào kháng thể

Sự hoạt hóa tế bào NK sơ cấp được thử nghiệm bằng cách sử dụng các tế bào mới được phân lập từ động vật cho đã được xác định kiểu gen trước đó để biểu hiện FcγRIIIa đồng hợp tử có ái lực cao (alen V158) hoặc thấp (alen F158). Các mẫu pha loãng tuần tự của mAb (pha loãng tuần tự 10 lần trong môi trường AIM-V từ 100 µg/ml đến 0,0001 µg/ml) được ủ với tế bào NK trong 4 giờ. Sự hoạt hóa tế bào NK được đo bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy bằng cách nhuộm tế bào NK với mAb kháng CD107a (kháng CD107 PE, BioLegend®, được sử dụng được pha loãng 1/35) làm chất đánh dấu chức năng đối với hoạt tính của tế bào NK.

Xác định sự hoạt hóa FcγRIIIA người phụ thuộc vào kháng thể

HBC34-V35-MLNS và HBC34-V35-MLNS-GAALIE được pha loãng tuần tự 4 lần trong dung dịch đệm thử nghiệm ADCC từ 5 µg/ml đến 0,076 µg/ml. Kháng nguyên đích (HBsAg từ Engerix B, Glaxo SmithKline) được bổ sung trong đĩa đáy bằng 96 giếng màu trắng ở 0,6 µg/ml trong 25 µl, sau đó các kháng thể đã pha loãng tuần tự được bổ sung vào mỗi giếng (25 µl trong mỗi giếng), và hỗn hợp kháng thể/tế bào được ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Tế bào đáp ứng cho thử nghiệm sinh học ADCC được

rã đông và được bổ sung ở mật độ tế bào là 7,5 x 10^4/giếng trong 25 µl (nồng độ HBsAg cuối cùng là 0,2 µg/ml). Các giếng đối chứng cũng được bao gồm được sử dụng để đo tác dụng hoạt hóa độc lập với kháng thể (chứa HBsAg và tế bào đáp ứng nhưng không có kháng thể) và sự phát quang tự phát của đĩa (giếng chỉ chứa dung dịch đệm thử nghiệm ADCC). Đĩa được ủ trong 24 giờ ở 37°C với 5% CO_2. Sự hoạt hóa FcγRIIIA người (biến thể V158 hoặc F158) trong thử nghiệm sinh học này dẫn đến sự biểu hiện gây ra bởi NFAT của gen chỉ thị luciferaza. Sự phát quang được đo bằng thiết bị đo phát quang bằng cách sử dụng chất phản ứng thử nghiệm Bio-Glo-™ Luciferaza theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dữ liệu (tức là, hoạt hóa FcγRIIIa đặc hiệu) được biểu thị bằng giá trị trung bình của đơn vị phát quang tương đối (RLU) trên nền bằng cách áp dụng công thức sau: (RLU ở nồng độ x của mAb – RLU của nền).

Xác định sự hoạt hóa FcγRIIa người phụ thuộc vào kháng thể

HBC34-V35-MLNS và HBC34-V35-MLNS-GAALIE được pha loãng tuần tự 5 lần trong đệm thử nghiệm ADCP từ 50 µg/ml đến 0,00013 µg/ml. Kháng nguyên đích (HBsAg từ Engerix B) được bổ sung trong đĩa đáy bằng 96 giếng màu trắng ở 0,6 hoặc 6 µg/ml trong 25 µl, sau đó kháng thể đã pha loãng tuần tự được bổ sung vào mỗi giếng (25 µl trong mỗi giếng), và kháng nguyên/kháng thể được ủ trong 25 phút ở nhiệt độ phòng. Tế bào đáp ứng cho thử nghiệm sinh học hoạt hóa FcγRIIa được rã đông và bổ sung ở mật độ tế bào là 50,0 x 10^4/giếng trong 25 µl (nồng độ HBsAg cuối là 0,2 hoặc 2 µg/ml, tương ứng). Các giếng đối chứng cũng được bao gồm được sử dụng để đo tác dụng hoạt hóa độc lập với kháng thể (chứa HBsAg và tế bào đáp ứng nhưng không có kháng thể) và sự phát quang tự phát của đĩa (giếng chỉ chứa dung dịch đệm thử nghiệm ADCP). Đĩa được ủ trong 23 giờ ở 37°C với 5% CO_2. Sự hoạt hóa FcγRIIA người (biến thể H131) trong thử nghiệm sinh học này dẫn đến sự biểu hiện gây ra bởi NFAT của gen chỉ thị luciferaza. Sự phát quang được đo bằng thiết bị đo phát quang bằng cách sử dụng chất phản ứng thử nghiệm Bio-Glo-™ Luciferaza theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dữ liệu (tức là, tác dụng hoạt hóa FcγRIIa đặc hiệu) được biểu thị bằng giá trị trung bình của đơn vị phát quang tương đối (RLU) trên nền bằng cách áp dụng công thức sau: (RLU ở nồng độ [x] của mAb – RLU của nền).

Xác định sự hoạt hóa FcγRIIb người phụ thuộc vào kháng thể

HBC34-V35-MLNS và HBC34-V35-MLNS-GAALIE được pha loãng tuần tự 5 lần trong đệm thử nghiệm ADCP từ 100 µg/ml đến 0,00026 µg/ml. Kháng nguyên đích (HBsAg từ Engerix B) được bổ sung trong đĩa đáy bằng 96 giếng màu trắng ở 3 µg/ml trong 25 µl, sau đó kháng thể đã pha loãng tuần tự được bổ sung vào mỗi giếng (25 µl trong mỗi giếng), và kháng nguyên/kháng thể được ủ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng. Tế bào đáp ứng đối với thử nghiệm sinh học hoạt hóa FcγRIIb được rã đông và bổ sung ở mật độ tế bào là 75,0 x 10^4/giếng trong 25 µl (nồng độ HBsAg cuối cùng là 1 µg/ml). Các giếng đối chứng cũng được bao gồm được sử dụng để đo tác dụng hoạt hóa độc lập với kháng thể (chứa HBsAg và tế bào đáp ứng nhưng không có kháng thể) và sự phát quang tự phát của đĩa (giếng chỉ chứa dung dịch đệm thử nghiệm ADCP). Đĩa được ủ trong 20 giờ ở 37°C với 5% CO_2. Sự hoạt hóa FcγRIIb người trong thử nghiệm sinh học này dẫn đến sự biểu hiện gây ra bởi NFAT của gen chỉ thị luciferaza. Sự phát quang được đo bằng thiết bị đo phát quang bằng cách sử dụng chất phản ứng thử nghiệm luciferaza Bio-Glo-™ theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dữ liệu (tức là, sự hoạt hóa FcγRIIb đặc hiệu) được biểu thị bằng giá trị trung bình của đơn vị phát quang tương đối (RLU) trên nền bằng cách áp dụng công thức sau: (RLU ở nồng độ [x] của mAb – RLU của nền).

Xác định kháng thể gắn kết với dòng tế bào u gan của người PLC/PRF/5

Tế bào PLC/PRF/5 được trypsin hóa trong 5 phút ở 37°C, được chuyển vào 7ml môi trường sinh trưởng, ly tâm ở 400 x g, 4 phút, 4°C, và được rửa nhiều ở 4°C trong PBS. Một số tế bào được cố định bằng formaldehyt 4% (20 phút ở 4°C); các tế bào khác được cố định và sau đó được thấm với dung dịch đệm thấm (20 phút ở 4°C). Pelet tế bào được tái tạo huyền phù trong 2,64 ml dung dịch đệm rửa (tế bào đã được cố định) hoặc dung dịch đệm thấm (tế bào fix&perm) (Bảng 7) và phân phối ở lượng 200 µl/giếng vào đĩa đáy tròn 96 giếng (tương ứng với 100.000 tế bào/giếng). Đĩa được ly tâm ở 400g, 4 phút, 4°C. Các dung dịch pha loãng tuần tự 5 điểm theo tỷ lệ 1:5 của kháng thể thử nghiệm bắt đầu từ nồng độ cuối cùng là 10 µg/ml được bổ sung vào các giếng chứa tế bào và được ủ 30 phút trên đá. Sau 2 lần rửa ở 4°C, 400 x g, 4 phút trong dung dịch đệm rửa (tế bào cố định) hoặc dung dịch đệm thấm (các tế bào fix&perm), 50 µl/giếng kháng

thể thứ cấp được dán nhãn Alexa Fluor® 647 (Bảng 7) được bổ sung vào tế bào và được ủ trong 20 phút trên đá. Tế bào được rửa thêm 2 lần nữa bằng dung dịch đệm rửa (tế bào cố định) hoặc dung dịch đệm thấm (tế bào fix&perm), được tái tạo huyền phù trong 200 µl/giếng dung dịch đệm rửa (tế bào cố định) hoặc dung dịch đệm thấm (tế bào fix&perm) và tín hiệu (MFI, cường độ huỳnh quang trung bình) được định lượng bằng máy đo huỳnh quang tế bào (BD FACSCanto™ II).

Kết quả

Các cơ chế kháng virut trực tiếp là quan trọng để trung hòa HBV *in vivo*. Các cơ chế tác động gián tiếp, phụ thuộc Fc gây ra bởi sự tương tác của vùng Fc với các thụ thể gamma Fc (FcγR) trên các tế bào miễn dịch cũng có thể có đóng góp quan trọng vào hiệu quả *in vivo* và để gây ra đáp ứng miễn dịch nội sinh. Các cơ chế phụ thuộc FcγR có thể được đánh giá *in vitro* bằng cách đo sự gắn kết với các FcγR cũng như trong sự hoạt hóa các FcγR người phụ thuộc kháng thể (Hsieh, Y.-T., et al., Journal of Immunological Methods, 441(C), 56–66. doi.org/10.1016/j.jim.2016.12.002). Khả năng của kháng thể để gắn kết với FcRn và với bổ thể là các yếu tố cần quan tâm khác.

Trong một bộ thử nghiệm, HBC34-V35-MLNS và HBC34-V35-MLNS-GAALIE được so sánh cạnh nhau về khả năng của chúng trong việc gắn kết với tập hợp đầy đủ của các FcγR người (alen FcγRIIIa V158 và F158, alen FcγRIIa H131 hoặc R131, và FcγRIIb) bằng cách sử dụng thiết bị đo giao thoa lớp sinh học (BLI Octet® System, ForteBio). Như được thể hiện trên các Fig. 9A-9E, Fc mang các đột biến MLNS-GAALIE có các tương tác thay đổi với các FcγR; đặc biệt là Fc mang cả hai đột biến này, trái ngược với Fc chỉ mang MLNS, đã sự gắn kết gia tăng với FcγRIIIa và FcγRIIa, và sự gắn kết giảm với FcγRIIb.

Như được thể hiện trên Fig. 9F, kháng thể mang đột biến MLNS Fc có sự gắn kết gia tăng với FcRn ở độ pH 6,0 so với kháng thể có Fc kiểu hoang, nhưng có sự gắn kết rất ít đến không thể đo được với FcRn ở độ pH 7,4, tương đương với kháng thể có Fc kiểu hoang.

Ngoài ra, sự gắn kết của HBC34-V35-MLNS-GAALIE với C1q được triệt tiêu, như được đo bằng phép đo giao thoa lớp sinh học (Fig. 10).

HBC34-V35-MLNS và HBC34-V35-MLNS-GAALIE cũng được thử nghiệm về khả năng của chúng trong việc hoạt hóa FcγRIIIa người và FcγRIIa người bằng cách sử dụng thử nghiệm sinh học gen chỉ thị trên cơ sở tế bào. Các thử nghiệm này sử dụng tế bào Jurkat đã được thao tác di truyền với gen chỉ thị luciferaza qua trung gian NFAT để phản ánh sự hoạt hóa các FcγR người. Trong khi HBC34-V35-MLNS hoạt hóa kém hoặc không hoạt hóa FcγRIIIa và FcγRIIa người khi có mặt HBsAg, HBC34-V35-MLNS-GAALIE thể hiện sự hoạt hóa phụ thuộc liều của tất cả các FcγR đã được thử nghiệm (Fig. 11A, 11B, 12A-12B). HBC34-V35-MLNS-GAALIE không hoạt hóa FcγRIIb, ngay cả khi được thử nghiệm ở 100 µg/ml (Fig. 13A-13B).

Hoạt tính ADCC cũng được đo bằng cách sử dụng tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK) được phân lập từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người từ người hiến tặng đã được xác định kiểu gen trước đó để biểu hiện FcγRIIIa (F/V) ái lực cao (V158) và thấp (F158) dị hợp tử. Tế bào NK đã được phân lập được sử dụng để đo tác dụng tiêu diệt dòng tế bào u gan PLC/PR/5 khi tiếp xúc với HBC34-V35; HBC34-V35-MLNS; HBC34-V35-MLNS-GAALIE; hoặc mAb khác (17.1.41, hướng đích epitop khác trên vòng kháng nguyên của HBsAg; xem Eren, R., et al., Hepatology, doi.org/10.1053/jhep.2000,9632; Galun, E., et al., Hepatology, doi.org/10.1053/jhep.2002.31867). Tác dụng tiêu diệt khi có mặt các mAb đặc hiệu HBsAg HBC34-V35, HBC34-V35-MLNS, HBC34-V35-MLNS-GAALIE và 17.1.41 không được quan sát thấy (Fig. 14A). Sự mất tác dụng tiêu diệt tế bào PLC/PR/5 phụ thuộc kháng thể đã quan sát thấy có thể liên quan đến sự biểu hiện HBsAg kém trên bề mặt của các tế bào này (Fig. 14B), mà, không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, có thể không đủ để kích thích sự tiêu diệt bởi tế bào NK. Ngược lại, nồng độ HBsAg cao được phát hiện với HBC34v35 và 17.1.41 khi các tế bào PLC/PR/5 được cố định và làm tăng tính thấm, cho thấy rằng hầu hết HBsAg được tìm thấy trong tế bào hoặc ở dạng được tiết (tức là, các hạt dưới virut) (Fig. 14B).

Sự hoạt hóa tế bào NK sơ cấp của người (V/F) khi có mặt HBC34v35-MLNS hoặc HBC34-V35-MLNS-GAALIE và HBsAg cũng được kiểm tra bằng cách sử dụng mAb kháng CD107a. Dữ liệu được thể hiện trên các Fig. 15A và 15B.

Dữ liệu *in vitro* này cho thấy rằng các protein gắn kết đặc hiệu HBV theo sáng chế mang đột biến Fc GAALIE gắn kết với và hoạt hóa FcγRIIa và FcγRIIIa hoạt hóa ái lực thấp hiệu quả hơn so với kháng thể bố mẹ không có GAALIE Fc. Protein gắn kết

mang GAALIE cũng không gắn kết với và/hoặc hoạt hóa FcγRIIb ức chế ái lực thấp. Protein gắn kết mang GAALIE cũng không gắn kết với C1q. Ngoài ra, protein gắn kết mang GAALIE không tăng cường ADCC trên tế bào u gan, nhưng hoạt hóa tế bào NK của người khi có mặt HbsAg hòa tan. Việc đưa vào đột biến MLNS làm tăng gắn kết với FcRn ở độ pH 6,0.

Ví dụ 7: Nghiên cứu in vitro về tương tác thuốc-thuốc giữa HBC34-V35-MLNS-GAALIE và chất ức chế Pol/RT

Nghiên cứu in vitro được thực hiện để xác định các hiệu quả kết hợp có thể của HBC34-V35-MLNS-GAALIE với chất ức chế HBV pol/RT Entecavir (ETV). Hiệu quả kết hợp *in vitro* được xác định bằng cách sử dụng HBC34-V35-MLNS-GAALIE và ETV trong tế bào HepG2.2.15 ở dạng bàn cờ. Các mức HBsAg và HBV ADN được sử dụng làm kết quả đọc và dữ liệu được phân tích về hiệu quả kết hợp bằng cách sử dụng MacSynergy II (uab.edu/medicine/peds/macsynergy). Để chuẩn hóa, các giá trị thu được từ các tế bào HepG2.2.15 chưa được điều trị được sử dụng làm mẫu đối chứng dương, trong khi môi trường nuôi cấy mô được sử dụng làm mẫu đối chứng âm. Biểu đồ hiệp đồng với độ tin cậy 99% được sử dụng để báo cáo. Dữ liệu được thể hiện trong Fig. 16. Các biểu đồ hiệp đồng đối với cả hai kết quả đọc cho thấy hiệu quả cộng hợp của HBC34-V35-MLNS-GAALIE với ETV *in vitro*. Đáng chú ý, không quan sát thấy sự đối kháng. Các dữ liệu này hỗ trợ việc sử dụng chất tương tự nucleosit kết hợp với HBC34-V35-MLNS-GAALIE tại cơ sở lâm sàng.

Ví dụ 8: Nhận diện và mô tả đặc điểm kháng thể đơn dòng người HBC24

Kháng thể đơn dòng người kháng HBV được phân lập theo cách tương tự như được mô tả trong Traggiai E. et al., 2004, Nat Med 10(8): 871-5 từ bệnh nhân là người. Kháng thể này được mô tả đặc điểm bằng cách xác định các trình tự nucleotit và axit amin của các vùng biến đổi của nó và các vùng quyết định bổ sung (CDR) trong đó và được gọi là "HBC24". Theo đó, HBC24 là kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người typ IgG1 có CDR, trình tự V_H và V_L như được thể hiện trên đây trong Bảng 3. Trình tự nucleotit được lấy làm ví dụ mã hóa V_H và V_L của HBC24 được cung cấp trong Bảng 4.

Ví dụ 9: Tạo ra các biến thể đã được tạo dòng mầm của HBC24 và thử nghiệm chức năng

HBC24 được phân tích về sự có mặt của các đột biến soma trong vùng biến đổi liên quan đến trình tự dòng mầm. Các đột biến soma đã nhận diện được quay trở lại trình tự dòng mầm để sản xuất biến thể HBC24. HBC24 và các biến thể được thử nghiệm về sự gắn kết (*in vitro*) và sự trung hòa (*in vitro*; *in vivo*) của typ huyết thanh HBV và HBD bằng cách sử dụng các thử nghiệm như được đề cập trong bản mô tả này.

Ví dụ 10: Đưa các cải biến Fc vào HBC24 và các biến thể

Các biến thể HBC24 khác nữa được sản xuất chứa các đột biến MLNS và GAALIE trong cả hai monome Fc. Các trình tự axit amin HC của các biến thể đã chọn được cung cấp trong SEQ ID NO: 121 và 122. Các biến thể được kiểm tra về: (1) gắn kết *in vitro* với kháng nguyên; (2) trung hòa *in vitro* typ huyết thanh HBV bằng cách sử dụng thử nghiệm như được đề cập trong bản mô tả này.

BẢNG TRÌNH TỰ VÀ SỐ SEQ ID (DANH MỤC TRÌNH TỰ):

SEQ ID NO	Trình tự	Nhận xét
1	X_1 X_2 X_3 TC X_4 X_5 X_6A X_7G trong đó X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6 và X_7 có thể là axit amin bất kỳ	epitop
2	X_1 X_2 X_3 TC X_4 X_5 X_6A X_7G trong đó X_1 là P, T hoặc S, X_2 là C hoặc S, X_3 là R, K, D hoặc I, X_4 là M hoặc T, X_5 là T, A hoặc I, X_6 là T, P hoặc L, và X_7 là Q, H hoặc L.	
3	MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLD SWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTS CPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLL DYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQ GTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKF LWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVW LSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIFFCLW VYI	Miền S của HBsAg (Số truy cập GenBank J02203)

4	MENVTSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLD SWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSNHSPTS CPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLL DYQGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQG TSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFL WEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWL SVIWMMWYWGPSLYSTLSPFLPLLPIFFCLW VYI	Miền S của HBsAg (Số truy cập GenBank FJ899792)
5	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	J02203 (D, ayw3)
6	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	FJ899792 (D, adw2)
7	QGMLPVCPLIPGTTTTSTGPCKTCTTPAQGNS MFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWE WASVRFSW	AM282986 (A)
8	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGTS MFPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFAKYLWE WASVRFSW	D23678 (B1)
9	QGMLPVCPLLPGTSTTSTGPCKTCTIPAQGTS MFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFARFLWE WASVRFSW	AB117758 (C1)
10	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCTTLAQGTS MFPSCCCSKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	AB205192 (E)
11	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTS MFPSCCCSKPSDGNCTCIPIPSSWALGKYLWE WASARFSW	X69798 (F4)
12	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFAKYLW EWASVRFSW	AF160501 (G)
13	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCKTCTTLAQGTS MFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKYLWE WASARFSW	AY090454 (H)
14	QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFAKYLW EWASARFSW	AF241409 (I)
15	QGMLPVCPLLPGSTTTSTGPCRTCTITAQGTS MFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFAKFLWE WASVRFSW	AB486012 (J)

16	CQGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGT SMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLW EWASARFSW	HBsAg Y100C/P120T
17	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg P120T
18	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGTCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPLDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg P120T/S143L
19	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPSRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg C121S
20	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCDTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg R122D
21	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCITCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg R122I
22	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRNCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg T123N
23	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAHGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg Q129H
24	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPALGTS MYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg Q129L
25	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS HYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg M133H
26	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS LYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg M133L
27	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS TYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg M133T
28	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTEPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg K141E
29	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKSSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg P142S

30	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPKDGNCTCIPIPSSWAFGKFLW EWASARFSW	HBsAg S143K
31	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSAGNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg D144A
32	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDRNCTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg G145R
33	QGMLPVCPLIPGSSTTGTGPCRTCTTPAQGTS MYPSCCCTKPSDGACTCIPIPSSWAFGKFLWE WASARFSW	HBsAg N146A
34	GRIFRSFY	HBC34 CDRH1 aa
35	NQDGSEK	HBC34 CDRH2 aa
36	AAWSGNSGGMDV	HBC34 CDRH3 aa
37	KLGNKN	HBC34 CDRL1 aa
38	EVK	HBC34 CDRL2 aa
39	VIYEVKYRP	HBC34 CDRL2 long aa
40	QTWDSTTVV	HBC34 CDRL3 aa
41	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRS FYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYV DSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNNLRVEDTA VYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVSVSS	HBC34, HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35 VH aa
42	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV CWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTWDSTTV VFGGGTRLTVL	HBC34 VL aa
43	GGACGCATCTTTAGAAGTTTTTAC	HBC34 CDRH1 nuc
44	ATAAACCAAGATGGAAGTGAGAAA	HBC34 CDRH2 nuc
45	GCGGCTTGGAGCGGCAATAGTGGGGGTAT GGACGTC	HBC34 CDRH3 nuc
46	AAATTGGGGAATAAAAAT	HBC34 CDRL1 nuc
47	GAGGTTAAA	HBC34 CDRL2 nuc
48	gtcatctatGAGGTTAAAtaccgcccc	HBC34 CDRL2 long nuc
49	CAGACGTGGGACAGCACCACTGTGGTG	HBC34 CDRL3 nuc

50	GAACTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGG CTGGGTCCAGCCGGGGGGGTCCCAGAGAC TGTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCATCTTTA GAAGTTTTTACATGAGCTGGGTCCGCCAGG CCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCC ACTATAAACCAAGATGGAAGTGAGAAATT ATATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCAC CATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACT ATTTCTGCAAATGAACAACCTGAGAGTCGA GGACACGGCCGTTTATTACTGCGCGGCTTG GAGCGGCAATAGTGGGGGTATGGACGTCT GGGGCCAGGGGACCACGGTCTCCGTCTCCT CA	HBC34 VH nuc
51	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTG TCCGTGTCCCCAGGACAGACAGTCAGCATC CCCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGAATAAA AATGTTTGCTGGTTTCAGCATAAGCCAGGC CAGTCCCCTGTGTTGGTCATCTATGAGGTT AAATACCGCCCCTCGGGGATTCCTGAGCGA TTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACAGCC ACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATG GATGAGGCTGCCTATTTCTGTCAGACGTGG GACAGCACCACTGTGGTGTTCGGCGGAGG GACCAGGCTGACCGTCCTA	HBC34 VL nuc
52	XGSSTTSTGPCRTCMTXPSDGNATAIPIPSSW X trong đó các gốc được mã hóa là X được thay thế bằng xystein	peptit
53	TSTGPCRTCMTTAQG	peptit
54	GMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMTT	peptit
55	XSMYPSASATKPSDGNXTGPCRTCMTTAQG TSX trong đó các gốc được ghi mã là X được thay thế bằng xystein	peptit
56	PCRTCMTTAQG	axit amin 120 – 130 của miền S của HBsAg (HBV-D J02203
57	$PCX_1TCX_2X_3X_4AQG$, trong đó X_1 là R hoặc K, X_2 là M hoặc T, X_3 là T hoặc I, và X_4 là T, P hoặc L	epitop

58	QTFDSTTVV	HBC34-V7 CDRL3 và HBC34-V23 CDRL3 (aa)
59	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV CWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTVL	HBC34-V7 VL
60	AAGCTGGGGAACAAAAAT	HBC34-V7 CDRL1 và HBC-V23 CDRL1 (nuc)
61	GAGGTGAAA	HBC34-V7 CDRL2 và HBC34v23 CDRL2 nuc
62	GTCATCTACGAGGTGAAATATCGGCCT	HBC34-V7 CDRL2 long và CDRL2 HBC34-V23 long nuc
63	CAGACATTCGATTCCACCACAGTGGTC	CDRL3 HBC34-V7 và CDRL3 HBC34-V23 nuc
64	TCTTACGAGCTGACACAGCCACCTAGCGTG TCCGTCTCTCCAGGACAGACCGTGTCCATC CCTTGCTCTGGCGACAAGCTGGGGAACAAA AATGTCTGTTGGTTCCAGCACAAGCCAGGG CAGAGTCCCGTGCTGGTCATCTACGAGGTG AAATATCGGCCTTCAGGAATTCCAGAACGG TTCAGCGGATCAAACAGCGGCAATACTGCA ACCCTGACAATTAGCGGGACCCAGGCCATG GACGAAGCCGCTTATTTCTGCCAGACATTC GATTCCACCACAGTGGTCTTTGGCGGGGGA ACTAGGCTGACCGTGCTG	HBC34-V7, HBC34-V34, và HBC34-V35 VL nuc
65	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNA CWYQQKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQTFDSTTV VFGGGTKLTVL	HBC34-V23 VL aa
66	INQDGSEK	HBC34wt CDRH2 aa
67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFRSF YMSWVRQAPGKGLEWVANINQDGSEKLYV DSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNNLRVEDTA VYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVTVSS	HBC34-V31, HBC34-V32 và HBC34-V33 VH

68	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCCGGCGGGGG ACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACT GAGCTGTGCAGCTTCTGGAAGAATCTTCAG ATCTTTTTACATGAGTTGGGTGAGACAGGC TCCTGGGAAGGGACTGGAGTGGGTCGCAA ACATCAATCAGGACGGATCAGAAAAGCTG TATGTGGATAGCGTCAAAGGCAGGTTCACT ATTTCCCGCGACAACGCCAAAAATTCTCTG TTTCTGCAGATGAACAATCTGCGGGTGGAG GATACCGCTGTCTACTATTGTGCAGCCTGG TCTGGCAACAGTGGAGGCATGGACGTGTG GGGACAGGGAACCACAGTGACAGTCAGCT CC	HBC34-V31, HBC34-V32 và HBC34-V33 VH (nuc)
69	TCTTACGAGCTGACACAGCCCCCTAGCGTG TCCGTCTCTCCAGGCCAGACAGCATCCATC ACTTGCTCTGGCGACAAGCTGGGGAACAA AAATGCCTGTTGGTATCAGCAGAAGCCAGG GCAGAGTCCCGTGCTGGTCATCTACGAGGT GAAATATCGGCCTTCAGGAATTCCAGAAAG ATTCAGTGGATCAAACAGCGGCAATACTGC TACCCTGACAATTAGCGGGACCCAGGCCAT GGACGAAGCTGATTACTATTGCCAGACATT CGATTCCACCACAGTGGTCTTTGGCGGGGG AACTAAGCTGACCGTGCTG	HBC34-V23 VL nuc
70	GAACTGCAGCTGGTCGAATCAGGAGGAGG GTGGGTCCAGCCCGGAGGGAGCCAGAGAC TGTCTTGTGCCGCATCAGGGAGGATCTTCA GGAGCTTCTACATGTCCTGGGTGCGCCAGG CACCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTCGCC ACCATCAACCAGGACGGATCTGAAAAGCT GTATGTGGATAGTGTCAAAGGCCGGTTCAC AATTAGCAGAGACAACGCTAAAAATTCTCT GTTTCTGCAGATGAACAATCTGCGAGTGGA GGATACCGCCGTCTACTATTGCGCCGCTTG GTCTGGCAACAGCGGCGGGATGGATGTCTG GGGGCAGGGCACAACAGTGAGCGTCTCTTC C	HBC34 wt VH được tối ưu hóa codon

71	TCATACGAACTGACTCAGCCTCCCTCCGTC TCCGTCTCACCTGGACAGACCGTCTCAATC CCCTGCTCCGGCGATAAACTGGGCAACAAG AACGTGTGCTGGTTCCAGCACAAACCCGGA CAGAGTCCTGTGCTGGTCATCTACGAGGTC AAGTATCGGCCAAGCGGCATTCCCGAAAG ATTCAGCGGCTCCAACTCTGGGAATACCGC AACACTGACTATCTCTGGAACCCAGGCAAT GGACGAGGCAGCTTACTTTTGCCAGACTTG GGATTCAACTACTGTCGTGTTCGGCGGCGG AACTAGACTGACTGTCCTG	HBC34 wt VL được tối ưu hóa codon
72	GGGAGGATCTTCAGGAGCTTCTAC	HBC34 wt CDRH1 được tối ưu hóa codon
73	ATCAACCAGGACGGATCTGAAAAG	HBC34 wt CDRH2 được tối ưu hóa codon
74	GCCGCTTGGTCTGGCAACAGCGGCGGGATG GATGTC	HBC34 wt CDRH3 được tối ưu hóa codon
75	AAACTGGGCAACAAGAAC	HBC34 wt CDRL1 được tối ưu hóa codon
76	GAGGTCAAG	HBC34 wt CDRL2 được tối ưu hóa codon
77	GTCATCTACGAGGTCAAGTATCGGCCA	HBC34 wt CDRL2 long được tối ưu hóa codon
78	CAGACTTGGGATTCAACTACTGTCGTG	HBC34 wt CDRL3 được tối ưu hóa codon
79	GGSGG	cầu nối
80	TGPCRTC	epitop
81	GNCTCIP	epitop
82	CCIPIPSSWAFGCSTTSTGPCRTCC trong đó cụ thể là thy xystein ở các vị trí 2, 21, và 24 được tạo cặp với axetamidometyl.	giả epitop gián đoạn
83	CGNCTCIPIPSSWAFCSTTSTGPCRTCC trong đó đặc biệt là thy Xystein ở các vị trí 4, 6, 24, và 27 được tạo cặp với axetamidometyl.	giả epitop gián đoạn
84	CGGGCSTTSTGPCRTCC trong đó đặc biệt là thy Xystein ở các vị trí 13 và 16 được tạo cặp với axetamidometyl.	giả epitop được tạo vòng
85	STTSTGPCRTC	epitop
86	GNCTCIPIPSSWAFC	epitop

87	GNCTCIPIPSSWAF	epitop
88	PCRXC	epitop
89	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV AWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTVL	HBC34-V35 VL
90	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV SWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTVL	HBC34-V34 VL
91	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRS FYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYV DSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNNLRVEDTA VYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVSVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHE ALHSHYTQKSLSLSPGK	HC của HBC34-V35-MLNS-GAALIE và HBC34-V34-MLNS-GAALIE (g1M17, 1)
92	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRS FYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYV DSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNNLRVEDTA VYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVSVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHE ALHSHYTQKSLSLSPGK	HC của HBC34-V35-MLNS và HBC34-V34-MLNS (g1M17, 1)

93	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV AWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA GVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	LC của HBC34-V35
94	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV SWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA GVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	LC của HBC34-V34
95	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTK YAMSWVRQAPGKGLEWVASISGSVPGFGIDT YYADSVKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAE DTALYYCAKDVGVIGSYYYYAMDVWGQGT AVTVSS	HBC24 VH
96	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGLSSSY LAWYQQKPGQAPRLLIYSASTRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAYSPR WTFGQGTKVEIK	HBC24 VL
97	GSTFTKYA	CDRH1 của HBC24
98	ISGSVPGF	CDRH2 của HBC24
99	LYYCAKDVGVIGSYYYYAMDV	CDRH3 của HBC24
100	QGLSSSY	CDRL1 của HBC24
101	SAS	CDRL2 của HBC24
102	QQYAYSPRWT	CDRL3 của HBC24
103	gagctgcagctggtggagtccggcggcggctgggtgcagcctggcg gctcccagaggctgagctgtgccgcttctggcaggatcttccggtcctt ttacatgtcttgggtgcggcaggctccaggcaagggcctggagtgggt ggctaccatcaaccaggacggctccgagaagctgtatgtggatagcgt gaagggcagattcacaatctctcgcgacaacgccaagaactccctgttt ctgcagatgaacaatctgagggtggaggataccgccgtgtactattgc gccgcttggtctggcaatagcggcggcatggacgtgtggggacagg gcaccaccgtgtccgtgtccagc	VH của HBC34-V7, HBC34-V35, và HBC34-V34 (được tối ưu hóa codon)

104	agctacgagctgacacagccccttccgtgtccgtgtcccctggacag accgtgtccatcccatgcagcggcgacaagctgggcaacaagaacgt gtcctggtttcagcataagcctggccagtccccgtgctggtcatctac gaggtgaagtataggcccagcggcatccctgagcggttctctggctcc aacagcggcaatacagccaccctgacaatctctggcacacaggctat ggacgaggccgcttatttctgccagacctttgattccaccacagtggtgt tcggcggcggcaccagactgacagtgctg	HBC34-V34 VL (được tối ưu hóa codon)
105	agctacgagctgacacagccccttccgtgtccgtgtcccctggacag accgtgtccatcccatgcagcggcgacaagctgggcaacaagaacgt ggcctggtttcagcataagcctggccagtccccgtgctggtcatctac gaggtgaagtataggcccagcggcatccctgagcggttctctggctcc aacagcggcaatacagccaccctgacaatctctggcacacaggctat ggacgaggccgcttatttctgccagacctttgattccaccacagtggtgt tcggcggcggcaccagactgacagtgctg	HBC34-V35 VL (được tối ưu hóa codon)
106	gaggtgcagttgttggagtctgggggaggcttggtacagcctgggggg gtccctgagactctcctgtgcagcctctGGATCCACTTTTA CCAAATATGCCatgagctgggtccgtcaggctccagggaag gggctggagtgggtcgcaagtATTAGTGGAAGTgttcctg gttttGGTATTGACACAtactacgcagactccgttaagggcc ggttcaccatctccagagacacttccaagaacaccctgtatctgcaaat gaacagcctgagagccgaggacacggccttatattactgtGCGAA AGATGTCGGGGTTATCGGGTCATACTATTA CTACGCTATGGACGTCtggggtcaa	HBC24 VH (kiểu hoang)
107	aaattgtgttgacgcagtctccaggcaccctgtctttgtctccaggggaa agagccaccctctcctgcagggccagtCAGGGTCTTAGCA GCAGTTACttagcctggtaccagcagaaacctggccaggctcc caggctcctcatctatAGTGCGTCCaccagggccactggcatc ccagacaggttcagtggcagtgggtctgggacagacttcactctcacc atcagcagactggagcctgaagattttgcagtgtattactgtCAACA GTATGCTTACTCACCTCGGTGGACGttcggccaa gggaccaaggtggagatcaaac	HBC24 VL (kiểu hoang)
108	GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCGG CCTGGTGCAGCCCGGCGGCTCCCTGAGGCT GTCTTGCGCCGCCTCTGGCAGCACCTTCAC AAAGTATGCAATGTCTTGGGTGCGCCAGGC ACCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCT CCATCTCTGGCAGCGTGCCTGGCTTCGGCA TCGACACCTACTATGCCGATTCCGTGAAGG GCCGGTTTACAATCAGCAGAGACACCTCCA AGAACACACTGTATCTGCAGATGAATTCTC TGCGGGCCGAGGACACCGCCCTGTACTATT GTGCCAAGGATGTGGGCGTGATCGGCAGCT ACTATTACTATGCAATGGACGTGTGGGGAC AGGGAACAGCAGTGACAGTGAGCTCC	HBC24 VH (được tối ưu hóa codon)

109	GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGGCACA CTGTCCCTGTCCCCTGGAGAGAGAGCCACC CTGTCCTGCAGAGCCTCTCAGGGCCTGAGC TCCTCTTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG CCTGGACAGGCCCCTCGGCTGCTGATCTAC TCTGCCTCCACCAGAGCAACAGGCATTCCT GACCGCTTCTCCGGATCTGGAAGCGGCACA GACTTCACCCTGACAATCAGCCGGCTGGAG CCTGAGGACTTCGCCGTGTACTATTGTCAG CAGTACGCCTATTCCCCAAGGTGGACCTTT GGCCAGGGCACAAAGGTGGAGATCAAG	HBC24 VL (được tối ưu hóa codon)
110	agctacgagctgacacagccccttccgtgtccgtgtccctggacag accgtgtccatcccatgcagcggcgacaagctgggcaacaagaacgt gtgctggtttcagcataagcctggccagtccccgtgctggtcatctac gaggtgaagtataggcccagcggcatccctgagcggttctctggctcc aacagcggcaatacagccaccctgacaatctctggcacacaggctatg gacgaggccgcttatttctgccagacctttgattccaccacagtggtgtt cggcggcggcaccagactgacagtgctg	HBC34-V7 VL (được tối ưu hóa codon)
111	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNA SWYQQKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQTFDSTTV VFGGGTKLTVL	HBC34-V23-L_C40S
112	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNA AWYQQKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQTFDSTTV VFGGGTKLTVL	HBC34-V23-L_C40A
113	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV SWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTWDSTTV VFGGGTRLTVL	HBC34-V31-L_C40S
114	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV AWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTWDSTTV VFGGGTRLTVL	HBC34-V31-L_C40A
115	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV SWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTVL	HBC34-V32-L_C40S
116	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV AWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTWDSTTV VFGGGTRLTVL	HBC34-V32-L_C40A

117	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNA SWYQQKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQTFDSTTV VFGGGTKLTVL	HBC34-V33-L_C40S
118	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKNA AWYQQKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQTFDSTTV VFGGGTKLTVL	HBC34-V33-L_C40A
119	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV SWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTWDSTTV VFGGGTRLTVL	HBC34-L_C40S
120	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV AWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTWDSTTV VFGGGTRLTVL	HBC34-L_C40A
121	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTK YAMSWVRQAPGKGLEWVASISGSVPGFGIDT YYADSVKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAE DTALYYCAKDVGVIGSYYYYAMDVWGQGT AVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	HBC24-MLNS

122	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTK YAMSWVRQAPGKGLEWVASISGSVPGFGIDT YYADSVKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAE DTALYYCAKDVGVIGSYYYYAMDVWGQGT AVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP LPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	HBC24-MLNS- GAALIE
123	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRS FYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYV DSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNNLRVEDTA VYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVSVSSAK TTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYF PEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS SSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKI EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIK DVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQ DWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGS VRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDF MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGS YFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLH NHHTTKSFSRTPGK	HBC34-V7-mu (IgG2a) HC
124	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV CWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSEELETN KATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQG METTQPSKQSNNKYMASSYLTLTARAWERH SSYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS	HBC34-V7-mu (IgG2a) LC

125	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRS FYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYV DSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNNLRVEDTA VYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVSVSSAK TTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYF PEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS SSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKI EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIK DVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQ DWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGS VRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDF MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGS YFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLH NHHTTKSFSRTPGK	HBC34-V35-mu (IgG2a) HC
126	SYELTQPPSVSVSPGQTVSIPCSGDKLGNKNV AWFQHKPGQSPVLVIYEVKYRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAAYFCQTFDSTTV VFGGGTRLTVLGQPKSSPSVTLFPPSSEELETN KATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQG METTQPSKQSNNKYMASSYLTLTARAWERH SSYSCQVTHEGHTVEKSLSRADCS	HBC34-V35-mu (IgG2a) LC
127	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFTK YAMSWVRQAPGKGLEWVASISGSVPGFGIDT YYADSVKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAE DTALYYCAKDVGVIGSYYYYAMDVWGQGT AVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTL GCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAV LQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPA SSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGP SVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDP DVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLR VVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPI ERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVT LTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT EPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYS CSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	HBC24-mu (IgG2a) HC
128	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQGLSSSY LAWYQQKPGQAPRLLIYSASTRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAYSPR WTFGQGTKVEIKADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGV LNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHN SYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	HBC24-mu (IgG2a) LC

129	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRS FYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYV DSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNNLRVEDTA VYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVSVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35 HC (kiểu hoang)
130	GCCTCCACAAAGGGCCCAAGCGTGTTTCCA CTGGCTCCCTCTTCCAAGTCTACCTCCGGCG GCACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGG ATTACTTCCCAGAGCCCGTGACCGTGTCTT GGAACTCCGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGC ATACATTTCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCTG GCCTGTACTCTCTGTCCAGCGTGGTGACCG TGCCCTCTTCCAGCCTGGGCACCCAGACAT ATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAAGCA ATACAAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCC AAGTCTTGTGATAAGACCCATACATGCCCT CCATGTCCAGCTCCAGAGCTGCTGGGCGGC CCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCT AAGGATACCCTGATGATCTCCAGAACCCCC GAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAGGATCCTGAGGTGAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC TAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACA ACTCTACCTATCGGGTGGTGTCCGTGCTGA CAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCA AGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCTAATAAG GCCCTGCCCGCTCCTATCGAGAAGACCATC TCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCC ACAGGTGTACACACTGCCTCCATCTCGCGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC ATGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCTTCCGA CATCGCTGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCC AGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCC CCTGTGCTGGACAGCGATGGCTCTTTCTTTC TGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCTC GCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTAGCTGTT CTGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATT ATACACAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTG GCAAG	HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35 CH1-bản lề-CH2-CH3 (được tối ưu hóa codon)

131	GAGCTGCAGCTGGTGGAGTCCGGCGGCGG CTGGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCAGAGGCT GAGCTGTGCCGCTTCTGGCAGGATCTTCCG GTCCTTTTACATGTCTTGGGTGCGGCAGGC TCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTAC CATCAACCAGGACGGCTCCGAGAAGCTGTA TGTGGATAGCGTGAAGGGCAGATTCACAAT CTCTCGCGACAACGCCAAGAACTCCCTGTT TCTGCAGATGAACAATCTGAGGGTGGAGG ATACCGCCGTGTACTATTGCGCCGCTTGGT CTGGCAATAGCGGCGGCATGGACGTGTGG GGACAGGGCACCACCGTGTCCGTGTCCAGC GCCTCCACAAAGGGCCCAAGCGTGTTTCCA CTGGCTCCCTCTTCCAAGTCTACCTCCGGCG GCACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGG ATTACTTCCCAGAGCCCGTGACCGTGTCTT GGAACTCCGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGC ATACATTTCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCTG GCCTGTACTCTCTGTCCAGCGTGGTGACCG TGCCCTCTTCCAGCCTGGGCACCCAGACAT ATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAAGCA ATACAAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCC AAGTCTTGTGATAAGACCCATACATGCCCT CCATGTCCAGCTCCAGAGCTGCTGGGCGGC CCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCT AAGGATACCCTGATGATCTCCAGAACCCCC GAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAGGATCCTGAGGTGAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC TAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACA ACTCTACCTATCGGGTGGTGTCCGTGCTGA CAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCA AGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCTAATAAG GCCCTGCCCGCTCCTATCGAGAAGACCATC TCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCC ACAGGTGTACACACTGCCTCCATCTCGCGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC ATGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCTTCCGA CATCGCTGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCC AGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCC CCTGTGCTGGACAGCGATGGCTCTTTCTTTC TGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCTC GCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTAGCTGTT CTGTGATGCATGAGGCCCTGCACAATCATT ATACACAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTG GCAAGTGATGAGGTACCGTGCGACGGCCG GCAAGCCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGT CGTACGAGGAAAGCTT	HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35 VH-CH1-bản lề-CH2-CH3 (được tối ưu hóa codon)

132	GGACAGCCAAAGGCTGCTCCATCTGTGACC CTGTTTCCACCCTCTTCCGAGGAGCTGCAG GCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATC TCTGACTTCTACCCTGGAGCTGTGACAGTG GCTTGGAAGGCTGATAGCTCTCCCGTGAAG GCTGGCGTGGAGACAACAACCCCTAGCAA GCAGTCTAACAATAAGTACGCCGCTTCCAG CTATCTGTCTCTGACACCAGAGCAGTGGAA GTCCCACCGCTCTTATTCCTGCCAGGTGAC CCATGAGGGCAGCACCGTGGAGAAGACAG TGGCCCCCACCGAGTGTTCT	HBC34-V7 CL (được tối ưu hóa codon)
133	AGCTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCGTG TCCGTGTCCCCTGGACAGACCGTGTCCATC CCATGCAGCGGCGACAAGCTGGGCAACAA GAACGTGTGCTGGTTTCAGCATAAGCCTGG CCAGTCCCCCGTGCTGGTCATCTACGAGGT GAAGTATAGGCCCAGCGGCATCCCTGAGCG GTTCTCTGGCTCCAACAGCGGCAATACAGC CACCCTGACAATCTCTGGCACACAGGCTAT GGACGAGGCCGCTTATTTCTGCCAGACCTT TGATTCCACCACAGTGGTGTTCGGCGGCGG CACCAGACTGACAGTGCTGGGACAGCCAA AGGCTGCTCCATCTGTGACCCTGTTTCCACC CTCTTCCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGC CACCCTGGTGTGCCTGATCTCTGACTTCTAC CCTGGAGCTGTGACAGTGGCTTGGAAGGCT GATAGCTCTCCCGTGAAGGCTGGCGTGGAG ACAACAACCCCTAGCAAGCAGTCTAACAAT AAGTACGCCGCTTCCAGCTATCTGTCTCTG ACACCAGAGCAGTGGAAGTCCCACCGCTCT TATTCCTGCCAGGTGACCCATGAGGGCAGC ACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCACCGA GTGTTCT	HBC34-V7 LC (VL-CL) (được tối ưu hóa codon)
134	GGACAGCCAAAGGCTGCTCCATCTGTGACC CTGTTTCCACCCTCTTCCGAGGAGCTGCAG GCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATC TCTGACTTCTACCCTGGAGCTGTGACAGTG GCTTGGAAGGCTGATAGCTCTCCCGTGAAG GCTGGCGTGGAGACAACAACCCCTAGCAA GCAGTCTAACAATAAGTACGCCGCTTCCAG CTATCTGTCTCTGACACCAGAGCAGTGGAA GTCCCACCGCTCTTATTCCTGCCAGGTGAC CCATGAGGGCAGCACCGTGGAGAAGACAG TGGCCCCCACCGAGTGTTCT	HBC34-V34, HBC34-V35 CL (được tối ưu hóa codon)

135	AGCTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCGTG TCCGTGTCCCCTGGACAGACCGTGTCCATC CCATGCAGCGGCGACAAGCTGGGCAACAA GAACGTGTCCTGGTTTCAGCATAAGCCTGG CCAGTCCCCCGTGCTGGTCATCTACGAGGT GAAGTATAGGCCCAGCGGCATCCCTGAGCG GTTCTCTGGCTCCAACAGCGGCAATACAGC CACCCTGACAATCTCTGGCACACAGGCTAT GGACGAGGCCGCTTATTTCTGCCAGACCTT TGATTCCACCACAGTGGTGTTCGGCGGCGG CACCAGACTGACAGTGCTGGGACAGCCAA AGGCTGCTCCATCTGTGACCCTGTTTCCACC CTCTTCCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGC CACCCTGGTGTGCCTGATCTCTGACTTCTAC CCTGGAGCTGTGACAGTGGCTTGGAAGGCT GATAGCTCTCCCGTGAAGGCTGGCGTGGAG ACAACAACCCCTAGCAAGCAGTCTAACAAT AAGTACGCCGCTTCCAGCTATCTGTCTCTG ACACCAGAGCAGTGGAAGTCCCACCGCTCT TATTCCTGCCAGGTGACCCATGAGGGCAGC ACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCACCGA GTGTTCT	HBC34-V34 LC (VL-CL) (được tối ưu hóa codon)
136	AGCTACGAGCTGACACAGCCCCCTTCCGTG TCCGTGTCCCCTGGACAGACCGTGTCCATCC CATGCAGCGGCGACAAGCTGGGCAACAAG AACGTGGCCTGGTTTCAGCATAAGCCTGGC CAGTCCCCCGTGCTGGTCATCTACGAGGTG AAGTATAGGCCCAGCGGCATCCCTGAGCGG TTCTCTGGCTCCAACAGCGGCAATACAGCC ACCCTGACAATCTCTGGCACACAGGCTATG GACGAGGCCGCTTATTTCTGCCAGACCTTTG ATTCCACCACAGTGGTGTTCGGCGGCGGCA CCAGACTGACAGTGCTGGGACAGCCAAAGG CTGCTCCATCTGTGACCCTGTTTCCACCCTC TTCCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCAC CCTGGTGTGCCTGATCTCTGACTTCTACCCT GGAGCTGTGACAGTGGCTTGGAAGGCTGAT AGCTCTCCCGTGAAGGCTGGCGTGGAGACA ACAACCCCTAGCAAGCAGTCTAACAATAAG TACGCCGCTTCCAGCTATCTGTCTCTGACAC CAGAGCAGTGGAAGTCCCACCGCTCTTATT CCTGCCAGGTGACCCATGAGGGCAGCACCG TGGAGAAGACAGTGGCCCCCACCGAGTGTT CT	HBC34-V35 LC (VL-CL) (được tối ưu hóa codon)

137	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K	WT hIgG1 Fc
138	ELQLVESGGGWVQPGGSQRLSCAASGRIFRS FYMSWVRQAPGKGLEWVATINQDGSEKLYV DSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNNLRVEDTA VYYCAAWSGNSGGMDVWGQGTTVSVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	HBC34, HBC34-V7, HBC34-V23, HBC34-V34, HBC34-V35, HBC34_C40S, HBC34_C40A, HBC34-V23_C40S, HBC34-V23_C40A HC với đột biến GAALIE trong hIgG1 Fc
139	ESKYGPPCPPCPAPPVAGP	Trình tự vùng bản lề khảm

Các phương án khác nhau được mô tả trên đây có thể được kết hợp để tạo ra các phương án khác. Tất cả các patent Mỹ, công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ, patent nước ngoài, đơn yêu cầu cấp patent nước ngoài và các công bố không phải patent được đề cập trong phần mô tả này và/hoặc được liệt kê trong Bảng dữ liệu đơn được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn đến toàn bộ nội dung của chúng. Các khía cạnh của các phương án có thể được cải biến, nếu cần thiết để sử dụng các khái niệm về patent, đơn patent và ấn phẩm khác nhau để đề xuất các phương án khác nữa.

Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 62/782,274, nộp ngày 19 tháng 12 năm 2018 và Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 62/860,085, nộp ngày 11 tháng 6 năm 2019 được đưa vào bản mô tả bằng cách viện dẫn đến toàn bộ nội dung của chúng.

Các thay đổi này và các thay đổi khác có thể được thực hiện với các phương án theo phần mô tả chi tiết trên đây. Nói chung, trong phần Yêu cầu bảo hộ sau, các thuật ngữ được sử dụng không nên hiểu là nhằm giới hạn yêu cầu bảo hộ ở các phương án cụ thể được bộc lộ trong bản mô tả và yêu cầu bảo hộ, mà phải được hiểu là bao gồm tất cả

các phương án có thể cùng với phạm vi tương đương đầy đủ mà yêu cầu bảo hộ như vậy được hưởng. Theo đó, yêu cầu bảo hộ không bị giới hạn bởi sáng chế.

Tuyên bố về Danh mục trình tự

Danh mục trình tự kèm theo đơn này được cung cấp ở dạng văn bản thay cho bản sao bằng giấy, và được đưa vào đây bằng cách viện dẫn trong bản mô tả. Tên của tệp văn bản chứa Danh mục trình tự là 930485_402WO_SEQUENCE_LISTING.txt. Tệp văn bản này là 109 KB, được tạo ra vào ngày 6 tháng 12, 2019, và được nộp theo đường điện tử qua EFS-Web.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể phân lập gắn kết HBsAg bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:91; và

(ii) chuỗi nhẹ (LC) chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:93.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này có khả năng gắn kết HBsAg có kiểu gen được chọn từ các kiểu gen HBsAg A, B, C, D, E, F, G, H, I, và J, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng.

3. Polynucleotit phân lập bao gồm trình tự nucleotit mã hóa kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, tùy ý trong đó trình tự nucleotit được tối ưu hóa codon để biểu hiện trong tế bào chủ.

4. Polynucleotit theo điểm 3, trong đó polynucleotit này bao gồm (i) trình tự nucleotit có tỷ lệ đồng nhất ít nhất là 80% với trình tự nucleotit theo bất kỳ một trong số SEQ ID NO: 103 và SEQ ID NO: 105, hoặc (ii) trình tự nucleotit mã hóa VH theo SEQ ID NO:103, và trình tự nucleotit mã hóa VL theo SEQ ID NO: 105.

5. Vectơ chứa polynucleotit theo điểm 3 hoặc 4, trong đó, tùy ý, vectơ này bao gồm vectơ lentivirut hoặc vectơ retrovirut.

6. Tế bào chủ bao gồm polynucleotit dị loài theo điểm 3 hoặc 4.

7. Dược phẩm chứa:

(i) kháng thể theo điểm 1 hoặc 2;

(ii) polynucleotit theo điểm 3 hoặc 4;

(iii) vectơ theo điểm 5;

(iv) tế bào chủ theo điểm 6; hoặc

(v) kết hợp bất kỳ của (i)-(iv);

và tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

8. Phương pháp sản xuất kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 6 trong các điều kiện và trong khoảng thời gian thích hợp để tạo ra kháng thể này.

9. Kháng thể phân lập gắn kết HBsAg bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:91; và

(ii) chuỗi nhẹ (LC) chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:93,

để sử dụng trong phương pháp điều trị, ngăn ngừa, và/hoặc làm thuyên giảm bệnh viêm gan B và/hoặc viêm gan D ở đối tượng, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệu của kháng thể.

10. Kháng thể phân lập gắn kết HBsAg bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:91; và

(ii) chuỗi nhẹ (LC) chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:93,

để sử dụng trong phương pháp điều trị, ngăn ngừa, và/hoặc làm thuyên giảm bệnh viêm gan B và/hoặc viêm gan D ở đối tượng, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệu của kháng thể, và còn bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này một hoặc nhiều trong số: (i) chất ức chế polymeraza, trong đó chất ức chế polymeraza này tùy ý bao gồm Lamivudine, Adefovir, Entecavir, Telbivudine, Tenofovir, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng; (ii) interferon, trong đó interferon này tùy ý bao gồm IFNbeta và/hoặc IFNalpha; (iii) chất ức chế điểm kiểm tra, trong đó chất ức chế điểm kiểm tra này tùy ý bao gồm kháng thể kháng PD-1 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, kháng thể kháng PD-L1 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó, và/hoặc kháng thể kháng CTLA4 hoặc đoạn gắn kết kháng nguyên của nó; (iv) chất chủ vận của phân tử điểm kiểm tra miễn dịch kích thích; hoặc (v) kết hợp bất kỳ của (i)-(iv).

11. Kháng thể phân lập gắn kết HBsAg bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:91; và

(ii) chuỗi nhẹ (LC) chứa trình tự axit amin theo SEQ ID NO:93, để sử dụng trong phương pháp điều trị, ngăn ngừa, và/hoặc làm thuyên giảm bệnh viêm gan B

và/hoặc viêm gan D ở đối tượng, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này lượng hữu hiệu của kháng thể,

trong đó bệnh viêm gan B là bệnh viêm gan B mãn tính; và/hoặc đối tượng này đã được ghép gan, đối tượng này chưa được gây miễn dịch chống lại viêm gan B, đối tượng này là trẻ sơ sinh, và/hoặc đối tượng này đang trải qua hoặc đã trải qua quá trình chạy thận nhân tạo.

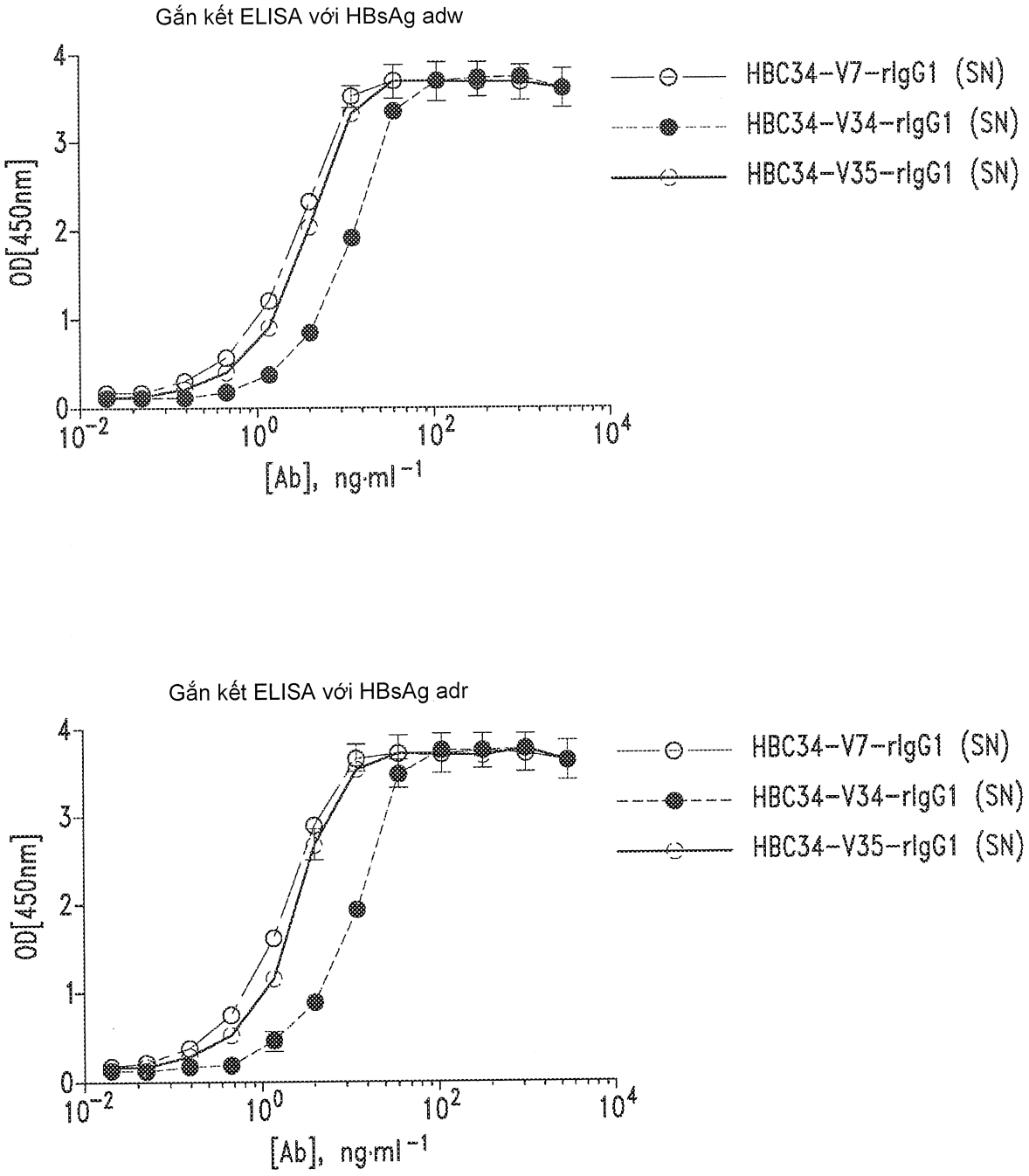

Gắn kết ELISA với HBsAg adw
OD[450nm]
[Ab], ng·ml⁻¹
HBC34-V7-rIgG1 (SN)
HBC34-V34-rIgG1 (SN)
HBC34-V35-rIgG1 (SN)
Gắn kết ELISA với HBsAg adr
OD[450nm]
[Ab], ng·ml⁻¹
HBC34-V7-rIgG1 (SN)
HBC34-V34-rIgG1 (SN)
HBC34-V35-rIgG1 (SN)

FIG. 1

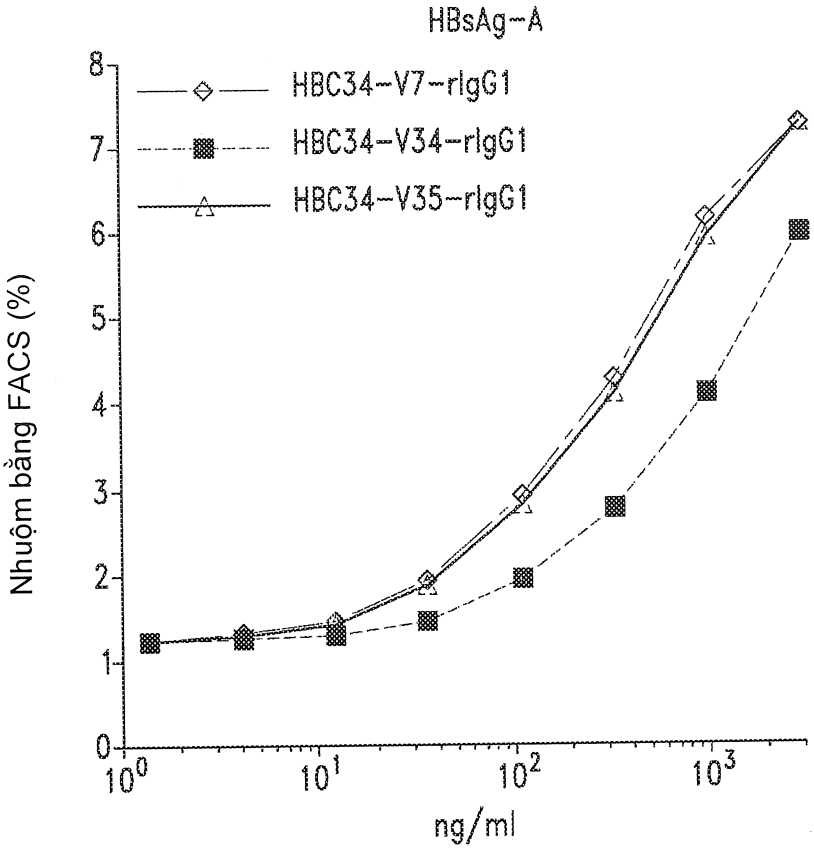

HBsAg-A
HBC34-V7-rIgG1
HBC34-V34-rIgG1
HBC34-V35-rIgG1
Nhuộm bằng FACS (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
10^0
10^1
10^2
10^3
ng/ml

FIG. 2A

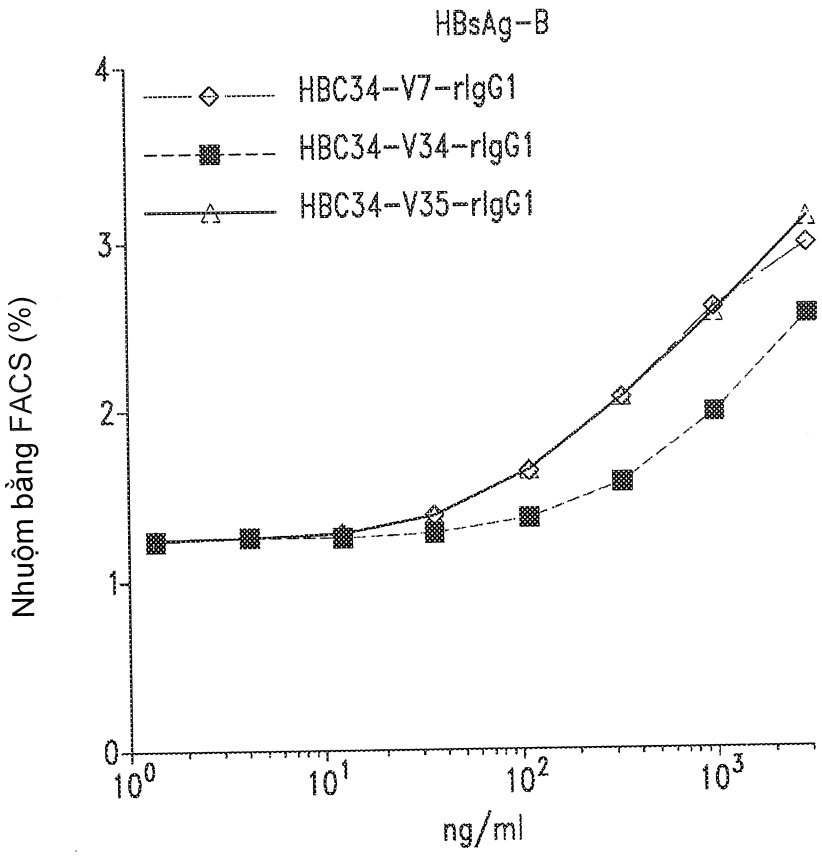

HBsAg-B
HBC34-V7-rIgG1
HBC34-V34-rIgG1
HBC34-V35-rIgG1
Nhuộm bằng FACS (%)
0
1
2
3
4
10^0
10^1
10^2
10^3
ng/ml

FIG. 2B

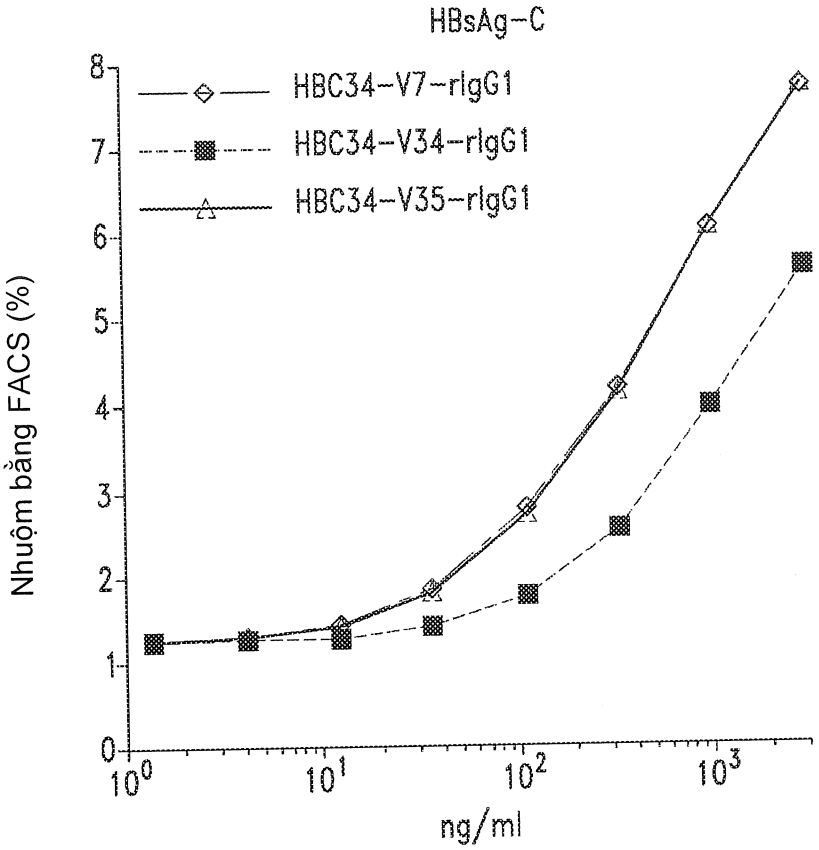

HBsAg-C
HBC34-V7-rIgG1
HBC34-V34-rIgG1
HBC34-V35-rIgG1
Nhuộm bằng FACS (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
10^0
10^1
10^2
10^3
ng/ml

FIG. 2C

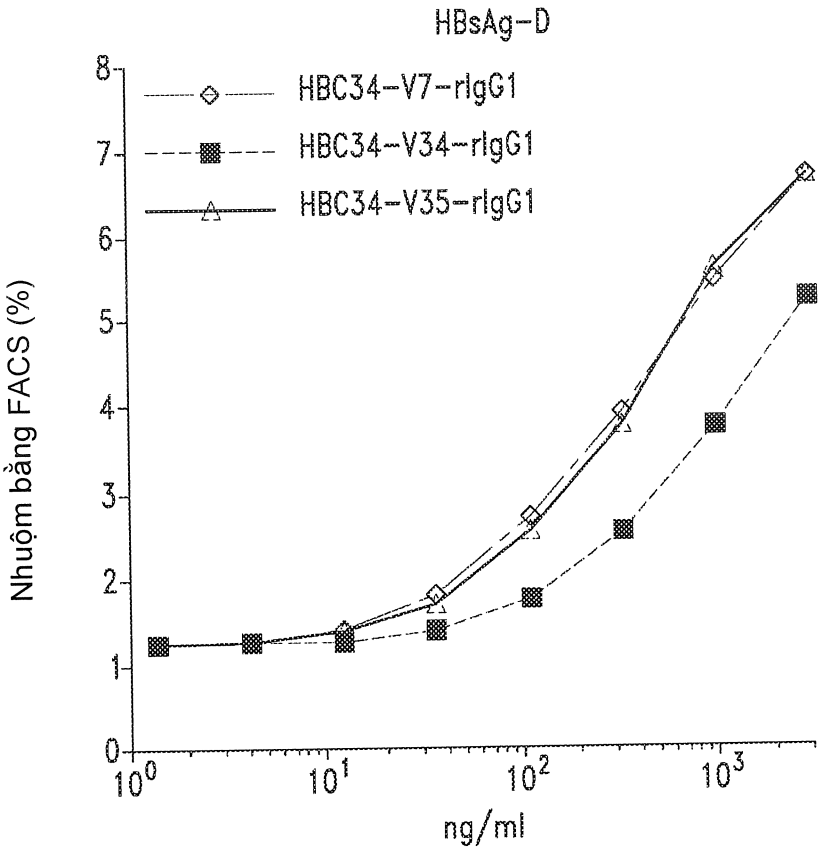

HBsAg-D
HBC34-V7-rIgG1
HBC34-V34-rIgG1
HBC34-V35-rIgG1
Nhuộm bằng FACS (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
10^0
10^1
10^2
10^3
ng/ml

FIG. 2D

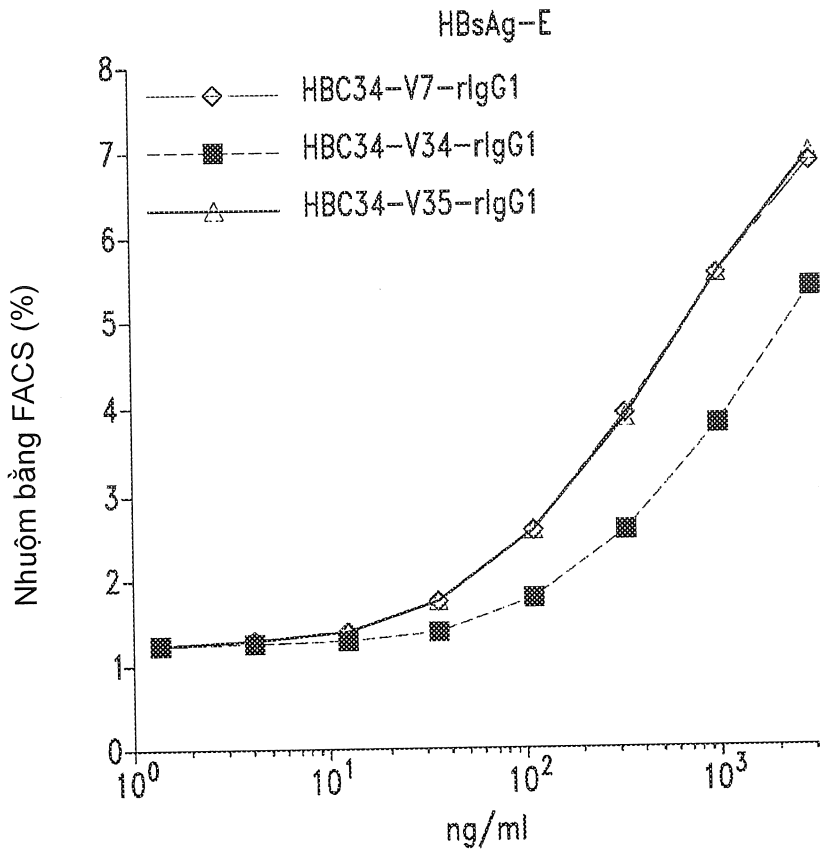

HBsAg-E
HBC34-V7-rIgG1
HBC34-V34-rIgG1
HBC34-V35-rIgG1
Nhuộm bằng FACS (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
10^0
10^1
10^2
10^3
ng/ml

FIG. 2E

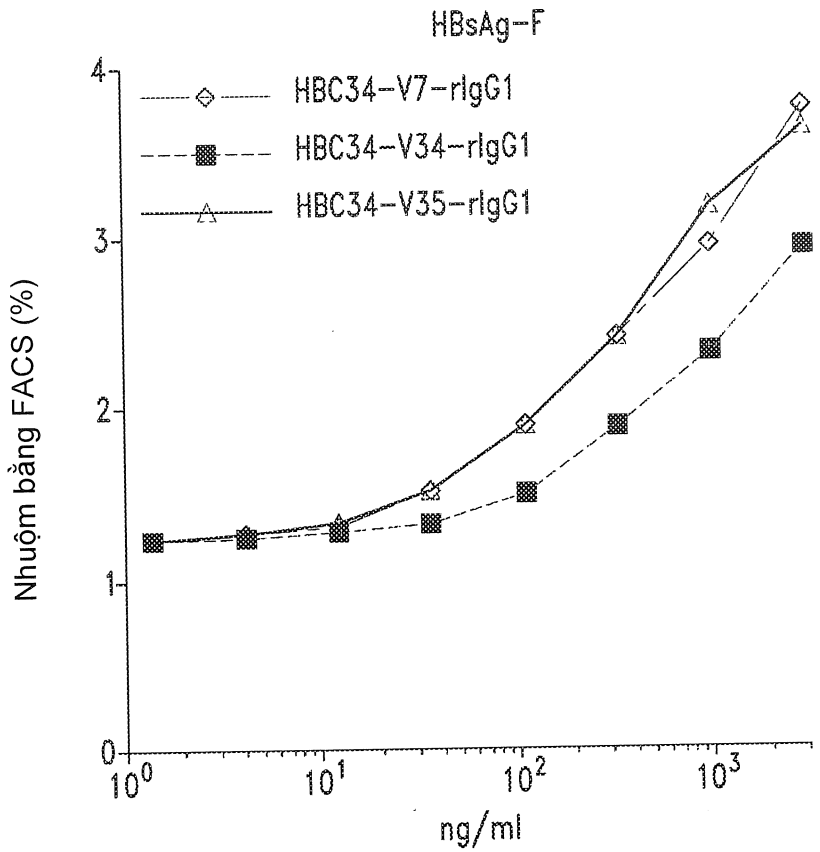

HBsAg-F
HBC34-V7-rIgG1
HBC34-V34-rIgG1
HBC34-V35-rIgG1
Nhuộm bằng FACS (%)
0
1
2
3
4
10^0
10^1
10^2
10^3
ng/ml

FIG. 2F

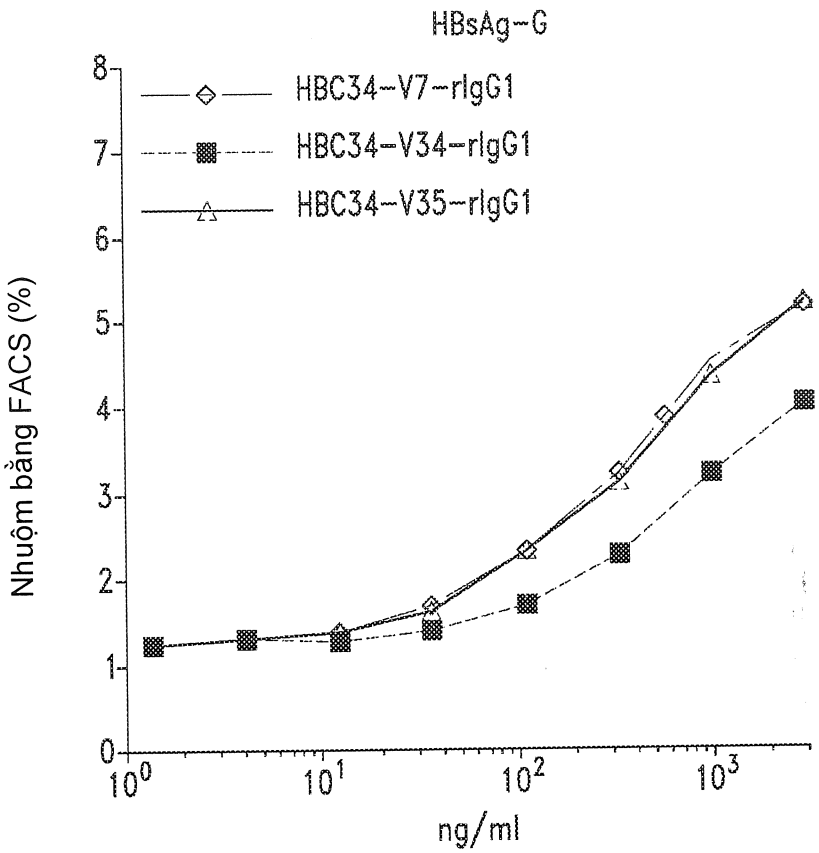

HBsAg-G
HBC34-V7-rIgG1
HBC34-V34-rIgG1
HBC34-V35-rIgG1
Nhuộm bằng FACS (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
10^0
10^1
10^2
10^3
ng/ml

FIG. 2G

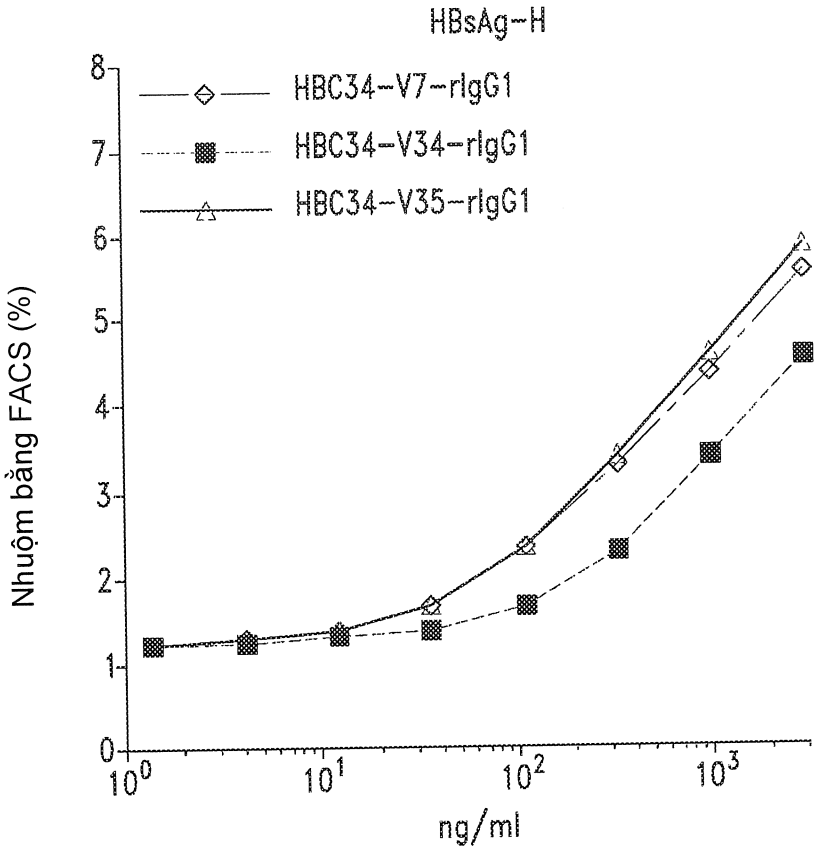

HBsAg-H
HBC34-V7-rIgG1
HBC34-V34-rIgG1
HBC34-V35-rIgG1
Nhuộm bằng FACS (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
10^0
10^1
10^2
10^3
ng/ml

FIG. 2H

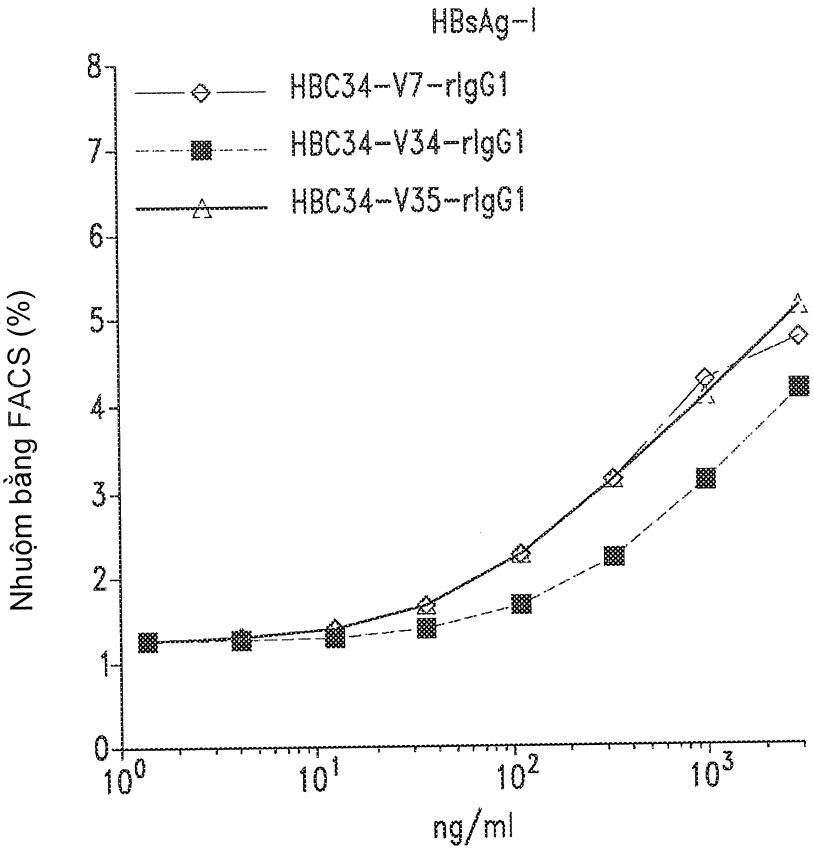

HBsAg-I
HBC34-V7-rIgG1
HBC34-V34-rIgG1
HBC34-V35-rIgG1
Nhuộm bằng FACS (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
10^0
10^1
10^2
10^3
ng/ml

FIG. 2I

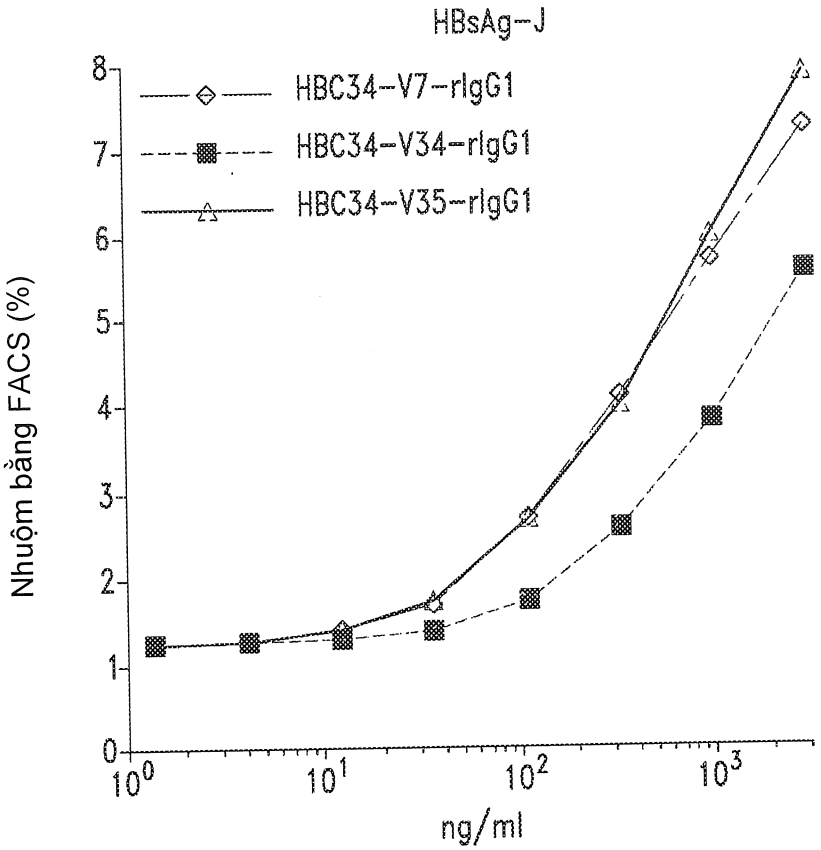

HBsAg-J
HBC34-V7-rIgG1
HBC34-V34-rIgG1
HBC34-V35-rIgG1
Nhuộm bằng FACS (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
10^0
10^1
10^2
10^3
ng/ml

FIG. 2J

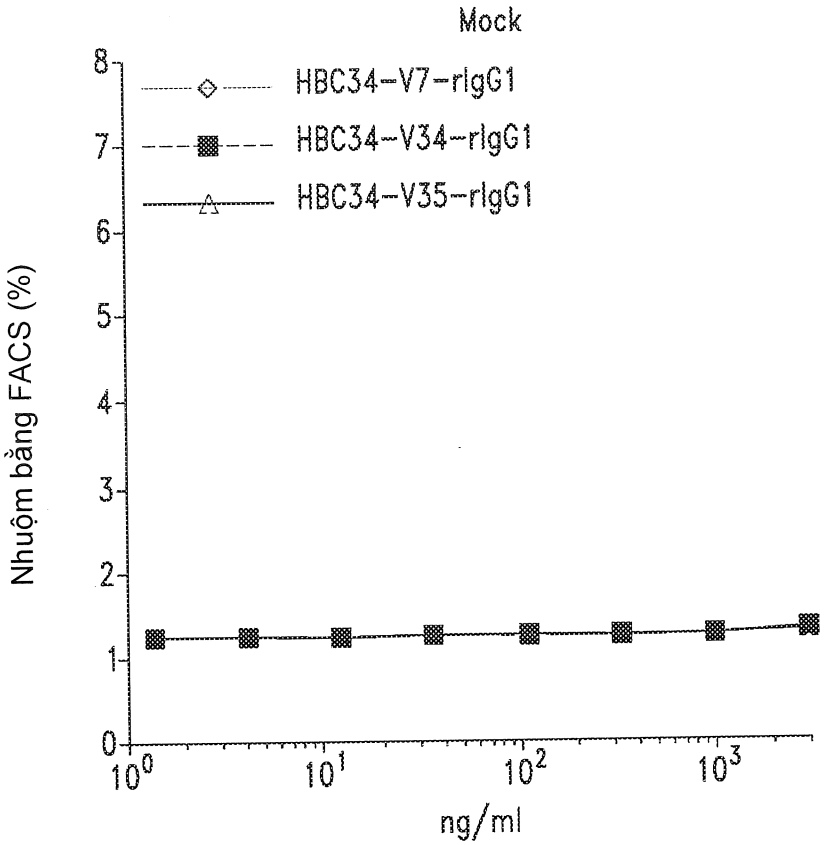
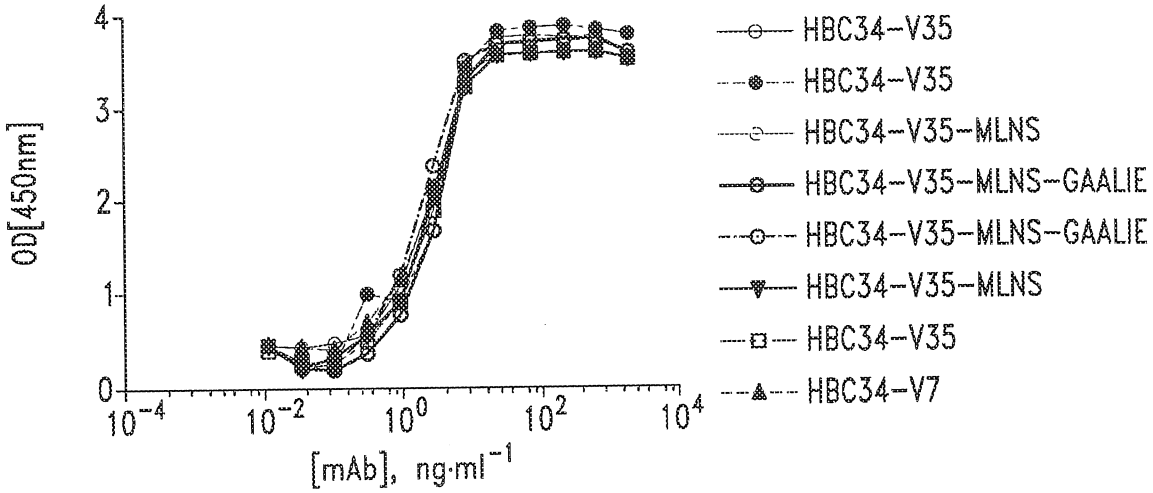

Mock
HBC34-V7-rIgG1
HBC34-V34-rIgG1
HBC34-V35-rIgG1
Nhuộm bằng FACS (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
10^0
10^1
10^2
10^3
ng/ml

FIG. 2K

Gắn kết với HBsAg (adw), Thí nghiệm 1



	EC50
HBC34-V35	2,43
HBC34-V35	2,799
HBC34-V35-MLNS	2,565
HBC34-V35-MLNS-GAALIE	3,186
HBC34-V35-MLNS-GAALIE	1,982
HBC34-V35-MLNS	2,309
HBC34-V35	2,662

Gắn kết với đĩa không được phủ, Thí nghiệm 1

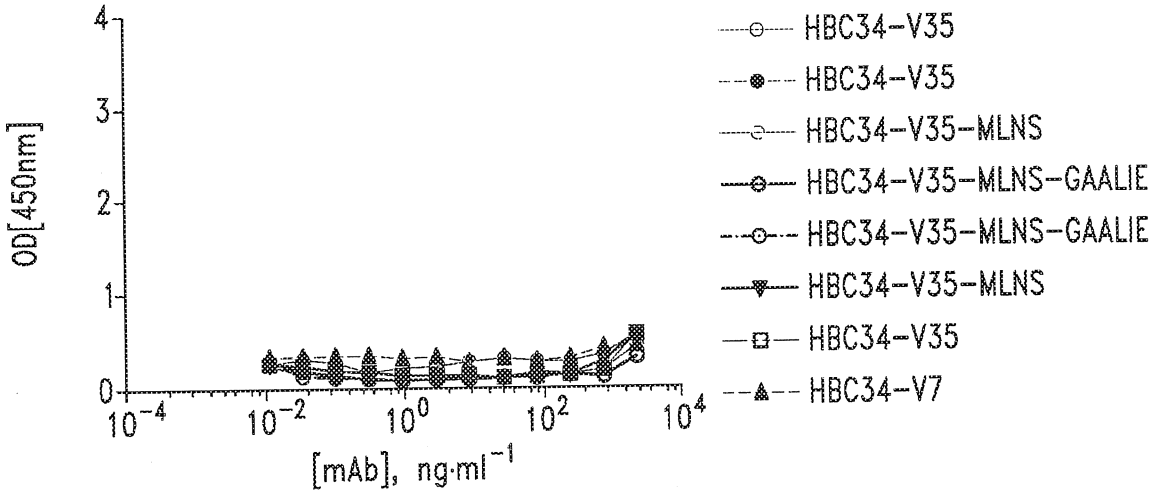
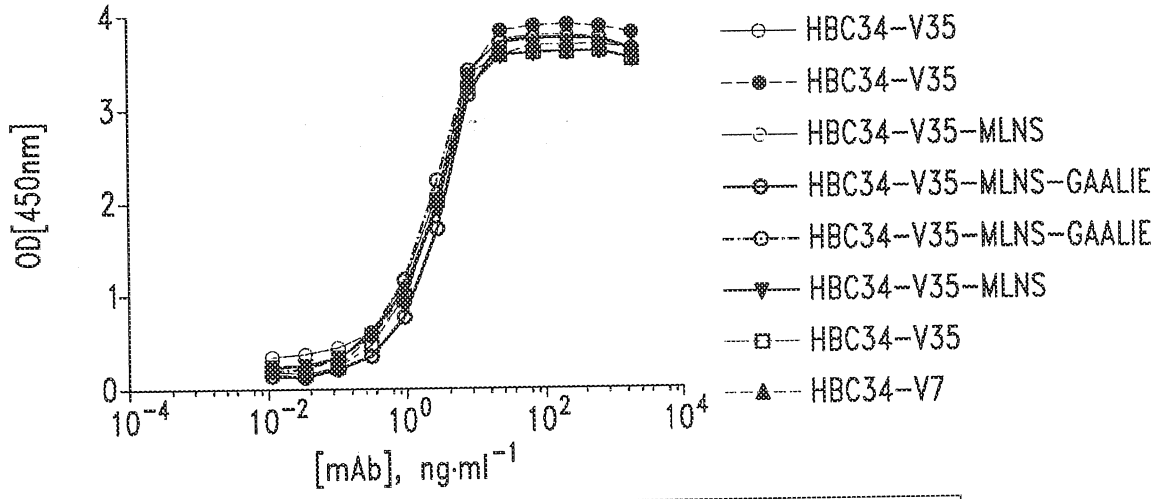


FIG. 3A

Gắn kết với HBsAg (adw), Thí nghiệm 2



	EC50
HBC34-V35	2,278
HBC34-V35	2,651
HBC34-V35-MLNS	2,484
HBC34-V35-MLNS-GAALIE	3,018
HBC34-V35-MLNS-GAALIE	1,958
HBC34-V35-MLNS	2,174
HBC34-V35	2,358

Gắn kết với đĩa không được phủ, Thí nghiệm 2

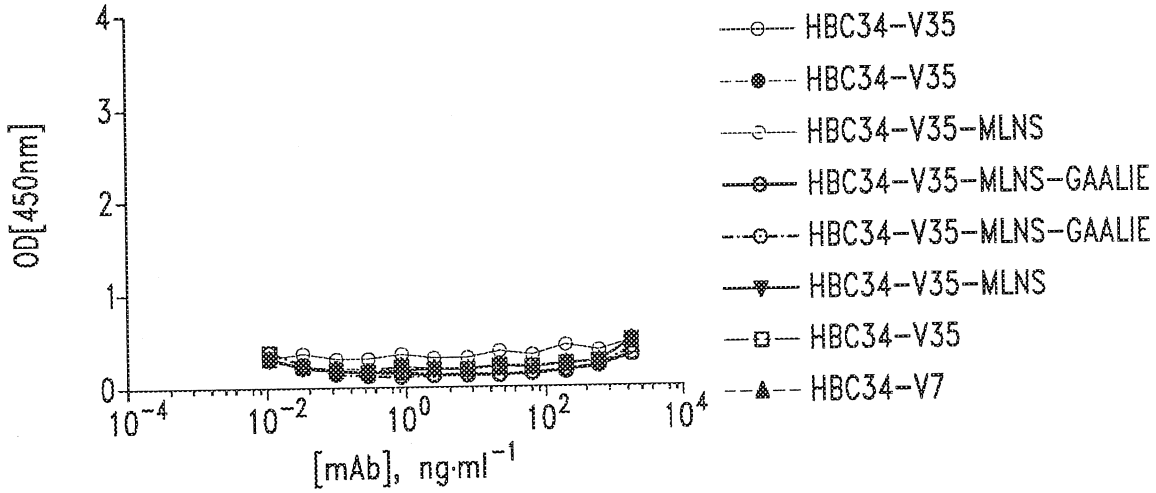


FIG. 3B

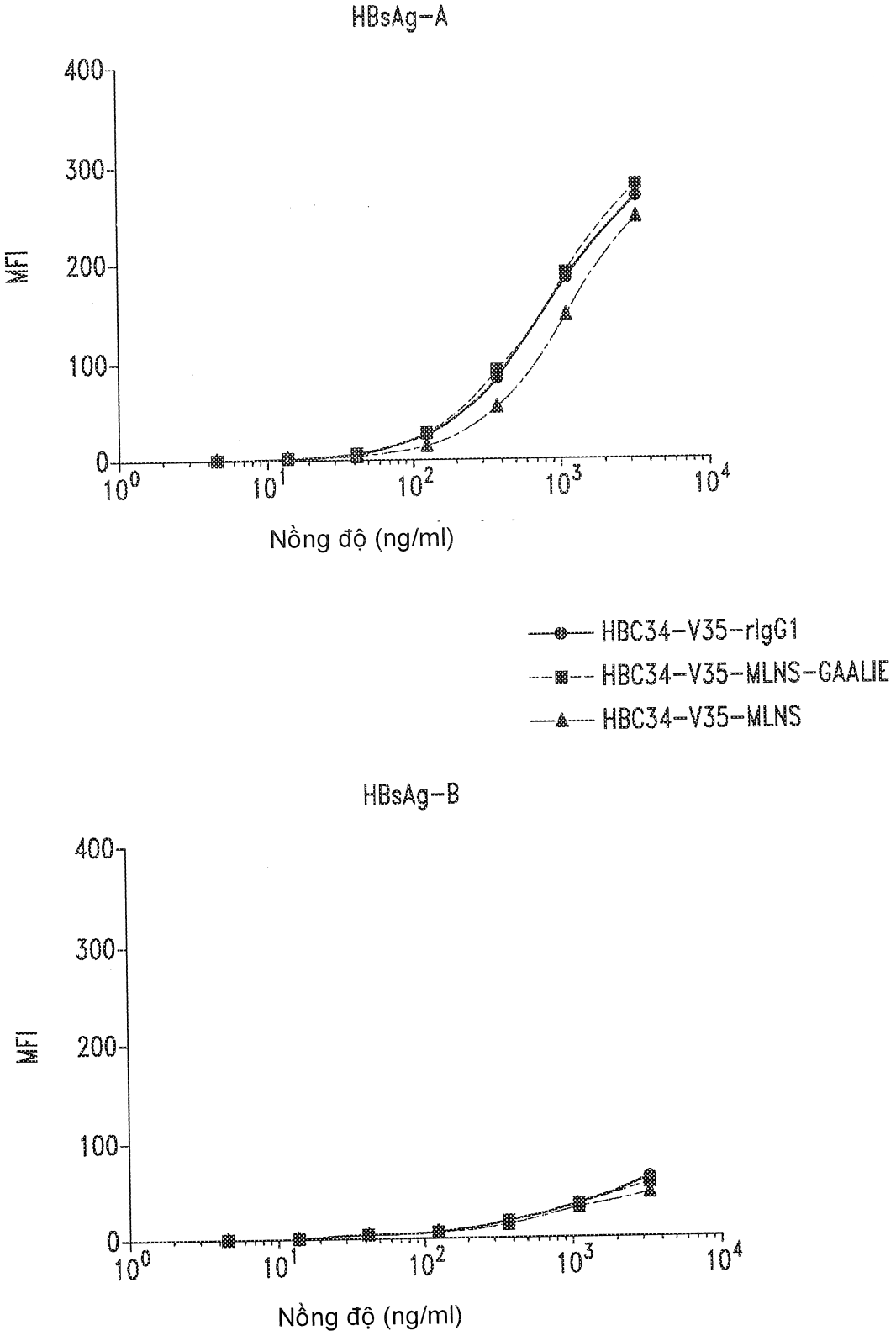

HBsAg-A
400
300
200
100
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)
HBC34-V35-rIgG1
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35-MLNS
HBsAg-B
400
300
200
100
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)

FIG. 3C

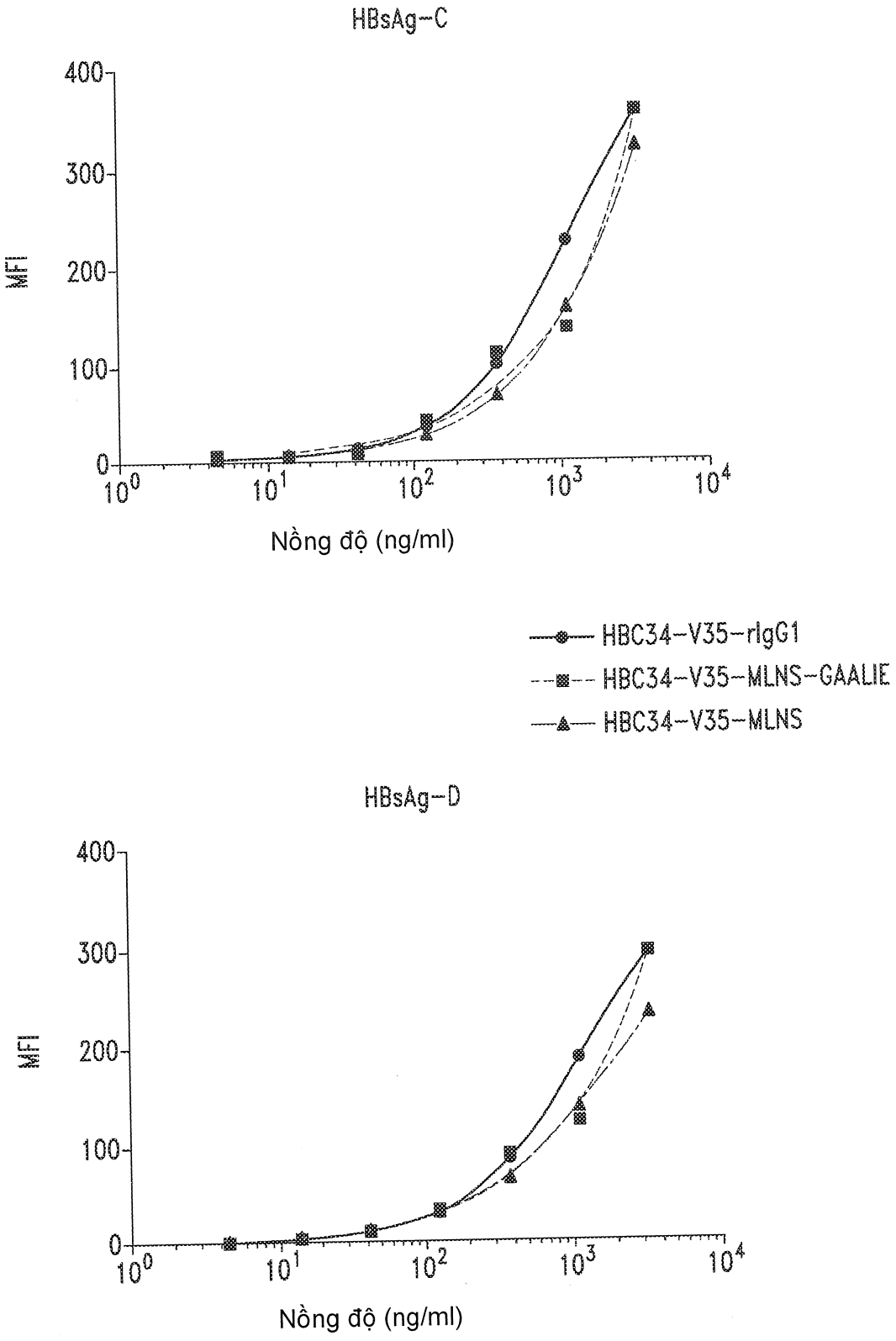

HBsAg-C
MFI
400
300
200
100
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)
HBC34-V35-rIgG1
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35-MLNS
HBsAg-D
MFI
400
300
200
100
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)

FIG. 3D

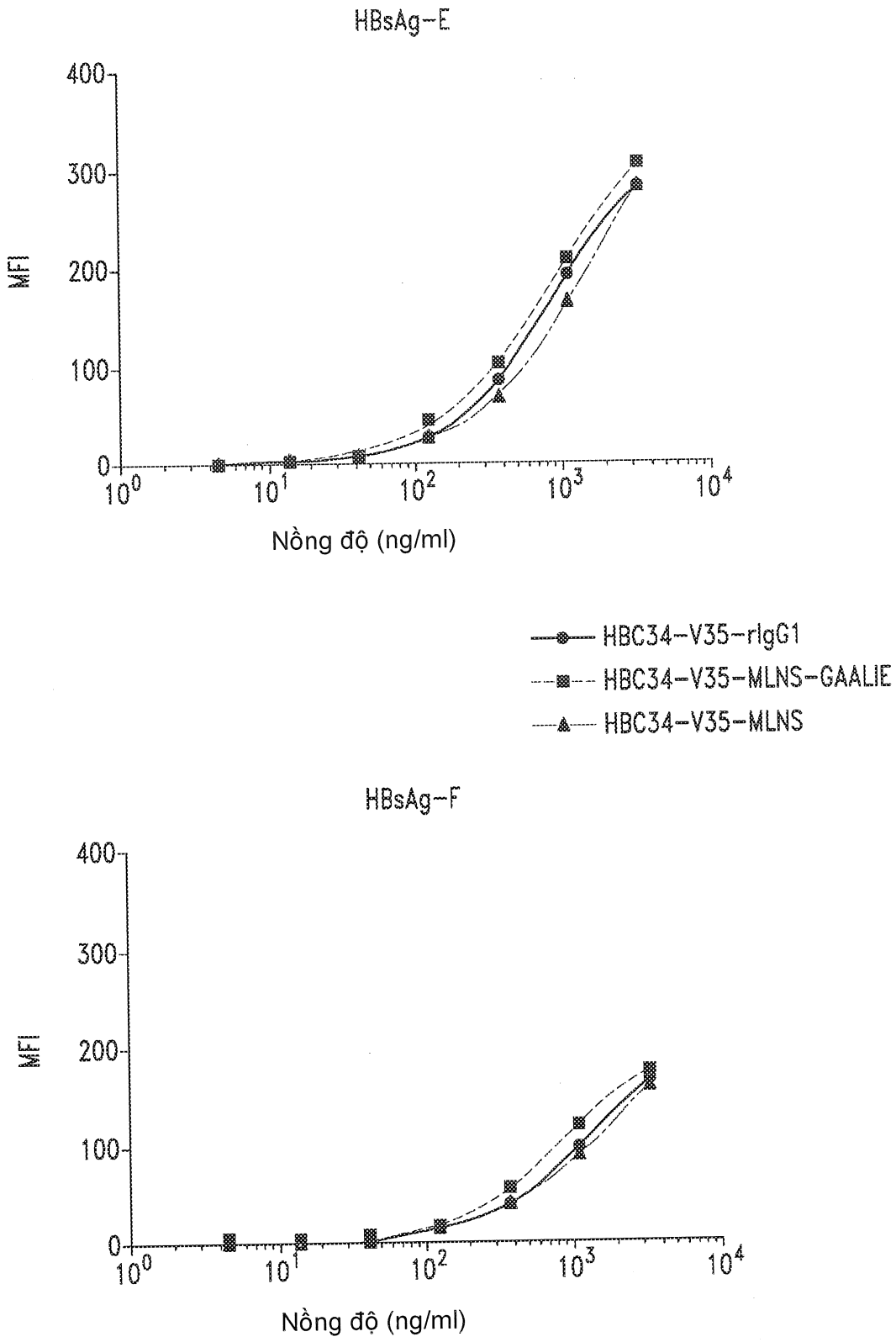

HBsAg-E
400
300
200
100
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)
HBC34-V35-rIgG1
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35-MLNS
HBsAg-F
400
300
200
100
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)

FIG. 3E

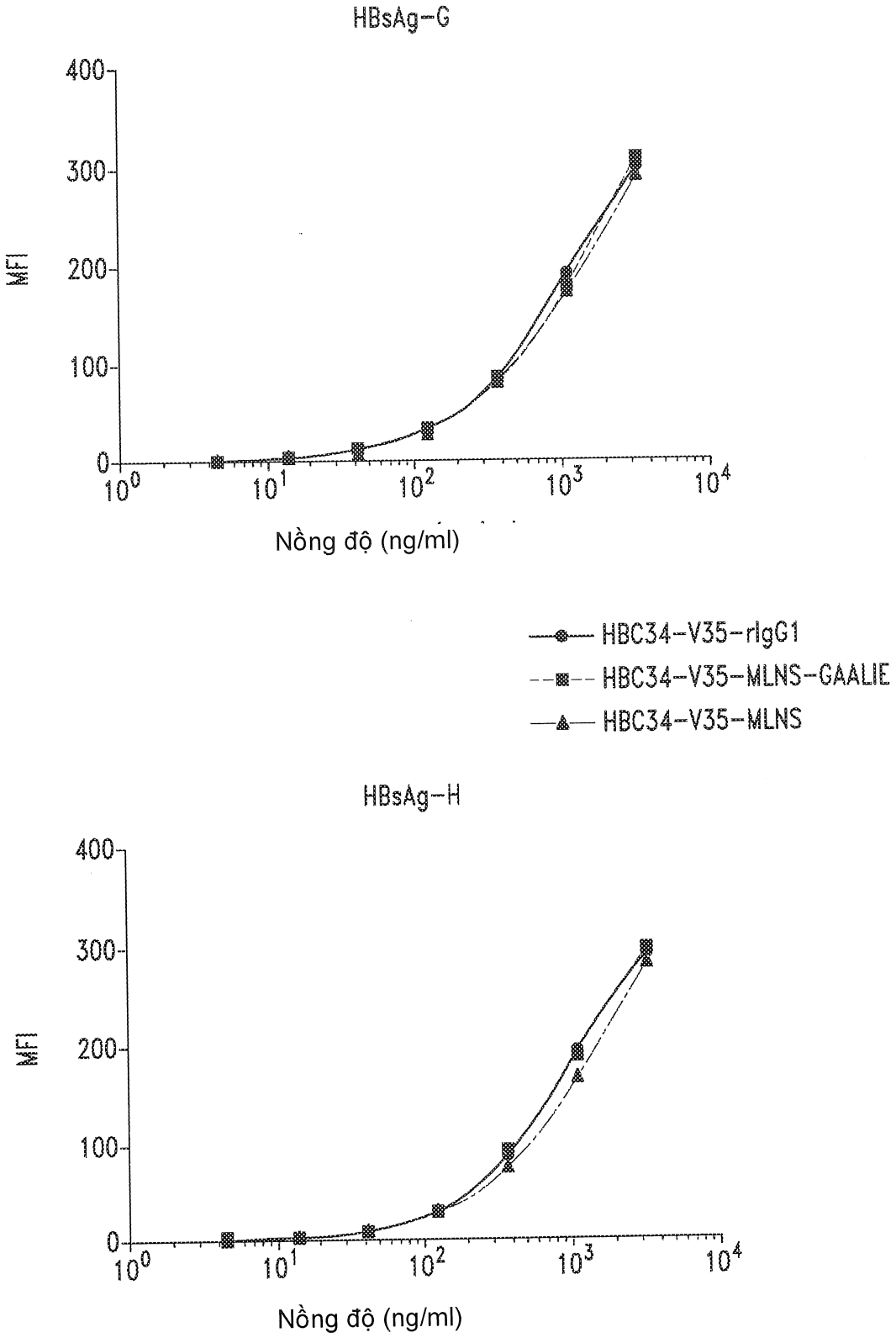

HBsAg-G
400
300
200
100
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)
HBC34-V35-rIgG1
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35-MLNS
HBsAg-H
400
300
200
100
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)

FIG. 3F

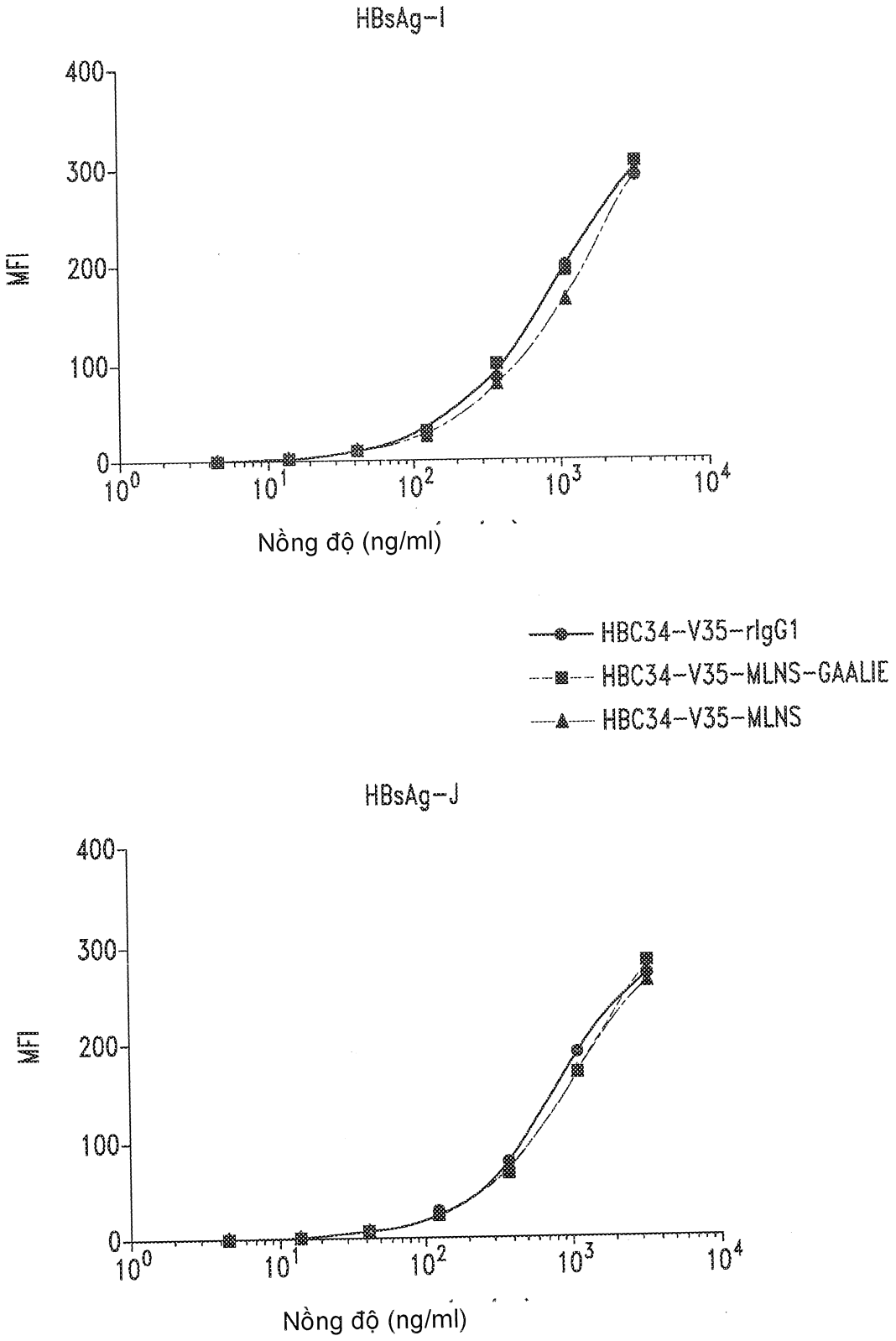

HBsAg-I
400
300
200
100
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)
HBC34-V35-rIgG1
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35-MLNS
HBsAg-J
400
300
200
100
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)

FIG. 3G

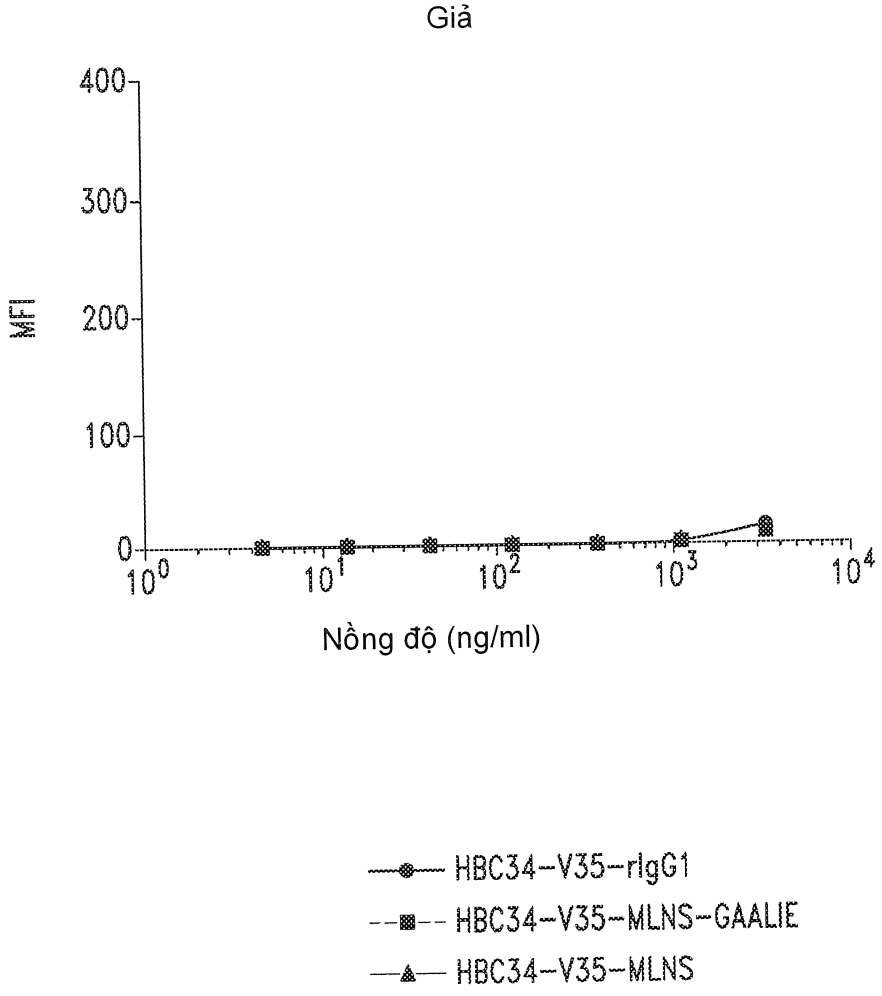

Giả
400
300
200
100
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)
HBC34-V35-rIgG1
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35-MLNS

FIG. 3H

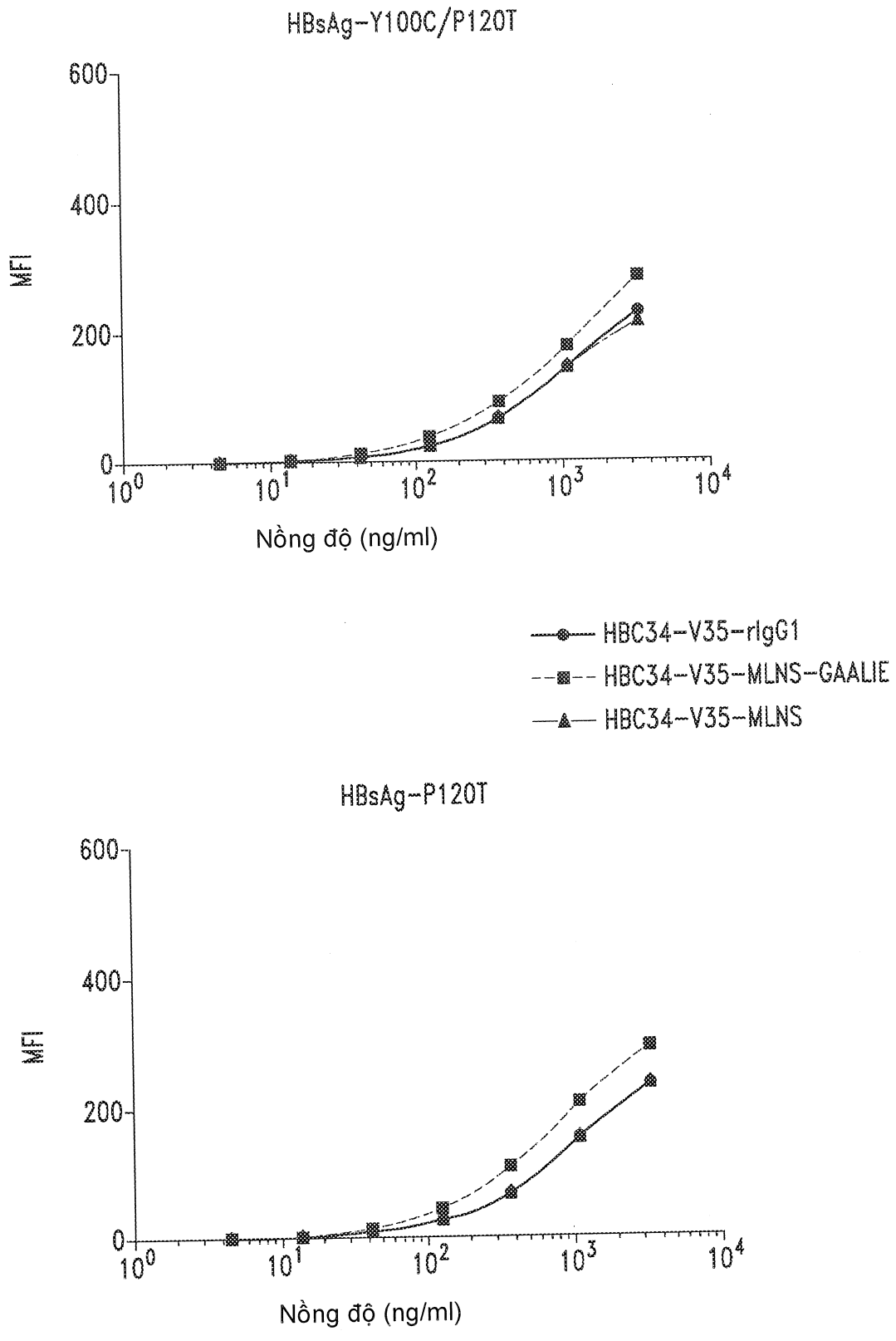

HBsAg-Y100C/P120T
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)
HBC34-V35-rIgG1
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35-MLNS
HBsAg-P120T
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)

FIG. 3I

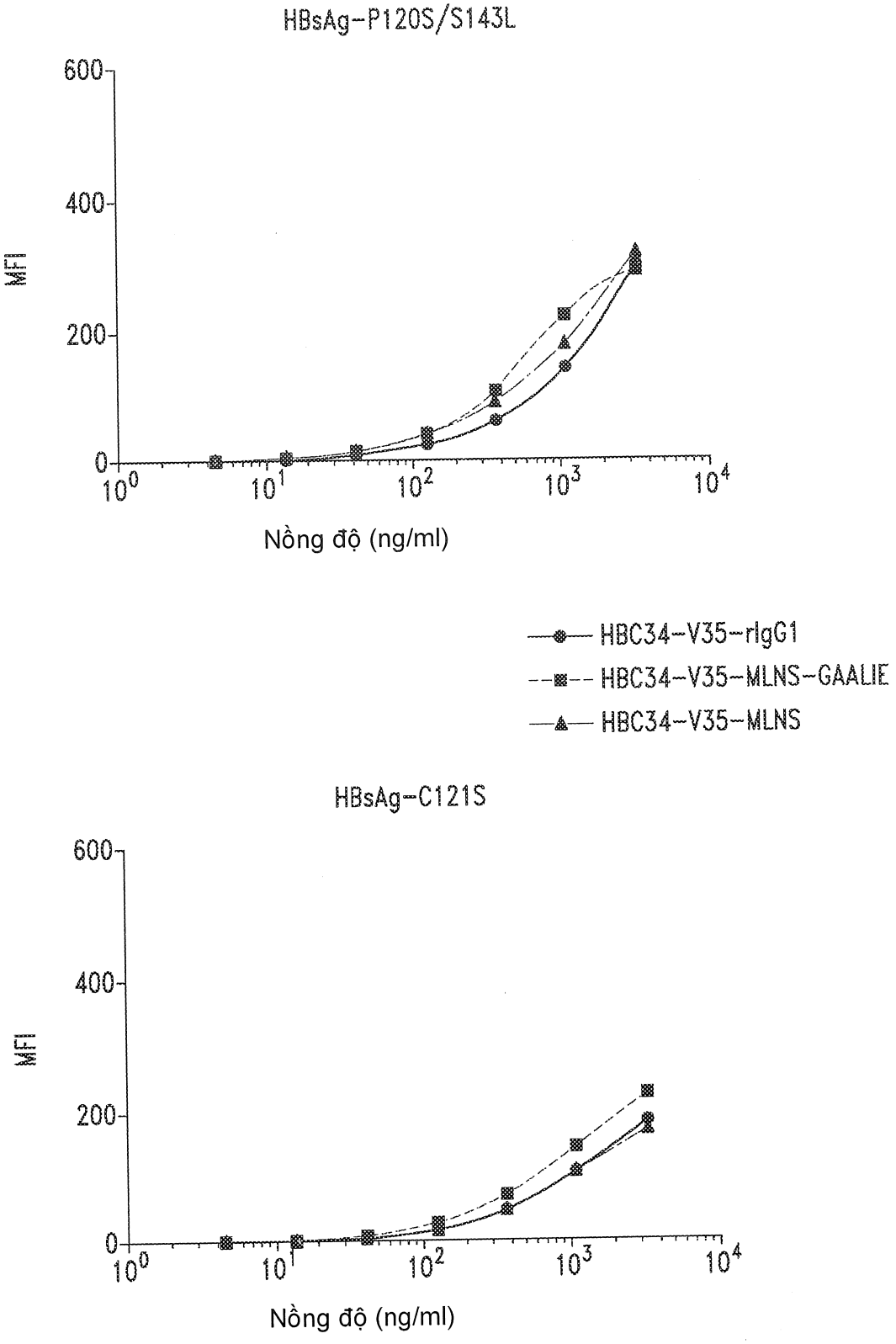

HBsAg-P120S/S143L
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)
HBC34-V35-rIgG1
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35-MLNS
HBsAg-C121S
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)

FIG. 3J

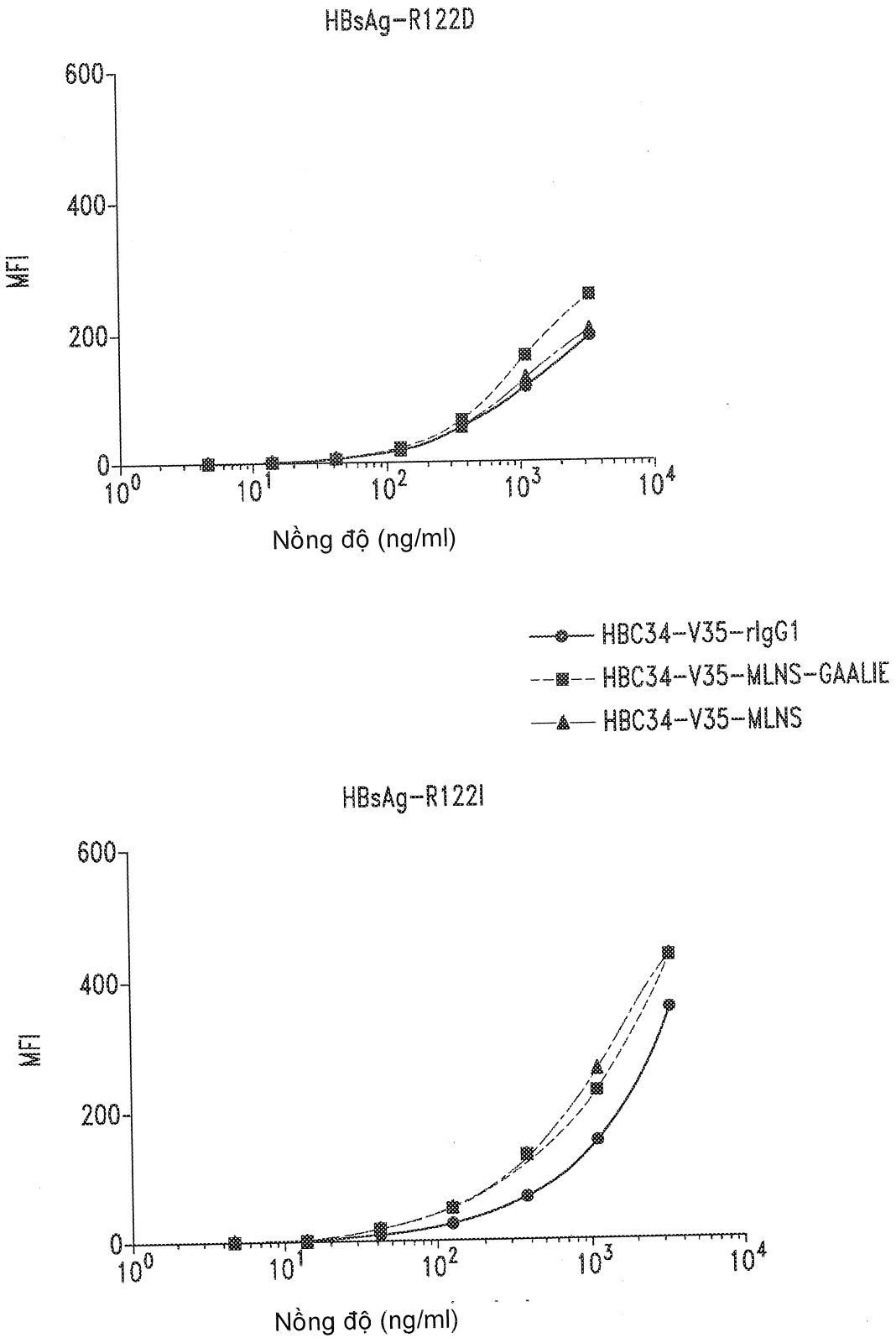

HBsAg-R122D
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)
HBC34-V35-rIgG1
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35-MLNS
HBsAg-R122I
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)

FIG. 3K

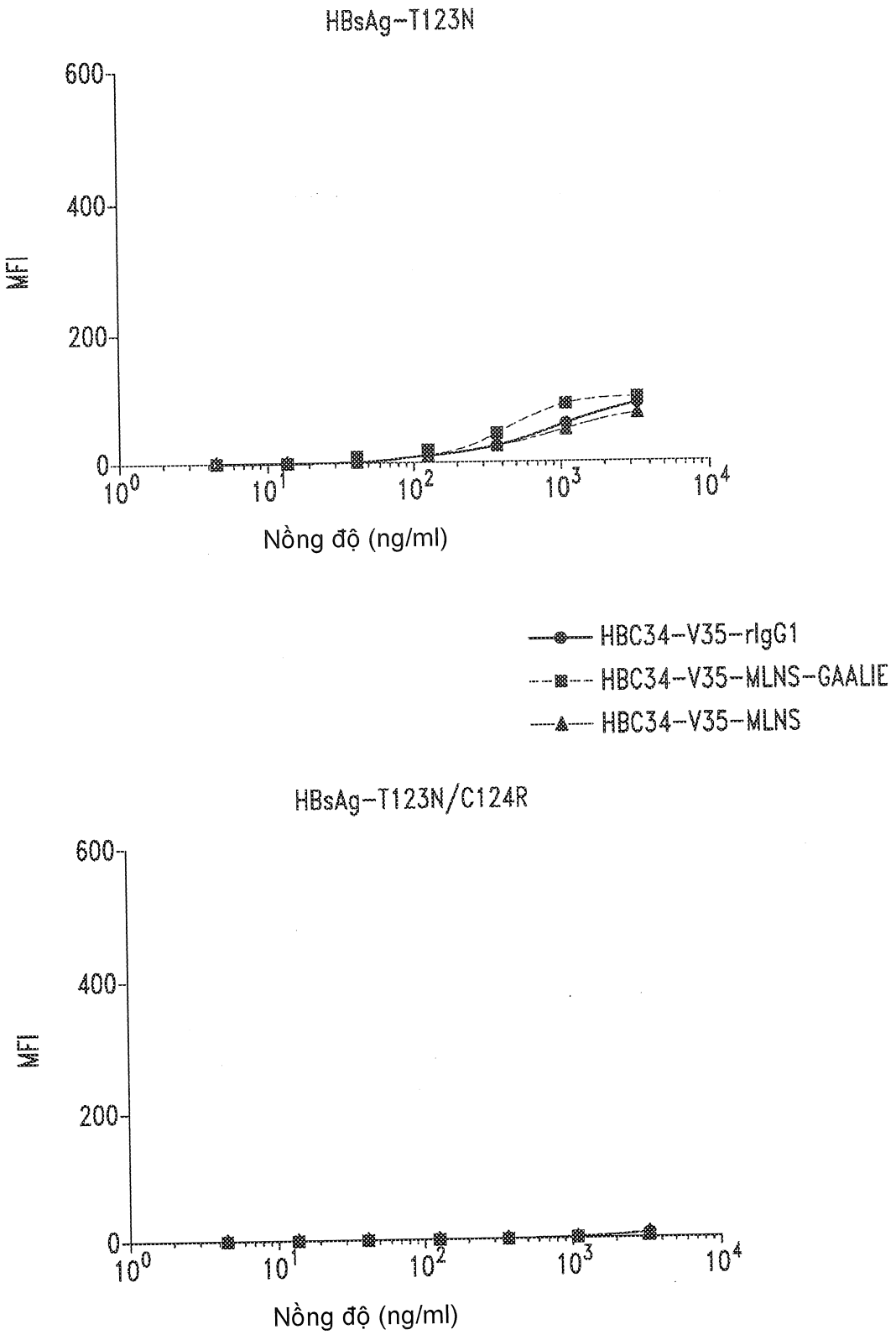

HBsAg-T123N
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)
HBC34-V35-rIgG1
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35-MLNS
HBsAg-T123N/C124R
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)

FIG. 3L

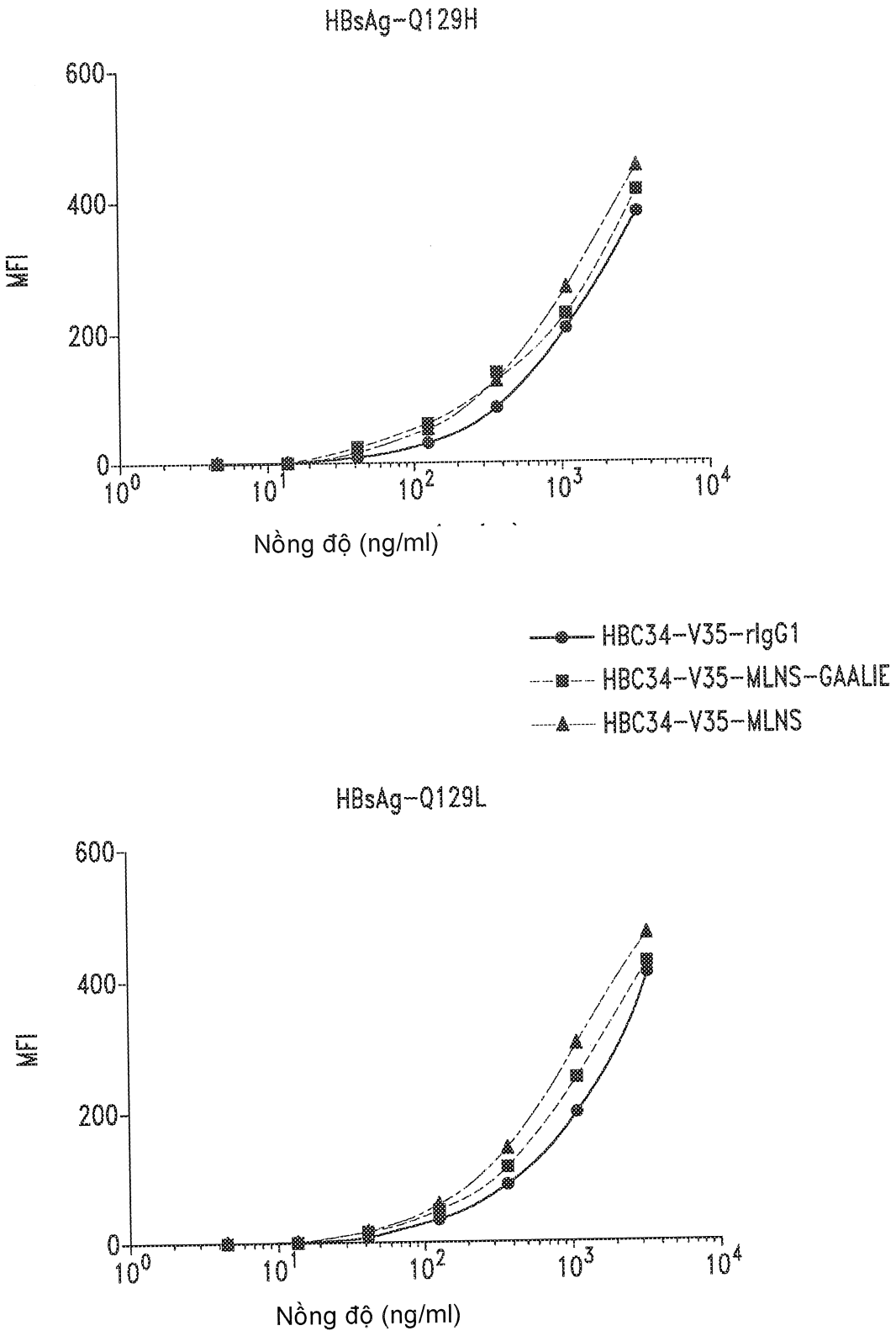

HBsAg-Q129H
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)
HBC34-V35-rIgG1
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35-MLNS
HBsAg-Q129L
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)

FIG. 3M

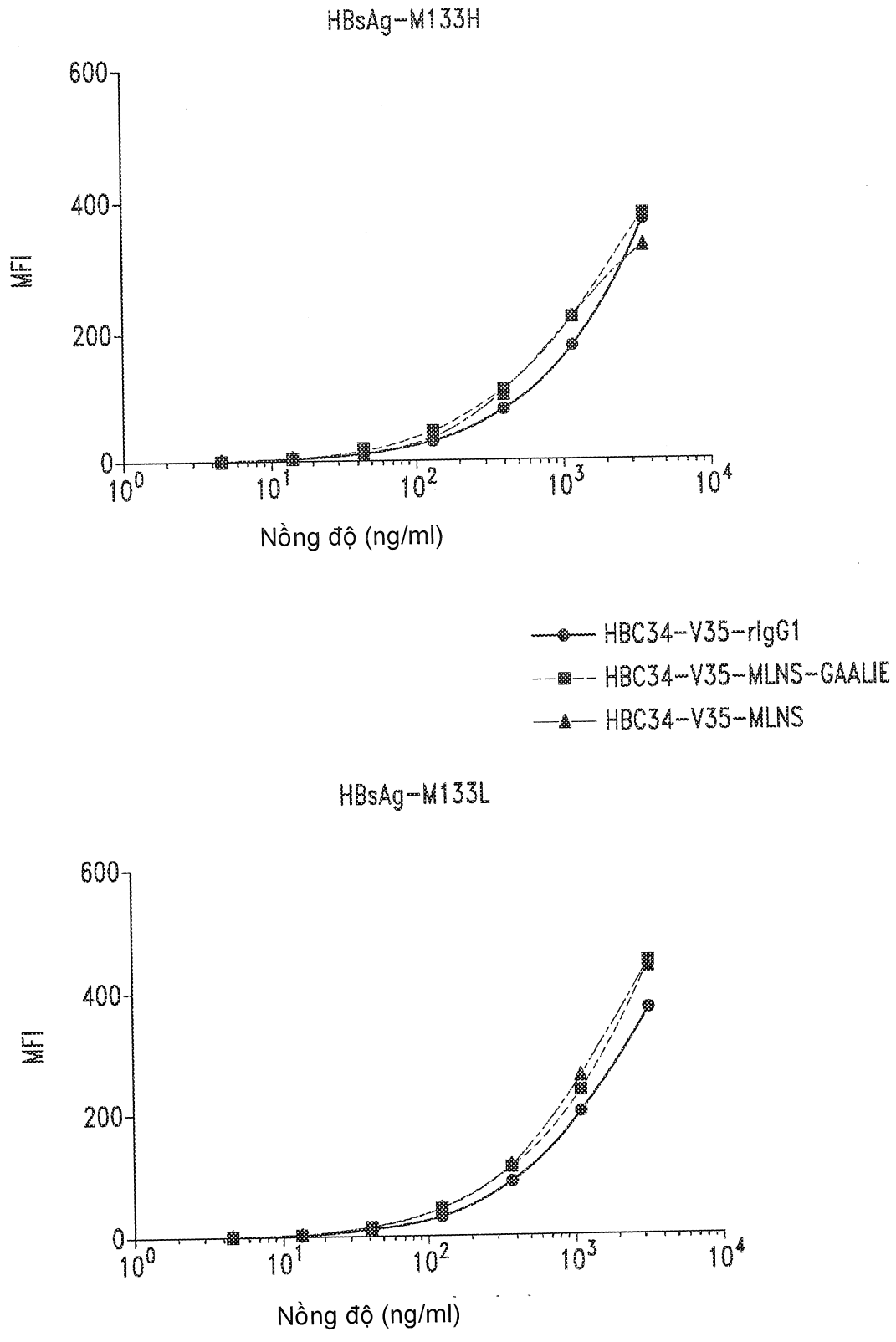

HBsAg-M133H
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)
HBC34-V35-rIgG1
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35-MLNS
HBsAg-M133L
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)

FIG. 3N

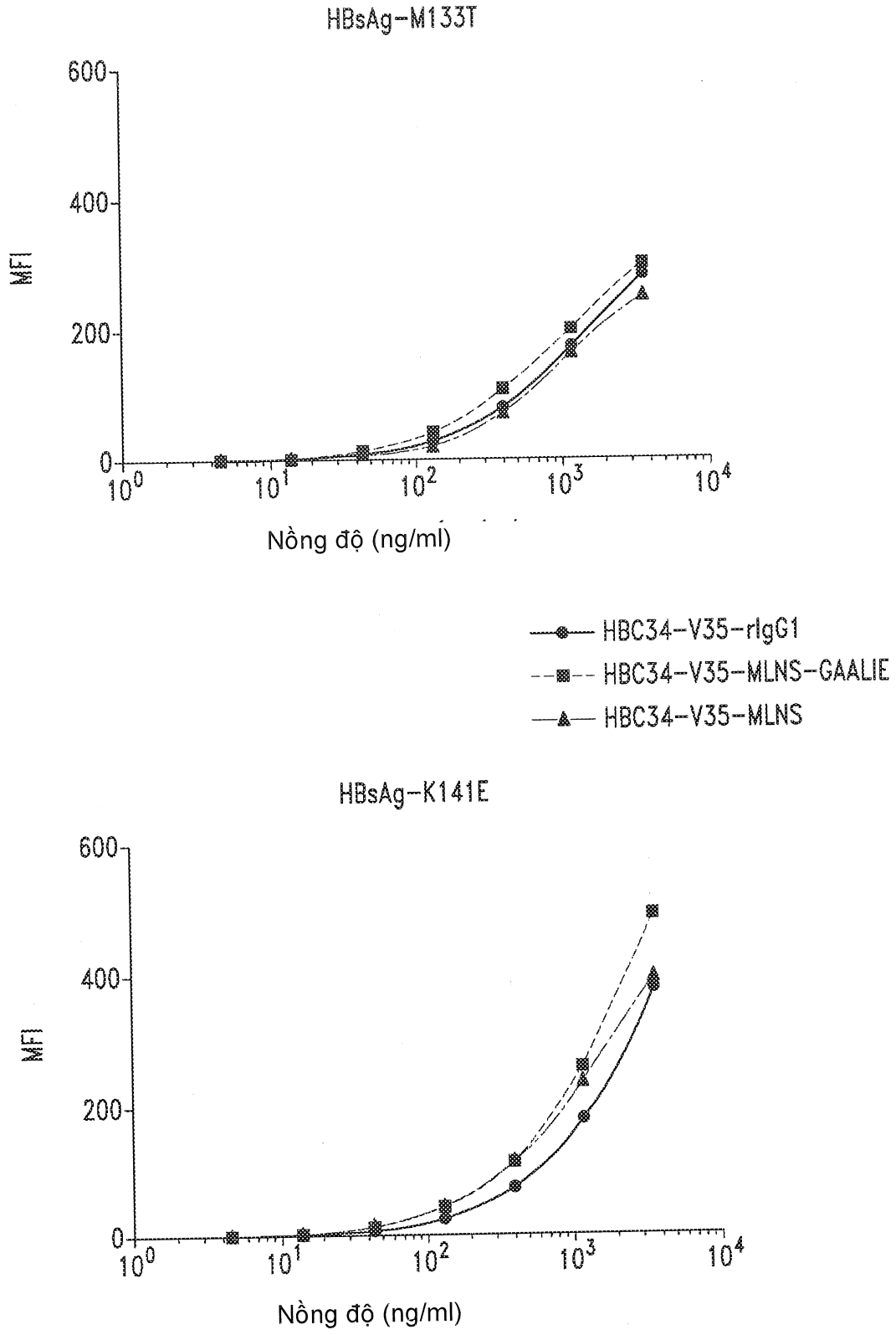

HBsAg-M133T
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)
HBC34-V35-rIgG1
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35-MLNS
HBsAg-K141E
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)

FIG. 30

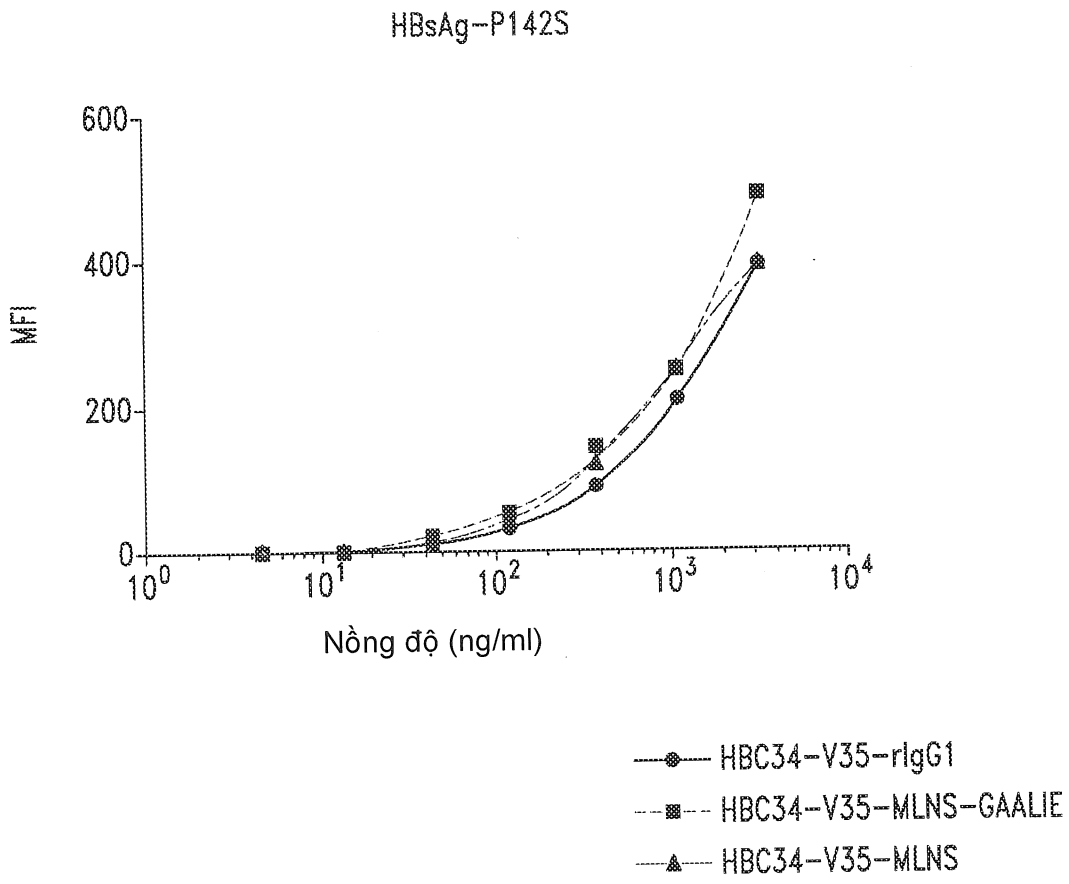

HBsAg-P142S
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)
HBC34-V35-rIgG1
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35-MLNS
HBsAg-S143K
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)

FIG. 3P

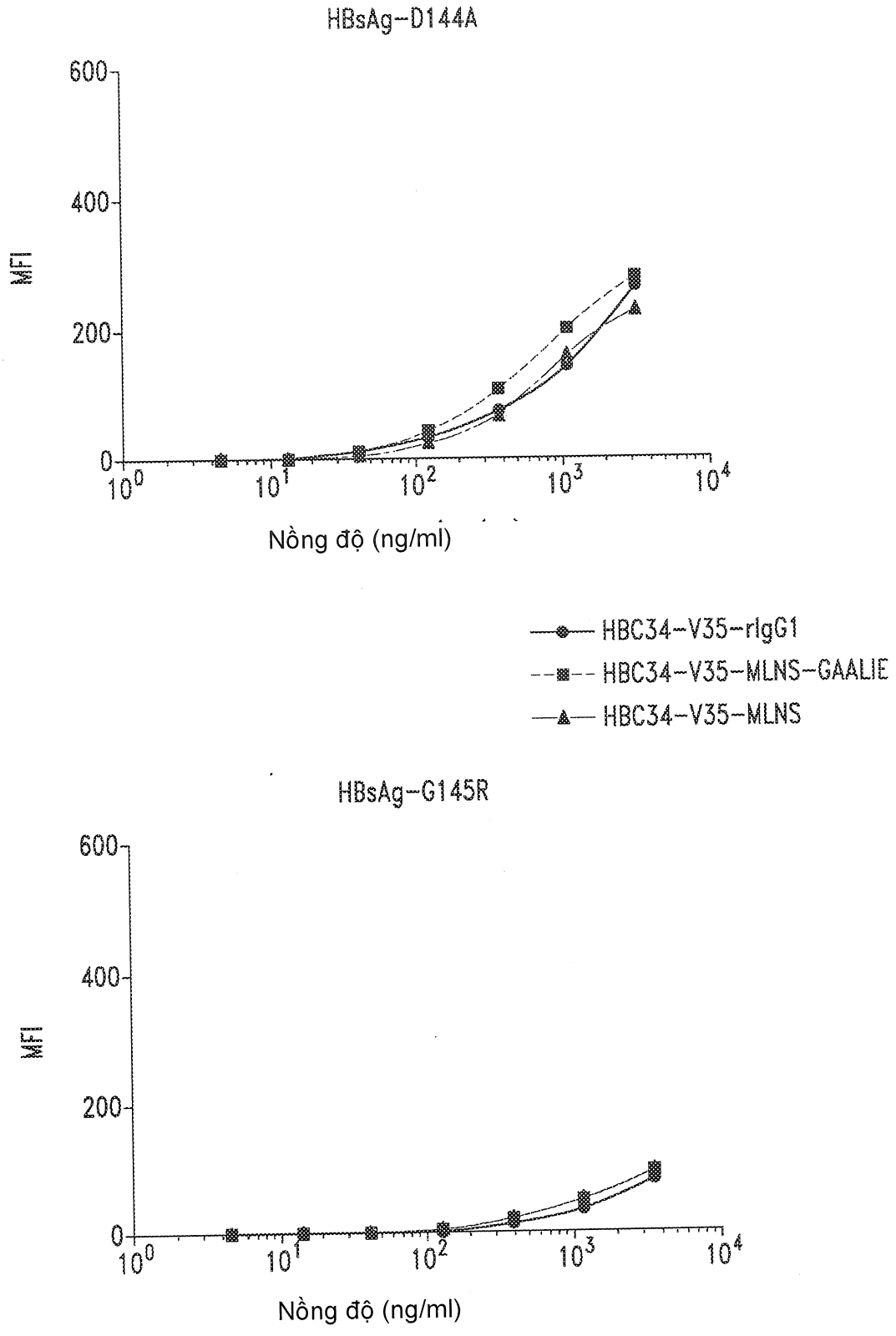

HBsAg-D144A
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)
HBC34-V35-rIgG1
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35-MLNS
HBsAg-G145R
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)

FIG. 3Q

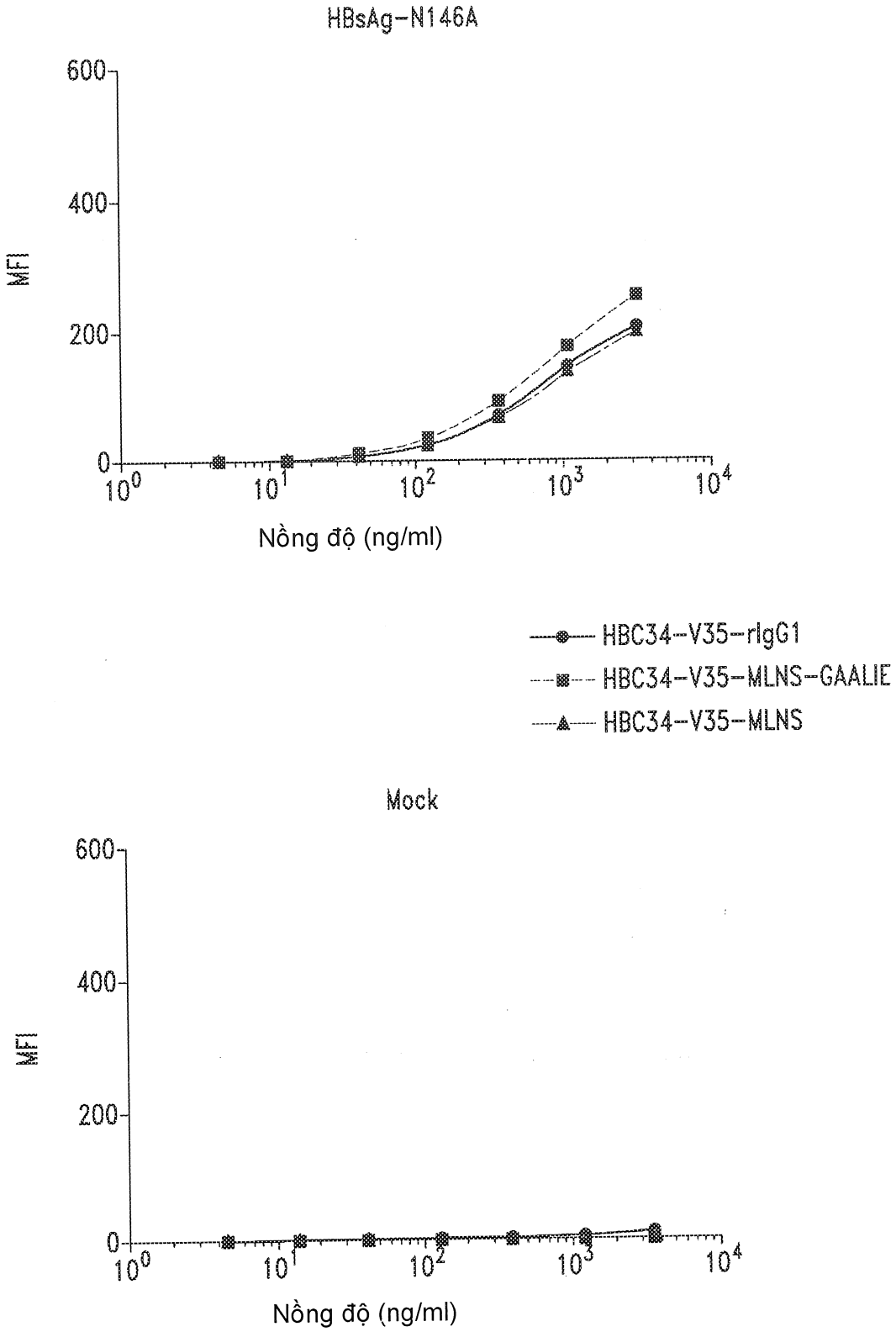

HBsAg-N146A
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)
HBC34-V35-rIgG1
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35-MLNS
Mock
600
400
200
0
MFI
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Nồng độ (ng/ml)

FIG. 3R

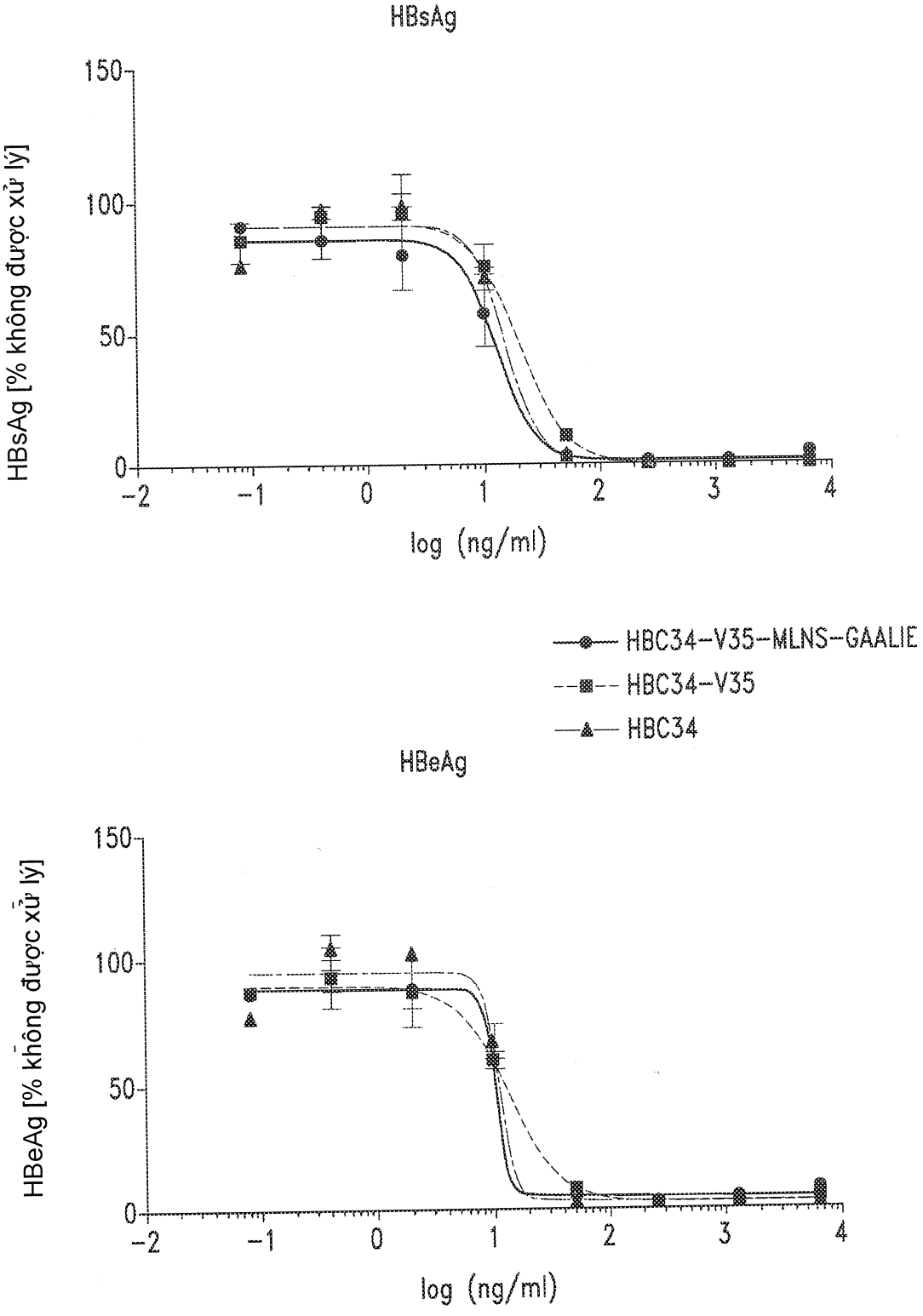

HBsAg
HBsAg [% không được xử lý]
150
100
50
0
−2
−1
0
1
2
3
4
log (ng/ml)
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35
HBC34
HBeAg
HBeAg [% không được xử lý]
150
100
50
0
−2
−1
0
1
2
3
4
log (ng/ml)

FIG. 3S

Kháng thể	HBsAg	HBeAg
	EC_{50} (ng/mL)	EC_{50} (ng/mL)
HBC34	13,64 (12,28 - 15,15)	11,67 (11,3 - 12,05)
HBC34-V35	17,97 (16,22 - 19,9)	12,61 (11,59 - 13,72)
HBC34-V35-MLNS-GAALIE	12,79 (12,75 - 12,84)	10,85 (10,78 - 10,93)

FIG. 3T

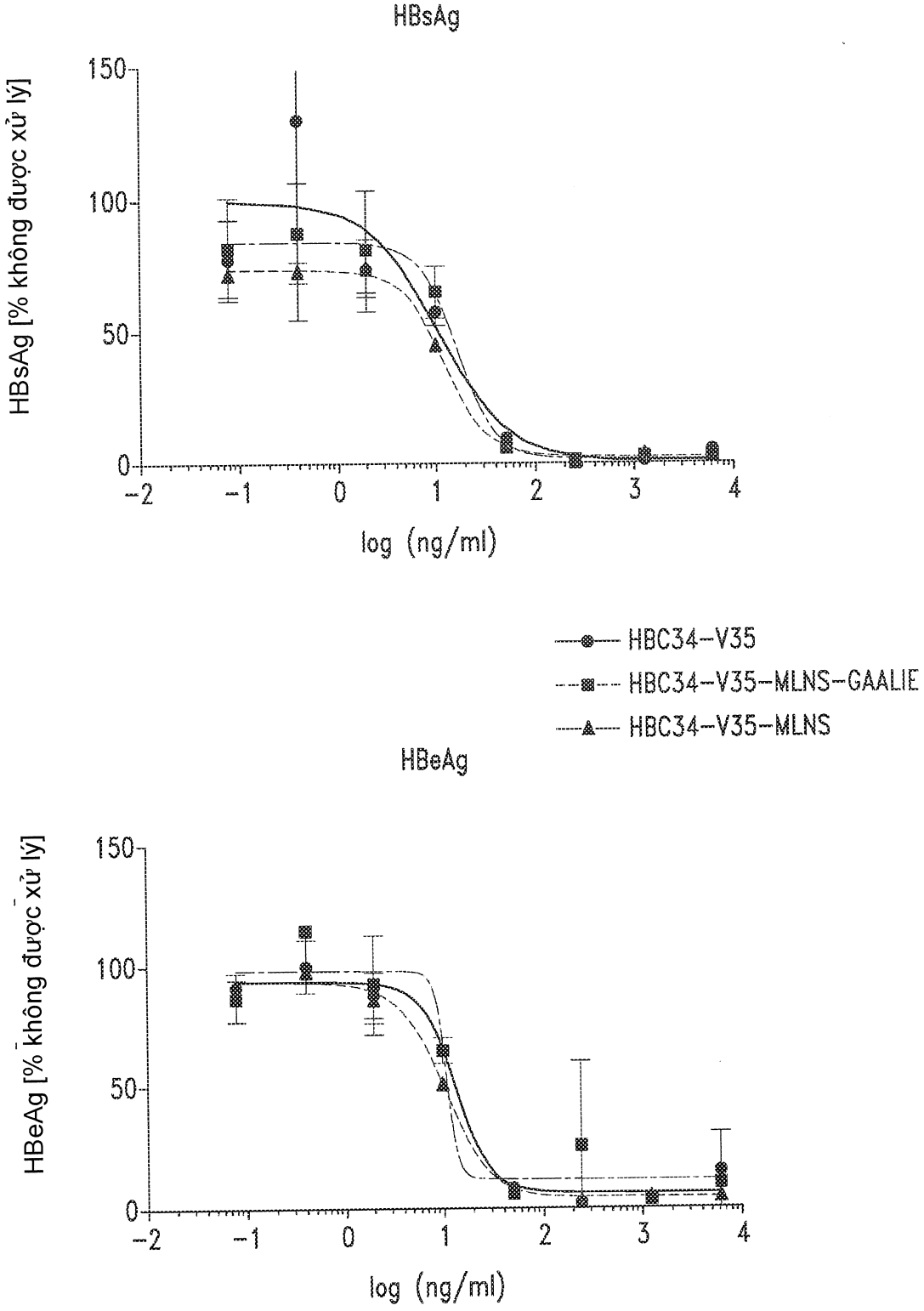

HBsAg
HBsAg [% không được xử lý]
150
100
50
0
-2
-1
0
1
2
3
4
log (ng/ml)
HBC34-V35
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34-V35-MLNS
HBeAg
HBeAg [% không được xử lý]
150
100
50
0
-2
-1
0
1
2
3
4
log (ng/ml)

FIG. 3U

Kháng thể	HBsAg	HBeAg
	EC_{50} (ng/mL)	EC_{50} (ng/mL)
HBC34-V35-MLNS-GAALIE	15,12 (13,81 - 16,56)	10,64 (10,63 - 10,66)
HBC34-V35-MLNS	16,56 (12,24 - 22,41)	10,49 (10,39 - 10,60)
HBC34-V35	14,47 (10,43 - 20,08)	13,61 (13,25 - 13,99)

Giá trị trung bình nhân và khoảng (trong ngoặc đơn) của các giá trị EC50 được xác định trong hai thí nghiệm độc lập

FIG. 3V

Kiểu gen	EC_{50} (ng/ml)
A	2,34
B	2,22
C	0,92
D	1,10
E	1,12
F	1,93
G	1,43
H	1,93

FIG. 4

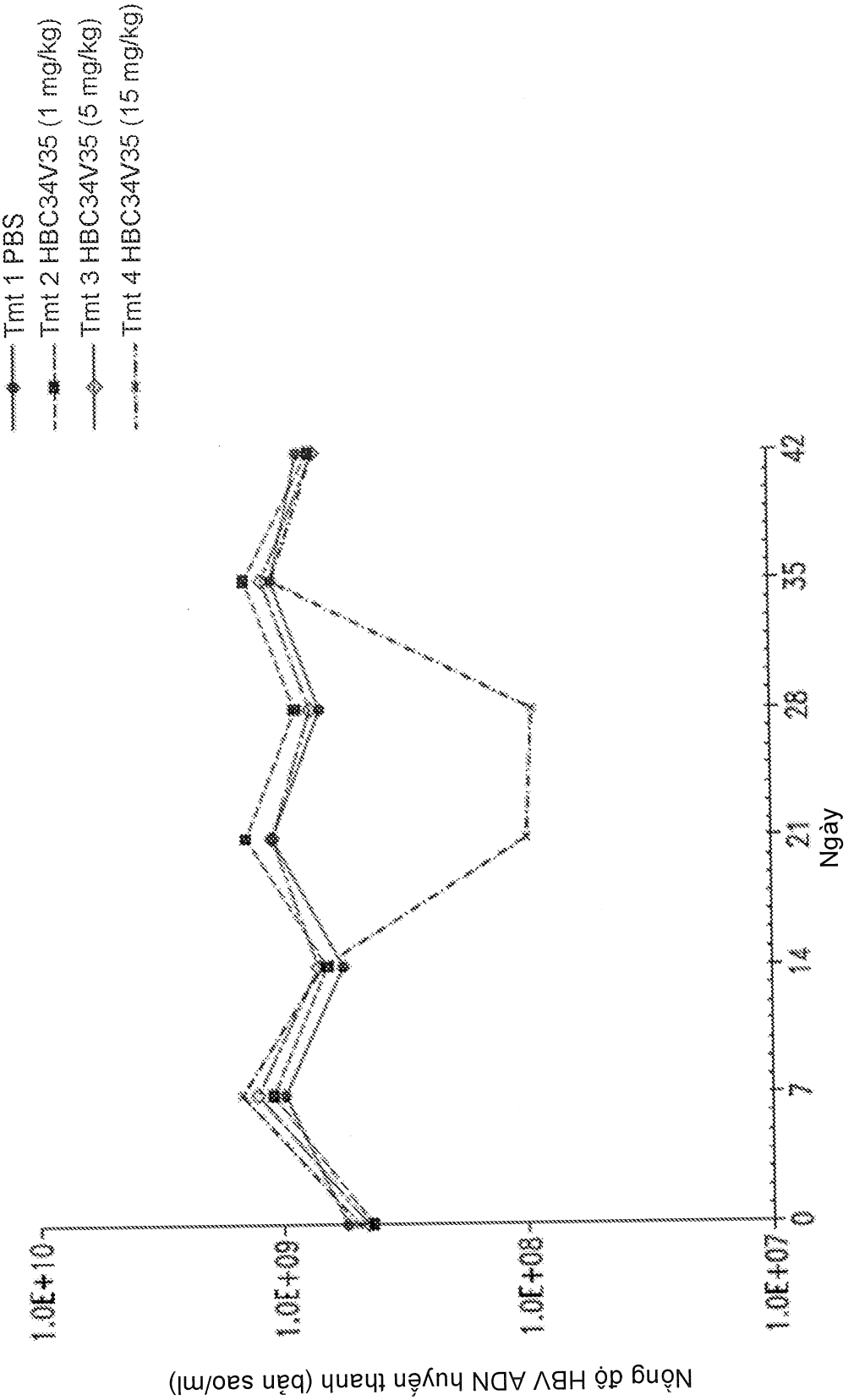

Tmt 1 PBS
Tmt 2 HBC34V35 (1 mg/kg)
Tmt 3 HBC34V35 (5 mg/kg)
Tmt 4 HBC34V35 (15 mg/kg)
1.0E+10
1.0E+09
1.0E+08
1.0E+07
0
7
14
21
28
35
42
Ngày
Nồng độ HBV ADN huyết thanh (bản sao/ml)

FIG. 5

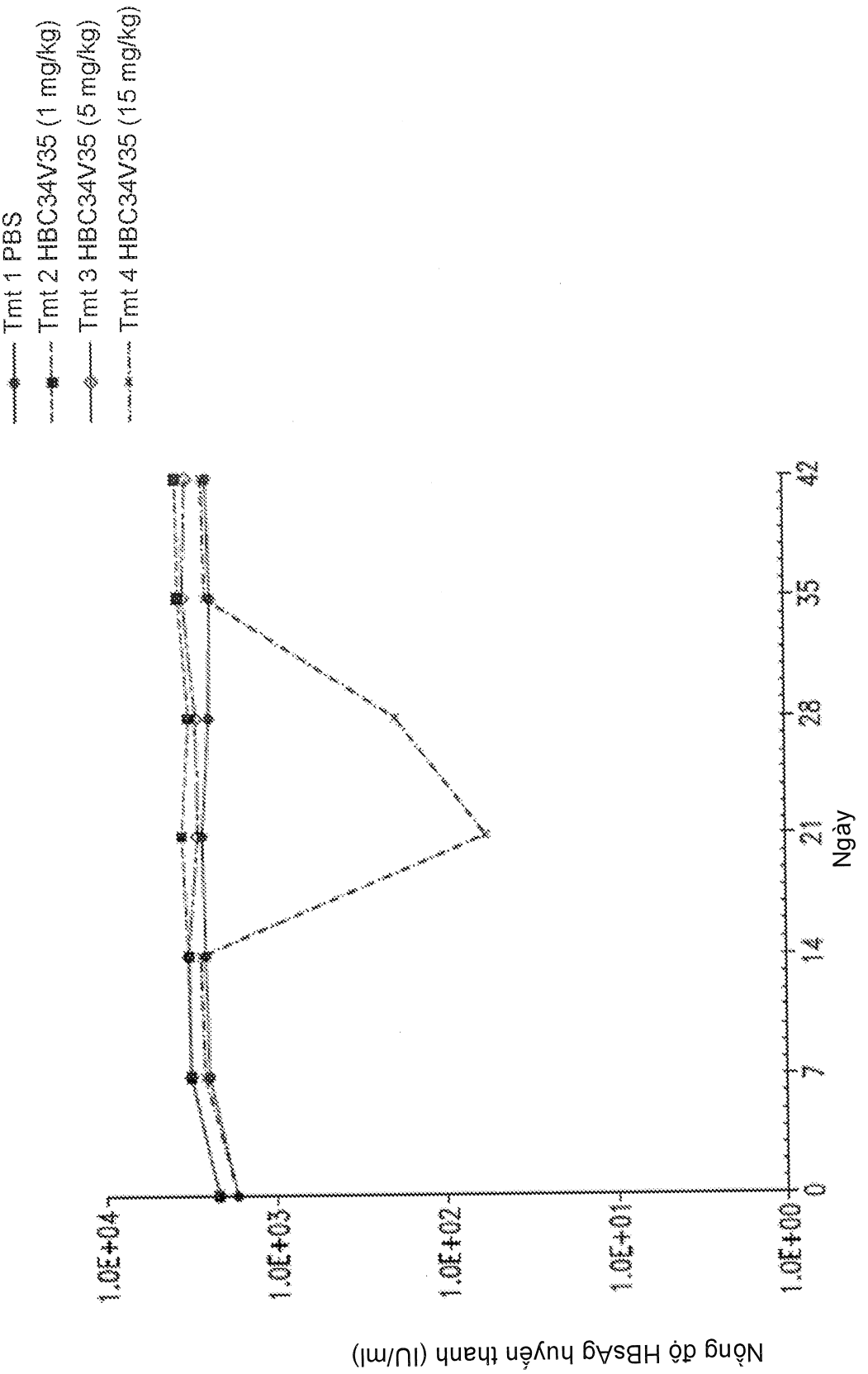

Tmt 1 PBS
Tmt 2 HBC34V35 (1 mg/kg)
Tmt 3 HBC34V35 (5 mg/kg)
Tmt 4 HBC34V35 (15 mg/kg)
1.0E+04
1.0E+03
1.0E+02
1.0E+01
1.0E+00
0
7
14
21
28
35
42
Ngày
Nồng độ HBsAg huyết thanh (IU/ml)

FIG. 6

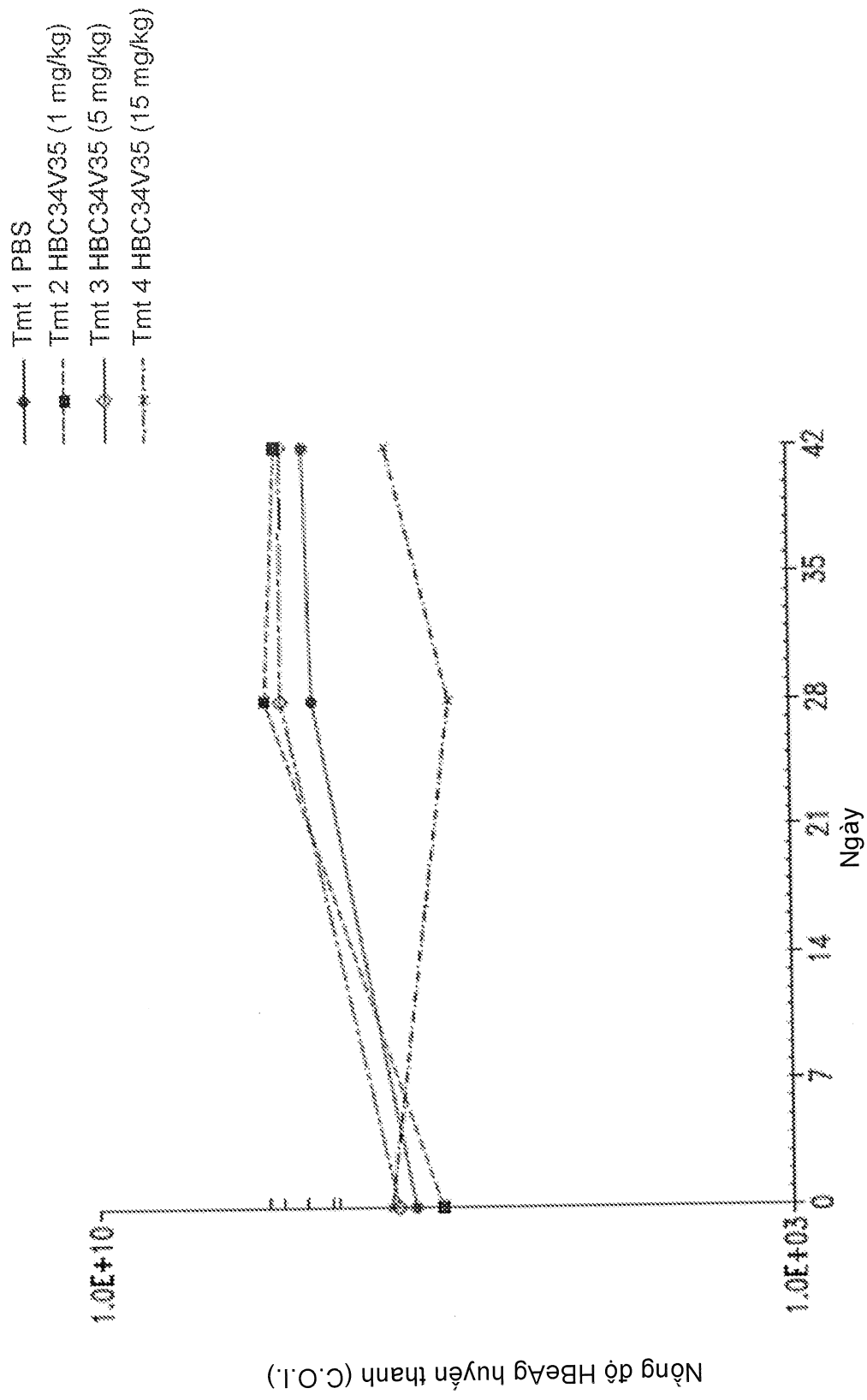

Tmt 1 PBS
Tmt 2 HBC34V35 (1 mg/kg)
Tmt 3 HBC34V35 (5 mg/kg)
Tmt 4 HBC34V35 (15 mg/kg)
1.0E+10
1.0E+03
Nồng độ HBeAg huyết thanh (C.O.I.)
0
7
14
21
28
35
42
Ngày

FIG. 7

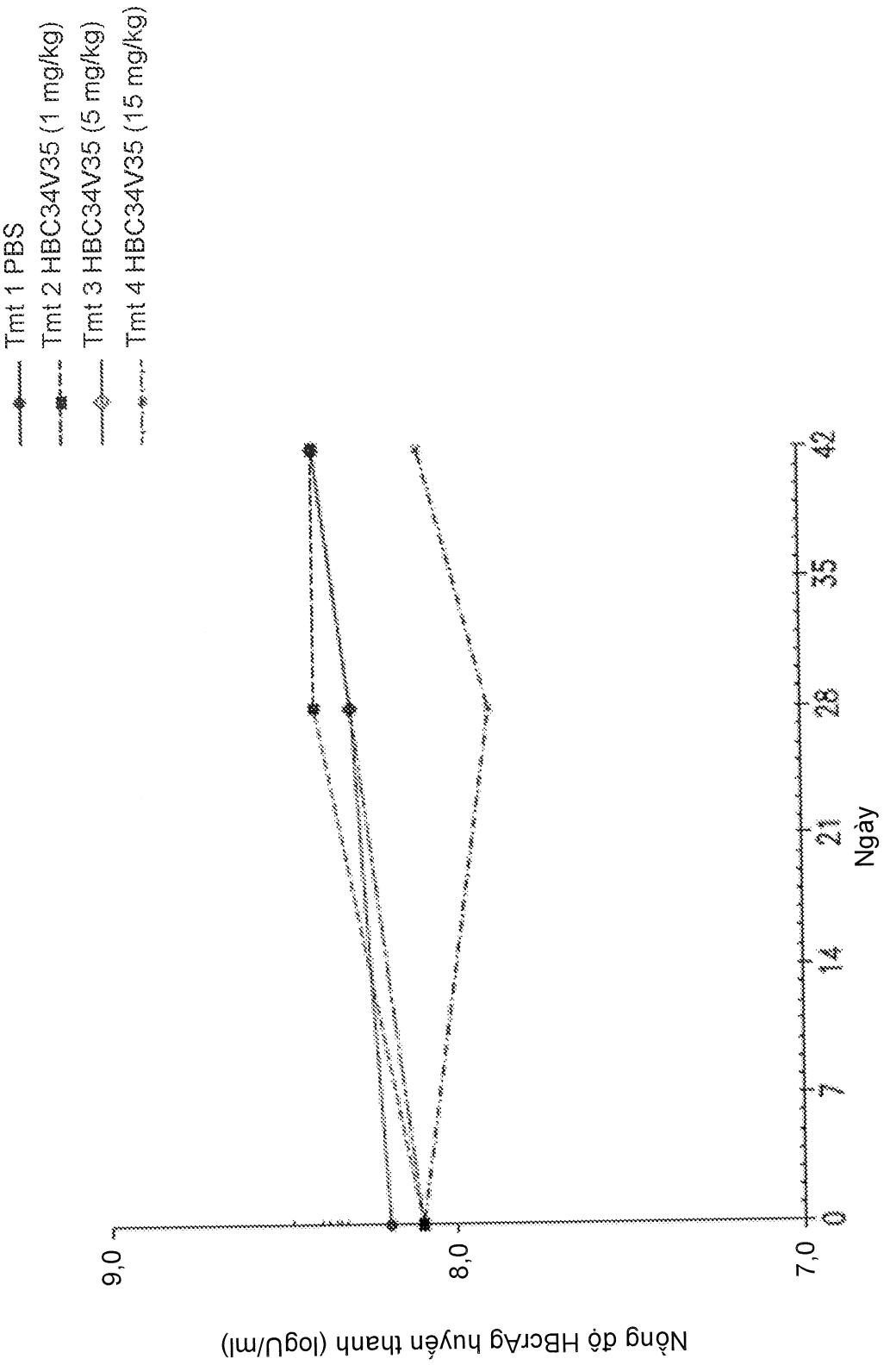

Tmt 1 PBS
Tmt 2 HBC34V35 (1 mg/kg)
Tmt 3 HBC34V35 (5 mg/kg)
Tmt 4 HBC34V35 (15 mg/kg)
Nồng độ HBcrAg huyết thanh (logU/ml)
9,0
8,0
7,0
0
7
14
21
28
35
42
Ngày

FIG. 8

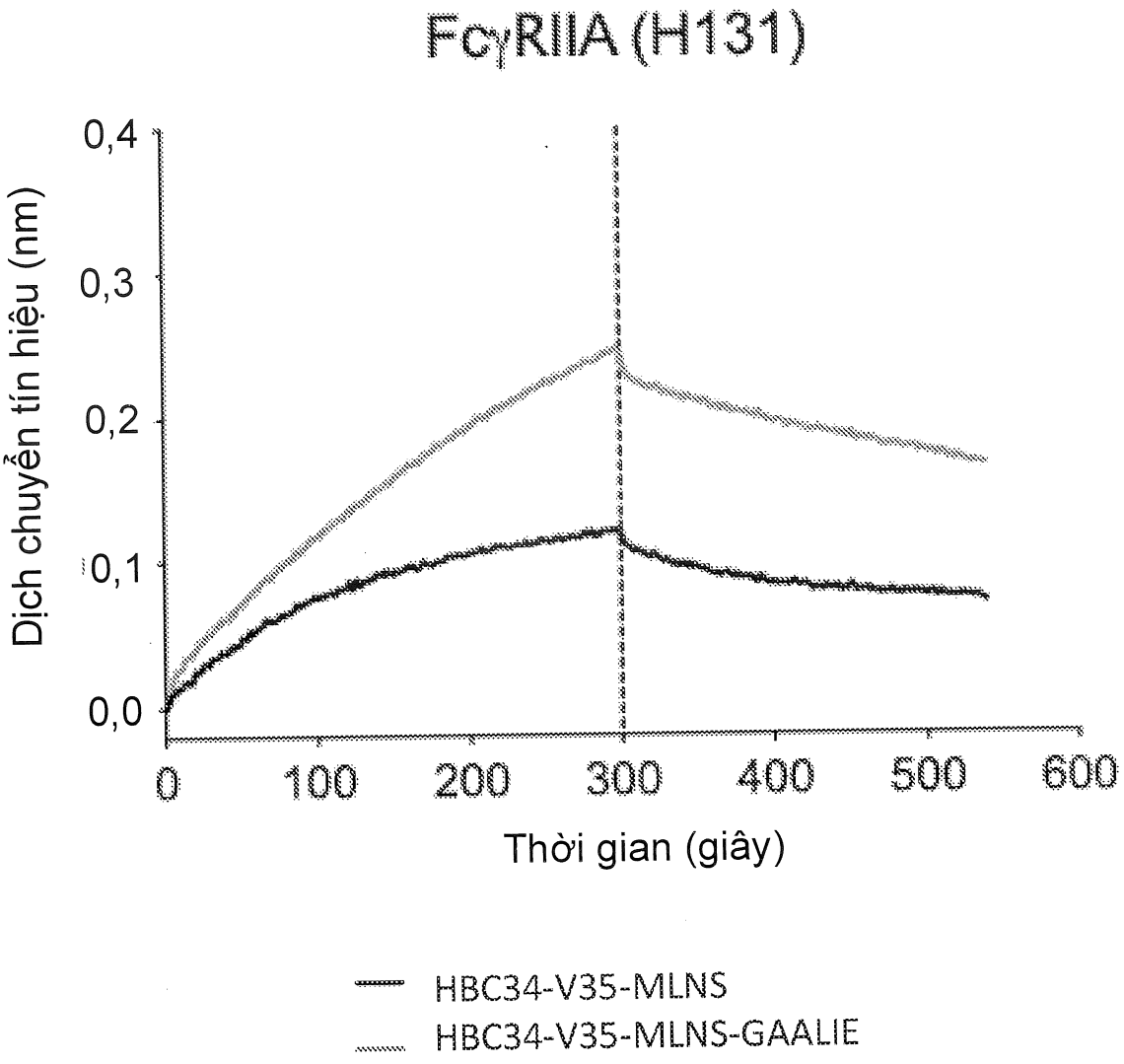

FcγRIIA (H131)
Dịch chuyển tín hiệu (nm)
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
0
100
200
300
400
500
600
Thời gian (giây)
HBC34-V35-MLNS
HBC34-V35-MLNS-GAALIE

FIG. 9A

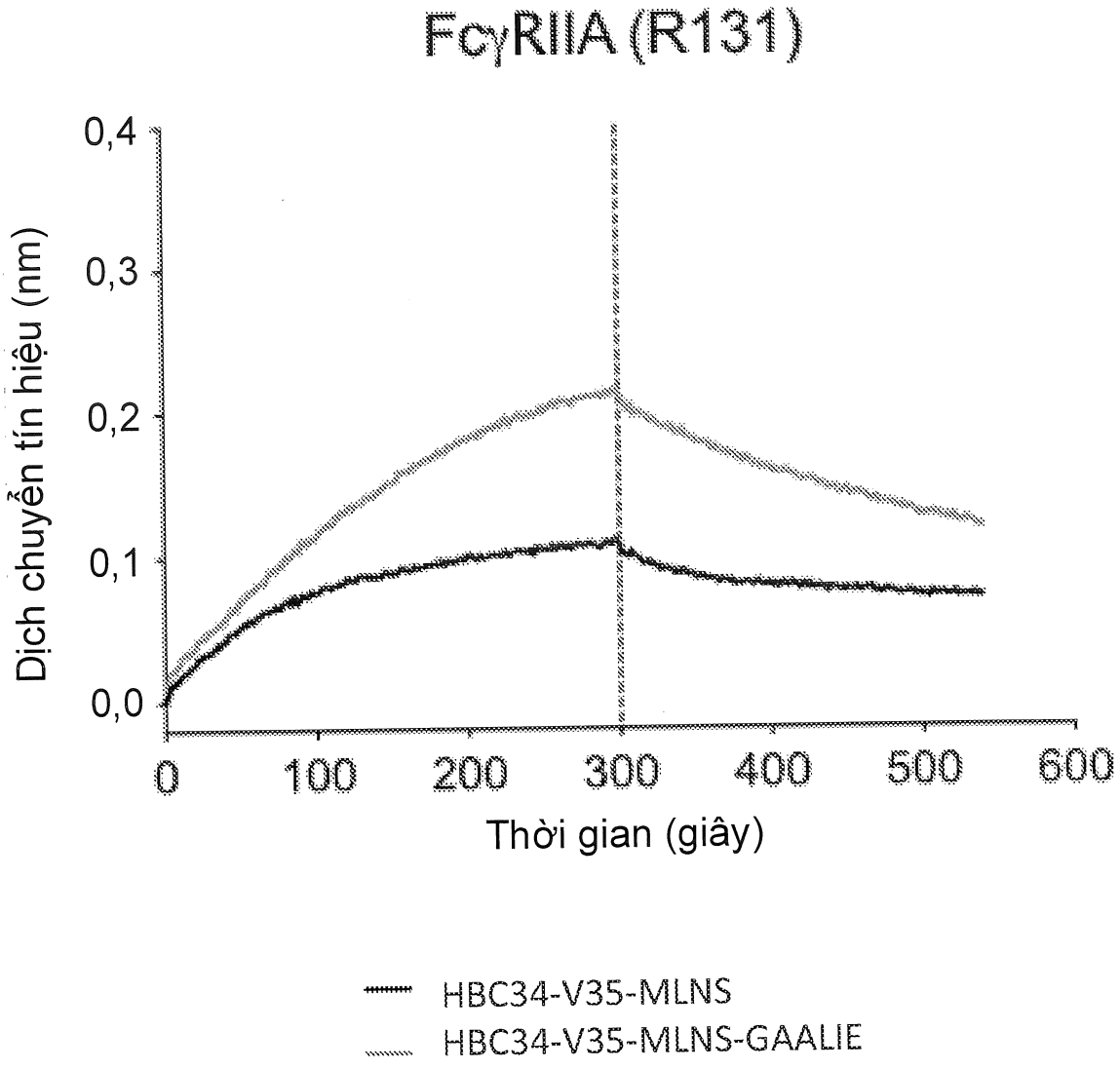

FcγRIIA (R131)
Dịch chuyển tín hiệu (nm)
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
0
100
200
300
400
500
600
Thời gian (giây)
HBC34-V35-MLNS
HBC34-V35-MLNS-GAALIE

FIG. 9B

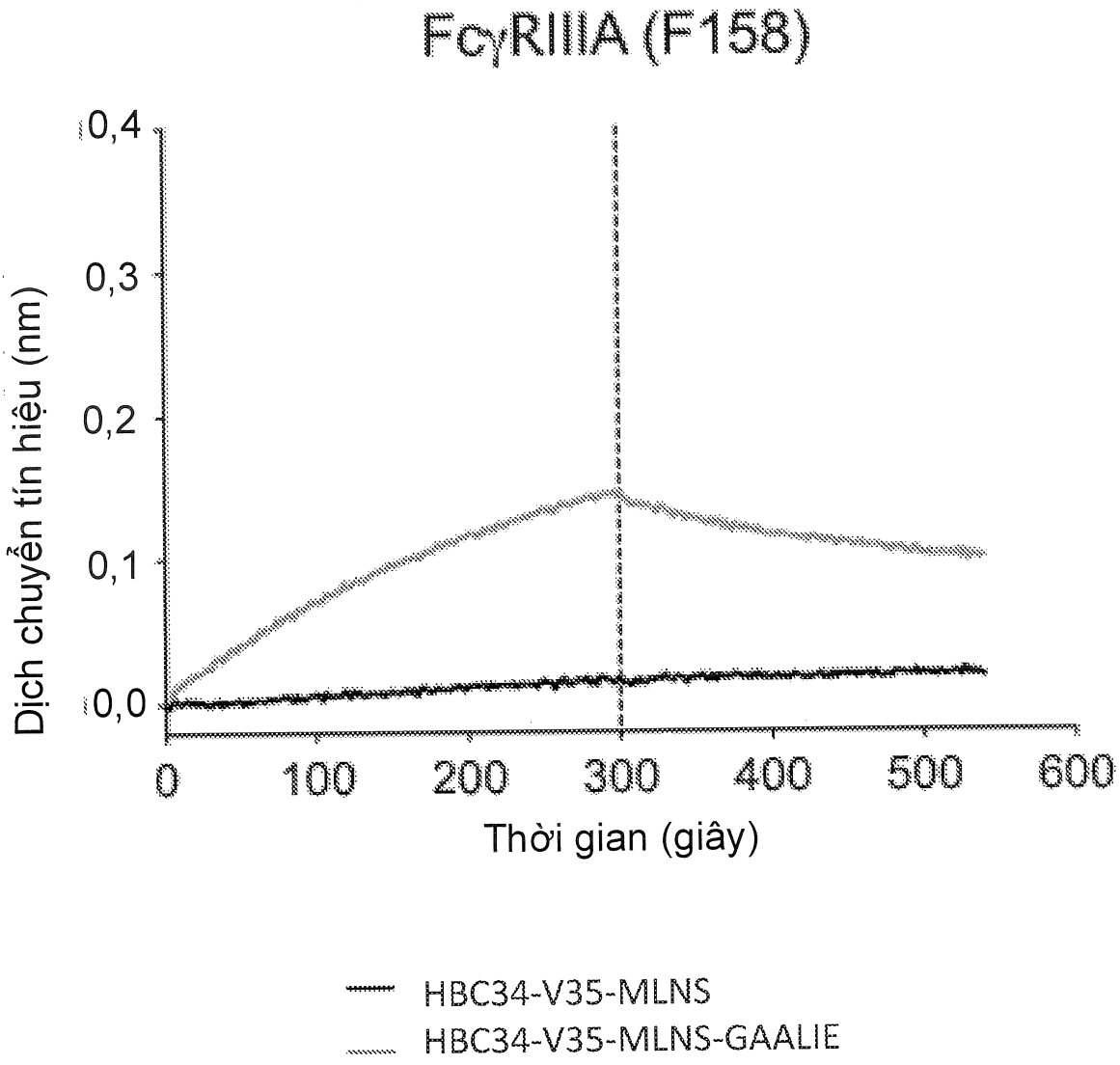

FcγRIIIA (F158)
Dịch chuyển tín hiệu (nm)
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
0
100
200
300
400
500
600
Thời gian (giây)
HBC34-V35-MLNS
HBC34-V35-MLNS-GAALIE

FIG. 9C

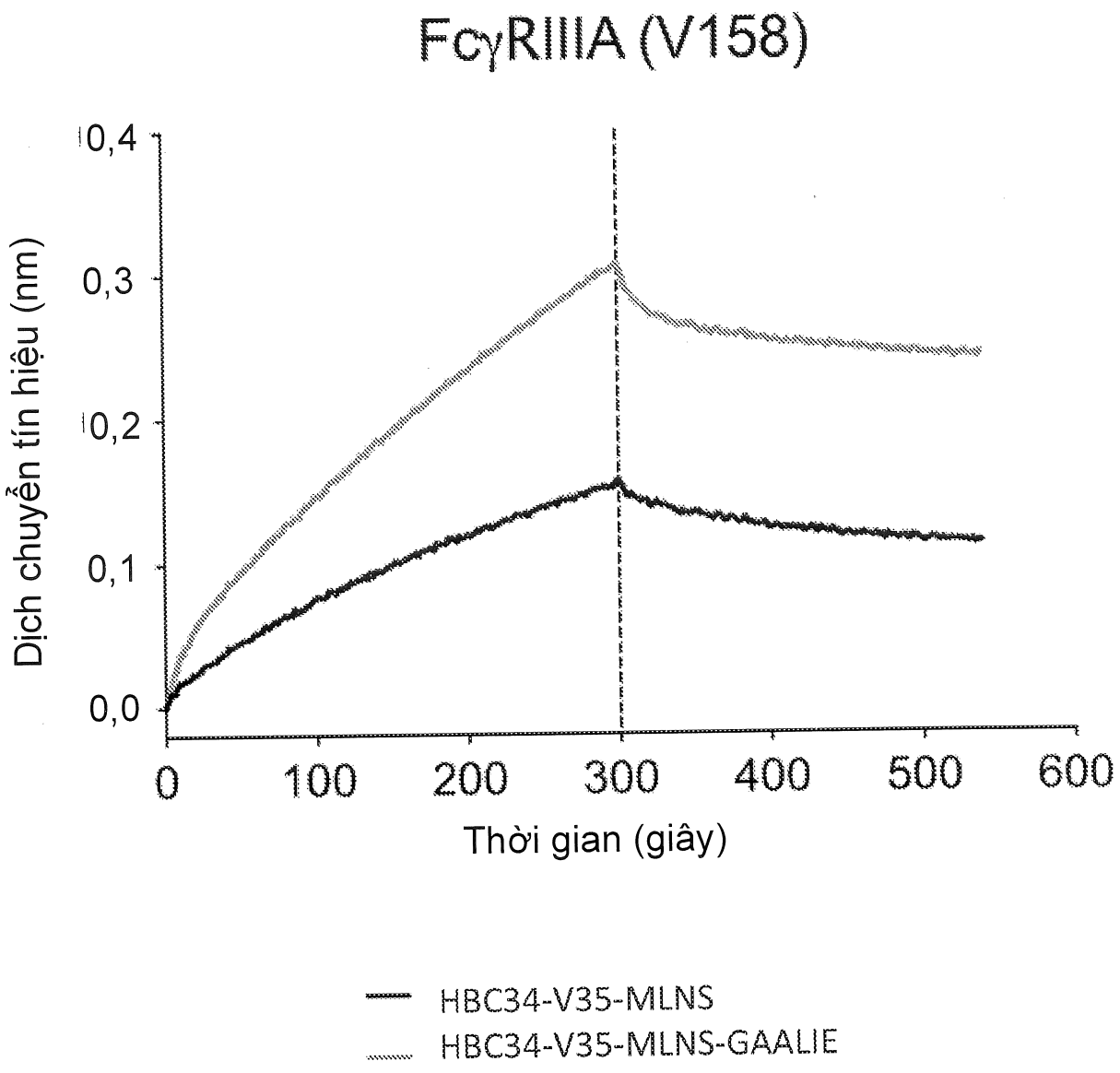

FcγRIIIA (V158)
Dịch chuyển tín hiệu (nm)
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
0
100
200
300
400
500
600
Thời gian (giây)
HBC34-V35-MLNS
HBC34-V35-MLNS-GAALIE

FIG. 9D

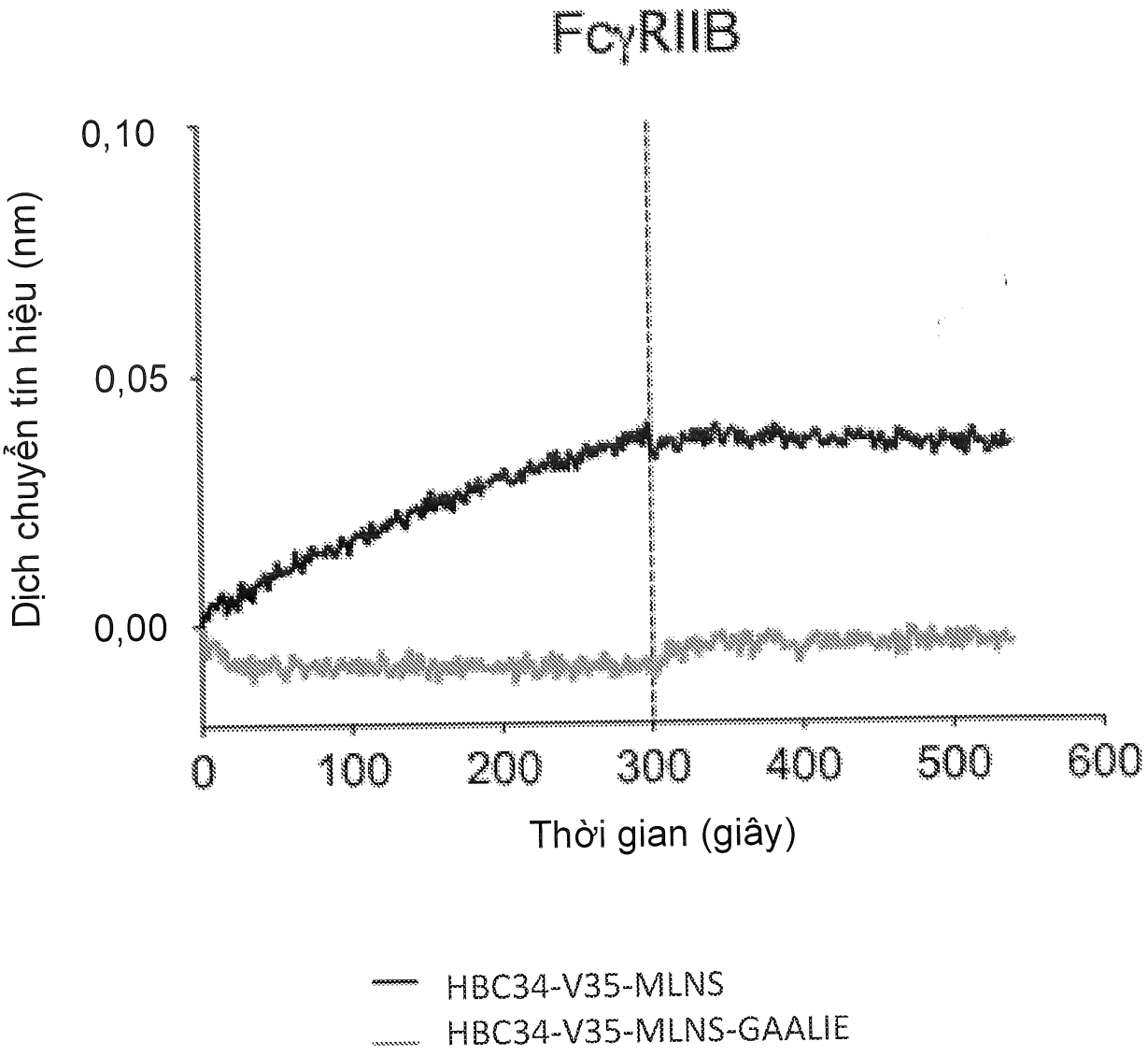

FcγRIIB
0,10
0,05
0,00
Dịch chuyển tín hiệu (nm)
0
100
200
300
400
500
600
Thời gian (giây)
HBC34-V35-MLNS
HBC34-V35-MLNS-GAALIE

FIG. 9E

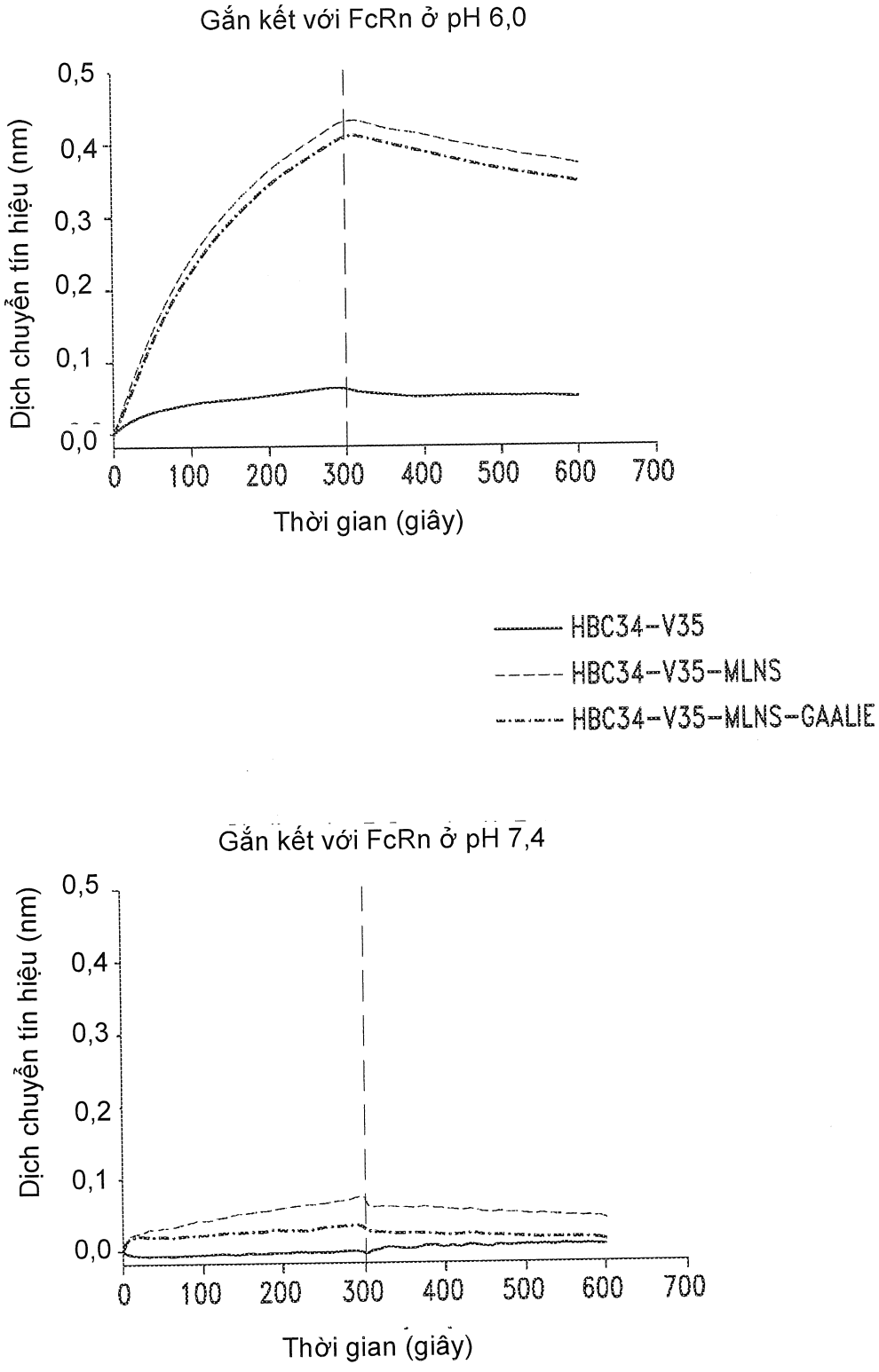

Gắn kết với FcRn ở pH 6,0
Dịch chuyển tín hiệu (nm)
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
0
100
200
300
400
500
600
700
Thời gian (giây)
HBC34-V35
HBC34-V35-MLNS
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
Gắn kết với FcRn ở pH 7,4
Dịch chuyển tín hiệu (nm)
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
0
100
200
300
400
500
600
700
Thời gian (giây)

FIG. 9F

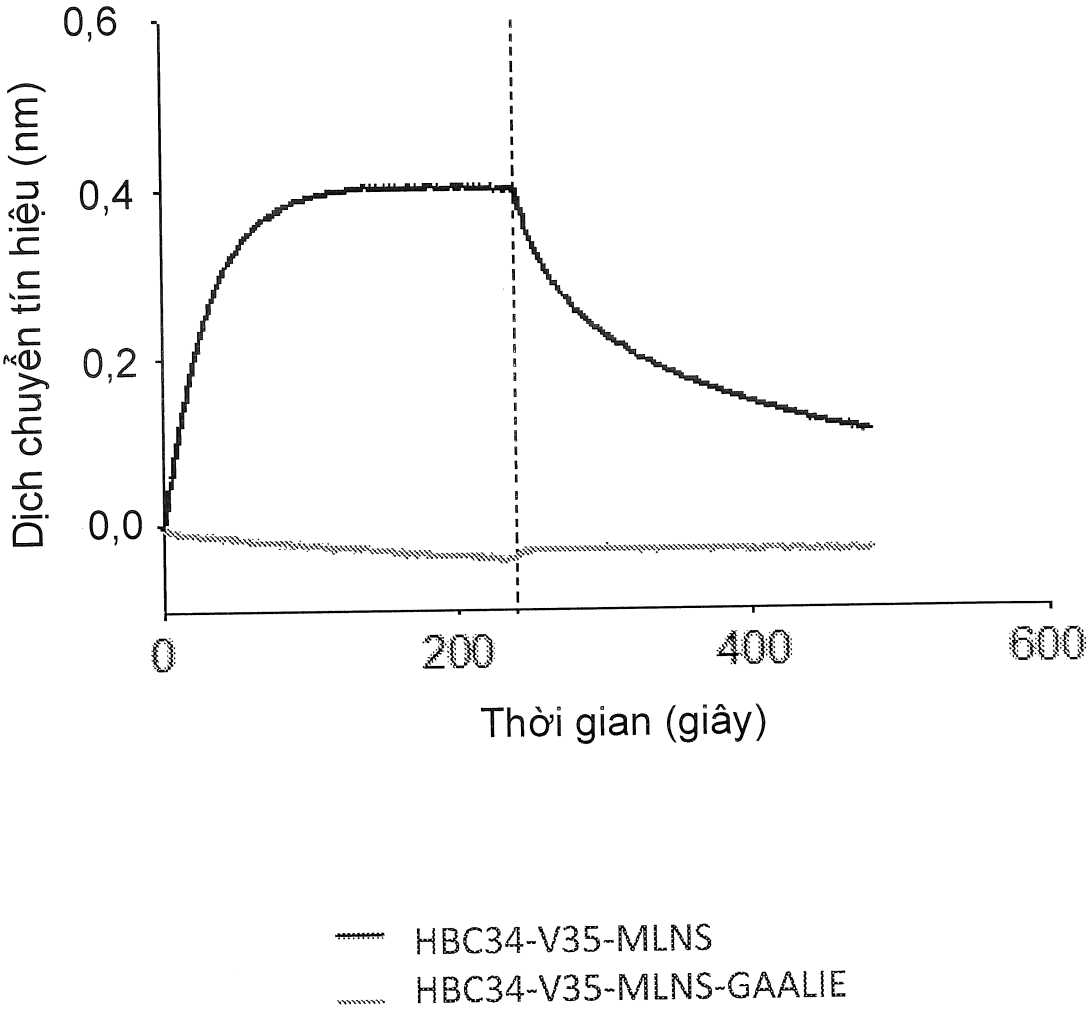

0,6
0,4
0,2
0,0
Dịch chuyển tín hiệu (nm)
0
200
400
600
Thời gian (giây)
HBC34-V35-MLNS
HBC34-V35-MLNS-GAALIE

FIG. 10

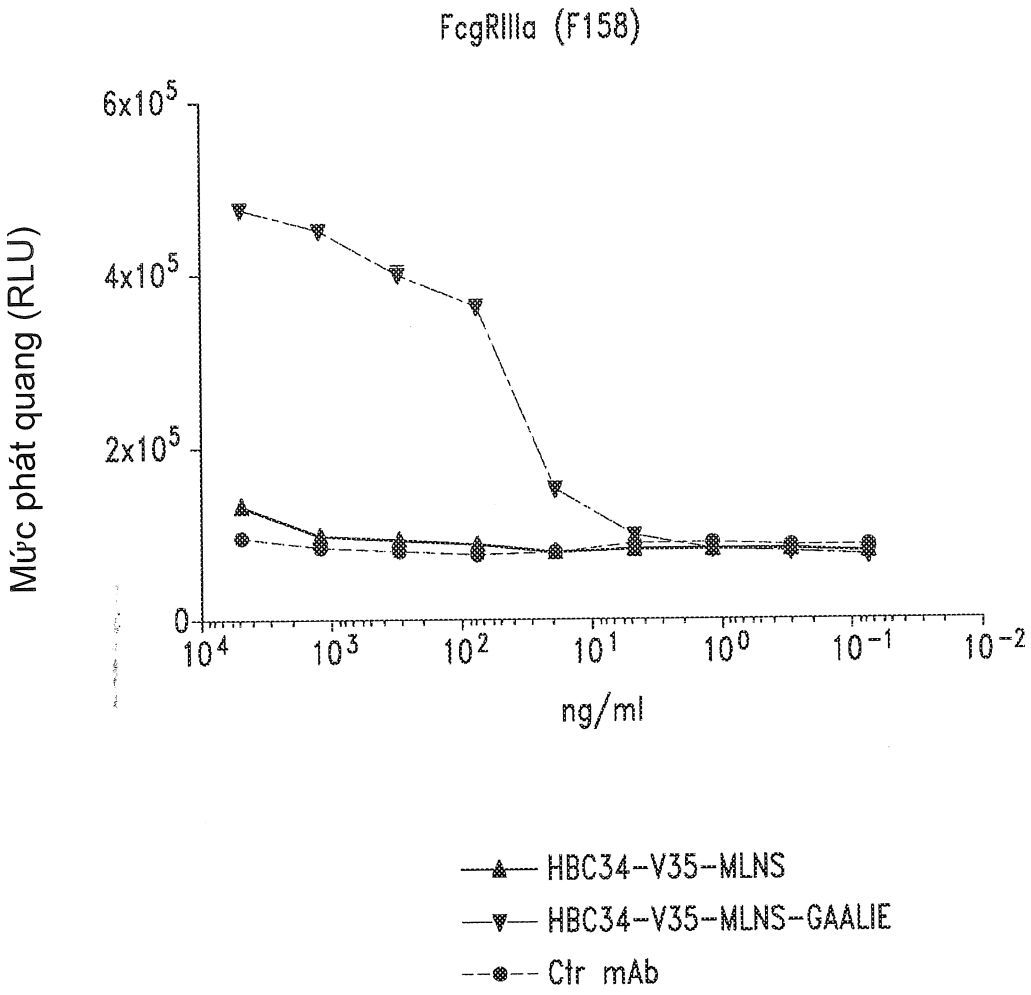

FcgRIIIa (F158)
Mức phát quang (RLU)
6x10^5
4x10^5
2x10^5
0
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
10^-1
10^-2
ng/ml
HBC34-V35-MLNS
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
Ctr mAb

FIG. 11A

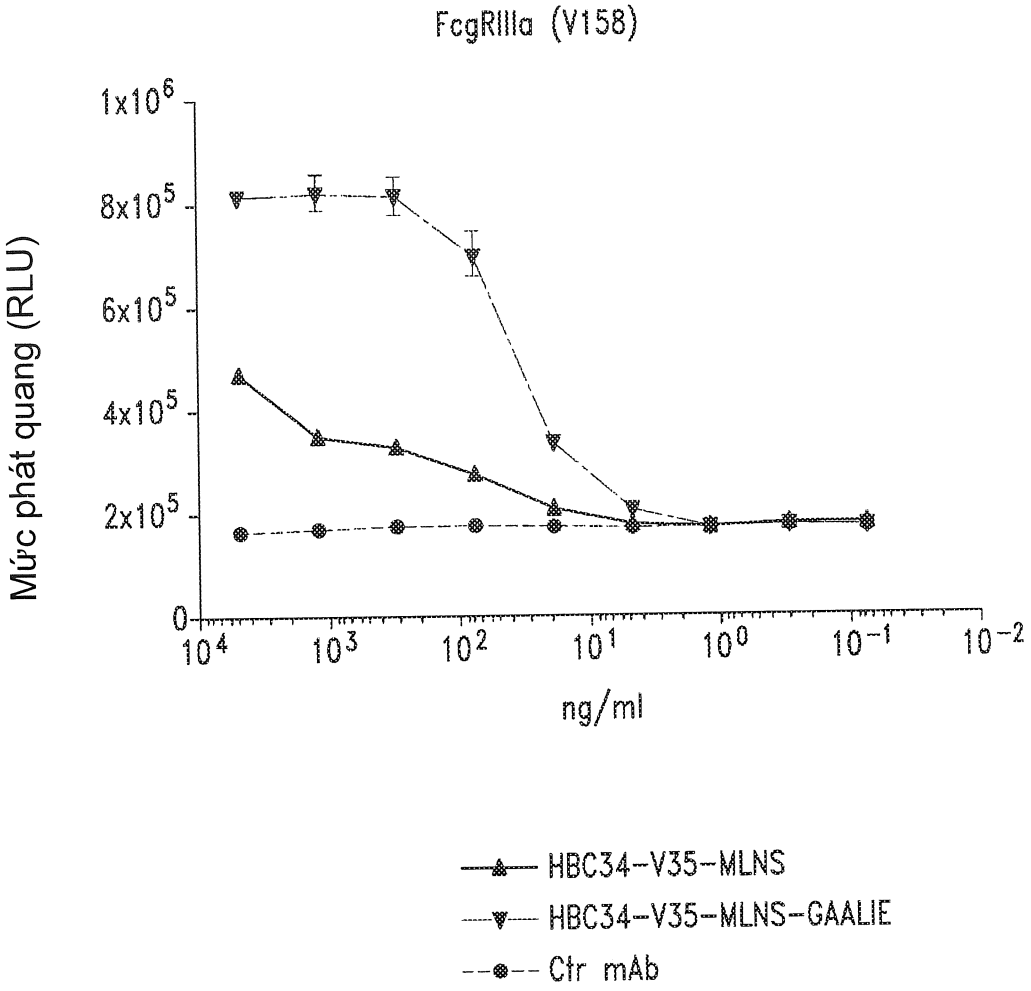

FcgRIIIa (V158)
Mức phát quang (RLU)
1x10^6
8x10^5
6x10^5
4x10^5
2x10^5
0
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
10^-1
10^-2
ng/ml
HBC34-V35-MLNS
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
Ctr mAb

FIG. 11B

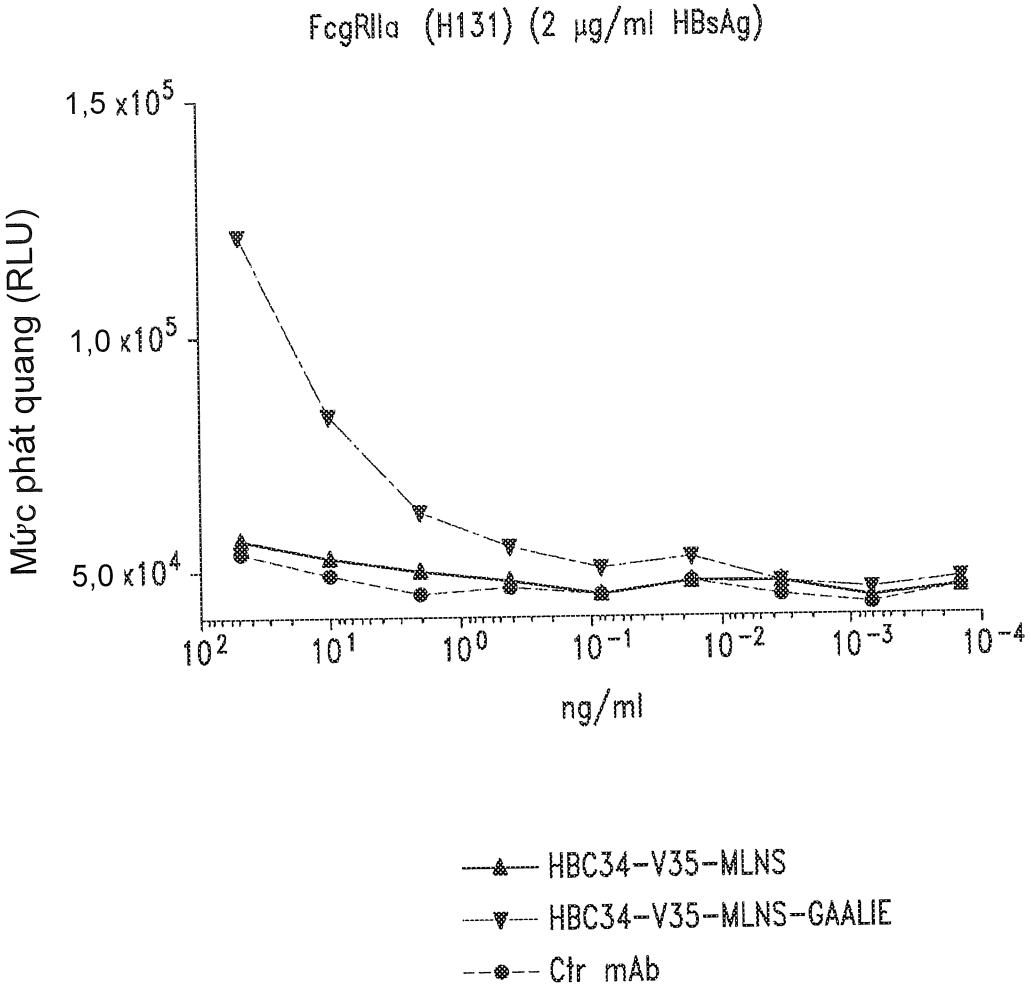

FcgRIIa (H131) (2 µg/ml HBsAg)
Mức phát quang (RLU)
1,5 x10^5
1,0 x10^5
5,0 x10^4
10^2
10^1
10^0
10^-1
10^-2
10^-3
10^-4
ng/ml
HBC34-V35-MLNS
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
Ctr mAb

FIG. 12A

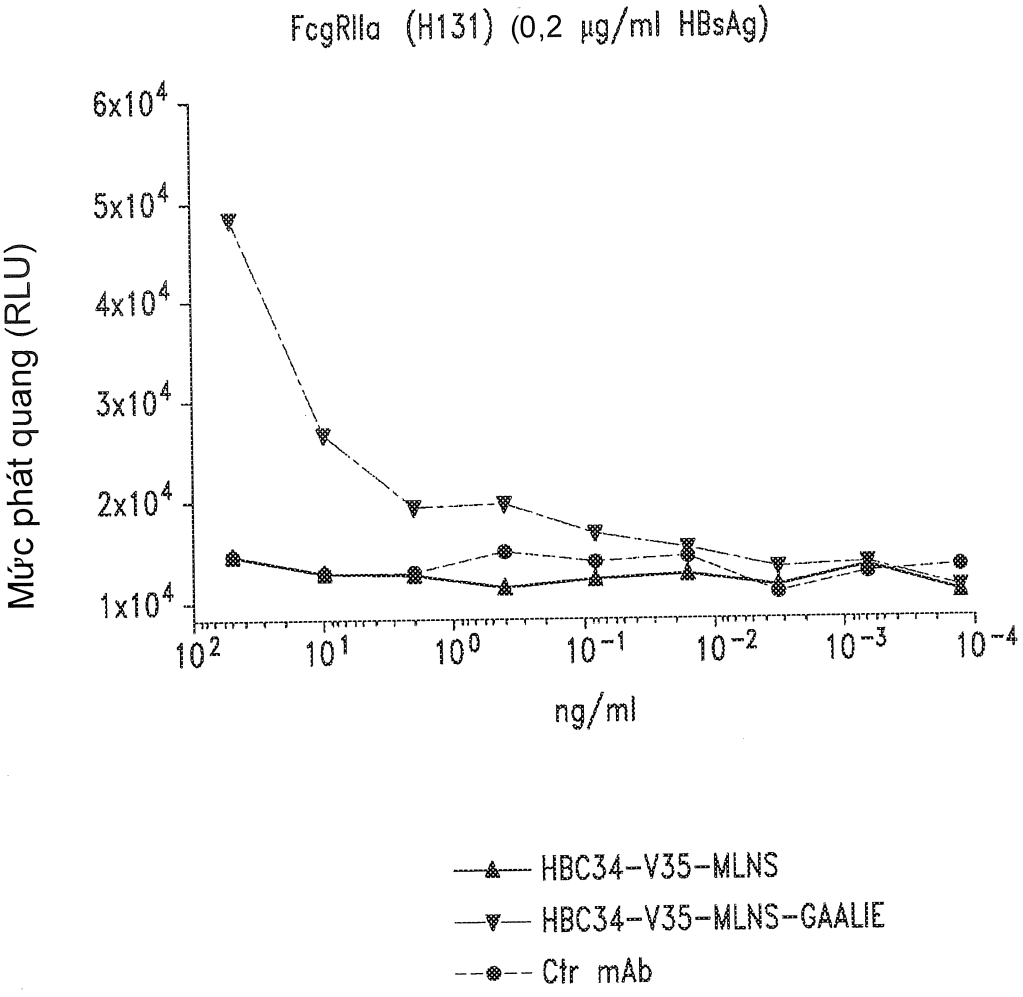

FcgRIIa (H131) (0,2 µg/ml HBsAg)
Mức phát quang (RLU)
6x10^4
5x10^4
4x10^4
3x10^4
2x10^4
1x10^4
10^2
10^1
10^0
10^-1
10^-2
10^-3
10^-4
ng/ml
HBC34-V35-MLNS
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
Ctr mAb

FIG. 12B

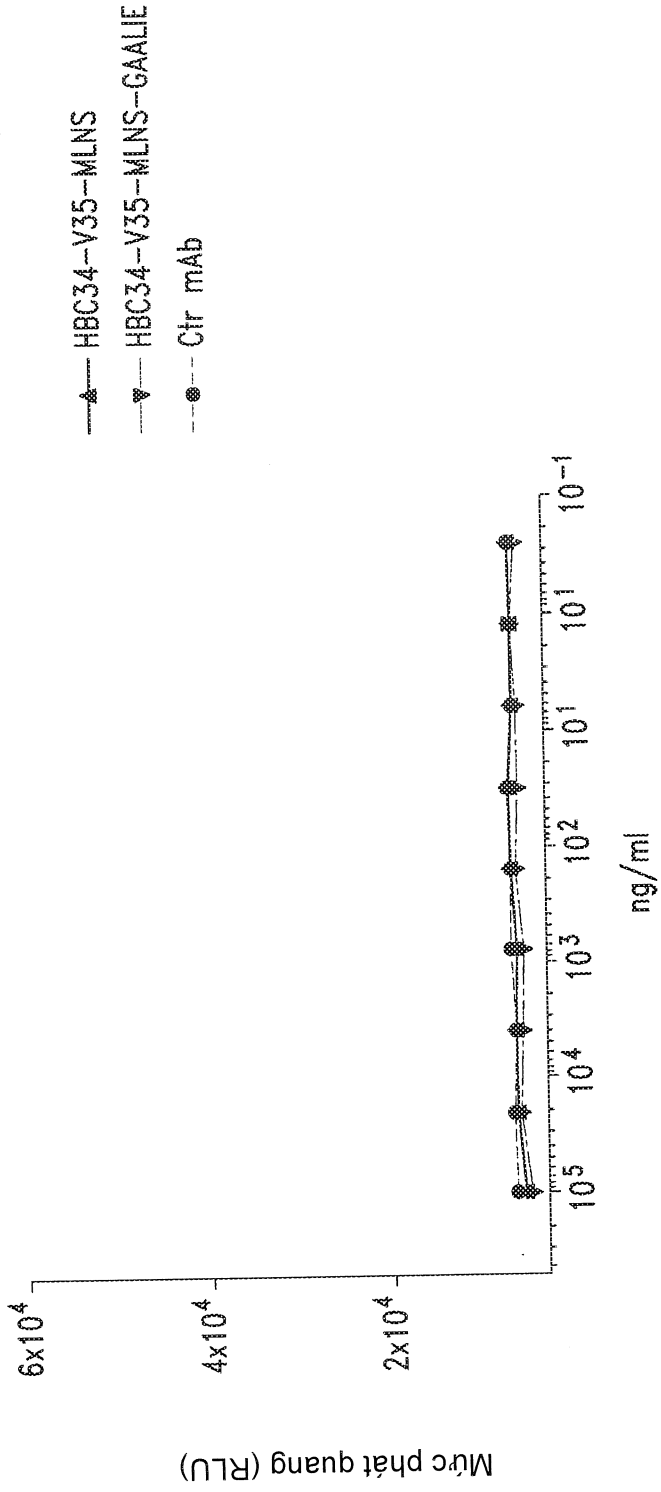

HBC34-V35-MLNS
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
Ctr mAb
FcgRIIb (1 µg/ml HBsAg)
Mức phát quang (RLU)
6x10^4
4x10^4
2x10^4
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^1
10^-1
ng/ml

FIG. 13A

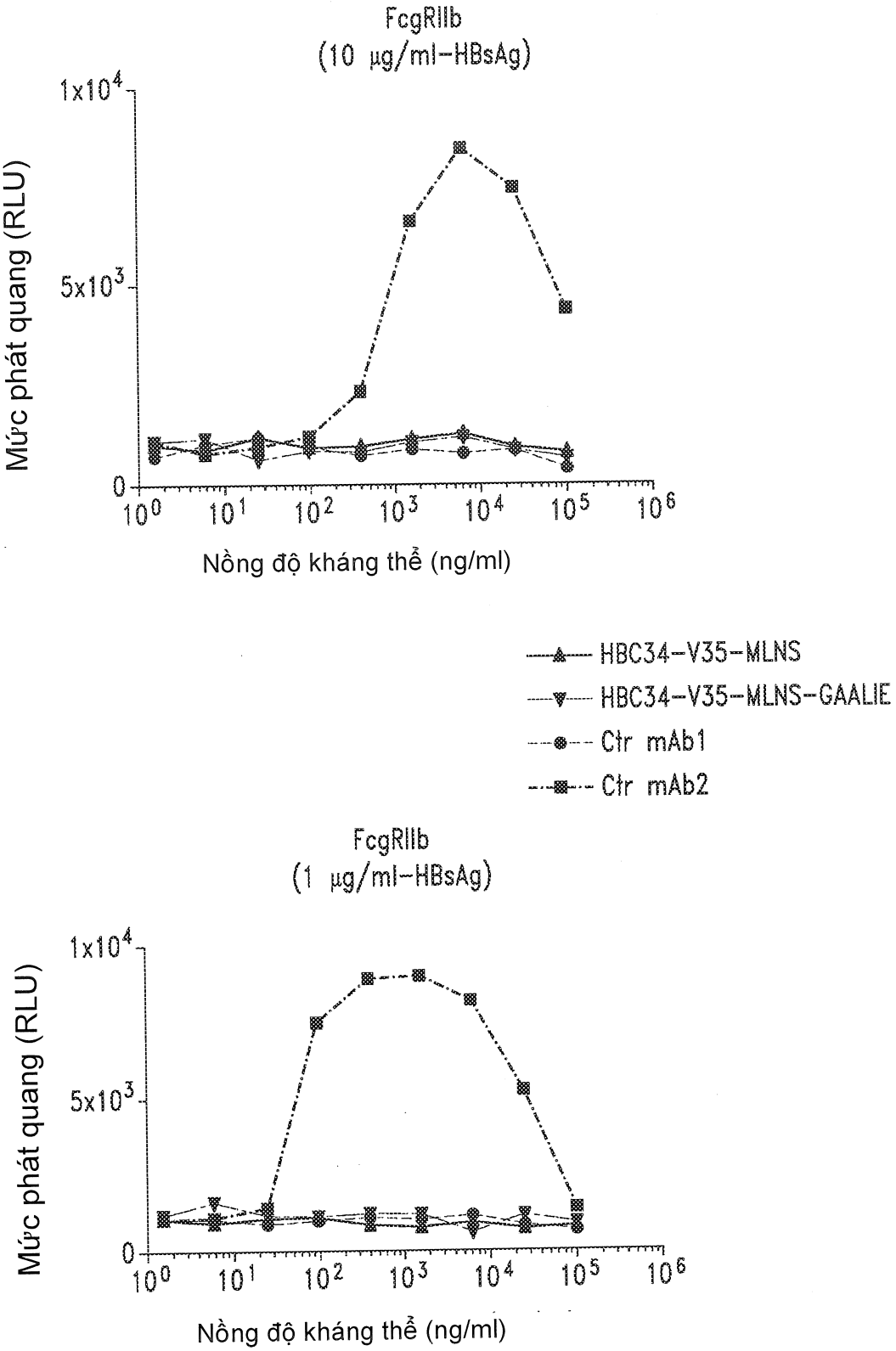

FcgRIIb
(10 µg/ml-HBsAg)
1x10^4
5x10^3
0
Mức phát quang (RLU)
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
Nồng độ kháng thể (ng/ml)
HBC34-V35-MLNS
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
Ctr mAb1
Ctr mAb2
FcgRIIb
(1 µg/ml-HBsAg)
1x10^4
5x10^3
0
Mức phát quang (RLU)
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6
Nồng độ kháng thể (ng/ml)

FIG. 13B

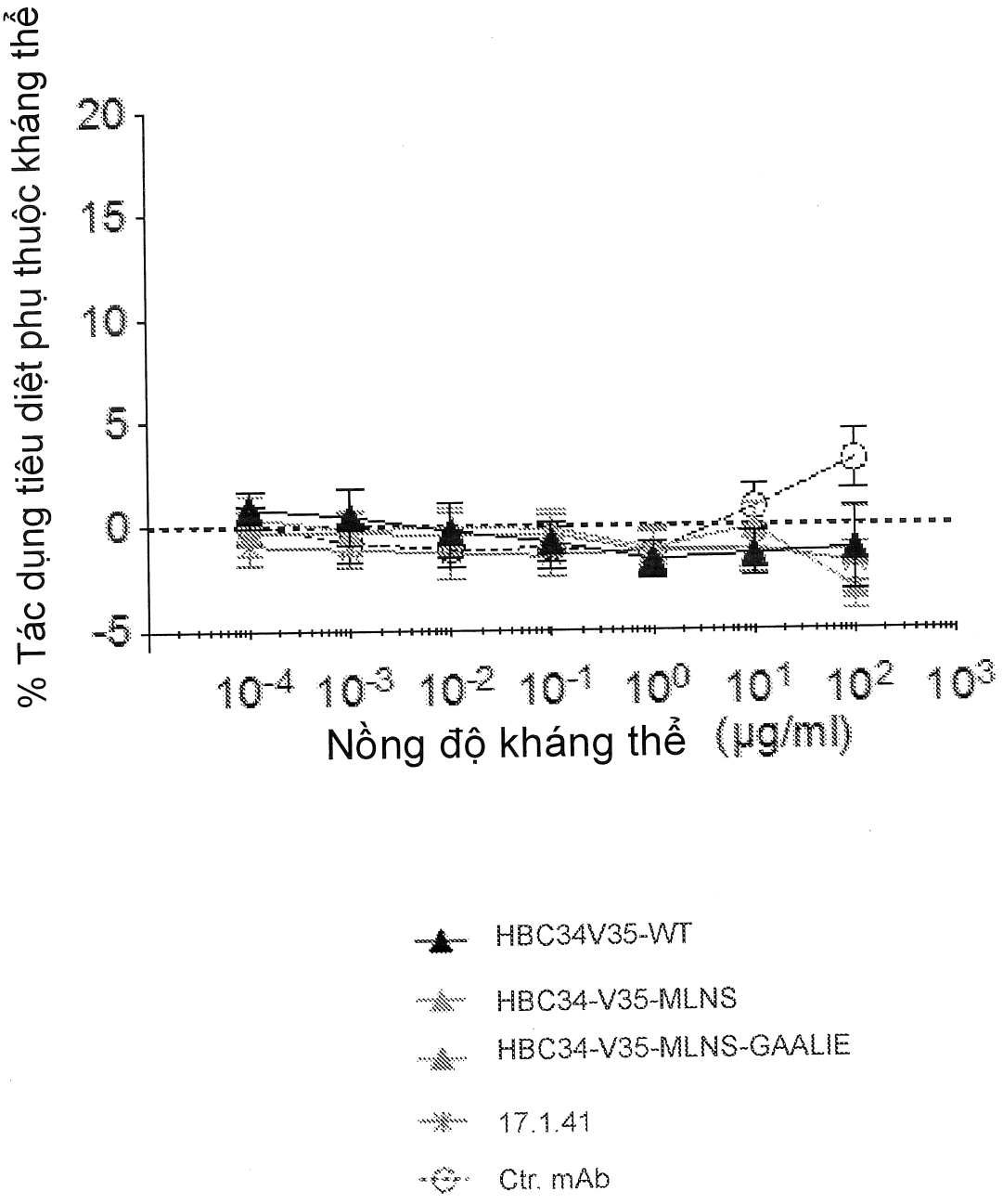

% Tác dụng tiêu diệt phụ thuộc kháng thể
20
15
10
5
0
-5
10^{-4} 10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3}
Nồng độ kháng thể (µg/ml)
HBC34V35-WT
HBC34-V35-MLNS
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
17.1.41
Ctr. mAb

FIG. 14A

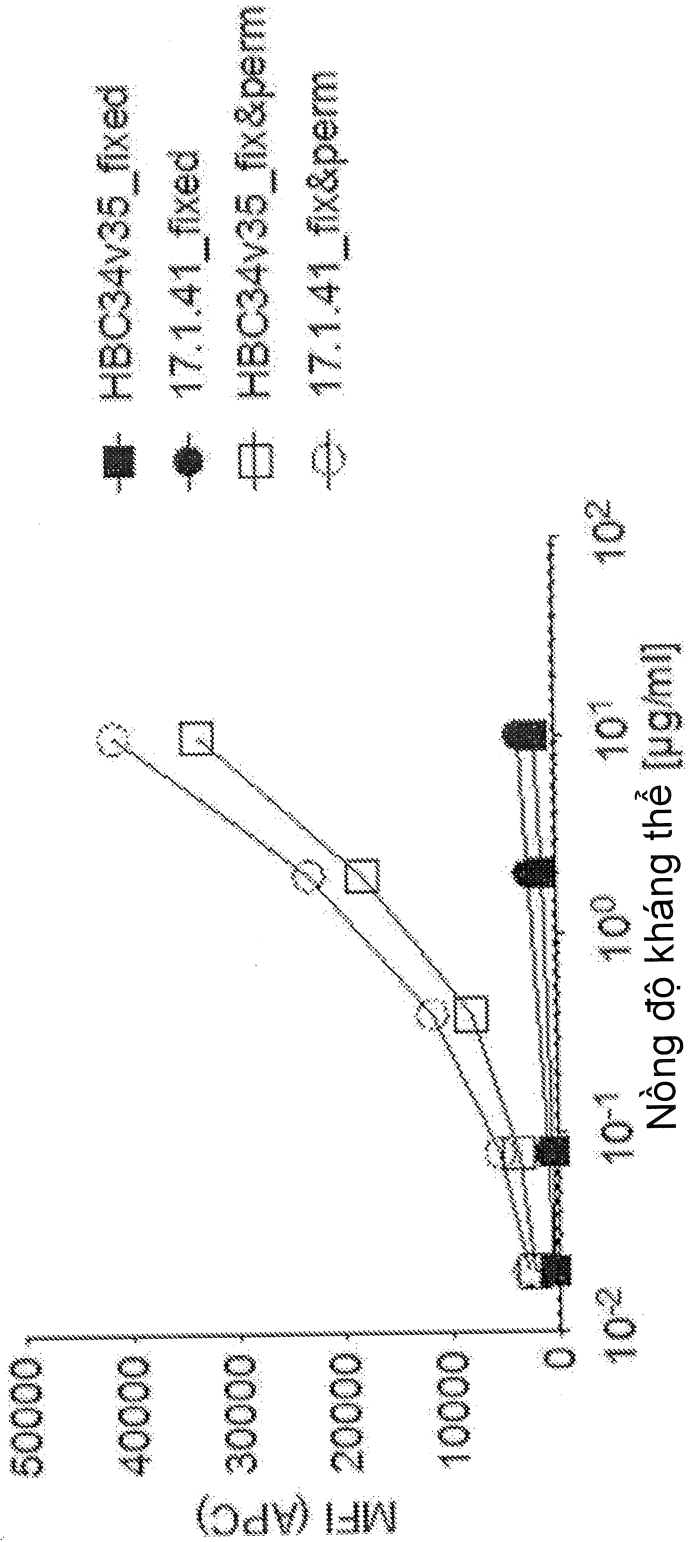

HBC34v35_fixed
17.1.41_fixed
HBC34v35_fix&perm
17.1.41_fix&perm
MFI (APC)
50000
40000
30000
20000
10000
0
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
Nồng độ kháng thể [µg/ml]

FIG. 14B

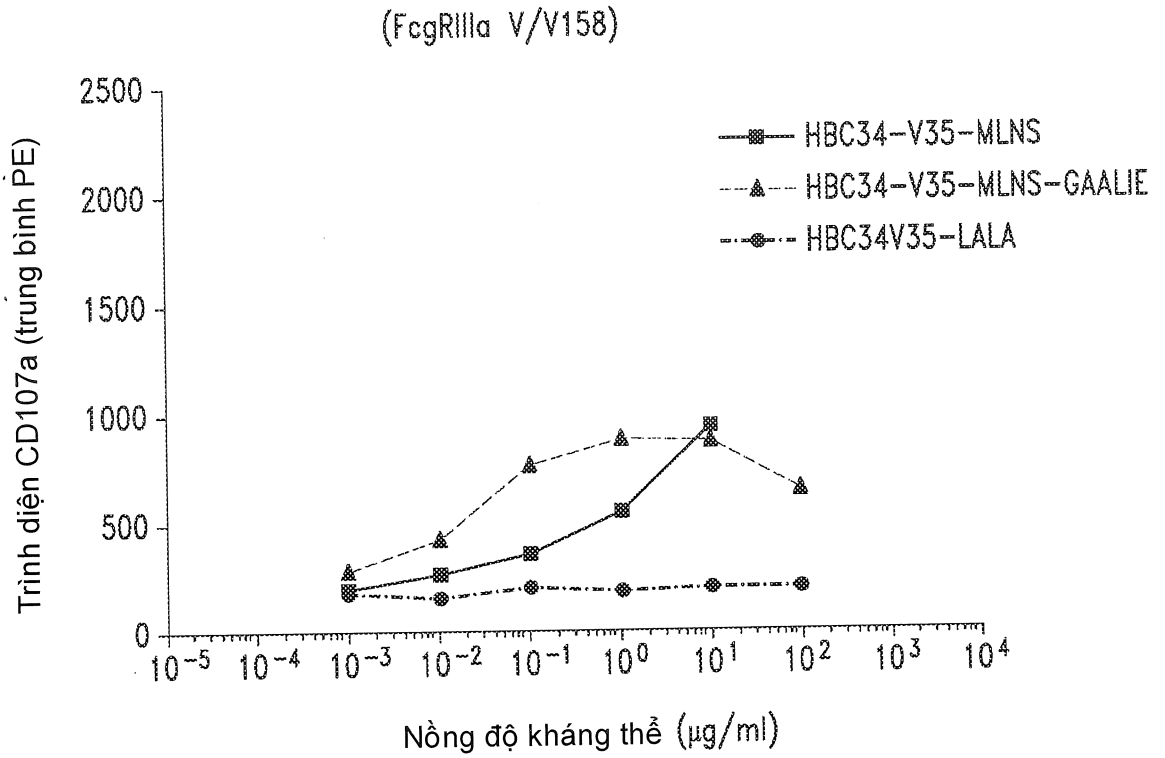

(FcgRIIIa V/V158)
Trình diện CD107a (trung bình PE)
2500
2000
1500
1000
500
0
HBC34-V35-MLNS
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34V35-LALA
10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} 10^{-2} 10^{-1} 10^{0} 10^{1} 10^{2} 10^{3} 10^{4}
Nồng độ kháng thể (µg/ml)

FIG. 15A

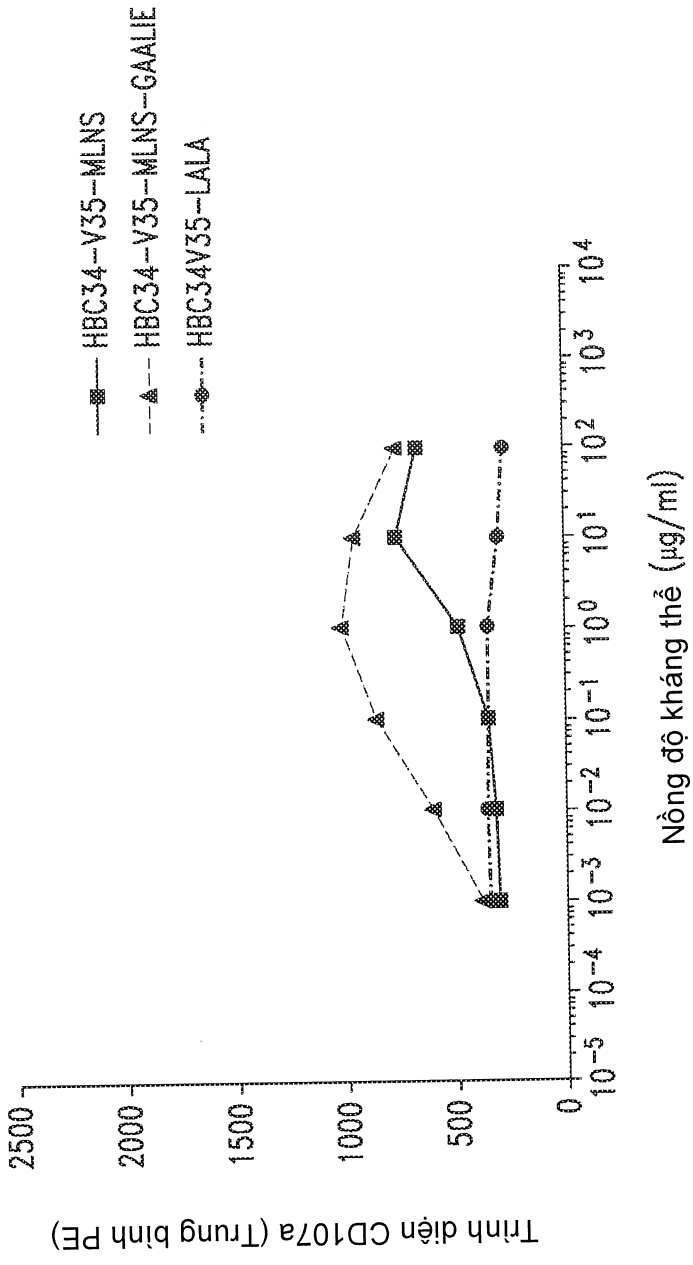

HBC34-V35-MLNS
HBC34-V35-MLNS-GAALIE
HBC34V35-LALA
(FcgRIIIa F/F158)
Trình diện CD107a (Trung bình PE)
Nồng độ kháng thể (µg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
10^{-5}
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
10^{3}
10^{4}

FIG. 15B

Phân tích tác dụng hiệp đồng/đối kháng đối với HBC34-V35-MLNS-GAALIE kết hợp với ETV

Chất đánh dấu	Hiệp đồng [μM 20%][a]	Đối kháng [μM 20%][a]	Bố trí
HBsAg	4,22	-12,04	Bổ sung
HBV DNA	0,19	-20,28	Bổ sung

a Các kết quả thể hiện giá trị trung bình của ba thí nghiệm độc lập, mỗi thí nghiệm đưa vào n=3 đĩa

FIG. 16

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Humabs BioMed SA
Corti, Davide

<120> KHÁNG THỂ TRUNG HÒA VIRUT VIÊM GAN B, DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

<130> 930485.402WO

<140> PCT
<141> 18-12-2019

<150> US 62/860,085
<151> 11-06-2019

<150> US 62/782,274
<151> 19-12-2018

<160> 139

<170> FastSEQ cho Windows phiên bản 4.0

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)...(11)
<223> Xaa = axit amin bất kỳ

<400> 1
Xaa Xaa Xaa Thr Cys Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Gly
1 5 10

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> 1
<223> Xaa = P, T hoặc S,

<220>
<221> BIẾN THỂ

<222> 2
<223> Xaa = C hoặc S,

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> 3
<223> Xaa = R, K, D hoặc I,

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> 6
<223> Xaa = M hoặc T

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> 7
<223> Xaa = T, A hoặc I

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> 8
<223> Xaa = T, P hoặc L

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)...(10)
<223> Xaa = Q, H hoặc L.

<400> 2
Xaa Xaa Xaa Thr Cys Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Gly
1 5 10

<210> 3
<211> 226
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> Miền S của HBsAg (Số truy cập Ngân hàng gen J02203)

<400> 3
Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
1 5 10 15
Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
20 25 30
Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys
35 40 45
Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
50 55 60
Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
65 70 75 80
Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val

```
                85                  90                  95
Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
            100                 105                 110
Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala
        115                 120                 125
Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
    130                 135                 140
Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys
145                 150                 155                 160
Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
                165                 170                 175
Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
            180                 185                 190
Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile
        195                 200                 205
Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
    210                 215                 220
Tyr Ile
225
```

<210> 4
<211> 226
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> Miền S của HBsAg (Số truy cập Ngân hàng gen FJ899792)

<400> 4

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

```
            180                 185                 190
Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Thr
        195                 200                 205
Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
    210                 215                 220
Tyr Ile
225
```

<210> 5
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> J02203 (D, ayw3)

<400> 5

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

<210> 6
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> FJ899792 (D, adw2)

<400> 6

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

<210> 7
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> AM282986 (A)

<400> 7
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Thr Thr Thr Thr
1 5 10 15
Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser
20 25 30
Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu
50 55 60
Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 8
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> D23678 (B1)

<400> 8
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15
Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30
Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu
50 55 60
Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 9
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> AB117758 (C1)

<400> 9
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr
1 5 10 15
Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30
Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu

50 55 60
Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 10
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> AB205192 (E)

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

<210> 11
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> X69798 (F4)

<400> 11
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Ser Thr Thr Thr
1 5 10 15
Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Leu Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30
Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Ser Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Leu Gly Lys Tyr Leu Trp Glu
50 55 60
Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 12
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> AF160501 (G)

<400> 12
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15
Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser
20 25 30
Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu
50 55 60
Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 13
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> AY090454 (H)

<400> 13
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Ser Thr Thr Thr
1 5 10 15
Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Leu Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30
Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Tyr Leu Trp Glu
50 55 60
Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 14
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> AF241409 (I)

<400> 14
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15
Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser
20 25 30
Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu
50 55 60
Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 15
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> AB486012 (J)

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

<210> 16
<211> 73
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg Y100C/P120T

<400> 16
Cys Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr
1 5 10 15
Thr Gly Thr Gly Thr Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr
20 25 30
Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys
35 40 45
Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp
50 55 60
Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 17
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg P120T

<400> 17
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Thr Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser

```
            20                  25                  30
Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
        35                  40                  45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
    50                  55                  60
Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65                  70
```

<210> 18
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg P120T/S143L

```
<400> 18
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1               5                  10                  15
Gly Thr Gly Thr Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
            20                  25                  30
Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Leu Asp Gly Asn Cys Thr
        35                  40                  45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
    50                  55                  60
Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65                  70
```

<210> 19
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg C121S

```
<400> 19
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
 1               5                  10                  15
Gly Thr Gly Pro Ser Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
            20                  25                  30
Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
        35                  40                  45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
    50                  55                  60
Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65                  70
```

<210> 20
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg R122D

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

<210> 21
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg R122I

<400> 21
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Pro Cys Ile Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30
Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60
Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 22
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg T123N

<400> 22
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Pro Cys Arg Asn Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30
Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu

50 55 60
Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 23
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg Q129H

<400> 23
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala His Gly Thr Ser
20 25 30
Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60
Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 24
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg Q129L

<400> 24
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Leu Gly Thr Ser
20 25 30
Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60
Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 25
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg M133H

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

<210> 26
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg M133L

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

<210> 27
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg M133T

<400> 27
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30
Thr Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60
Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 28
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg K141E

<400> 28
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30
Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Glu Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60
Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 29
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg P142S

<400> 29
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30
Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Ser Ser Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60
Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 30
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg S143K

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

20 25 30
Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Lys Asp Gly Asn Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60
Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 31
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg D144A

<400> 31
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30
Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Ala Gly Asn Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60
Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 32
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg G145R

<400> 32
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30
Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Arg Asn Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60
Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

<210> 33
<211> 72
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> HBsAg N146A

<400> 33
Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr
1 5 10 15
Gly Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30
Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Ala Cys Thr
35 40 45
Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu
50 55 60
Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp
65 70

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 CDRH1

<400> 34
Gly Arg Ile Phe Arg Ser Phe Tyr
1 5

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 CDRH2

<400> 35
Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys
1 5

<210> 36
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 CDRH3

<400> 36
Ala Ala Trp Ser Gly Asn Ser Gly Gly Met Asp Val
1 5 10

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 CDRL1

<400> 37
Lys Leu Gly Asn Lys Asn
1 5

<210> 38
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 CDRL2

<400> 38
Glu Val Lys
1

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 CDRL2 dài

<400> 39
Val Ile Tyr Glu Val Lys Tyr Arg Pro
1 5

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 CDRL3

<400> 40
Gln Thr Trp Asp Ser Thr Thr Val Val
1 5

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34, HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35 VH

<400> 41
Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Arg Ser Phe
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Leu Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Trp Ser Gly Asn Ser Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Val Ser Val Ser Ser
115

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 VL

<400> 42
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Ser Ile Pro Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Val
20 25 30
Cys Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Thr Trp Asp Ser Thr Thr Val Val
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
100 105

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 CDRH1

<400> 43
ggacgcatct ttagaagttt ttac
24

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 CDRH2

<400> 44
ataaaccaag atggaagtga gaaa
24

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 CDRH3

<400> 45
gcggcttgga gcggcaatag tgggggtatg gacgtc
36

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 CDRL1

<400> 46
aaattgggga ataaaaat
18

<210> 47
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 CDRL2

<400> 47

gaggttaaa
9

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 CDRL2 dài

<400> 48
gtcatctatg aggttaaata ccgcccc
27

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 CDRL3

<400> 49
cagacgtggg acagcaccac tgtggtg
27

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 VH

<400> 50
gaactgcagc tggtggagtc tgggggaggc tgggtccagc cgggggggtc ccagagactg
60
tcctgtgcag cctctggacg catctttaga agtttttaca tgagctgggt ccgccaggcc
120
ccagggaagg ggctggagtg ggtggccact ataaaccaag atggaagtga gaaattatat
180
gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactattt
240
ctgcaaatga acaacctgag agtcgaggac acggccgttt attactgcgc ggcttggagc
300
ggcaatagtg ggggtatgga cgtctggggc caggggacca cggtctccgt ctcctca
357

<210> 51
<211> 318
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 VL

<400> 51
tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tccgtgtccc caggacagac agtcagcatc
60
ccctgctctg gagataaatt ggggaataaa aatgtttgct ggtttcagca taagccaggc
120
cagtcccctg tgttggtcat ctatgaggtt aaataccgcc cctcggggat tcctgagcga
180
ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg
240
gatgaggctg cctatttctg tcagacgtgg gacagcacca ctgtggtgtt cggcggaggg
300
accaggctga ccgtccta
318

<210> 52
<211> 33
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)...(33)
<223> Xaa = Axit amin bất kỳ

<400> 52
Xaa Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr
 1   5   10   15
Xaa Pro Ser Asp Gly Asn Ala Thr Ala Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp
            20   25   30
Xaa

<210> 53
<211> 15
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<400> 53
Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala Gln Gly
 1   5   10   15

<210> 54
<211> 26
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<400> 54

Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr Ser
1 5 10 15
Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr
20 25

<210> 55
<211> 33
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)...(33)
<223> Xaa = Axit amin bất kỳ

<400> 55
Xaa Ser Met Tyr Pro Ser Ala Ser Ala Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn
1 5 10 15
Xaa Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala Gln Gly Thr Ser
20 25 30
Xaa

<210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> các axit amin 120 - 130 của miền S của HBsAg
(HBV-D J02203)

<400> 56
Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala Gln Gly
1 5 10

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> 3
<223> Xaa = R hoặc K

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> 6
<223> Xaa = M hoặc T

<220>

<221> BIẾN THỂ
<222> 7
<223> Xaa = T hoặc I

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> 8
<223> Xaa = T, P hoặc L

<400> 57
Pro Cys Xaa Thr Cys Xaa Xaa Xaa Ala Gln Gly
1 5 10

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V7 CDRL3 và HBC34-V23 CDRL3

<400> 58
Gln Thr Phe Asp Ser Thr Thr Val Val
1 5

<210> 59
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V7 VL

<400> 59
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Ser Ile Pro Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Val
20 25 30
Cys Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Thr Phe Asp Ser Thr Thr Val Val
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 60
<211> 18

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34v7 CDRL1 và HBC-V23 CDRL1

<400> 60
aagctgggga acaaaaat
18

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V7 CDRL2 và HBC34v23
CDRL2

<400> 61
gaggtgaaa
9

<210> 62
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V7 CDRL2 dài và CDRL2
HBC34-V23 dài

<400> 62
gtcatctacg aggtgaaata tcggcct
27

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp CDRL3 HBC34-V7 và CDRL3
HBC34-V23

<400> 63
cagacattcg attccaccac agtggtc
27

<210> 64
<211> 318
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V7, HBC34-V34, và
HBC34-V35 VL

<400> 64
tcttacgagc tgacacagcc acctagcgtg tccgtctctc caggacagac cgtgtccatc
60
ccttgctctg gcgacaagct ggggaacaaa aatgtctgtt ggttccagca caagccaggg
120
cagagtcccg tgctggtcat ctacgaggtg aaatatcggc cttcaggaat tccagaacgg
180
ttcagcggat caaacagcgg caatactgca accctgacaa ttagcgggac ccaggccatg
240
gacgaagccg cttatttctg ccagacattc gattccacca cagtggtctt tggcgggggga
300
actaggctga ccgtgctg
318

<210> 65
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V23 VL

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

<210> 66
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34wt CDRH2

<400> 66
Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys
1 5

<210> 67
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V31, HBC34-V32 và HBC34-V33 VH

<400> 67
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Arg Ser Phe
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Asn Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Leu Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Trp Ser Gly Asn Ser Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 68
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V31, HBC34-V32 và HBC34-V33 VH

<400> 68
gaggtgcagc tggtggaatc cggcggggga ctggtgcagc ctggcggctc actgagactg
60
agctgtgcag cttctggaag aatcttcaga tcttttttaca tgagttgggt gagacaggct
120
cctgggaagg gactggagtg ggtcgcaaac atcaatcagg acggatcaga aaagctgtat
180
gtggatagcg tcaaaggcag gttcactatt tcccgcgaca acgccaaaaa ttctctgttt
240
ctgcagatga acaatctgcg ggtggaggat accgctgtct actattgtgc agcctggtct
300

ggcaacagtg gaggcatgga cgtgtgggga cagggaacca cagtgacagt cagctcc
357

<210> 69
<211> 318
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34v23 VL

<400> 69
tcttacgagc tgacacagcc ccctagcgtg tccgtctctc caggccagac agcatccatc
60
acttgctctg gcgacaagct ggggaacaaa aatgcctgtt ggtatcagca gaagccaggg
120
cagagtcccg tgctggtcat ctacgaggtg aaatatcggc cttcaggaat tccagaaaga
180
ttcagtggat caaacagcgg caatactgct accctgacaa ttagcgggac ccaggccatg
240
gacgaagctg attactattg ccagacattc gattccacca cagtggtctt tggcggggga
300
actaagctga ccgtgctg
318

<210> 70
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 wt VH codon được tối ưu hóa

<400> 70
gaactgcagc tggtcgaatc aggaggaggg tgggtccagc ccggagggag ccagagactg
60
tcttgtgccg catcagggag gatcttcagg agcttctaca tgtcctgggt gcgccaggca
120
ccaggcaagg gactggagtg ggtcgccacc atcaaccagg acggatctga aaagctgtat
180
gtggatagtg tcaaaggccg gttcacaatt agcagagaca acgctaaaaa ttctctgttt
240
ctgcagatga acaatctgcg agtggaggat accgccgtct actattgcgc cgcttggtct
300
ggcaacagcg gcgggatgga tgtctggggg cagggcacaa cagtgagcgt ctcttcc
357

<210> 71
<211> 318
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 wt VL codon được tối ưu hóa

<400> 71
tcatacgaac tgactcagcc tccctccgtc tccgtctcac ctggacagac cgtctcaatc
60
ccctgctccg gcgataaact gggcaacaag aacgtgtgct ggttccagca caaacccgga
120
cagagtcctg tgctggtcat ctacgaggtc aagtatcggc caagcggcat tcccgaaaga
180
ttcagcggct ccaactctgg gaataccgca acactgacta tctctggaac ccaggcaatg
240
gacgaggcag cttacttttg ccagacttgg gattcaacta ctgtcgtgtt cggcggcgga
300
actagactga ctgtcctg
318

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 wt CDRH1 codon được tối ưu hóa

<400> 72
gggaggatct tcaggagctt ctac
24

<210> 73
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 wt CDRH2 codon được tối ưu hóa

<400> 73
atcaaccagg acggatctga aaag
24

<210> 74
<211> 36
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 wt CDRH3 codon được tối ưu hóa

<400> 74
gccgcttggt ctggcaacag cggcgggatg gatgtc
36

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 wt CDRL1 codon được tối ưu hóa

<400> 75
aaactgggca acaagaac
18

<210> 76
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34 wt CDRL2 codon được tối ưu hóa

<400> 76
gaggtcaag
9

<210> 77
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp codon dài HBC34 wt CDRL2
được tối ưu hóa

<400> 77
gtcatctacg aggtcaagta tcggcca
27

<210> 78
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp của codon được tối ưu hóa HBC34 wt CDRL3

<400> 78
cagacttggg attcaactac tgtcgtg
27

<210> 79
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự cầu nối tổng hợp

<400> 79
Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 80
<211> 7
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<400> 80
Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys
1 5

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<400> 81
Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro
1 5

<210> 82
<211> 25
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> chất giả peptit không liên tục

<221> BIẾN THỂ
<222> 2, 21, 24
<223> Xystein được tạo cặp với axetamidometyl

<400> 82
Cys Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Cys Ser Thr Thr

1 5 10 15
Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Cys
20 25

<210> 83
<211> 28
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> chất giả epitop không liên tục

<221> BIẾN THỂ
<222> 4,6, 24, 27
<223> Cys được tạo cặp với axetamidometyl

<400> 83
Cys Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Cys
1 5 10 15
Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Cys
20 25

<210> 84
<211> 17
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<223> chất giả epitop được tạo vòng

<221> BIẾN THỂ
<222> 13, 16
<223> cys được tạo cặp với axetamidometyl

<400> 84
Cys Gly Gly Gly Cys Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys
1 5 10 15
Cys

<210> 85
<211> 11
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<400> 85
Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys
1 5 10

<210> 86
<211> 15
<212> PRT

<213> Virut viêm gan B

<400> 86
Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Cys
1 5 10 15

<210> 87
<211> 14
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<400> 87
Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe
1 5 10

<210> 88
<211> 5
<212> PRT
<213> Virut viêm gan B

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)...(5)
<223> Xaa = Axit amin bất kỳ

<400> 88
Pro Cys Arg Xaa Cys
1 5

<210> 89
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V35 VL

<400> 89
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Ser Ile Pro Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Val
20 25 30
Ala Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Thr Phe Asp Ser Thr Thr Val Val
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu

100 105

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V34 VL

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

<210> 91
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HC của HBC34-V35-MLNS-GAALIE và HBC34-V34-MLNS-GAALIE (g1M17, 1)

<400> 91
Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Arg Ser Phe
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Leu Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Trp Ser Gly Asn Ser Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

```
Thr Thr Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro
225                 230                 235                 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys
                325                 330                 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu
            420                 425                 430
Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445
Lys
```

<210> 92
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HC của HBC34-V35-MLNS và

HBC34-V34-MLNS (g1M17, 1)

<400> 92

```
Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Arg Ser Phe
            20                  25                  30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Thr Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Leu Tyr Val Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Ala Trp Ser Gly Asn Ser Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110
Thr Thr Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380
```

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu
420 425 430
Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Lys

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp LC của HBC34-V35

<400> 93
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Ser Ile Pro Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Val
20 25 30
Ala Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Thr Phe Asp Ser Thr Thr Val Val
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
115 120 125
Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val
130 135 140
Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
145 150 155 160
Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
165 170 175
Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser
180 185 190
Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro
195 200 205
Thr Glu Cys Ser
210

<210> 94
<211> 212
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp LC của HBC34-V34

<400> 94
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Ser Ile Pro Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Val
20 25 30
Ser Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Thr Phe Asp Ser Thr Thr Val Val
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
115 120 125
Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val
130 135 140
Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
145 150 155 160
Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
165 170 175
Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser
180 185 190
Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro
195 200 205
Thr Glu Cys Ser
210

<210> 95
<211> 128
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC24 VH

<400> 95
Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Thr Phe Thr Lys Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Ser Gly Ser Val Pro Gly Phe Gly Ile Asp Thr Tyr Tyr
50 55 60

```
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
65                  70                  75                  80
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
                85                  90                  95
Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Val Gly Val Ile Gly Ser Tyr Tyr Tyr
            100                 105                 110
Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 96
<211> 109
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC24 VL

<400> 96
```
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 Gly Leu 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 Ser Ala Ser Thr 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 Ala Tyr Ser Pro
                85                  90                  95
Arg Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 97
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp CDRH1 của HBC24

<400> 97
```
Gly Ser Thr Phe Thr Lys Tyr Ala
 1               5
```

<210> 98
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp CDRH2 của HBC24

<400> 98
Ile Ser Gly Ser Val Pro Gly Phe
1 5

<210> 99
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp CDRH3 của HBC24

<400> 99
Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Val Gly Val Ile Gly Ser Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15
Tyr Ala Met Asp Val
20

<210> 100
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp CDRL1 của HBC24

<400> 100
Gln Gly Leu Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 101
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp CDRL2 của HBC24

<400> 101
Ser Ala Ser
1

<210> 102
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp CDRL3 của HBC24

<400> 102

Gln Gln Tyr Ala Tyr Ser Pro Arg Trp Thr
1 5 10

<210> 103
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp VH của HBC34-V7, HBC34-V35, và HBC34-V34 (codon được tối ưu hóa)

<400> 103
gagctgcagc tggtggagtc cggcggcggc tgggtgcagc ctggcggctc ccagaggctg 60
agctgtgccg cttctggcag gatcttccgg tccttttaca tgtcttgggt gcggcaggct 120
ccaggcaagg gcctggagtg ggtggctacc atcaaccagg acggctccga gaagctgtat 180
gtggatagcg tgaagggcag attcacaatc tctcgcgaca acgccaagaa ctccctgttt 240
ctgcagatga acaatctgag ggtggaggat accgccgtgt actattgcgc cgcttggtct 300
ggcaatagcg gcggcatgga cgtgtgggga cagggcacca ccgtgtccgt gtccagc 357

<210> 104
<211> 318
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V34 VL (codon được tối ưu hóa)

<400> 104
agctacgagc tgacacagcc cccttccgtg tccgtgtccc ctggacagac cgtgtccatc 60
ccatgcagcg gcgacaagct gggcaacaag aacgtgtcct ggtttcagca taagcctggc 120
cagtcccccg tgctggtcat ctacgaggtg aagtataggc ccagcggcat ccctgagcgg 180
ttctctggct ccaacagcgg caatacagcc accctgacaa tctctggcac acaggctatg 240
gacgaggccg cttatttctg ccagaccttt gattccacca cagtggtgtt cggcggcggc 300
accagactga cagtgctg 318

<210> 105
<211> 318
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V35 VL (codon được tối ưu hóa)

<400> 105
agctacgagc tgacacagcc cccttccgtg tccgtgtccc ctggacagac cgtgtccatc
60
ccatgcagcg gcgacaagct gggcaacaag aacgtggcct ggtttcagca taagcctggc
120
cagtcccccg tgctggtcat ctacgaggtg aagtataggc ccagcggcat ccctgagcgg
180
ttctctggct ccaacagcgg caatacagcc accctgacaa tctctggcac acaggctatg
240
gacgaggccg cttatttctg ccagaccttt gattccacca cagtggtgtt cggcggcggc
300
accagactga cagtgctg
318

<210> 106
<211> 360
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC24 VH (kiểu dại)

<400> 106
gaggtgcagt tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc
60
tcctgtgcag cctctggatc cacttttacc aaatatgcca tgagctgggt ccgtcaggct
120
ccagggaagg ggctggagtg ggtcgcaagt attagtggaa gtgttcctgg ttttggtatt
180
gacacatact acgcagactc cgttaagggc cggttcacca tctccagaga cacttccaag
240
aacaccctgt atctgcaaat gaacagcctg agagccgagg acacggcctt atattactgt
300
gcgaaagatg tcggggttat cgggtcatac tattactacg ctatggacgt ctggggtcaa
360

<210> 107
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC24 VL (kiểu dại)

<400> 107
aaattgtgtt gacgcagtct ccaggcaccc tgtctttgtc tccaggggaa agagccaccc
60
tctcctgcag ggccagtcag ggtcttagca gcagttactt agcctggtac cagcagaaac
120
ctggccaggc tcccaggctc ctcatctata gtgcgtccac cagggccact ggcatcccag
180
acaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcactct caccatcagc agactggagc
240
ctgaagattt tgcagtgtat tactgtcaac agtatgctta ctcacctcgg tggacgttcg
300
gccaagggac caaggtggag atcaaac
327

<210> 108
<211> 384
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC24 VH (codon được tối ưu hóa)

<400> 108
gaggtgcagc tgctggaaag cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggctc cctgaggctg
60
tcttgcgccg cctctggcag caccttcaca aagtatgcaa tgtcttgggt gcgccaggca
120
ccaggcaagg gcctggagtg ggtggcctcc atctctggca gcgtgcctgg cttcggcatc
180
gacacctact atgccgattc cgtgaagggc cggtttacaa tcagcagaga cacctccaag
240
aacacactgt atctgcagat gaattctctg cgggccgagg acaccgccct gtactattgt
300
gccaaggatg tgggcgtgat cggcagctac tattactatg caatggacgt gtggggacag
360
ggaacagcag tgacagtgag ctcc
384

<210> 109
<211> 327
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC24 VL (codon được tối ưu hóa)

<400> 109
gagatcgtgc tgacccagtc tcctggcaca ctgtccctgt cccctggaga gagagccacc
60
ctgtcctgca gagcctctca gggcctgagc tcctcttacc tggcctggta tcagcagaag
120

cctggacagg cccctcggct gctgatctac tctgcctcca ccagagcaac aggcattcct
180
gaccgcttct ccggatctgg aagcggcaca gacttcaccc tgacaatcag ccggctggag
240
cctgaggact tcgccgtgta ctattgtcag cagtacgcct attccccaag gtggaccttt
300
ggccagggca caaaggtgga gatcaag
327

<210> 110
<211> 318
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V7 VL (codon được tối ưu hóa)

<400> 110
agctacgagc tgacacagcc cccttccgtg tccgtgtccc ctggacagac cgtgtccatc
60
ccatgcagcg gcgacaagct gggcaacaag aacgtgtgct ggtttcagca taagcctggc
120
cagtcccccg tgctggtcat ctacgaggtg aagtataggc ccagcggcat ccctgagcgg
180
ttctctggct ccaacagcgg caatacagcc accctgacaa tctctggcac acaggctatg
240
gacgaggccg cttatttctg ccagaccttt gattccacca cagtggtgtt cggcggcggc
300
accagactga cagtgctg
318

<210> 111
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34v23-L_C40S

<400> 111
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Ala
20 25 30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Phe Asp Ser Thr Thr Val Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 112
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34v23-L_C40A

<400> 112
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Ala
20 25 30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Phe Asp Ser Thr Thr Val Val
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 113
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34v31-L_C40S

<400> 113
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Ser Ile Pro Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Val
20 25 30
Ser Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Thr Trp Asp Ser Thr Thr Val Val
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 114

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34v31-L_C40A

<400> 114
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Ser Ile Pro Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Val
20 25 30
Ala Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Thr Trp Asp Ser Thr Thr Val Val
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 115
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34v32-L_C40S

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

<210> 116
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34v32-L_C40A

<400> 116
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Ser Ile Pro Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Val
20 25 30
Ala Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Thr Trp Asp Ser Thr Thr Val Val
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 117
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34v33-L_C40S

<400> 117
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Ala
20 25 30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Phe Asp Ser Thr Thr Val Val
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 118
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34v33-L_C40A

<400> 118

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

<210> 119
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-L_C40S

<400> 119

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

<210> 120
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-L_C40A

<400> 120

```
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1               5                  10                  15
Thr Val Ser Ile Pro Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Val
            20                  25                  30
```

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

<210> 121
<211> 458
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC24-MLNS

<400> 121

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

```
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305                 310                 315                 320
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
                325                 330                 335
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
            340                 345                 350
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
        355                 360                 365
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
    370                 375                 380
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385                 390                 395                 400
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                405                 410                 415
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
            420                 425                 430
Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr
        435                 440                 445
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 122
<211> 458
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC24-MLNS-GAALIE

<400> 122

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

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
    130                 135                 140
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145                 150                 155                 160
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
                165                 170                 175
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
            180                 185                 190
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
        195                 200                 205
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
    210                 215                 220
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225                 230                 235                 240
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                245                 250                 255
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
            260                 265                 270
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
        275                 280                 285
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
    290                 295                 300
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305                 310                 315                 320
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
                325                 330                 335
Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
            340                 345                 350
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
        355                 360                 365
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
    370                 375                 380
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385                 390                 395                 400
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                405                 410                 415
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
            420                 425                 430
Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr
        435                 440                 445
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 123
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V7-mu (IgG2a) HC

<400> 123

```
Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Arg Ser Phe
            20                  25                  30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Thr Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Leu Tyr Val Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Ala Trp Ser Gly Asn Ser Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110
Thr Thr Val Ser Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
        115                 120                 125
Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
    130                 135                 140
Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
145                 150                 155                 160
Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175
Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
            180                 185                 190
Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
        195                 200                 205
Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys
    210                 215                 220
Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255
Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp
            260                 265                 270
Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr
        275                 280                 285
Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val
    290                 295                 300
Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320
Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
                325                 330                 335
Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val
            340                 345                 350
Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr
        355                 360                 365
Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr
    370                 375                 380
Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu
385                 390                 395                 400
Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys
                405                 410                 415
```

Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu
420 425 430
Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
435 440 445
Lys

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V7-mu (IgG2a) LC

<400> 124
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Ser Ile Pro Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Asn Val
20 25 30
Cys Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Glu Val Lys Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80
Asp Glu Ala Ala Tyr Phe Cys Gln Thr Phe Asp Ser Thr Thr Val Val
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ser Ser
100 105 110
Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Glu Thr Asn
115 120 125
Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp Phe Tyr Pro Gly Val Val
130 135 140
Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro Val Thr Gln Gly Met Glu
145 150 155 160
Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Met Ala Ser Ser
165 170 175
Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu Arg His Ser Ser Tyr Ser
180 185 190
Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val Glu Lys Ser Leu Ser Arg
195 200 205
Ala Asp Cys Ser
210

<210> 125
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V35-mu (IgG2a) HC

<400> 125
Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Arg Ser Phe
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Leu Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ala Trp Ser Gly Asn Ser Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Val Ser Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
180 185 190
Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
195 200 205
Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys
210 215 220
Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser
245 250 255
Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp
260 265 270
Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr
275 280 285
Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val
290 295 300
Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu
305 310 315 320
Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val
340 345 350
Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr
355 360 365
Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr
370 375 380
Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu
385 390 395 400

```
Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys
                405                 410                 415
Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu
            420                 425                 430
Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
        435                 440                 445
Lys
```

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

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V35-mu (IgG2a) LC

<400> 126

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

<210> 127
<211> 458
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC24-mu (IgG2a) HC

<400> 127
Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Thr Phe Thr Lys Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Ser Gly Ser Val Pro Gly Phe Gly Ile Asp Thr Tyr Tyr
50 55 60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
65 70 75 80
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
85 90 95
Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Val Gly Val Ile Gly Ser Tyr Tyr Tyr
100 105 110
Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
130 135 140
Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
145 150 155 160
Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
165 170 175
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
180 185 190
Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
195 200 205
Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
210 215 220
Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
225 230 235 240
Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
245 250 255
Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
260 265 270
Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
275 280 285
Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
290 295 300
Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
305 310 315 320
His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
325 330 335
Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
340 345 350
Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
355 360 365
Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
370 375 380

```
Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
385                 390                 395                 400
Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
                405                 410                 415
Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
            420                 425                 430
Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
        435                 440                 445
Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
    450                 455
```

<210> 128
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC24-mu (IgG2a) LC

<400> 128

```
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 Gly Leu 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 Ser Ala Ser Thr 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 Ala Tyr Ser Pro
                85                  90                  95
Arg Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ala Asp Ala
            100                 105                 110
Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser
        115                 120                 125
Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp
    130                 135                 140
Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
145                 150                 155                 160
Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
                165                 170                 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
            180                 185                 190
Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
        195                 200                 205
Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
    210                 215
```

<210> 129
<211> 449
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35
HC (wild-type)

<400> 129

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Lys

<210> 130
<211> 990
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35
CH1-bản lề-CH2-CH3 (codon-được tối ưu hóa)

<400> 130
gcctccacaa agggcccaag cgtgtttcca ctggctccct cttccaagtc tacctccggc
60
ggcacagccg ctctgggatg tctggtgaag gattacttcc cagagcccgt gaccgtgtct
120
tggaactccg gcgccctgac cagcggagtg catacatttc agctgtgct gcagagctct
180
ggcctgtact ctctgtccag cgtggtgacc gtgccctctt ccagcctggg cacccagaca
240
tatatctgca acgtgaatca caagccaagc aatacaaagg tggacaagaa ggtggagccc
300
aagtcttgtg ataagaccca tacatgccct ccatgtccag ctccagagct gctgggcggc
360
ccaagcgtgt tcctgtttcc acccaagcct aaggataccc tgatgatctc cagaaccccc
420
gaggtgacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaggatc ctgaggtgaa gttcaactgg
480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgct aagaccaagc ccagggagga gcagtacaac
540
tctacctatc gggtggtgtc cgtgctgaca gtgctgcacc aggattggct gaacggcaag
600
gagtataagt gcaaggtgtc taataaggcc ctgcccgctc ctatcgagaa gaccatctcc
660
aaggccaagg gccagcctag agagccacag gtgtacacac tgcctccatc tcgcgatgag
720
ctgaccaaga accaggtgtc cctgacatgt ctggtgaagg gcttctatcc ttccgacatc
780

gctgtggagt gggagagcaa tggccagcca gagaacaatt acaagaccac acccccctgtg
840
ctggacagcg atggctcttt ctttctgtat agcaagctga ccgtggacaa gtctcgctgg
900
cagcagggca acgtgtttag ctgttctgtg atgcatgagg ccctgcacaa tcattataca
960
cagaagtccc tgagcctgtc tcctggcaag
990

<210> 131
<211> 1417
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V7, HBC34-V34, HBC34-V35
VH-CH1-bản lề-CH2-CH3 (codon-được tối ưu hóa)

<400> 131
gagctgcagc tggtggagtc cggcggcggc tgggtgcagc ctggcggctc ccagaggctg
60
agctgtgccg cttctggcag gatcttccgg tccttttaca tgtcttgggt gcggcaggct
120
ccaggcaagg gcctggagtg ggtggctacc atcaaccagg acggctccga gaagctgtat
180
gtggatagcg tgaagggcag attcacaatc tctcgcgaca acgccaagaa ctccctgttt
240
ctgcagatga acaatctgag ggtggaggat accgccgtgt actattgcgc cgcttggtct
300
ggcaatagcg gcggcatgga cgtgtgggga cagggcacca ccgtgtccgt gtccagcgcc
360
tccacaaagg gcccaagcgt gtttccactg gctccctctt ccaagtctac ctccggcggc
420
acagccgctc tgggatgtct ggtgaaggat tacttcccag agcccgtgac cgtgtcttgg
480
aactccggcg ccctgaccag cggagtgcat acatttccag ctgtgctgca gagctctggc
540
ctgtactctc tgtccagcgt ggtgaccgtg ccctcttcca gcctgggcac ccagacatat
600
atctgcaacg tgaatcacaa gccaagcaat acaaaggtgg acaagaaggt ggagcccaag
660
tcttgtgata agacccatac atgccctcca tgtccagctc cagagctgct gggcggccca
720
agcgtgttcc tgtttccacc caagcctaag ataccctga tgatctccag aacccccgag
780
gtgacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaggatcctg aggtgaagtt caactggtac
840
gtggacggcg tggaggtgca taatgctaag accaagccca gggaggagca gtacaactct
900
acctatcggg tggtgtccgt gctgacagtg ctgcaccagg attggctgaa cggcaaggag
960

tataagtgca aggtgtctaa taaggccctg cccgctccta tcgagaagac catctccaag
1020
gccaagggcc agcctagaga gccacaggtg tacacactgc ctccatctcg cgatgagctg
1080
accaagaacc aggtgtccct gacatgtctg gtgaagggct tctatccttc cgacatcgct
1140
gtggagtggg agagcaatgg ccagccagag aacaattaca agaccacacc ccctgtgctg
1200
gacagcgatg gctctttctt tctgtatagc aagctgaccg tggacaagtc tcgctggcag
1260
cagggcaacg tgtttagctg ttctgtgatg catgaggccc tgcacaatca ttatacacag
1320
aagtccctga gcctgtctcc tggcaagtga tgaggtaccg tgcgacggcc ggcaagcccc
1380
cgctccccgg gctctcgcgg tcgtacgagg aaagctt
1417

<210> 132
<211> 318
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V7 CL (codon-được tối ưu hóa)

<400> 132
ggacagccaa aggctgctcc atctgtgacc ctgtttccac cctcttccga ggagctgcag
60
gccaacaagg ccaccctggt gtgcctgatc tctgacttct accctggagc tgtgacagtg
120
gcttggaagg ctgatagctc tcccgtgaag gctggcgtgg agacaacaac ccctagcaag
180
cagtctaaca ataagtacgc cgcttccagc tatctgtctc tgacaccaga gcagtggaag
240
tcccaccgct cttattcctg ccaggtgacc catgagggca gcaccgtgga gaagacagtg
300
gcccccaccg agtgttct
318

<210> 133
<211> 636
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V7 LC (VL-CL)
(codon-được tối ưu hóa)

<400> 133
agctacgagc tgacacagcc cccttccgtg tccgtgtccc ctggacagac cgtgtccatc
60

ccatgcagcg gcgacaagct gggcaacaag aacgtgtgct ggtttcagca taagcctggc
120
cagtcccccg tgctggtcat ctacgaggtg aagtataggc ccagcggcat ccctgagcgg
180
ttctctggct ccaacagcgg caatacagcc accctgacaa tctctggcac acaggctatg
240
gacgaggccg cttatttctg ccagaccttt gattccacca cagtggtgtt cggcggcggc
300
accagactga cagtgctggg acagccaaag gctgctccat ctgtgaccct gtttccaccc
360
tcttccgagg agctgcaggc caacaaggcc accctggtgt gcctgatctc tgacttctac
420
cctggagctg tgacagtggc ttggaaggct gatagctctc ccgtgaaggc tggcgtggag
480
acaacaaccc ctagcaagca gtctaacaat aagtacgccg cttccagcta tctgtctctg
540
acaccagagc agtggaagtc ccaccgctct tattcctgcc aggtgaccca tgagggcagc
600
accgtggaga agacagtggc ccccaccgag tgttct
636

<210> 134
<211> 318
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V34, HBC34-V35 CL
(codon-được tối ưu hóa)

<400> 134
ggacagccaa aggctgctcc atctgtgacc ctgtttccac cctcttccga ggagctgcag
60
gccaacaagg ccaccctggt gtgcctgatc tctgacttct accctggagc tgtgacagtg
120
gcttggaagg ctgatagctc tcccgtgaag gctggcgtgg agacaacaac ccctagcaag
180
cagtctaaca ataagtacgc cgcttccagc tatctgtctc tgacaccaga gcagtggaag
240
tcccaccgct cttattcctg ccaggtgacc catgagggca gcaccgtgga gaagacagtg
300
gcccccaccg agtgttct
318

<210> 135
<211> 636
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V34 LC (VL-CL)

(codon-được tối ưu hóa)

<400> 135
agctacgagc tgacacagcc cccttccgtg tccgtgtccc ctggacagac cgtgtccatc
60
ccatgcagcg gcgacaagct gggcaacaag aacgtgtcct ggtttcagca taagcctggc
120
cagtcccccg tgctggtcat ctacgaggtg aagtataggc ccagcggcat ccctgagcgg
180
ttctctggct ccaacagcgg caatacagcc accctgacaa tctctggcac acaggctatg
240
gacgaggccg cttatttctg ccagaccttt gattccacca cagtggtgtt cggcggcggc
300
accagactga cagtgctggg acagccaaag gctgctccat ctgtgaccct gtttccaccc
360
tcttccgagg agctgcaggc caacaaggcc accctggtgt gcctgatctc tgacttctac
420
cctggagctg tgacagtggc ttggaaggct gatagctctc ccgtgaaggc tggcgtggag
480
acaacaaccc ctagcaagca gtctaacaat aagtacgccg cttccagcta tctgtctctg
540
acaccagagc agtggaagtc ccaccgctct tattcctgcc aggtgaccca tgagggcagc
600
accgtggaga agacagtggc ccccaccgag tgttct
636

<210> 136
<211> 636
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34-V35 LC (VL-CL)
(codon-được tối ưu hóa)

<400> 136
agctacgagc tgacacagcc cccttccgtg tccgtgtccc ctggacagac cgtgtccatc
60
ccatgcagcg gcgacaagct gggcaacaag aacgtggcct ggtttcagca taagcctggc
120
cagtcccccg tgctggtcat ctacgaggtg aagtataggc ccagcggcat ccctgagcgg
180
ttctctggct ccaacagcgg caatacagcc accctgacaa tctctggcac acaggctatg
240
gacgaggccg cttatttctg ccagaccttt gattccacca cagtggtgtt cggcggcggc
300
accagactga cagtgctggg acagccaaag gctgctccat ctgtgaccct gtttccaccc
360
tcttccgagg agctgcaggc caacaaggcc accctggtgt gcctgatctc tgacttctac
420
cctggagctg tgacagtggc ttggaaggct gatagctctc ccgtgaaggc tggcgtggag
480

acaacaaccc ctagcaagca gtctaacaat aagtacgccg cttccagcta tctgtctctg
540
acaccagagc agtggaagtc ccaccgctct tattcctgcc aggtgaccca tgagggcagc
600
accgtggaga agacagtggc ccccaccgag tgttct
636

<210> 137
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens IgG1

<220>
<223> WT hIgG1 Fc

<400> 137
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 138
<211> 449
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự tổng hợp HBC34, HBC34v7, HBC34v23,

HBC34v34, HBC34v35, HBC34_C40S, HBC34_C40A,
HBC34v23_C40S, HBC34v23_C40A
HC với đột biến GAALIE trong hIgG1 Fc

<400> 138

```
Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Arg Ser Phe
            20                  25                  30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Thr Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Leu Tyr Val Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Ala Trp Ser Gly Asn Ser Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110
Thr Thr Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro
225                 230                 235                 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys
                325                 330                 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365
```

```
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445
Lys
```

<210> 139
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự bản lề khảm

<400> 139

```
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
 1               5                  10                  15
Ala Gly Pro
```