



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

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



1-0052706

(51)^{2022.01} A61K 39/00; A61P 31/06; C07K 16/12; (13) B
A61K 39/085

(21) 1-2022-07360

(22) 29/04/2021

(86) PCT/CN2021/090809 29/04/2021

(87) WO2021/219047 04/11/2021

(30) 202010369100.7 01/05/2020 CN

(45) 27/10/2025 451

(43) 27/01/2023 418A

(73) SINOCELLTECH LTD (CN)

No.31 Kechuang 7th St., BDA Beijing 100176, China

(72) XIE, Liangzhi (CN); ZHANG, Yanjing (CN); ZHANG, Jiandong (CN).

(74) Công ty Luật TNHH quốc tế BMVN (BMVN INTERNATIONAL LLC)

(54) PHƯƠNG PHÁP CẢI THIỆN TÍNH SINH MIỄN DỊCH CỦA KHÁNG NGUYÊN
PROTEIN/PEPTIT, LIÊN HỢP KHÁNG NGUYÊN GLYCO-PROTEIN/PEPTIT,
CHẾ PHẨM SINH MIỄN DỊCH BAO GỒM LIÊN HỢP KHÁNG NGUYÊN
GLYCO-PROTEIN/PEPTIT

(21) 1-2022-07360

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp cải thiện tính sinh miễn dịch của kháng nguyên protein/peptit, phương pháp này bao gồm tạo liên hợp kháng nguyên protein/peptit với đường để tạo ra liên hợp đường-kháng nguyên protein/peptit, có tính sinh miễn dịch được tăng cường khi được so sánh với kháng nguyên protein/peptit không được tạo liên hợp. Đặc biệt là, phương pháp này liên quan đến việc tạo liên hợp với mầm bệnh, chẳng hạn như kháng nguyên protein bề mặt virus hoặc mảnh của kháng nguyên này, với polysaccharit, đặc biệt là polysaccharit vỏ của *Streptococcus pneumoniae*. Liên hợp có tính sinh miễn dịch được tăng cường này có thể được sử dụng để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh do các mầm bệnh gây ra, đặc biệt là các bệnh do các virus corona gây ra. Sáng chế cũng đề xuất liên hợp kháng nguyên glyco-protein/peptit và chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm liên hợp kháng nguyên glyco-protein/peptit.

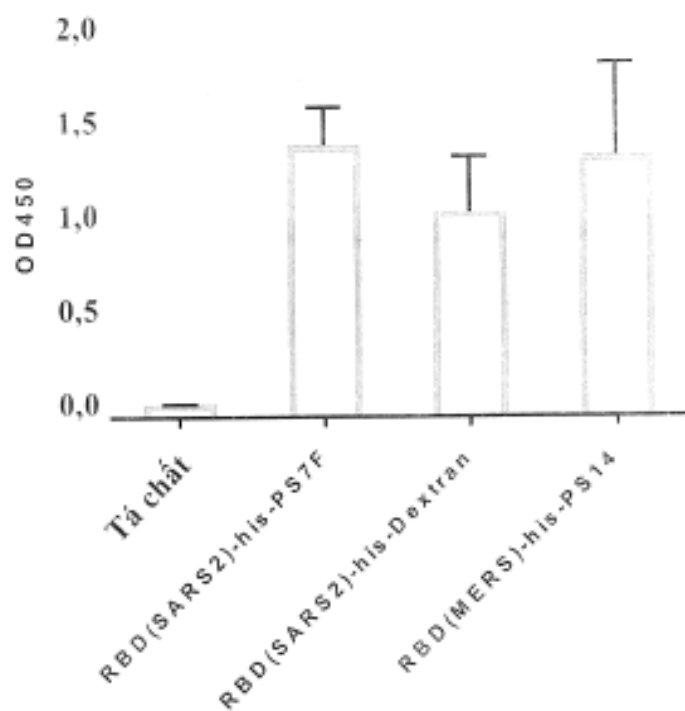


FIG.4

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến lĩnh vực các chế phẩm sinh miễn dịch và, cụ thể hơn, đến phương pháp cải thiện tính sinh miễn dịch của kháng nguyên protein/peptit bằng cách tạo liên hợp kháng nguyên protein/peptit này với sacarit, tạo ra liên hợp kháng nguyên glyco-protein/peptit có tính sinh miễn dịch tăng so với kháng nguyên protein/peptit không được liên hợp. Cụ thể hơn, sáng chế liên quan đến sự liên hợp của mầm bệnh, chẳng hạn như kháng nguyên protein bề mặt virus hoặc mảnh của kháng nguyên này, với polysacarit, đặc biệt là polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae*. Liên hợp được tăng cường tính sinh miễn dịch này có thể được sử dụng để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh do các mầm bệnh gây ra, đặc biệt là các bệnh do các virus corona gây ra.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Khi cá thể động vật có xương sống được tạo miễn dịch bằng vắc-xin trong đó vi sinh vật truyền nhiễm, độc tố, virus hoặc các tiểu đơn vị của chúng được sử dụng làm các thành phần kháng nguyên, thành phần kháng nguyên nêu trên, chất ngoại sinh đối với cá thể này, sẽ tạo ra hoặc kích thích phản ứng miễn dịch trí nhớ chống lại phân tử ngoại sinh trong cá thể này, do đó bảo vệ cá thể này không bị tổn thương bởi phản ứng miễn dịch thứ cấp khi tái tiếp xúc với phân tử ngoại sinh này.

Thuật ngữ "kháng nguyên" là chất ngoại sinh được nhận dạng (liên kết đặc hiệu) bởi kháng thể hoặc thụ thể tế bào T, nhưng không nhất thiết tạo ra phản ứng miễn dịch. Các chất ngoại sinh có thể được nhận dạng (liên kết đặc hiệu) bởi các kháng thể hoặc các thụ thể tế bào T và có thể tạo ra miễn dịch đặc hiệu được gọi là "các kháng nguyên sinh miễn dịch" hoặc "các chất sinh miễn dịch".

Các vắc-xin sử dụng các tiểu đơn vị của các vi sinh vật truyền nhiễm, các độc tố, các virus, tức là các cấu trúc tế bào (vi khuẩn hoặc nấm) hoặc các bộ phận của các virus làm các kháng nguyên là các vắc-xin không sống và được sử dụng rộng rãi vì tính an toàn của chúng. Tuy nhiên, khả năng của các tiểu đơn vị để tạo ra phản ứng miễn dịch cụ thể là yếu, tức là kháng nguyên này có tính sinh miễn dịch kém.

Các phương pháp truyền thống để tăng cường tính sinh miễn dịch là bổ sung thêm các tá chất miễn dịch. Các phương pháp mới để tăng cường phản ứng miễn dịch vẫn đang được khám phá trong các nghiên cứu đang diễn ra. Một trong các công cụ quan trọng là tăng cường tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên sinh miễn dịch kém bằng cách tạo

liên hợp chúng với các đại phân tử vận chuyển ngoại sinh, đã được sử dụng thành công trong nhiều thập kỷ, chẳng hạn như vắc-xin viêm não thường thấy, vắc-xin *Haemophilus influenzae b* và vắc-xin viêm phổi, trong đó polysaccharit vỏ đã được tinh chế (capsularpolymer) được kết hợp với protein vận chuyển để tạo ra các chế phẩm sinh miễn dịch hiệu quả hơn (Schneerson và các cộng sự (1984) *Infect. Immun.* 45: 582-591). Các protein vận chuyển thường được sử dụng chẳng hạn như giải độc tố uốn ván, mảnh của giải độc tố uốn ván C, các đột biến không độc của giải độc tố uốn ván, giải độc tố bạch hầu, CRM197, các đột biến không độc khác của giải độc tố bạch hầu [ví dụ: CRM176, CRM197, CRM228, CRM45 (Uchida và cộng sự. *Human J. Biol. Chem.* 218; 3838-3844, 1973); CRM9, CRM45, CRM02, CRM103 và CRM107, và các yếu tố đột biến khác. Các kháng nguyên polysaccharit này là các kháng nguyên không phụ thuộc vào tế bào thymocyte không tạo ra phản ứng miễn dịch tế bào, do đó không tạo ra trí nhớ miễn dịch, các kháng nguyên polysaccharit này không thể tạo ra các kháng thể bảo vệ ở trẻ em hoặc người bị suy giảm miễn dịch. Các kháng nguyên polysaccharit này được tạo liên hợp với protein vận chuyển mang epitop tế bào T, sau đó liên hợp này được nhập bào và được xử lý bởi các tế bào trình diện kháng nguyên hoặc các tế bào B, mảnh peptit của protein vận chuyển này được hiển thị trên bề mặt tế bào, kích hoạt các tế bào T trợ giúp và tạo ra một loạt các phản ứng miễn dịch để tạo ra các kháng thể bảo vệ và tạo ra trí nhớ miễn dịch.

Tuy nhiên, tác dụng của các polysaccharit vi khuẩn lên tính sinh miễn dịch của kháng nguyên protein/peptit hiếm khi được báo cáo. Bằng sáng chế Mỹ số US5192540A bộc lộ các vắc-xin bao gồm liên hợp sinh miễn dịch của protein màng ngoài có kích thước 38000 dalton hoặc 40000 dalton của *Haemophilus influenzae* týp B và mảnh polyriboza-ribitol-phosphat polysaccharit bị oxy hóa của *Haemophilus influenzae* týp B, có thể được sử dụng để gây miễn dịch chống lại các bệnh do *Haemophilus influenzae* týp B gây ra. Tuy nhiên, "các vắc-xin liên hợp theo sáng chế có tính sinh miễn dịch cao trên các mô hình động vật. Các đáp ứng kháng thể của chúng với PRP cao hơn đáng kể so với các vắc-xin được báo cáo trước đây. Các vắc-xin liên hợp này cũng tạo ra các kháng thể với protein chính (Protein 38K hoặc 40k) của *Haemophilus influenzae* týp B. "

Patent Mỹ số US9296795B đã bộc lộ việc sử dụng liên hợp polysaccharit-protein sinh miễn dịch có kháng nguyên polysaccharit (hoặc mảnh oligosaccharit của nó, đại diện cho một hoặc nhiều epitop kháng nguyên) có nguồn gốc từ mầm bệnh trong bệnh viện trong chế phẩm sinh miễn dịch và polysaccharit này được tạo liên hợp với protein vận chuyển chất kết dính bề mặt tụ cầu để tạo ra phản ứng kháng thể với kháng nguyên polysaccharit này và protein vận chuyển chất kết dính bề mặt tụ cầu này. Mặc dù "liên hợp được mô tả trong sáng chế có ưu điểm duy nhất là tạo ra các kháng thể chống lại kháng nguyên polysaccharit này và protein vật truyền bám dính bề mặt, cả hai đều là các yếu tố độc lực và tạo ra khả năng miễn dịch đối với các bệnh do các mầm bệnh trong bệnh viện gây ra. Nói cách khác,

bản thân các protein bám dính bề mặt này có khả năng tạo miễn dịch cho cơ thể, thay vì chỉ hoạt động như các chất mang protein cho các kháng nguyên polysacarit. "Các hiệu giá của các kháng thể đặc hiệu với protein bám dính bề mặt được tạo ra bởi protein bám dính bề mặt được ghim là tương tự với các hiệu giá của protein bám dính bề mặt không liên hợp (Các Fig. 17 đến Fig. 20). Điều này khẳng định rằng các epitope kháng nguyên không bị thay đổi bởi sự liên kết của protein bám dính bề mặt và CP. "

Trong hai nỗ lực nghiên cứu trên đây, các tác giả sáng chế chỉ báo cáo rằng các kháng nguyên protein/peptit này được tạo liên hợp với các polysacarit có thể tạo ra kháng thể, nhưng không có báo cáo nào về việc tăng cường tính sinh miễn dịch của chúng.

Sự phát hiện tiên phong của các tác giả sáng chế bao gồm việc tăng cường tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên protein/peptit bằng cách tạo liên hợp các kháng nguyên protein/peptit này với các sacarit và tạo thành các liên hợp kháng nguyên glyco-protein/peptit.

Các tác giả sáng chế suy đoán rằng cơ sở lý luận là các tập hợp protein kích thích phản ứng miễn dịch của cơ thể và tạo ra các kháng thể một cách dễ dàng hơn so với các đơn phân (monomer) protein. Hơn nữa, hầu hết các thụ thể nhận dạng mẫu trên bề mặt của các tế bào trình diện kháng nguyên trong hệ thống miễn dịch của động vật có liên quan đến sacarit, và sacarit do vi khuẩn tạo ra là tín hiệu quan trọng để kích thích hệ thống miễn dịch này. Tuy nhiên, sáng chế không bị ràng buộc bởi lý thuyết này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện tính sinh miễn dịch của kháng nguyên protein/peptit, phương pháp này bao gồm việc tạo ra liên hợp kháng nguyên glyco-protein/peptit bằng cách tạo liên hợp kháng nguyên protein/peptit này với sacarit.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, sacarit này được chọn từ polysacarit, oligosacarit hoặc monosacarit;

ưu tiên polysacarit vỏ của *Neisseria encephalitis*, polysacarit vỏ của *Haemophilus influenzae b*, polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae*, polysacarit vỏ của Nhóm B *Staphylococcus aureus*, dextran, mannan, tinh bột, inulin, pectin, tinh bột carboxymetyl, chitosan và các chất dẫn xuất của chúng;

ưu tiên hơn polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae*;

ưu tiên nhất polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 14, polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 6B và polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 7F,

trong đó kháng nguyên protein/peptit này được chọn từ kháng nguyên protein/peptit

liên kết mầm bệnh hoặc kháng nguyên protein/peptit liên kết khối u,

trong đó mầm bệnh này được chọn từ:

virut corona (coronavirus), virut gây thiếu hụt miễn dịch ở người (human immunodeficiency virus) HIV-1, virut herpes simplex ở người, virut cự bào (cytomegalovirus), virut rota (rotavirus), virut EB, virut varicella zoster, virut viêm gan, virut hợp bào hô hấp, virut parainfluenza, virut sởi, virut quai bị, virut u nhú ở người, virut *Flavivirus* hoặc virut cúm, *Neisseria*, *Moraxella*, *Bordetella*, *Mycobacterium* bao gồm *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia* bao gồm *Escherichia coli* độc tố ruột; *Salmonella*, *Listeria*, *Helicobacter*, *Staphylococcus* bao gồm *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*; *Borrelia*, *Chlamydia* bao gồm *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*; *Plasmodium* bao gồm *Plasmodium falciparum*; *Toxoplasma*, *Candida*;

ưu tiên protein/peptit có liên quan đến sự xâm nhập của mầm bệnh này vào vật chủ;

ưu tiên hơn các mầm bệnh nêu trên là các virut;

ưu tiên hơn các virut nêu trên được chọn từ các virut của *Coronaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Filoviridae* hoặc *Flaviviridae*, và

trong đó khối u này được chọn từ:

u lympho tế bào B lớn lan tỏa, u lympho nang, u lympho khác, bệnh bạch cầu, đa u tủy, u trung biểu mô, ung thư dạ dày, u cơ vân ác tính, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú, ung thư ống mật và túi mật, ung thư bàng quang, khối u não bao gồm cả các u nguyên bào thần kinh, u vỏ tế bào thần kinh, u thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm và u tế bào hình sao, ung thư cổ tử cung, ung thư ruột, u ác tính, ung thư nội mạc tử cung, ung thư thực quản, ung thư đầu và cổ, ung thư phổi, ung thư vòm họng, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tụy, ung thư tế bào thận, ung thư trực tràng, ung thư tuyến giáp, khối u tuyến cận giáp, khối u tử cung và sarcoma mô mềm.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này là protein/peptit bao gồm

kháng nguyên virut của *Coronaviridae*;

ưu tiên protein gai của virut corona;

ưu tiên hơn tiểu đơn vị S1 protein gai của virut corona;

ưu tiên hơn vùng liên kết thụ thể protein gai của virut corona RBD;

hoặc mảnh hoặc biến thể có tính sinh miễn dịch của tất cả kháng nguyên protein/peptit nêu trên.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, virut corona này là SARS-CoV-2 hoặc Virut

corona gây hội chứng hô hấp Trung Đông.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp của kháng nguyên như được xác định trước đây với protein hoặc peptit khác.

Ưu tiên, protein dung hợp này được chọn từ SARS-CoV-2 RBD-mFc; hoặc SARS-CoV-2 RBD-his; hoặc MERS-COV RBD-his; và

Ưu tiên Fc là mảnh Fc IgG, ưu tiên hơn mảnh Fc IgG ở người hoặc chuột.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này bao gồm trình tự như được nêu là trình tự bất kỳ trong số SEQ ID số: 1, SEQ ID số: 2, SEQ ID số: 3.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, liên hợp kháng nguyên glyco-protein/peptit này có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 400KDa đến 14000 KDa.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này là protein/peptit bao gồm

kháng nguyên virus của *Paramyxoviridae*;

ưu tiên vùng liên kết thụ thể glycoprotein của paramyxovirus;

ưu tiên glycoprotein F, glycoprotein G của paramyxovirus;

hoặc mảnh hoặc biến thể có tính sinh miễn dịch của tất cả kháng nguyên protein/peptit nêu trên.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, virus *Paramyxoviridae* này là virus hợp bào hô hấp ở người.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp của kháng nguyên như được xác định trước đây với protein hoặc peptit khác; ưu tiên protein dung hợp này là RSV-gpG-his.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, trong đó kháng nguyên protein/peptit này bao gồm trình tự như được nêu là SEQ ID số: 4 và/hoặc SEQ ID số: 12.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này là protein/peptit bao gồm

kháng nguyên virus của *Orthomyxoviridae*;

ưu tiên vùng liên kết thụ thể glycoprotein của orthomyxovirus;

ưu tiên protein haemagglutinin (HA) và/hoặc protein neuraminidase (NA);

hoặc mảnh hoặc biến thể có tính sinh miễn dịch của tất cả kháng nguyên protein/peptit nêu trên.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, orthomyxovirus này là virus cúm B và/hoặc virus cúm A H5N1.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp của kháng nguyên như được xác định trước đây với protein hoặc peptit khác,

ưu tiên protein dung hợp này là Flu-B-HA1-his hoặc H5N1-HA-his.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, trong đó kháng nguyên protein/peptit này bao gồm trình tự như được nêu là trình tự bất kỳ trong số SEQ ID số: 7 và/hoặc SEQ ID số: 15, SEQ ID số: 8 và/hoặc SEQ ID số: 16.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này là protein/peptit bao gồm

kháng nguyên virus của *Filovirida*;

ưu tiên vùng liên kết thụ thể a glycoprotein vỏ của filovirus;

ưu tiên glycoprotein vỏ của filovirus GP1 và/hoặc GP2;

ưu tiên hơn glycoprotein vỏ của filovirus GP1;

hoặc mảnh hoặc biến thể có tính sinh miễn dịch của tất cả kháng nguyên protein/peptit nêu trên.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, filovirus này là virus Ebola.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp của kháng nguyên như được xác định trước đây với protein hoặc peptit khác,

ưu tiên protein dung hợp này là Ebola-GP-Fc hoặc Ebola-GP1-his;

trong đó Fc ưu tiên này là mảnh Fc IgG, ưu tiên hơn mảnh Fc IgG ở người hoặc chuột.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này bao gồm các trình tự như được nêu là trình tự bất kỳ trong số SEQ ID số: 9 và/hoặc SEQ ID số: 17, SEQ ID số: 10 và/hoặc SEQ ID số: 18.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, protein/kháng nguyên này là protein/peptit bao gồm

kháng nguyên virus của *Flaviviridae*;

ưu tiên kháng nguyên virus của *Flavivirus* hoặc *Hepacivirus*;

ưu tiên vùng liên kết thụ thể protein vỏ của virus *Flavivirus*;

ưu tiên ít nhất một trong số các miền cấu trúc EDI, EDII và EDIII của protein vỏ của virus *Flavivirus*;

ưu tiên hơn miền cấu trúc EDIII của protein vỏ của virus *Flavivirus*; hoặc

ưu tiên vùng liên kết thụ thể glycoprotein vỏ của virus *Hepacivirus*:

ưu tiên glycoprotein vỏ virus của *Hepacivirus* E1 và/hoặc E2;

hoặc mảnh hoặc biến thể có tính sinh miễn dịch của tất cả kháng nguyên protein/peptit nêu trên.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, ưu tiên virus Flavivirus này là virus Zika; ưu tiên virus *Hepacivirus* này là virus viêm gan C.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp của kháng nguyên như được xác định trước đây với protein hoặc peptit khác,

ưu tiên protein dung hợp này là ZIKV-E-Fc; trong đó

Ưu tiên Fc là mảnh Fc IgG, ưu tiên hơn mảnh Fc IgG ở người hoặc chuột; hoặc

ưu tiên protein dung hợp này là HCV-E2-his và/hoặc HCV-E1-his.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này bao gồm trình tự như được nêu là trình tự bất kỳ trong số SEQ ID số: 11 và/hoặc SEQ ID số: 19, SEQ ID số: 6 và/hoặc SEQ ID số: 14, SEQ ID số: 5 và/hoặc SEQ ID số: 13.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên glyco-protein/peptit này còn được tạo liên hợp với chất mang protein.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, chất mang protein này là giải độc tố uốn ván, mảnh giải độc tố uốn ván C, đột biến không độc của giải độc tố uốn ván, giải độc tố bạch hầu, CRM197, các đột biến không độc khác của giải độc tố bạch hầu, ưu tiên CRM197.

Khía cạnh thứ hai của sáng chế đề cập đến liên hợp kháng nguyên glyco-protein/peptit có tính sinh miễn dịch tăng so với kháng nguyên protein/peptit không được tạo liên hợp.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, sacarit này được chọn từ polysacarit, oligosacarit hoặc monosacarit;

ưu tiên polysacarit vỏ của *Neisseria encephalitis*, polysacarit vỏ của *Haemophilus influenzae* b, polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae*, polysacarit vỏ của Nhóm B *Staphylococcus aureus*, dextran, mannan, tinh bột, inulin, pectin, tinh bột carboxymetyl, chitosan và các chất dẫn xuất của chúng;

ưu tiên hơn polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae*;

ưu tiên nhất polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 14, polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 6B và polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 7F; trong đó kháng nguyên protein/peptit này được chọn từ kháng nguyên protein/peptit liên kết mầm bệnh hoặc kháng nguyên protein/peptit liên kết khối u,

trong đó mầm bệnh này được chọn từ:

virut corona, virut gây thiếu hụt miễn dịch ở người HIV-1, virut herpes simplex ở người, virut cự bào (cytomegalovirus), virut rota (rotavirus), virut EB, virut varicella zoster, virut viêm gan, virut hợp bào hô hấp, virut parainfluenza, virut sởi, virut gây đại dịch quai bị, virut u nhú ở người, Flavivirus hoặc virut cúm, *Neisseria*, *Moraxella*, *Bordetella*, *Mycobacterium* bao gồm *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia* bao gồm *Escherichia coli* độc tố ruột; *Salmonella*, *Listeria*, *Helicobacter*, *Staphylococcus* bao gồm *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*; *Borrelia*, *Chlamydia* bao gồm *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*; *Plasmodium* bao gồm *Plasmodium falciparum*; *Toxoplasma*, *Candida*;

ưu tiên protein/peptit có liên quan đến sự xâm nhập mầm bệnh của vật chủ này;

ưu tiên hơn mầm bệnh nêu trên là virut;

ưu tiên hơn các virut nêu trên được chọn từ các virut của *Coronaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Filoviridae* hoặc *Flaviviridae*, và

trong đó khối u này được chọn từ:

u lympho tế bào B lớn lan tỏa, u lympho nang, u lympho khác, bệnh bạch cầu, đa u tủy, u trung biểu mô, ung thư dạ dày, u cơ vân ác tính, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú, ung thư ống mật và túi mật, ung thư bàng quang, khối u não bao gồm u nguyên bào thần kinh, u vỏ thần kinh, u thần kinh đệm, u nguyên bào thần kinh đệm và u tế bào hình sao, ung thư cổ tử cung, ung thư ruột kết, u ác tính, ung thư nội mạc tử cung, ung thư thực quản, ung thư đầu và cổ, ung thư phổi, ung thư vòm họng, ung thư buồng trứng, ung thư tuyến tụy, ung thư tế bào thận, ung thư trực tràng, ung thư tuyến giáp, khối u tuyến cận giáp, khối u tử cung và sarcoma mô mềm.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này là protein/peptit bao gồm

kháng nguyên virut của *Coronaviridae*;

ưu tiên protein gai của virut corona;

ưu tiên hơn tiểu đơn vị S1 protein gai của virut corona;

ưu tiên hơn vùng liên kết thụ thể protein gai của virut corona RBD;

hoặc mảnh hoặc biến thể có tính sinh miễn dịch của tất cả kháng nguyên protein/peptit nêu trên.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, virut corona này là SARS-CoV-2 hoặc Virut corona gây hội chứng hô hấp Trung Đông.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp của kháng nguyên như được xác định trước đây với protein hoặc peptit khác.

Ưu tiên, protein dung hợp này được chọn từ SARS-CoV-2 RBD-mFc; hoặc SARS-CoV-2 RBD-his; hoặc MERS-COV RBD-his; và

Ưu tiên Fc là mảnh Fc IgG, ưu tiên hơn mảnh Fc IgG ở người hoặc chuột.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này bao gồm trình tự như được nêu là trình tự bất kỳ trong số SEQ ID số: 1, SEQ ID số: 2, SEQ ID số: 3.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này là protein/peptit bao gồm

kháng nguyên bao gồm *Paramyxoviridae*;

ưu tiên vùng liên kết thụ thể glycoprotein của paramyxovirus;

ưu tiên glycoprotein F, glycoprotein G của paramyxovirus;

hoặc mảnh hoặc biến thể có tính sinh miễn dịch của tất cả kháng nguyên protein/peptit nêu trên.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, paramyxovirus này là virus hợp bào hô hấp ở người.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp của kháng nguyên như được xác định trước đây với protein hoặc peptit khác,

ưu tiên protein dung hợp này là RSV-gpG-his.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này bao gồm trình tự như được nêu là SEQ ID số: 4 và/hoặc SEQ ID số: 12.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này bao gồm

kháng nguyên bao gồm *Orthomyxoviridae*;

ưu tiên vùng liên kết thụ thể glycoprotein của orthomyxovirus;

ưu tiên protein haemagglutinin (HA) và/hoặc protein neuraminidase (NA);

hoặc mảnh hoặc biến thể có tính sinh miễn dịch của tất cả kháng nguyên protein/peptit nêu trên.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, orthomyxovirus này là virus cúm B và/hoặc virus cúm A H5N1.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp của kháng nguyên như được xác định trước đây với protein hoặc peptit khác;

ưu tiên protein dung hợp này là Flu-B-HA1-his hoặc H5N1-HA-his.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này bao gồm các trình tự như được nêu là trình tự bất kỳ trong số SEQ ID số: 7 và/hoặc SEQ ID số: 15, SEQ ID số: 8 và/hoặc SEQ ID số: 16.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này bao gồm kháng nguyên bao gồm *Filoviridae*;

ưu tiên vùng liên kết thụ thể glycoprotein vỏ của filovirus;

ưu tiên glycoprotein vỏ của filovirus GP1 và/hoặc GP2;

ưu tiên hơn glycoprotein vỏ của filovirus GP1;

hoặc mảnh hoặc biến thể có tính sinh miễn dịch của tất cả kháng nguyên protein/peptit nêu trên.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, filovirus này là virus Ebola.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp của kháng nguyên như được xác định trước đây với protein hoặc peptit khác,

ưu tiên protein dung hợp này là Ebola-GP-Fc hoặc Ebola-GP1-his;

trong đó Fc ưu tiên này là mảnh Fc IgG, ưu tiên hơn mảnh Fc IgG ở người hoặc chuột.

Theo phương án đặc biệt của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này bao gồm các trình tự như được nêu là trình tự bất kỳ trong số SEQ ID số: 9 và/hoặc SEQ ID số: 17, SEQ ID số: 10 và/hoặc SEQ ID số: 18.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này bao gồm kháng nguyên bao gồm *Flaviviridae*;

ưu tiên virus kháng nguyên của *Flavivirus* hoặc *Hepacivirus*;

ưu tiên vùng liên kết thụ thể protein vỏ của *Flavivirus* virus;

ưu tiên ít nhất một trong số các miền cấu trúc EDI, EDII và EDIII của protein vỏ của virus *Flavivirus*;

ưu tiên hơn miền cấu trúc EDIII của protein vỏ của virus *Flavivirus*; hoặc

ưu tiên vùng liên kết thụ thể glycoprotein vỏ của virus *Hepacivirus*;

ưu tiên glycoprotein vỏ virus của *Hepacivirus* E1 và/hoặc E2;

hoặc mảnh hoặc biến thể có tính sinh miễn dịch của tất cả kháng nguyên protein/peptit nêu trên.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, ưu tiên virus *Flavivirus* này là virus Zika; hoặc ưu tiên virus *Hepacivirus* này là virus viêm gan C.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp của kháng nguyên như được xác định trước đây với protein hoặc peptit khác;

ưu tiên protein dung hợp này là ZIKV-E-Fc; trong đó

Ưu tiên Fc là mảnh Fc IgG, ưu tiên hơn mảnh Fc IgG ở người hoặc chuột; hoặc

ưu tiên protein dung hợp này là HCV-E2-his và/hoặc HCV-E1-his.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên protein/peptit này bao gồm bất kỳ trình tự nào trong số các trình tự được nêu là SEQ ID số: 11 và/hoặc SEQ ID số: 19, SEQ ID số: 6 và/hoặc SEQ ID số: 14, SEQ ID số: 5 và/hoặc SEQ ID số: 13.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, liên hợp kháng nguyên glyco-protein/peptit này có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 400 KDa đến 14000 KDa.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng nguyên glyco-protein/peptit này còn được tạo liên hợp với chất mang protein.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, chất mang protein này là giải độc tố uốn ván, mảnh giải độc tố uốn ván C, đột biến không độc của giải độc tố uốn ván, giải độc tố bạch hầu, CRM197, các đột biến không độc khác của giải độc tố bạch hầu, ưu tiên CRM197.

Khía cạnh thứ ba của sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch, bao gồm liên hợp kháng nguyên glyco-protein/peptit nêu trên, các tá chất miễn dịch và các tá chất.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, các tá chất này được chọn từ tá chất nhôm, tá chất nhũ tương nước trong dầu, MF59, QS-21 và lipit monophosphat A.

Khía cạnh thứ tư của sáng chế đề cập đến việc sử dụng liên hợp kháng nguyên glyco-protein/peptit hoặc *các chế phẩm sinh miễn dịch* dùng để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh do các kháng nguyên protein/peptit liên kết mầm bệnh hoặc protein/peptit liên kết khối u như được xác định trước đây gây ra, ưu tiên mầm bệnh này là

virut corona, ưu tiên hơn SARS-CoV-2 và/hoặc MERS-CoV;

paramyxovirus, ưu tiên hơn virut hợp bào hô hấp ở người;

orthomyxovirus, ưu tiên hơn virut cúm B và/hoặc virut cúm A H5N1;

filovirus, ưu tiên hơn virut Ebola;

Flavivirus, ưu tiên virut Zika; hoặc các virut viêm gan C.

Khía cạnh thứ năm của sáng chế đề cập đến việc sử dụng liên hợp kháng nguyên glyco-protein/peptit hoặc các chế phẩm sinh miễn dịch trong bào chế các vắc-xin hoặc các thuốc dùng để điều trị phòng ngừa các bệnh do các kháng nguyên protein/peptit liên kết mầm bệnh hoặc protein/peptit liên kết khối u như được xác định trước đây gây ra, ưu tiên mầm bệnh này là

virut corona, ưu tiên hơn SARS-CoV-2 và/hoặc MERS-CoV;
 paramyxovirus, ưu tiên hơn virut hợp bào hô hấp ở người;
 orthomyxovirus, ưu tiên hơn virut cúm B và/hoặc virut cúm A H5N1;
 filovirus, ưu tiên hơn virut Ebola;
 Flavivirus, ưu tiên hơn virut Zika; hoặc virut viêm gan C.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện các chuẩn giá kháng thể kháng -SARS-COV-2 RBD của huyết thanh chuột được tạo miễn dịch bằng tổ hợp miễn dịch bằng cách sử dụng SARS-COV-2 RBD-mFc làm kháng nguyên. Các giá trị là độ hấp thụ được phát hiện ở độ pha loãng 8000 lần của huyết thanh này.

Fig. 2 thể hiện sự so sánh giữa các tá chất khác nhau với liên hợp kháng nguyên SARS-COV-2 RBD-his-PS14 ở độ pha loãng huyết thanh là 32000 lần và liều lượng miễn dịch là 3 µg/chuột.

Fig. 3 thể hiện liên hợp polysacarit SARS-COV-2 RBD protein-PS14, và sự so sánh giữa hoạt tính trung hòa huyết thanh của các tổ hợp miễn dịch của SARS-COV-2 RBD và CRM197 được đồng liên hợp với PS14 làm kháng nguyên trong chuột được tạo miễn dịch ở độ pha loãng huyết thanh là 1500 lần, và liều lượng miễn dịch là 3 µg/chuột.

Fig. 4 thể hiện các kết quả miễn dịch học của PS7F, PS14 và dextran làm các tác nhân liên hợp cho liên hợp này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Trừ khi được nêu khác đi, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Đối với các mục đích của sáng chế, các thuật ngữ sau đây được định nghĩa thêm.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này và trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít "một", "khác", và "này" bao gồm chỉ định số nhiều của đối tượng trừ khi ngữ cảnh nêu khác đi một cách rõ ràng.

Các thuật ngữ "bao gồm", "gồm" đề cập đến việc bao gồm các thành phần cụ thể mà không loại trừ bất kỳ thành phần nào khác. Các thuật ngữ chẳng hạn như "về cơ bản gồm có" cho phép bao gồm các thành phần hoặc các bước khác không ảnh hưởng đến đặc tính mới hoặc cơ bản của sáng chế, tức là chúng loại trừ các thành phần hoặc các bước chưa được liệt kê khác làm ảnh hưởng đến đặc tính mới hoặc cơ bản của sáng chế. Thuật ngữ "gồm có" có nghĩa là bao gồm các thành phần hoặc các nhóm thành phần cụ thể

và loại trừ tất cả các thành phần khác. Trong bản mô tả này và các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, "trong đó kháng nguyên protein/peptit này là protein/peptit bao gồm X" có nghĩa là trình tự axit amin của kháng nguyên protein/peptit này bao gồm trình tự protein/peptit của X.

Thuật ngữ "kháng nguyên" là chất ngoại sinh được nhận dạng (được liên kết đặc hiệu) bởi kháng thể hoặc thụ thể tế bào T, nhưng không tạo ra phản ứng miễn dịch một cách chắc chắn. Các chất ngoại sinh tạo ra miễn dịch đặc hiệu được gọi là "kháng nguyên sinh miễn dịch" hoặc "các chất sinh miễn dịch". "Bán kháng nguyên (semi-antigen)" là kháng nguyên không thể tự tạo ra phản ứng miễn dịch (mặc dù tổ hợp của một vài phân tử bán kháng nguyên, hoặc tổ hợp của bán kháng nguyên và chất mang phân tử lớn, có thể tạo ra phản ứng miễn dịch).

"Phản ứng miễn dịch thể dịch" là phản ứng miễn dịch qua trung gian kháng thể và liên quan đến việc đưa vào và sản xuất các kháng thể nhận dạng và liên kết các kháng nguyên trong chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế với ái lực nhất định. "Phản ứng miễn dịch qua trung gian tế bào" là phản ứng miễn dịch qua trung gian các tế bào T và/hoặc các bạch cầu khác được kích thích bằng cách cung cấp các epitop kháng nguyên có liên quan đến các phân tử lớp I hoặc lớp II của phức hợp tương thích mô chính (major histocompatibility complex - MHC), CD1 hoặc các phân tử giống MHC không điển hình khác.

Thuật ngữ "sacarit" có thể được sử dụng để chỉ các polysacarit, oligosacarit hoặc monosacarit. Polysacarit này có thể được phân lập từ sinh vật, chẳng hạn như vi khuẩn, và có thể là polysacarit xuất hiện tự nhiên, được tùy chọn tạo kích thước đến mức độ nhất định bằng các phương pháp vi lỏng (microfluidic). Việc thay đổi kích thước polysacarit làm giảm độ nhớt của mẫu thử polysacarit và/hoặc cải thiện khả năng lọc của sản phẩm được liên hợp. Các oligosacarit là các polysacarit được thủy phân có một số lượng nhỏ các đơn vị lặp lại (thông thường, từ 5 đến 30 đơn vị lặp lại). Các polysacarit cũng có thể được tổng hợp hóa học.

Thuật ngữ "liên hợp" được sử dụng trong bản mô tả này và các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo để chỉ protein/peptit được liên hợp cộng hóa trị với sacarit. Các liên hợp glyco-protein/peptit theo sáng chế và các chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm chúng có thể có chứa lượng nhất định các sacarit, protein/peptit tự do.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này "liên hợp" đề cập đến quá trình mà theo đó sacarit, chẳng hạn như polysacarit vô vi khuẩn, được liên kết cộng hóa trị với protein/peptit.

Thuật ngữ "chế phẩm sinh miễn dịch" đề cập đến bất kỳ được phẩm nào có chứa kháng nguyên, chẳng hạn như vi sinh vật hoặc thành phần của vi sinh vật này, có thể được sử dụng để tạo ra phản ứng miễn dịch ở một cá thể.

Thuật ngữ "chất mang" có thể được sử dụng để chỉ chất pha loãng, chất phụ trợ, tá chất hoặc chất trung gian được sử dụng cùng với được phẩm này. Nước, các dung dịch muối và các dung dịch nước của dextroza và glyxerol có thể được sử dụng làm các chất mang lỏng, đặc biệt dùng cho các dung dịch có thể tiêm được.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, "tính sinh miễn dịch" có nghĩa là khả năng của kháng nguyên (hoặc epitop của kháng nguyên) chẳng hạn như vùng liên kết thụ thể protein gai của virus corona hoặc liên hợp glyco của protein gai hoặc chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm protein gai này để tạo ra phản ứng miễn dịch thể dịch hoặc qua trung gian tế bào hoặc cả trong vật chủ (ví dụ: động vật có vú).

Phản ứng miễn dịch "bảo vệ" là khả năng của chế phẩm sinh miễn dịch để tạo ra phản ứng miễn dịch qua trung gian thể dịch hoặc tế bào, hoặc cả hai, để bảo vệ cá thể không bị lây nhiễm. Việc bảo vệ được tạo ra này không cần phải tuyệt đối, tức là, không cần ngăn chặn hoặc tiêu diệt hoàn toàn sự lây nhiễm, miễn là có sự cải thiện đáng kể về mặt thống kê so với nhóm các cá thể đối chứng (ví dụ, các động vật bị lây nhiễm không được tiêm vắc-xin hoặc chế phẩm sinh miễn dịch). Việc bảo vệ có thể được giới hạn trong việc điều chỉnh mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng lây nhiễm hoặc sự nhanh chóng của các cuộc tấn công.

Các thuật ngữ "liều lượng sinh miễn dịch" và "liều lượng hữu hiệu miễn dịch" được sử dụng theo cách hoán đổi cho nhau trong bản mô tả này và có nghĩa là kháng nguyên hoặc chế phẩm sinh miễn dịch này đủ để kích hoạt phản ứng miễn dịch (phản ứng tế bào (tế bào T) hoặc phản ứng thể dịch (tế bào B hoặc kháng thể) hoặc cả hai, khi được đo bằng các thử nghiệm tiêu chuẩn được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết đến).

Hiệu quả của kháng nguyên làm chất sinh miễn dịch có thể được đo, ví dụ, bằng thử nghiệm tăng sinh, bằng thử nghiệm phân giải tế bào, hoặc bằng cách đo mức hoạt động của tế bào B.

Phương pháp theo sáng chế dùng để cải thiện tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên protein/peptit

Sáng chế này là sáng chế tiên phong trong đó các tác giả sáng chế phát hiện rằng tính sinh miễn dịch của kháng nguyên protein/peptit được cải thiện bao gồm bằng cách tạo liên hợp kháng nguyên protein/peptit này với sacarit để tạo ra liên hợp kháng nguyên glyco-protein/peptit.

Trước khi có sáng chế này, không có nghiên cứu nào báo cáo về sự gia tăng tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên protein/peptit trong liên hợp kháng nguyên glyco-protein/peptit. Ngược lại, như được đề cập trong phần tình trạng kỹ thuật của sáng chế, các nghiên cứu trước đây đã mô tả tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên protein/peptit

trong các liên hợp là tính sinh miễn dịch được bảo toàn (US5192540A/US9296795B) hoặc các epitop kháng nguyên protein/peptit này không bị thay đổi bởi liên hợp (US9296795B). Các mô tả này là ngược với mục đích của sáng chế.

Các kháng nguyên protein/peptit được liên hợp glyco theo sáng chế

1. Các virus *Coronaviridae* làm các kháng nguyên

Họ *Coronaviridae* bao gồm các phân họ *Orthocoronavirinae* và *Letovirinae*.

Giống *betacoronaviru* của phân họ *Orthocoronaviridae* có chứa virus corona Hội chứng Hô hấp Cấp tính Nghiêm trọng (Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus - SARS-CoV) đã được biết rõ, virus corona liên quan đến Hội chứng Hô hấp Trung Đông (Middle East respiratory syndrome-related coronavirus - MERS-CoV), và virus corona Hội chứng Hô hấp Cấp tính Nghiêm trọng 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 - SARS-CoV-2). Ba loại virus này làm trung gian cho sự xâm nhập của virus chủ yếu thông qua sự gắn kết của protein gai (S protein) với các thụ thể tế bào chủ và xác định các mô của virus hoặc tính hướng kích thích của vật chủ. Protein thụ thể tế bào vật chủ đối với SARS-CoV-2 enzym chuyển đổi angiotensin 2 (angiotensin-converting enzyme 2 - ACE2). Protein gai (S protein) này liên kết với thụ thể ACE2 này và bị phân cắt bởi proteaza của vật chủ này thành polypeptit S1 có chứa miền liên kết thụ thể (SARS-CoV-2 RBD (Miền liên kết thụ thể)) và polypeptit S2 chịu trách nhiệm làm trung gian cho sự dung hợp của virus này với màng tế bào này và do đó xâm nhập vào vật chủ này.

Theo một phương án của sáng chế, protein gai của virus corona SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 S protein) này, vùng ngoại bào của nó, tiểu đơn vị S1 này hoặc vùng liên kết thụ thể này được sử dụng làm các kháng nguyên.

Theo một phương án của sáng chế, Virus corona gây hội chứng hô hấp Trung Đông được chọn làm kháng nguyên, ví dụ như vùng ngoại bào của nó, tiểu đơn vị S1 hoặc vùng liên kết thụ thể được sử dụng làm kháng nguyên.

2. Các virus *Paramyxoviridae* làm các kháng nguyên

Họ *Paramyxoviridae* bao gồm hai phân họ, *Paramyxivirinae* và *Pneumovirinae*. Virus hợp bào hô hấp ở người (RSV) là một virus trong số các virus hô hấp của giống *Respirovirus* trong phân họ *Paramyxivirinae*. RSV mã hóa hai glycoprotein bề mặt xuyên màng chính, glycoprotein G (protein hấp phụ) và glycoprotein F (protein dung hợp). Glycoprotein G làm trung gian cho sự liên kết virus với các thụ thể tế bào, trong khi glycoprotein F tạo điều kiện cho sự dung hợp virus với màng tế bào, cho phép các ribonucleoprotein virus xâm nhập vào tế bào chất (Lopez và các cộng sự (1998) *J. Virology* 72:6922-6928).

Theo một phương án của sáng chế, các glycoprotein vỏ RSV được chọn làm các kháng nguyên. Glycoprotein vỏ RSV ở người, chẳng hạn như glycoprotein RSV F hoặc

glycoprotein G, có thể được sử dụng.

3. Các virus *Orthomyxoviridae* làm các kháng nguyên

Họ *Orthomyxoviridae* bao gồm *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C* và các giống khác.

Các lây nhiễm virus cúm A, B và C chủ yếu dựa vào hai proteoglycan vỏ: haemagglutinin (HA) và neuraminidaza (NA), hai proteoglycan vỏ này chịu trách nhiệm cho sự gắn kết virus và sự xâm nhập tế bào vào các hạt virus. Lây nhiễm virus cúm được kích hoạt bởi sự gắn kết của protein haemagglutinin (HA) với các thụ thể tế bào có chứa axit sialic (các glycoprotein và các glycolipid) trên bề mặt của virion. Protein neuraminidaza (NA) làm trung gian cho quá trình xử lý thụ thể axit sialic và sự xâm nhập của virus vào các tế bào phụ thuộc vào cytokinesis trung gian thụ thể phụ thuộc HA (Patent Trung Quốc số CN103865892B).

Theo một phương án của sáng chế, protein haemagglutinin (HA) cúm A H5N1 được sử dụng làm kháng nguyên, và protein haemagglutinin (tiểu đơn vị HA1) cúm A H5N1 cũng có thể được sử dụng làm kháng nguyên.

4. Các virus *Filoviridae* làm các kháng nguyên

Filoviridae được đại diện bởi các ebolavirus của giống *Ebolavirus* và các marburgvirus của giống *Marburgvirus*.

Chỉ protein có mặt trên bề mặt của các Ebolavirus là glycoprotein (GP). Trimer của GP1, 2 tạo ra gai bề mặt của virus này và bao gồm hai tiểu đơn vị, GP1 và GP2, được liên kết bởi các liên kết disulfide (Volchkova, VA và các cộng sự, (1998), *Virology* 250:408-414; Falzarano, D. và các cộng sự (2006) *ChemBiochem* 7: 1605-1611). GP1 được biết là làm trung gian cho sự gắn kết virus với các tế bào chủ và GP2 liên quan đến sự dung hợp màng (Sanchez, A. và các cộng sự, (1996), *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3602-3607; Alazard-Dany, N. và các cộng sự, (2006), *J. Gen. Virol.* 87: 1247- 1257).

Theo một phương án của sáng chế, glycoprotein (GP) của Ebolavirus này được chọn làm kháng nguyên. Chẳng hạn như miền cấu trúc ngoại bào GP, các protein GP tiểu đơn vị (GP1 và/hoặc GP2).

5. Các virus *Flaviviridae* làm các kháng nguyên

Họ *Flaviviridae* của các virus chủ yếu bao gồm giống *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Pegivirus* and *Hepacivirus*, trong đó *Flaviviridae* bao gồm virus Zika (ZIKV), sốt xuất huyết (Dengue fever - DV), virus West Nile, virus viêm não Nhật Bản và virus sốt vàng. *Hepacivirus* bao gồm virus viêm gan C (HCV).

Protein vỏ *Flavivirus* đóng vai trò quan trọng trong quá trình lây nhiễm virus vào tế bào chủ, làm trung gian cho sự xâm nhập của virus này vào tế bào vật chủ này. Protein vỏ

Flavivirus này gồm có ba miền vỏ cấu trúc riêng biệt I, II và III (EDI, EDII và EDIII). EDI là miền trung tâm cấu trúc của protein vỏ này làm ổn định định hướng tổng thể của protein này, và các vị trí glycosyl hóa trong EDI có liên quan đến sự sản xuất virus, độ nhạy pH và sự xâm lấn thần kinh. EDII đóng vai trò quan trọng trong sự dung hợp màng do các ưu điểm miễn dịch học của các epitop vòng dung hợp và các epitop đối xứng hai bên vỏ (envelope dimeric epitope). Ngoài ra, EDIII là đích chính để trung hòa các kháng thể (Xingcui Zhang và các cộng sự, (2017) *Viruses*. 2017 Nov; 9(11): 338. Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in *Flavivirus* Infections).

Protein vỏ virus Zika ("E" hoặc "EP") bao gồm ba miền cấu trúc riêng biệt. E miền cấu trúc I (E-DI) là miền cấu trúc trung tâm tổ chức toàn bộ cấu trúc protein E. E miền cấu trúc II (E-DII) được tạo ra bởi hai vòng mở rộng nhô ra từ E-DI và nằm trong các túi ở E-DI và E miền cấu trúc III (E-DIII). E-DIII là miền cấu trúc giống globulin miễn dịch, tạo ra các phần nhô nhỏ trên bề mặt của các hạt virus trưởng thành, nhẵn, hình cầu và được cho là tương tác với các thụ thể tế bào trên các tế bào đích (Công bố đơn sáng chế Trung Quốc số CN109996560A).

Bộ gen ARN HCV mã hóa protein đa monome đơn lẻ phân cắt thành ba protein cấu trúc (lõi, các glycoprotein E1 và E2) và bảy protein không có cấu trúc (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A và NS5B) khi dịch mã hoặc sau dịch mã. Các protein vỏ này, các glycoprotein E1 và E2, tạo ra các heterodime và cấu thành nên các protein vỏ virus, các protein này đóng vai trò quan trọng trong việc làm trung gian cho xâm nhập và sự tạo hình của virus và khi virus này đi vào tế bào vật chủ này. Các proteoglycan vỏ virus viêm gan C liên kết với các protein cụ thể trên bề mặt tế bào gan của vật chủ này để bắt đầu quá trình xâm nhập. Quá trình này liên quan đến số lượng lớn các thụ thể/các đồng thụ thể của vật chủ. Trong đó, E2 là proteoglycan vỏ của HCV chính và tương tác trực tiếp với thụ thể/đồng thụ thể. Từ lâu, người ta cho rằng E1 không tương tác trực tiếp với thụ thể vật chủ trong quá trình này, mà E1 tạo ra sự dung hợp màng kết hợp với E2 bằng cách duy trì hình dáng E2 chức năng cần thiết để liên kết với thụ thể (Yimin, Tong, và các cộng sự, (2018) *Front Immunol*. 2018; 9: 1411. Role of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E1 in Virus Entry and Assembly).

Theo một phương án của sáng chế, protein vỏ của virus Zika E-DIII được chọn làm kháng nguyên.

Theo một phương án của sáng chế, glycoprotein vỏ của virus viêm gan C E1 và/hoặc E2 được chọn làm các kháng nguyên.

Các kháng nguyên virus được mô tả trên đây trong phần này có thể thu được bằng cách chiết xuất các mầm bệnh tự nhiên hoặc bằng cách tái tổ hợp di truyền. Phiên bản sửa đổi của các kháng nguyên này, ví dụ: các mảnh hoặc các biến thể sinh miễn dịch của các

kháng nguyên này cũng như là ví dụ: các protein dung hợp của các kháng nguyên này với các thể đã được tinh chế hoặc với các mảnh Fc kháng thể, có thể được sử dụng theo sáng chế.

Các polysacarit có thể là các polysacarit vi khuẩn chẳng hạn như polysacarit vỏ thông thường của *Neisseria encephalitis*, polysacarit vỏ của *Haemophilus influenzae b*, polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae*, polysacarit vỏ của *Staphylococcus aureus* Nhóm B, cũng như là dextran và mannan và v.v.. Các polysacarit này cũng có thể là các polysacarit thu được từ thực vật chẳng hạn như tinh bột, inulin, pectin, v.v., hoặc các dẫn xuất của các polysacarit được biến đổi hóa học, chẳng hạn như tinh bột carboxymetyl. Các polysacarit này cũng có thể là các polysacarit có nguồn gốc động vật, chẳng hạn như chitosan và các dẫn xuất của chitosan.

Quy trình liên hợp protein polysacarit là như sau: polysacarit này được tạo ra để mang nhóm hoạt động phản ứng bởi phản ứng hóa học. Sau đó, các nhóm hoạt động này phản ứng với các nhóm phản ứng hóa học trên phân tử protein này chẳng hạn như các nhóm amino, carboxyl, sulfhydryl, vòng imidazol trên histidin, vòng indol trên tryptophan, vòng phenyl trên tyrosin, vòng phenyl trên phenylalanin, vòng hydroxyl trên serin và glutamin và asparagin để tạo ra các liên kết cộng hóa trị.

Một phương pháp tạo liên hợp các polysacarit vào các phân tử protein là oxy hóa polysacarit này bằng natri periodat để tạo ra nhóm andehyt trên polysacarit này, nhóm này phản ứng với nhóm amin trên phân tử protein này để tạo thành bazơ Schiff, bị khử thành liên kết đơn bền với sự có mặt của các chất khử. Theo đó, polysacarit này tạo ra liên kết cộng hóa trị với phân tử protein này. Chất khử chẳng hạn như natri xyanoborohydrat có thể được thêm vào hệ thống phản ứng.

Phương pháp khác để liên hợp các polysacarit vào các phân tử protein là phản ứng của polysacarit này với cyanogen bromua hoặc 1-cyano-4-dimethylaminopyridin tetraflorat để tạo ra este xyanat phản ứng. Nhóm xyanat này phản ứng với nhóm amin trên bề mặt của protein này để tạo thành cộng hóa trị. Polysacarit được hoạt hóa này cũng có thể được phản ứng đầu tiên với nhánh liên kết như hexandiamin, hexandihydrazit, v.v. Sau đó, sản phẩm này được phản ứng với protein khi có mặt chất ngưng tụ để tạo thành liên kết cộng hóa trị.

Polysacarit cũng có thể được kích hoạt bằng các thuốc thử hóa học khác và sau đó được phản ứng với protein để tạo thành liên hợp. Chẳng hạn như epichlorhydrin, triazin, diazin, divinyl sulfon và các thuốc thử khác đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Để cải thiện tính sinh miễn dịch của liên hợp kháng nguyên glyco-protein/peptit theo sáng chế, chất mang protein có thể được thêm vào phản ứng của sacarit này với liên hợp kháng nguyên protein/peptit này để tạo thành liên hợp chất mang protein kháng nguyên

glyco-protein/peptit. Chất mang protein này có thể là giải độc tố uốn ván, mảnh C của giải độc tố uốn ván, đột biến không độc của giải độc tố uốn ván, giải độc tố bạch hầu, CRM197, các thể đột biến không độc khác của giải độc tố bạch hầu, ưu tiên CRM197, được sử dụng phổ biến trong công nghiệp vắc-xin.

Các chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế

Theo một phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế còn bao gồm ít nhất một trong số tá chất, chất đệm, chất bảo vệ đông lạnh, muối, cation hóa trị hai, chất tẩy rửa không ion, chất ức chế oxi hóa gốc tự do, chất pha loãng hoặc chất mang. Theo một phương án, tá chất trong chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế là tá chất nền nhôm. Theo một phương án, tá chất này là tá chất nền nhôm được chọn từ nhôm photphat, nhôm sunphat và nhôm hydroxit. Theo một phương án, tá chất này là nhôm photphat.

Tá chất là chất giúp tăng cường phản ứng miễn dịch khi được sử dụng cùng với chất miễn dịch hoặc kháng nguyên. Các chế phẩm được sử dụng theo sáng chế có thể có chứa hoặc có thể không chứa tá chất vắc-xin. Các tá chất có thể được sử dụng trong các chế phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở:

Các chế phẩm nhũ tương dầu bao gồm các nhũ tương squalen- nước, ví dụ MF59; Tá chất Freund hoàn chỉnh (Complete Freund Adjuvant - CFA) và Tá chất Freund không hoàn chỉnh (Incomplete Freund Adjuvant - IFA); các công thức saponin; Tổ hợp của saponin và cholesterol để tạo thành các hạt độc đáo được gọi là Các phức hợp kích thích miễn dịch (Immunostimulatory Complexes - ISCOM); các Virosome và các hạt giống virus; Tá chất được sử dụng sẽ phụ thuộc vào cá thể được sử dụng chế phẩm sinh miễn dịch này, đường dùng được chỉ định và tần suất sử dụng.

Chế phẩm sinh miễn dịch này có thể tùy ý bao gồm chất mang được dụng. Các chất mang được dụng này bao gồm các chất mang của các động vật (bao gồm người cũng như là các động vật có vú không phải là người) như được ghi nhận hoặc sẽ được ghi nhận trong các được điển quốc gia. Thuật ngữ "chất mang" có thể được sử dụng để chỉ chất pha loãng, tá chất, tá được hoặc môi trường được sử dụng cùng với được phẩm này. Nước, các dung dịch muối cũng như là các dung dịch nước dextroza và glyxerol có thể được sử dụng làm các chất mang lỏng, đặc biệt cho các dung dịch tiêm.

Các chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều chất điều hòa miễn dịch bổ sung, là các chất làm nhiễu loạn hoặc thay đổi hệ thống miễn dịch để quan sát thấy sự điều hòa lên hoặc xuống của miễn dịch thể dịch và/hoặc qua trung gian tế bào. Theo một phương án, sáng chế đề xuất việc điều chỉnh tăng năng lực (các nhánh) thể dịch và/hoặc qua trung gian tế bào của hệ thống miễn dịch. Điều này bao gồm, ví dụ, các tá chất hoặc các cytokin.

Các đường dùng của các chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế

Các chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế dùng để điều trị chữa bệnh hoặc dự phòng có thể được đưa vào trong cơ, trong màng bụng, trong da hoặc dưới da; hoặc qua các màng nhầy đến miệng/thực quản, đường hô hấp, đường sinh dục. Ưu tiên sử dụng vắc-xin qua đường mũi để điều trị một số bệnh nhất định, chẳng hạn như ưu tiên cho bệnh viêm phổi hoặc viêm tai giữa. Mặc dù vắc-xin theo sáng chế có thể được tiêm một liều duy nhất, các thành phần của vắc-xin này cũng có thể được sử dụng đồng thời hoặc ở các thời điểm khác nhau. Ngoài một đường dùng đơn nhất, có thể sử dụng hai đường dùng khác nhau.

Liều lượng tối ưu của thành phần đối với chế phẩm sinh miễn dịch cụ thể có thể được xác định bằng các nghiên cứu tiêu chuẩn liên quan đến việc quan sát phản ứng miễn dịch thích hợp ở các cá thể. Sau khi tạo miễn dịch ban đầu, các cá thể có thể nhận được một hoặc một vài lần miễn dịch tăng cường theo khoảng thời gian thích hợp.

Sử dụng các chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế

Các liên hợp kháng nguyên protein/peptit và các chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế có thể phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh do các mầm bệnh gây ra chẳng hạn như các virus corona, các paramyxovirus, các orthomyxovirus, các filovirus và các flavivirus, và đặc biệt hơn là các virus SARS-CoV-2 và/hoặc MERS-CoV, virus hợp bào gây bệnh hô hấp ở người, virus cúm B, virus cúm A H5N1, virus Ebola, virus Zika và/hoặc virus viêm gan C.

Các từ viết tắt trong sáng chế

SARS-COV-2 RBD-mFc: protein dung hợp Fc chuột - vùng liên kết - thụ thể protein gai của virus corona SARS-CoV-2;

SARS-COV-2 RBD-his: vùng liên kết thụ thể protein gai của virus corona SARS-CoV-2 với thẻ 6-histidin;

MERS-COV RBD-his: vùng liên kết thụ thể protein gai của virus corona gây hội chứng hô hấp Trung Đông với thẻ 6-histidine tag;

RSV-gpG: Glycoprotein G của virus hợp bào hô hấp ở người;

HCV-E1: Glycoprotein vỏ E1 của virus viêm gan C;

HCV-E2: Protein E2 vỏ của virus viêm gan C;

flu-B-HA1: Protein Hemagglutinin Cúm B (Tiểu đơn vị HA1) ;

H5N1-HA: Hemagglutinin Cúm A H5N1;

Ebola-GP: v Glycoprotein (Miền liên kết thụ thể) của virus Ebola;

Ebola-GP1: Glycoprotein GP1 của virus Ebola;

ZIKV-E: protein vỏ của virus Zika (Miền III);

PS14: polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 14

PS7F: polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 7F

Alum: tá chất nhôm, trong trường hợp này là tá chất nhôm phot phát.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Điều chế polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 14 (PS14) và 7F (PS7F)

Các hạt *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 14 là ATCC 6314 và các hạt *Streptococcus pneumoniae* serotyp 7F là ATCC 10351.

Thêm 0,5 mL hạt *Streptococcus pneumoniae* được bảo quản bằng glyxerol vào 500 ml môi trường Hoeprich (V.M. Goncalves, Optimization of medium and cultivation conditions for capsular polysacarit production by *Streptococcus pneumoniae* serotyp 23F, *AllpMicrobiolBiotechnol* (2002) 59:713-717) ở 37 °C trong máy lắc ở tốc độ 150 vòng/phút trong khoảng thời gian từ 10 giờ đến 16 giờ và ngừng nuôi cấy khi OD600 cao hơn 1.0. Thêm 0,6 g natri deoxycholat vào, trộn đều và để yên trong 2 giờ hoặc lâu hơn để ly giải hoàn toàn vi khuẩn. Ly tâm ở tốc độ 14000 g trong 30 phút, loại bỏ dịch nổi phía trên và cô đặc bằng siêu lọc với 100 kDa đến 1/10 thể tích ban đầu, khoảng 400 ml. Thêm từ từ dung dịch axit axetic 36% vào dịch cô đặc này và điều chỉnh đến độ pH 3,5. Để trong 2 giờ, ly tâm ở tốc độ 14000 g trong 30 phút, loại bỏ 390 ml dịch nổi phía trên và trộn với 130 ml etanol khan và để qua đêm. Ngày hôm sau, ly tâm dịch nổi phía trên ở tốc độ 14000 g trong 30 phút, thêm 780 ml etanol khan vào dịch nổi phía trên này và để yên qua đêm. Ngày hôm sau, loại bỏ dịch nổi phía trên sau 30 phút ly tâm ở tốc độ 14000 g. Thêm 300 ml dung dịch etanol 75% vào chất kết tủa và tạo huyền phù chất kết tủa này và sau đó ly tâm lại ở tốc độ 14000 g trong 30 phút. Loại bỏ dịch nổi phía trên và hòa tan chất kết tủa này trong 10 ml nước để kiểm soát nồng độ polysacarit trong dung dịch này lớn hơn 10 mg/ml. Dung dịch thu được là dung dịch polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae*.

Ví dụ 2: Thủy phân, kích hoạt mức độ hoạt hóa cao và thấp của các polysacarit

Polysacarit này là *Streptococcus pneumoniae* serotyp 14 (PS14) và polysacarit vỏ 7F (PS7F) được điều chế trong Ví dụ 1 hoặc dextran (dextran, Sigma, 00894, giống như dưới đây).

2.1 Thủy phân polysacarit.

Thêm 10 mL dung dịch polysacarit vỏ đã được tinh chế 10 mg/ml vào 0,86 ml dung dịch axit axetic 36%, nồng độ cuối cùng của axit axetic trong dung dịch này là 500 mM. Sau khi đun cách thủy ở 90 °C trong 2 giờ, thêm dung dịch NaOH 1 M vào để trung hòa đến độ pH nằm trong khoảng từ 6 đến 7 để thu được mẫu thử polysacarit bị thủy phân.

Phân tử lượng của polysacarit PS14 được xác định bởi HPLC-MALS là khoảng 500 KDa và khoảng 300 KDa sau khi thủy phân.

Phân tử lượng của polysacarit vỏ PS7F là khoảng 700 KDa và không bị thủy phân.

Dextran không bị thủy phân.

2.2 Mức độ hoạt hóa cao của các polysacarit.

Thêm 100 mg natri periodat vào 10 mL dung dịch polysacarit 10 mg/ml, trộn đều và để phản ứng trong 1 giờ trong bóng tối. Lấy cột sắc ký ly tâm có chứa 5 ml gói Sephadex G 25 và thêm 10 ml dung dịch đệm Na_2HPO_4 50 mM độ pH = 7,0 vào. Chất đệm này chảy qua cột này nhờ trọng lực của nó. Sau đó, cột này được đặt trong máy ly tâm và ly tâm trong 2 phút ở tốc độ 1000 g. Sau đó, thay thế ống thu cũ bởi ống thu mới và phủ 1 ml dung dịch polysacarit được oxy hóa bằng natri periodat lên cột ly tâm và ly tâm lại ở tốc độ 1000 g trong 2 phút. Nước thải được thu thập từ cột này là dung dịch polysacarit đã được kích hoạt hoạt hóa cao.

2.3 Kích hoạt mức độ hoạt hóa thấp của các polysacarit.

Thêm 30 mg natri periodat vào 10 mL dung dịch polysacarit 10 mg/ml và trộn đều. Lấy cột sắc ký ly tâm có chứa 5 ml gói Sephadex G 25 và thêm 10 ml dung dịch đệm Na_2HPO_4 50 mM độ pH = 7,0 vào. Sau đó, đặt cột này trong máy ly tâm và ly tâm trong 2 phút ở tốc độ 1000 g. Sau đó, thay thế ống thu cũ bởi ống thu mới và phủ 1 ml dung dịch polysacarit được oxy hóa bằng natri periodat lên cột và ly tâm lại trong 2 phút ở tốc độ 1000 g. Nước thải được thu thập từ cột này là dung dịch polysacarite được kích hoạt hoạt hóa thấp.

Ví dụ 3: Kháng nguyên protein/peptit được tạo liên hợp với polysacarit

Kháng nguyên protein/peptit được sử dụng này là vùng liên kết thụ thể protein gai của virus corona và polysacarit này là polysacarit vỏ hoặc dextran của *Streptococcus pneumoniae*. Các thành phần, các hàm lượng và các thể tích cụ thể được thể hiện trong Bảng 1.

1. Trao đổi đệm protein thụ thể gai của virus corona: lấy 5 mg protein thụ thể gai của virus corona và trao đổi vào đệm 50 mM Na_2HPO_4 độ pH 7,0, bằng cách sử dụng ống siêu lọc 30,000 MW và nồng độ cuối cùng của protein được trao đổi được yêu cầu phải ≥ 10 mg/mL.
2. Protein thụ thể gai của virus corona và sự liên hợp polysacarit: thêm 3 mg protein thụ thể gai của virus corona vào polysacarit vỏ hoặc dextran của *Streptococcus pneumoniae* được hoạt hóa theo Bảng 1 và bổ sung dung dịch đệm Na_2HPO_4 50 mM độ pH 7,0, trong thể tích cuối cùng được thể hiện trong Bảng 1. Thêm dung dịch natri borohydrit 10 mg/mL vào dung dịch phản ứng này (0,15 ml vào 0,6 ml hệ phản ứng và 0,375 ml vào 1,5 ml hệ phản ứng) và thực hiện phản ứng này trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, lọc vô trùng liên hợp này qua ống siêu lọc 100000 MW với sự trao đổi gấp 10 lần đệm PBS đến thể tích siêu lọc cuối cùng nhỏ hơn 2 ml. Sử dụng bộ lọc 0,22 um để lọc các mẫu thử cố định một

cách vô trùng và bảo quản các mẫu thử này ở 4 ° C.

3. Xác định phân tử lượng của liên hợp bằng cách sử dụng HPLC-MALLS. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Các điều kiện phản ứng của một vài liên hợp và các phân tử lượng của các sản phẩm của các liên hợp này

Liên hợp	Kháng nguyên	Polysacarit	Mức độ hoạt hóa của polysacarit	Lượng kháng nguyên (mg)	Phân tử lượng của polysacarit (kDa)	Polysacarit (mg)	Tổng thể tích (ml)	natri xyanoborohyđrit 5M (μl)	Phân tử lượng của liên hợp (kDa)
SARS-COV-2 RBD-mFc - PS14 Conj- 1	SARS-COV-2 RBD - mFc	PS14	thấp	3	322	0,3	0,6	3,6	908
SARS-COV-2 RBD-mFc - PS14 Conj- 2	SARS-COV-2 RBD - mFc	PS14	thấp	3	322	0,6	0,6	3,6	907,7
SARS-COV-2 RBD-mFc - PS14 Conj- 3	SARS-COV-2 RBD- mFc	PS14	thấp	3	526	1,5	1,5	9	1059
SARS-COV-2 RBD-mFc - PS14 Conj- 4	SARS-COV-2 RBD- mFc	PS14	thấp	3	526	1,5	0,6	3,6	4449/1090
SARS-COV-2 RBD-his - PS14	SARS-COV-2 RBD-his	PS14	cao	3	355	1,5	0,6	3,6	4716
SARS-COV-2 RBD- mFc	SARS-COV-2 RBD-	PS14	cao	3	355	1,5	0,6	3,6	13340/2328/ 479*

-PS14	mFC								
SARS-COV-2 RBD-his-PS7F	SARS-COV-2 RBD-his	PS7F	cao	3	9	1,5	0,6	3,6	921,4
SARS-COV-2 RBD-his-dextran	SARS-COV-2 RBD-his	Dextran	cao	3	257	1,5	0,6	3,6	9524
MERS-COV RBD-his-PS14	MERS-COV RBD-his	PS14	cao	3	154	1,5	0,6	3,6	1300

* biểu thị phân tử lượng của ba đỉnh của sự cố định được xác định bởi HPLC-MALLS

MERS-COV RBD-his (nguồn: Beijing Sino Biological, Inc., 40071-V08B1), các protein khác được điều chế bởi chính các tác giả sáng chế.

Ví dụ 4. Kháng nguyên protein/peptit và chất mang protein được tạo liên hợp với polysacarit

Kháng nguyên protein/peptit được sử dụng này là SARS-COV-2 RBD, vùng liên kết thụ thể protein gai của virus corona, vật truyền protein này là CRM197, và polysacarit này là polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae*. Thành phần cụ thể, hàm lượng và thể tích được thể hiện trong Bảng 2.

CRM197 là biến thể của độc tố bạch hầu (Efficient CRM197-mediated drug targeting to monocytes, Journal of Controlled Release 158 (2012) 139 -147). Vùng liên kết thụ thể protein gai của virus corona và CRM197 được đồng liên hợp với polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 14. Quá trình hoạt hóa polysacarit này được tiến hành như trong Ví dụ 2.2. Lấy 1,5 mg polysacarit, 2,7 mg vùng liên kết thụ thể protein gai của virus corona và 0,3 mg CRM197 và tạo liên hợp theo quy trình tương tự như trong Ví dụ 3. Các điều kiện phản ứng của các liên hợp này và các phân tử lượng của các sản phẩm của các liên hợp này được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2: Các điều kiện phản ứng của các đồng liên hợp SARS-COV-2 RBD và CRM197 và các phân tử lượng của các sản phẩm của các đồng liên hợp này

Liên hợp	Kháng nguyên	Polysacarit	Mức độ hoạt hóa	Kháng nguyên (mg)	Chất mang protein (mg)	Phân tử lượng của polysacarit (kDa)	Lượng polysacarit (mg)	Tổng thể tích (ml)	natri xyanoborohydrit 5M (μl)	Phân tử lượng của liên hợp (kDa)
----------	--------------	-------------	-----------------	-------------------	------------------------	-------------------------------------	------------------------	--------------------	-------------------------------	----------------------------------

(SARS-COV-2 RBD-his+CRM197)-PS14	SARS-COV-2 RBD-his	PS14	cao	2,7	0,3	355	1,5	0,6	3,6	3340
(SARS-COV-2 RBD-mFc+CRM197)-PS14	SARS-COV-2 RBD-mFc	PS14	cao	2,7	0,3	355	1,5	0,6	3,6	12740/2163/435*

Ví dụ 5. Tính sinh miễn dịch của các liên hợp vùng liên kết thụ thể protein gai của virus corona - polysaccharit

Các liên hợp vùng liên kết thụ thể protein gai của virus corona - polysaccharit được sử dụng được thể hiện trong các Bảng từ 3 đến 6.

5.1 Điều chế các chế phẩm sinh miễn dịch

Các chế phẩm sinh miễn dịch được điều chế bằng cách sử dụng protein vùng liên kết thụ thể protein gai của virus corona hoặc các liên hợp được điều chế trong Ví dụ 3 hoặc Ví dụ 4 làm các kháng nguyên.

5.1.1 Điều chế tá chất MF59

Chuẩn bị 200 ml dung dịch natri xitrat 10 mM (độ pH 6,5 được điều chỉnh bằng HCl) và thêm 1 ml Tween 80 (Nanjing Well Pharmaceutical CO., LTD) và trộn đều để hòa tan. Lấy 10 ml squalen (Merck) và thêm 1 ml Span 85 (Zhaoqing Chaoneng Industrial Co., Ltd.) vào và trộn đều để hòa tan. Trộn hai dung dịch trên đây này và đồng nhất 3 lần bằng cách sử dụng thiết bị đồng nhất áp suất cao (AH-PILOTATS) đặt ở 80×10^6 Pa (800 bar) để thu được nhũ tương đồng nhất là tá chất MF59.

5.1.2 Điều chế tá chất MF59 có chứa monophosphatidyl lipid A (MPL)

Phân tán 10 mg MPL (MERCK L6895) trong 10 ml chất đệm natri xitrat (10 mM, độ pH 6,5). Thêm 4 ml tá chất MF59 khác vào 1 ml huyền phù MPL và trộn để thu được tá chất MF59 có chứa MPL.

5.1.3 Điều chế các chế phẩm sinh miễn dịch tá chất nhôm

Pha loãng kháng nguyên này đến nồng độ 0,02 mg/ml hoặc 0,06 mg/ml (xét về peptit/protein, sau đây) bằng PBS và pha loãng tá chất nhôm (Beijing Nuoning

Biotechnology Co., Ltd.) đến 1 mg/ml bằng PBS. Kháng nguyên và tá chất nhôm đã được pha loãng này được trộn với các thể tích bằng nhau. Nồng độ protein của kháng nguyên này trong chế phẩm sinh miễn dịch này tương ứng là 0,01 mg/ml hoặc 0,03 mg/ml.

5.1.4 Điều chế các chế phẩm sinh miễn dịch tá chất MF59

Pha loãng kháng nguyên này với PBS đến nồng độ lần lượt là 0,02 mg/ml hoặc 0,06 mg/ml, và trộn kháng nguyên đã được pha loãng này với thể tích tương đương của tá chất MF59. Nồng độ protein của kháng nguyên này trong chế phẩm miễn dịch này tương ứng là 0,01 mg/ml hoặc 0,03 mg/ml.

5.1.5 Điều chế các chế phẩm sinh miễn dịch tá chất MF59 có chứa MPL

Pha loãng kháng nguyên này với PBS đến nồng độ lần lượt là 0,02 mg/ml hoặc 0,06 mg/ml, và trộn kháng nguyên đã được pha loãng này với thể tích tương đương của tá chất MF59 có chứa MPL. Nồng độ protein của kháng nguyên này trong chế phẩm miễn dịch này tương ứng là 0,01 mg/ml hoặc 0,03 mg/ml.

5.1.6 Điều chế các chế phẩm sinh miễn dịch tá chất hỗn hợp gồm MF59 và tá chất nhôm

Trộn 1,5 ml tá chất nhôm và 1,5 ml tá chất MF59 và sau đó thêm 0,18 ml kháng nguyên ở nồng độ 1 mg/ml vào. Nồng độ protein của kháng nguyên này trong chế phẩm miễn dịch này là 0,03 mg/ml.

5.2 Chuột được tạo miễn dịch.

Chuột được chọn từ các con chuột Balb/c từ 4 tuần tuổi đến 6 tuần tuổi và được tiêm trong màng bụng 0,1 ml chế phẩm miễn dịch ở nồng độ 0,01 mg/ml hoặc 0,03 mg/ml như được mô tả trong Ví dụ 5.1 và được tạo miễn dịch vào ngày 14 và ngày 28 tương ứng. Lấy máu từ các ổ mắt vào các ngày 7, 21 và 35 để xác định các hiệu giá kháng thể huyết thanh và các hiệu giá trung hòa.

5.3 Thử nghiệm hiệu lực của huyết thanh

5.3.1 Thử nghiệm hiệu lực của huyết thanh khi kháng nguyên này là SARS-COV-2 RBD hoặc protein dung hợp của SARS-COV-2 RBD

Sử dụng protein SARS-COV-2 RBD-mFc nồng độ 5 µg/mL (SinoCelltech Ltd., toàn văn) để phủ lên đĩa 96 giếng ở mức 100 µl/giếng trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, và rửa các đĩa này và đóng bằng 2% BSA trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, bằng cách sử dụng CD155(D1)-mFc (SinoCelltech Ltd., toàn văn) làm mẫu đối chứng không liên quan có cùng thể. Pha loãng huyết thanh cần thử nghiệm (được điều chế trong Ví dụ 5.2) thành các độ pha loãng khác nhau (các độ pha loãng chính xác được thay đổi tùy thuộc vào thời gian được thiết lập để thu thập miễn dịch, ví dụ, các độ pha loãng 1000 lần, 8000 lần, 16000 lần, 32000 lần) bằng cách sử dụng PBS có chứa 0,1% albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin - BSA), và sử dụng huyết thanh chuột đã được tạo miễn dịch với SARS-COV-2

RBD-mFc làm mẫu đối chứng dương, sử dụng huyết thanh chuột có đích miễn dịch không liên quan (huyết thanh kháng - CD70, Beijing Sino Biological, Inc.) làm đối chứng âm. thêm đồng thời huyết thanh cần được thử nghiệm và kháng thể thử phát hiện IgG F(ab)₂/HRP kháng chuột từ dê (Beijing Sino Biological, Inc.) ở các độ pha loãng khác nhau vào, mỗi loại 100 μ l/giếng. OD₄₅₀ ở mức pha loãng nhất định chỉ báo hiệu giá kháng thể này.

5.3.2 Thử nghiệm hiệu lực của huyết thanh khi kháng nguyên này là MERS-COV RBD hoặc protein dung hợp của MERS-COV RBD

Trong thử nghiệm huyết thanh miễn dịch MERS-COV RBD-his, phủ MERS-COV RBD-his (Beijing Sino Biological, Inc., 40071-V08B1) lên đĩa mà không có đối chứng dương hoặc đối chứng âm. Các bước khác là giống như thử nghiệm 5.3.1 trên đây.

5.3.3 Các kết quả thử nghiệm hiệu lực của huyết thanh

Các kết quả của thử nghiệm hiệu lực huyết thanh được thể hiện trong các Bảng 3 - 5 và các Fig. 1 - 4.

Hiệu lực của tổ hợp miễn dịch tá chất nhôm được thể hiện trong Bảng 3 đối với chuột được tạo miễn dịch trong 35 ngày ở huyết thanh có các độ pha loãng 8000 lần.

Bảng 3: Hiệu lực huyết thanh của các chế phẩm sinh miễn dịch tá chất nhôm trong chuột sau 35 ngày (các kết quả sau 35 ngày tạo miễn dịch)

Kháng nguyên	Liều lượng miễn dịch (μ g)	Độ pha loãng 8000 lần của huyết thanh (OD ₄₅₀)
SARS-COV-2 RBD-mFc	1	0,319
SARS-COV-2 RBD-mFc	3	0,591
SARS-COV-2 RBD-mFc-PS14 Conj-1	3	0,609
SARS-COV-2 RBD-mFc-PS14 Conj-2	1	1,232
SARS-COV-2 RBD-mFc-PS14 Conj-2	3	0,844
SARS-COV-2 RBD-mFc-PS14 Conj-3	3	1,348
SARS-COV-2 RBD-mFc-PS14 Conj-4	1	1,384
SARS-COV-2 RBD-mFc-PS14	3	0,950

Conj-4		
SARS-COV-2 RBD-his	3	0,171
SARS-COV-2 RBD-his -PS14	3	1,694
SARS-COV-2 RBD-his-CRM197-PS14	3	1,403
SARS-COV-2 RBD-mFc -PS14	3	1,224
SARS-COV-2 RBD-mFc-CRM197 -PS14	3	0,839

Các kết quả hiệu lực của chế phẩm sinh miễn dịch SARS-COV-2 RBD-his-PS14 tá chất nhôm/MF59/MF59-nhôm/MF59-MPL vào Ngày 35, huyết thanh có các độ pha loãng 32000 lần được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4: Hiệu lực huyết thanh của liên hợp SARS-COV-2 RBD-his -PS14 khi được kết hợp với các tá chất khác nhau (các kết quả miễn dịch Ngày 35, liều lượng miễn dịch 3 μ g)

Tá chất	Độ pha loãng 32000 lần của huyết thanh (OD ₄₅₀)
Tá chất nhôm	0,423
MF59	1,052
MF59-nhôm	1,114
MF59-MPL	1,111

Hiệu lực huyết thanh của chế phẩm miễn dịch tá chất MF59 này ở chuột được tạo miễn dịch vào Ngày 21 ở huyết thanh có các độ pha loãng 8000 lần được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5: Hiệu lực huyết thanh của các chế phẩm sinh miễn dịch tá chất MF59 (Ngày 21 sau khi miễn dịch, liều miễn dịch 3 μ g)

Kháng nguyên	Độ pha loãng 8000 lần của huyết thanh (OD ₄₅₀)
SARS-COV-2 RBD-his-PS7F	1,382
SARS-COV-2 RBD-his-dextran	1,040

MERS-COV RBD-his-PS14	1,325
-----------------------	-------

5.4 Thử nghiệm hiệu lực trung hòa

Pha loãng mẫu thử huyết thanh chuột thu được trong Ví dụ 5.2 theo kinh nghiệm một số lần nhất định (ví dụ: pha loãng 500 lần) và trộn với pseudovirus 2019-nCoV PSV (China Academy of Food and Drug Administration) với thể tích bằng nhau, sử dụng cùng một mẫu thử khác mà không có huyết thanh làm mẫu đối chứng dương và mẫu thử khác không có pseudovirus làm mẫu đối chứng âm, và ủ ở 37 °C trong 1 giờ trước khi nhiễm đồng thời với các tế bào Vero E6 hoặc 293FT/ACE2 (SinoCelltech Ltd.). Ủ các tế bào này ở 37 °C với 5% CO₂ trong khoảng thời gian từ 20 giờ đến 28 giờ sau khi lây nhiễm và đo các giá trị RLU trên máy dò phát quang vi tấm. Dựa theo % ức chế trung hòa = $(\lg(\text{RLU đối chứng dương}) - \lg(\text{RLU mẫu thử})) / (\lg(\text{RLU đối chứng dương}) - \lg(\text{RLU đối chứng âm})) \times 100\%$, để tính tỷ lệ ức chế trung hòa.

Các kết quả về hiệu lực trung hòa của huyết thanh từ các chuột được tạo miễn dịch bằng các chế phẩm sinh miễn dịch khác nhau được thể hiện trong Bảng 6 và Fig. 3.

Bảng 6: Hiệu lực trung hòa của các chế phẩm sinh miễn dịch (các kết quả Ngày 35, liều lượng miễn dịch 3 µg)

Kháng nguyên	Ức chế trung hòa ở độ pha loãng 500 lần của huyết thanh này (%)	Ức chế trung hòa ở độ pha loãng 1500 lần của huyết thanh này (%)
SARS-COV-2 RBD-mFc	36,7	---
SARS-COV-2 RBD-mFc-PS14 Conj-1	56,1	---
SARS-COV-2 RBD-mFc-PS14 Conj-2	64,7	---
SARS-COV-2 RBD-mFc-PS14 Conj-3	93,0	---
SARS-COV-2 RBD-mFc-PS14 Conj-4	90,6	---
SARS-COV-2 RBD-his	16,2	---
SARS-COV-2 RBD-his -PS14	90,3	40
SARS-COV-2 RBD-his- CRM197-PS14	100	65

SARS-COV-2 RBD-mFc -PS14	59,8	18
SARS-COV-2 RBD-mFc-CRM197 -PS14	59,3	12,75

Ví dụ 6. Tăng cường tính sinh miễn dịch của một vài kháng nguyên virus bởi các polysacarit

Một vài kháng nguyên virus, như được thể hiện trong Bảng 7 (tất cả đều do Beijing Sino Biological, Inc. cung cấp), được chọn và được tạo liên hợp với PS14 polysacarit trong các bước sau.

Điều chế *Streptococcus pneumoniae* serotyp 14 (PS14) theo Ví dụ 1 và hoạt hóa theo các bước của Ví dụ 2.2, trong đó điều chỉnh lượng natri periodat được thêm vào theo Bảng 8. Tạo liên hợp PS14 với chất mang protein CRM197 theo các bước của Ví dụ 3, với tỷ lệ giữa protein và polysacarit để tạo liên hợp như được thể hiện trong Bảng 8. Điều chế các chế phẩm sinh miễn dịch có chứa tá chất nhôm theo Ví dụ 5.1.3. Chuột được tạo miễn dịch theo Ví dụ 5.2 ở liều lượng 3 µg kháng nguyên trên một con chuột.

Thử nghiệm hiệu lực huyết thanh miễn dịch bằng cách sử dụng việc phủ kháng nguyên tương ứng mà không có các đối chứng dương và đối chứng âm và quy trình giống hoàn toàn như trong thử nghiệm 5.3.1 trên đây.

Các hiệu lực huyết thanh miễn dịch của các liên hợp kháng nguyên khác nhau được thể hiện trong Bảng 8. Có thể thấy rằng đối với hầu hết các kháng nguyên, tính sinh miễn dịch tăng lên đáng kể sau khi liên hợp với các polysacarit.

Bảng 7: Các tên, các số danh mục và các ký hiệu tương ứng của một vài kháng nguyên virus

Các kháng nguyên	Danh mục số (Sinobiological).	SEQ ID số	Ký hiệu
Glycoprotein virus hợp bào hô hấp ở người G (His Tag)	11070-V08B2	12	RSV-gpG-his
Glycoprotein vỏ virus viêm gan C E1	40374-V07H	13	HCV-E1-his
Protein E2 Vỏ Virus viêm gan C (His Tag)	40375-V08H	14	HCV-E2-his
Protein Hemagglutinin Cúm B (Tiểu đơn vị HA1) (His Tag)	40016-V08H1	15	flu-B-HA1-his
Hemagglutinin Cúm A H5N1 (His Tag)	11048-V08H1	16	H5N1-HA-his

Glycoprotein virus Ebola (Miền liên kết thụ thể, Fc Tag)	40368-V02H	17	Ebola-GP-Fc
Glycoprotein virus Ebola GP1 (His Tag)	40094-V08H2	18	Ebola-GP1-his
Protein Vỏ virus Zika (Miền III, Fc Tag)	40543-V02H	19	ZIKV-E-Fc

Table 8: Điều kiện tạo liên hợp và hiệu lực huyết thanh miễn dịch của một vài liên hợp kháng nguyên virus - polysaccharit

		Hoạt hóa		Liên hợp		Hiệu lực huyết thanh (Pha loãng huyết thanh này 1000 lần) OD450
Mã số	Polysacarit được liên hợp	Polysacarit mg	Natri periodat mg	Kháng nguyên mg	Polysacarit mg	OD450 (1000)
HCV-E1	PS14	100	100	3	1,5	0,280
flu-B-HA1	PS14	100	100	3	1,5	0,810
H5N1-HA	PS14	100	100	3	1,5	3,514
Ebola-GP-Fc	PS14	100	100	3	1,5	2,259
Ebola-GP1	PS14	100	100	3	1,5	0,439
ZIKV-E-Fc	PS14	100	100	3	1,5	3,520
HCV-E2	PS14	100	100	3	6	0,220
	PS14	100	100	3	3	0,312
	PS14	100	100	3	1,5	0,301
	PS14	100	100	3	0,6	0,242

	PS14	100	100	3	0,3	0,756
RSV- gpG	PS14	100	200	3	1,5	1,907
	PS14	100	100	3	1,5	2,017
	PS14	100	50	3	1,5	2,060
	PS14	100	50	3	1,5	2,060
RSV- gpG	---	---	---	---	---	0,629
HCV-E1	---	---	---	---	---	0,284
HCV-E2	---	---	---	---	---	0,298
flu-B- HA1	---	---	---	---	---	0,052
H5N1- HA	---	---	---	---	---	1,705
Ebola- GP-Fc	---	---	---	---	---	2,688
Ebola- GP1	---	---	---	---	---	0,207
ZIKV-E- Fc	---	---	---	---	---	2,887

Các kháng nguyên được sử dụng trong Bảng 8 được ghi lại Bảng 7, trong đó His-tag không được thể hiện.

Theo dữ liệu nêu trên, tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên protein này đã tăng lên đáng kể khi chúng được tạo liên hợp với polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae*. Dưới các điều kiện tá chất nhôm, hiệu lực kháng thể của huyết thanh miễn dịch của liên hợp này đạt tới 2,3 lần hiệu lực ban đầu. Hoạt tính trung hòa của liên hợp này cũng cao hơn đáng kể so với hoạt tính trung hòa của các protein tương ứng. Khi được so sánh với tá chất nhôm, tá chất MF59, MF59 được trộn với tá chất nhôm và tá chất MF59 có chứa tá chất MPL, tất cả đều cải thiện hơn hiệu quả miễn dịch của liên hợp này. Hiệu quả miễn dịch học là tương tự khi sử dụng polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 14, polysacarit vỏ và dextran của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 7F làm liên hợp.

Danh mục trình tự

SEQ ID số: 1

SARS-COV-2 RBD

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLYN
 SASFSTFKCYGVSP TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKL
 PDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPC
 NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQP YRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLV
 KNKCVNF

SEQ ID số: 2

SARS-COV-2RBD-his

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLYN
 SASFSTFKCYGVSP TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKL
 PDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPC
 NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQP YRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLV
 KNKCVNFAHHHHHHHHHH

SEQ ID số: 3

SARS-COV-2 RBD-mFc

RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLYN
 SASFSTFKCYGVSP TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQTGKIADYNYKL
 PDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPC
 NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQP YRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLV
 KNKCVNFADDDDKAVPRDSGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL TITLTPKVTCV
 VVDISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNG
 KEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDF
 FPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTC
 SVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

SEQ ID số: 4

RSV-gpG

NHKVTSTTTIIQDATSQIKNTTPTYLTQSPQLGISPSNPSEITSQITTLASTTPG
 VKSTLQSTTVGKNTTTTQAQPSKPTTKQRQNKPPSKPNNDFHFEVFN FVPCSICS

NNPTCWAICKRIPNKKPGKKTTHKPTTEPTFKTAKEDPKPQTTGSGEVPTTKPTG
EPTINTTKTNITTTLLTSNTTRNPELTSQMETFHSTSSEGNPSPSQVSITSEYLSQPS
SPPNTPR

SEQ ID số: 5

HCV-E1

ALEVLFGGPYEVRNVSGIYHVTNDCSNSSIVYEAADVIMHTPGCVPCVREG
NSSRCWVALTPTLAARNASVPTTTIRRHVDLLVGTAAFCSAMYVGDLCGSIFLVS
QLFTFSPRRHETVQDCNCSIYPGHVSGHRMAWDMMMWNWSPTTALVVSQLLRI

SEQ ID số: 6

HCV-E2

ETHTTGRVAGHTTSGFTSLFSSGASQKIQLVNTNGSWHINRTALNCNDSLQT
GFFAALFYAHKFNSSGCPERMASCRPIDWFAQGWGPITYTKPNSSDQRPYCWHY
APRPCGVVPASQVCGPVYCFTSPVVGTTDRSGVPTYSWGENETDMMLLNNT
RPPQGNWFGCTWMNSTGFTKTCGGPPCNIGGVGNRTLICPTDCFRKHPEATYTK
CGSGPWLTTPRCLVDYPYRLWHYPCTLNFSIFKVRMYVGGVEHRLNAACNWTRG
ERCNLEDRDRSE

SEQ ID số: 7

flu-B-HA1

DRICTGITSSNSPHVVKATATQGEVNVTGVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGK
LCPKCLNCTDLVALGRPCKTGKIPSARVSILHEVRPVTSGCFPIMHDRTKIRQLP
NLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPYKIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKN
DKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSAN
GVTTHYVSQIGGFNPQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKV
WCASGRSKVIKGSPLIGEADCLHEKYGGLNKSHPYYTGEHAKAIGNCPIWVKT
PLKLANGTKYRPPAKLLKER

SEQ ID số: 8

H5N1-HA

DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLCDLDGVKPLI
LRDCSVAGWLLGNPMCDEFINPEWSYIVEKANPANDLCYPGNFNDYEELKHLL

SRINHFEEKIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYQGTPSFFRNVVWLIKKNNTYPTIKR
 SYNNTNQEDLLILWGIHHSNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRS
 KVNGQSGRMDFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIVKSEVEYG
 NCNTKCQTPIGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNNKLVLATGLRNSPLTETRGL
 FGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVTNKNVNSI
 IDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTL
 DFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYP
 QYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQ

SEQ ID số: 9

Ebola-GP

IPLGVVHNNTLQVSDIDKLVCRDKLSSTSQKSVGLNLEGNGVATDVPTAT
 KRWGFRAGVPPKVVNYEAGEWAENCYNLDIKKADGSECLPEAPEGVRGFPRCR
 YVHKVSGTGPCPEGYAFHKEGAFFLYDRLASTIIYRSTTFSEGVAFLILPETKKD
 FFQSPPLHEPANMTTDPSSYYHTVTLNLYVADNFGTNMTNFLFQVDHLTYVQLEP
 RFTPQFLVQLNETIYTNGRRSNTTGTLIWKVNPTVDTGVGEWAFWENKKNFTKT
 LSSEELSV

SEQ ID số: 10

Ebola-GP1

MPLGVVTNSTLEVTEIDQLVCKDHLASTDQLKSVGLNLEGSGVSTDIPSATK
 RWGFRSGVPPKVVSYEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPPPPDGVRGFPRCRYV
 HKAQGTGPCPGDYAFHKDGAFFLYDRLASTVIYRGVNFAGVIAFLILAKPKETF
 LQSPPIREAVNYTENTSSYYATSYLEYEIENFGAQHSTTLFKIDNNTFVRLDRPHT
 PQFLFQLNDTIHLHQQLSNTTGRLIWTLDANINADIGEWAFWENKKNLSEQLRGE
 ELSFEALSLNETEDDDAASSRITKGRISDRATRKYSIDLVPKNSPGMVPLHIPEGET
 TLPSQNSTEGRRVGVTQETITETAATIIGTNGNHMQISTIGIRPSSSQIPSSPTTAP
 SPEAQTPTTHTSGPSVMATEEPTTPPGSSPGPTTEAPTLTTPENITTAVKTVLPQES
 TSNGLITST VTGILGSLGLRKRSR

SEQ ID số: 11

ZIKV-E

VSYSLCTAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKVPAQMAVDMQTL
 TPVGRLITANPVITESTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHRSGSTIG

K

SEQ ID số: 12

RSV-gpG-his

NHKVTSTTTIIQDATSQIKNTTPTYLTQSPQLGISPSNPSEITSQITTILASTTPG
VKSTLQSTTVGTKNTTTTQAQPSKPTTKQRQNKPPSKPNNDHFHFEVFNFVPCSICS
NNPTCWAICKRIPNKKPGKKTTHKPTTEPTFKTAKEDPKPQTTGSGEVPTTKPTG
EPTINTTKTNITTTLLTSNTTRNPELTSQMETFHSTSSEGNPSPSQVSITSEYLSQPS
SPPNTPRAHHHHHHHHHH

SEQ ID số: 13

HCV-E1-his

HHHHHHHHHHHALEVLFGGPYEVNRNVSGIYHVTNDCSNSSIVYEAADVIMH
TPGCVPCVREGNSSRCWVALTPTLAARNASVPTTTIRRHVDLLVGTAAFCSAMY
VGDLGCSIFLVSQLFSPRRHETVQDCNCSIYPGHVSGHRMAWDMMMNWSPT
TALVVSQLLRI

SEQ ID số: 14

HCV-E2-his

ETHTTGRVAGHTTSGFTSLFSSGASQKIQLVNTNGSWHINRTALNCNDSLQT
GFFAALFYAHKFNSGCPERMASCRPIDWFAQGWGPITYTKPNSSDQRPYCWHY
APRPCGVVPASQVCGPVYCFTPSPVVVGTTDRSGVPTYSWGENETDMMLLNNT
RPPQGNWFGCTWMNSTGFTKTCGGPPCNIGGVGNRTLICPTDCFRKHPEATYTK
CGSGPWLTPRCLVDYPYRLWHYPCTLNFSIFKVRMYVGGVEHRLNAACNWTRG
ERCNLEDRDRSEAHHHHHHHHHH

SEQ ID số: 15

flu-B-HA1-his

DRICTGITSSNSPHVVKATQGEVNVTGVIPLTTTPTKSHFANLKGTETRGK
LCPKCLNCTDLDVALGRPCKTGKIP SARVSILHEVRPVTSGCFPIHMDRTKIRQLP
NLLRGYEHIRLSTHNVINAENAPGGPYKIGTSGSCPNTNGNGFFATMAWAVPKN
DKNKTATNPLTIEVPYICTEGEDQITVWGFHSDNETQMAKLYGDSKPQKFTSSAN
GVTTHYVSQIGGFPNQTEDGGLPQSGRIVVDYMVQKSGKTGTITYQRGILLPQKV

WCASGRSKVIKGSPLIGEADCLHEKYGGLNKSHPYYTGEHAKAIGNCPIWVKT
PLKLANGTKYRPPAKLLKERAAAAHHHHHHHHH

SEQ ID số: 16

H5N1-HA-his

DQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLCDLGDKPLI
LRDCSVAGWLLGNPMCMDEFINVPESYIVEKANPANDLCYPGNFNDYEELKHLL
SRINHFEDIQIIPKSSWSDHEASSGVSSACPYQGTPSFFRNVVWLIKNNNTYPTIKR
SYNNTNQEDLLILWGIHHSNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRS
KVNGQSGRMDFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAIKSEVEYG
NCNTKCQTPIGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNNKLVLATGLRNSPLTETRGL
FGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNSI
IDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTL
DFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNALGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYP
QYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQAAAAHHHHHHHHH

SEQ ID số: 17

Ebola-GP-Fc

IPLGVVHNNTLQVSDIDKLVCRDKLSSTSQKSVGLNLEGNGVATDVPTAT
KRWGFRAGVPPKVVNIEAGEWAENCYNLDIKKADGSECLPEAPEGVRGFPRCR
YVHKVSGTGPCPEGYAFHKEGAFFLYDRLASTIYRSTTFSEGVVAFLILPETKKD
FFQSPPLHEPANMTTDPSSYYHTVTLNIVADNFGTNMTNFLFQVDHLTYVQLEP
RFTPQFLVQLNETIYTNGRRSNTTGTLIWKVNPTVDTGVGEWAFWENKKNFTKT
LSSEELSVADDDDDKEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID số: 18

Ebola-GP1-his

MPLGVVTNSTLEVTEIDQLVCKDHLASTDQLKSVGLNLEGSGVSTDIPSATK
RWGFRSGVPPKVVSIEAGEWAENCYNLEIKKPDGSECLPPPDGVRGFPRCRYV
HKAQGTGPCPGDYAFHKDGAFFLYDRLASTVIYRGVNFAEGVIAFLILAKPKETF

LQSPPIREAVNYTENTSSYYATSYLEYEIENFGAQHSTTLFKIDNNTFVRLDRPHT
PQFLFQLNDTIHLHQQLSNTTGRLIWTLNANINADIGEWAFWENKKNLSEQLRGE
ELSFEALSLNETEDDDAASSRITKGRISDRATRKYSDLVPKNSPGMVPLHIPEGET
TLPSQNSTEGRRVGVNTQETITETAATIIGTNGNHMQISTIGIRPSSSQIPSSSPTTAP
SPEAQTPTTHTSGPSVMATEEPTTPPGSSPGPTTEAPTLTTPENITTAVKTVLPQES
TSNGLITST VTGILGSLGLRKRSRRRAHHHHHHHHHH

SEQ ID số: 19

ZIKV-E-Fc

VSYSLCTAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKVPAQMAVDMQTL
TPVGRLITANPVITESTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHRSGSTIG
KADDDDKKPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp cải thiện tính sinh miễn dịch của kháng nguyên protein/peptit, bao gồm việc tạo ra liên hợp kháng nguyên glyco-protein/peptit bằng cách tạo liên hợp kháng nguyên protein/peptit này với sacarit

trong đó sacarit này là polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae*,

trong đó kháng nguyên protein/peptit này là kháng nguyên protein/peptit liên kết mầm bệnh được lựa chọn từ glycoprotein G của virus hợp bào hô hấp ở người (RSV-gpG), protein glycoprotein vỏ E1 của virus viêm gan C (HCV-E1), protein E2 vỏ virus viêm gan C (HCV-E2), protein hemagglutinin Cúm B (Flu-B-HA1), hemagglutinin Cúm A H5N1 (H5N1-HA), glycoprotein của virus Ebola (Ebola-GP), glycoprotein GP1 của virus Ebola (Ebola-GP1), protein vỏ của virus Zika (Miền III) (ZIKV-E), và/hoặc protein gai của virus corona.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó polysacarit vỏ này được lựa chọn từ polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 14, polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 6B và polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 7F.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó kháng nguyên protein/peptit này là protein/peptit bao gồm kháng nguyên virus của vùng liên kết thụ thể protein gai của virus corona RBD.

4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó virus corona này là SARS-CoV-2 hoặc virus corona gây hội chứng hô hấp Trung Đông.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó kháng nguyên protein/peptit này được chọn từ SARS-CoV-2 RBD-Fc, SARS-CoV-2 RBD-his, hoặc MERS-COV RBD-his, và trong đó mảnh Fc này là mảnh Fc IgG ở người hoặc chuột.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó kháng nguyên protein/peptit này bao gồm trình tự được xác định là trình tự bất kỳ trình tự nào trong số các trình tự SEQ ID số: 1, SEQ ID số: 2, SEQ ID số: 3.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó phân tử lượng của liên hợp này nằm trong khoảng từ 400 KDa đến 14000 KDa.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp là RSV-gpG-his.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó kháng nguyên protein/peptit này bao gồm trình tự được xác định là SEQ ID số: 4 và/hoặc SEQ ID số: 12.

10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp là Flu-B-HA1-his hoặc H5N1-HA-his.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó kháng nguyên protein/peptit này bao gồm trình tự được xác định là trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID số: 7 và/hoặc SEQ ID số: 15, SEQ ID số: 8 và/hoặc SEQ ID số: 16.

12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp là Ebola-GP-Fc hoặc Ebola-GP1-his;

trong đó Fc này là mảnh Fc IgG ở người hoặc chuột.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó kháng nguyên protein/peptit này bao gồm trình tự được xác định là trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID số: 9 và/hoặc SEQ ID số: 17, SEQ ID số: 10 và/hoặc SEQ ID số: 18.

14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp là ZIKV-E-Fc; trong đó Fc này là mảnh Fc IgG ở người hoặc chuột; hoặc protein dung hợp là HCV-E2-his và/hoặc HCV-E1-his.

15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó kháng nguyên protein/peptit này bao gồm trình tự được xác định là trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID số: 11 và/hoặc SEQ ID số: 19, SEQ ID số: 6 và/hoặc SEQ ID số: 14, SEQ ID số: 5 và/hoặc SEQ ID số: 13.

16. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó kháng nguyên glyco-protein/peptit này còn được tạo liên hợp với chất mang protein.

17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó chất mang protein này là giải độc tố uốn ván, mảnh giải độc tố uốn ván C, đột biến không độc của giải độc tố uốn ván, giải độc tố bạch hầu, CRM197, các đột biến không độc khác của giải độc tố bạch hầu.

18. Liên hợp kháng nguyên glyco-protein/peptit có tính sinh miễn dịch tăng so với kháng nguyên protein/peptit không được tạo liên hợp, trong đó sacarit này là *Streptococcus pneumoniae*;

trong đó kháng nguyên protein/peptit này là kháng nguyên protein/peptit liên kết mầm bệnh được lựa chọn từ glycoprotein G của virus hợp bào hô hấp ở người (RSV-gpG), protein glycoprotein vỏ E1 của virus viêm gan C (HCV-E1), protein E2 vỏ virus viêm gan C (HCV-E2), protein hemagglutinin Cúm B (Flu-B-HA1), hemagglutinin Cúm A H5N1 (H5N1-HA), glycoprotein của virus Ebola (Ebola-GP), glycoprotein GP1 của virus Ebola (Ebola-GP1), protein vỏ của virus Zika (Miền III) (ZIKV-E), và/hoặc protein gai của virus corona.

19. Liên hợp theo điểm 18, trong đó sacarit này là polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 14, polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 6B hoặc

polysacarit vỏ của *Streptococcus pneumoniae* serotyp 7F.

20. Liên hợp theo điểm 18, trong đó kháng nguyên protein/peptit này là protein/peptit bao gồm kháng nguyên virut của vùng liên kết thụ thể protein gia của virut corona RBD.

21. Liên hợp theo điểm 20, trong đó virut corona này là SARS-CoV-2 hoặc virut corona gây hội chứng hô hấp Trung Đông.

22. Liên hợp theo điểm 21, trong đó kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp là SARS-CoV-2 RBD-Fc; SARS-CoV-2 RBD-his; hoặc MERS-COV RBD-his; và

mảnh Fc này là mảnh Fc IgG ở người hoặc chuột.

23. Liên hợp theo điểm 22, trong đó kháng nguyên protein/peptit này bao gồm trình tự được xác định là trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID số: 1, SEQ ID số: 2, SEQ ID số: 3.

24. Liên hợp theo điểm 18, trong đó kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp là RSV-gpG-his.

25. Liên hợp theo điểm 24, trong đó kháng nguyên protein/peptit này bao gồm trình tự được xác định là SEQ ID số: 4 và/hoặc SEQ ID số: 12.

26. Liên hợp theo điểm 18, trong đó kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp là Flu-B-HA1-his hoặc H5N1-HA-his.

27. Liên hợp theo điểm 26, trong đó kháng nguyên protein/peptit này bao gồm trình tự được xác định là trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID số: 7 và/hoặc SEQ ID số: 15, SEQ ID số: 8 và/hoặc SEQ ID số: 16.

28. Liên hợp theo điểm 18, trong đó kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp là Ebola-GP-Fc hoặc Ebola-GP1-his,

trong đó Fc này là mảnh Fc IgG ở người hoặc chuột.

29. Liên hợp theo điểm 28, trong đó kháng nguyên protein/peptit này bao gồm trình tự được xác định là trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID số: 9 và/hoặc SEQ ID số: 17, SEQ ID số: 10 và/hoặc SEQ ID số: 18.

30. Liên hợp theo điểm 18, trong đó kháng nguyên protein/peptit này là protein dung hợp là ZIKV-E-Fc; trong đó Fc là mảnh Fc IgG ở người hoặc chuột; hoặc

protein dung hợp là HCV-E2-his và/hoặc HCV-E1-his.

31. Liên hợp theo điểm 30, trong đó kháng nguyên protein/peptit này bao gồm trình tự được xác định là trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID số: 11 và/hoặc SEQ ID số: 19, SEQ ID số: 6 và/hoặc SEQ ID số: 14, SEQ ID số: 5 và/hoặc SEQ ID số: 13.

32. Liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 31, trong đó phân tử lượng của

liên hợp này nằm trong khoảng từ 400 KDa đến 14000 KDa.

33. Liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 31, trong đó kháng nguyên glyco-protein/peptit này còn được tạo liên hợp với chất mang protein.

34. Liên hợp theo điểm 33, trong đó chất mang protein này là giải độc tố uốn ván, mảnh C của giải độc tố uốn ván, đột biến không độc của giải độc tố uốn ván, giải độc tố bạch hầu, CRM197, các đột biến không độc khác của giải độc tố bạch hầu.

35. Chế phẩm sinh miễn dịch bao gồm liên hợp kháng nguyên glyco-protein/peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 34, tá chất miễn dịch và tá dược.

36. Chế phẩm sinh miễn dịch theo điểm 35, các tá chất này được chọn từ tá chất nhôm, tá chất nhũ tương dầu trong nước, MF59, QS-21 và lipit monophosphat A.

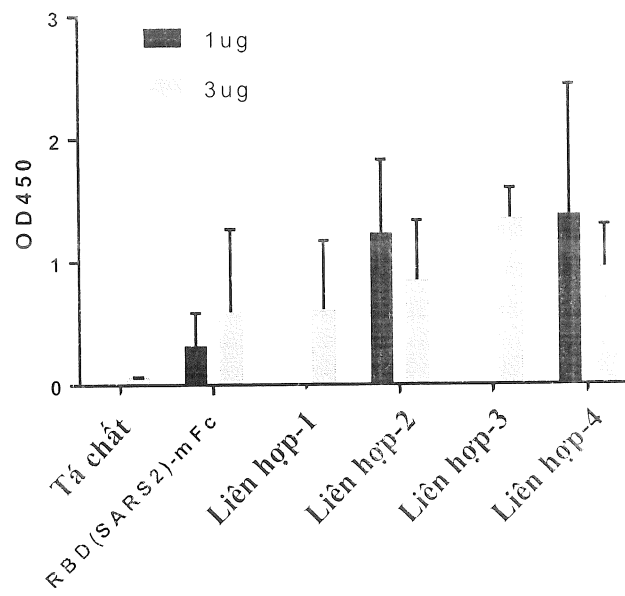


FIG.1

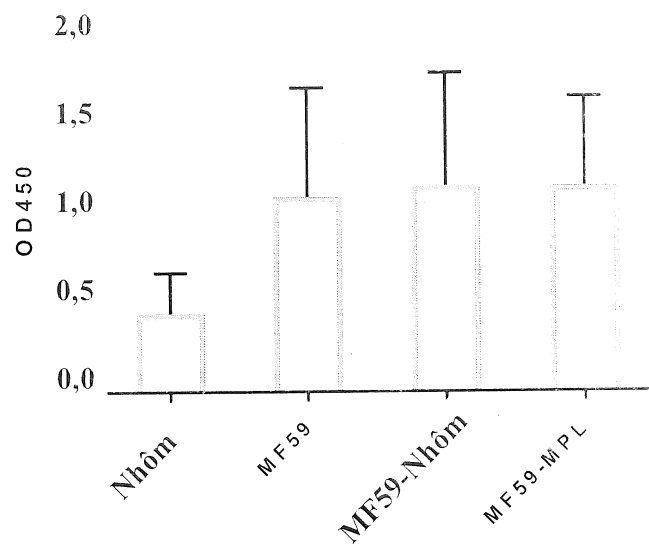


FIG.2

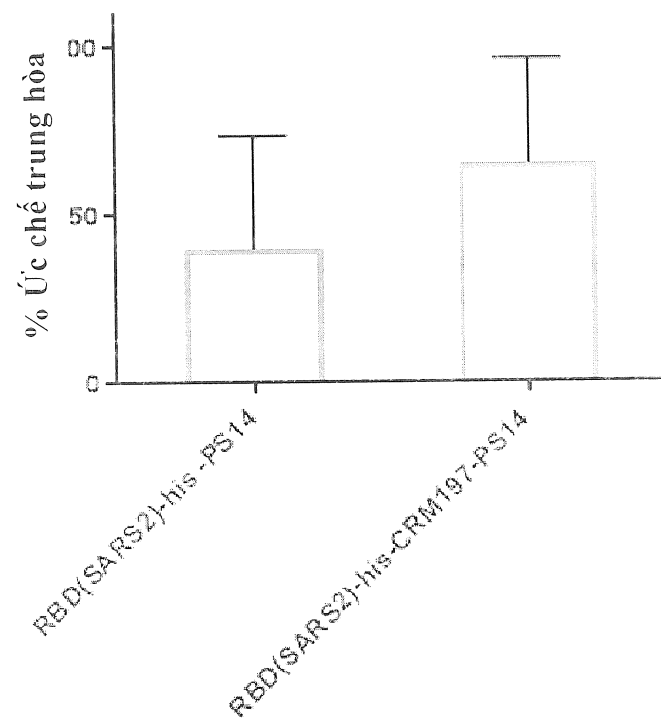


FIG.3

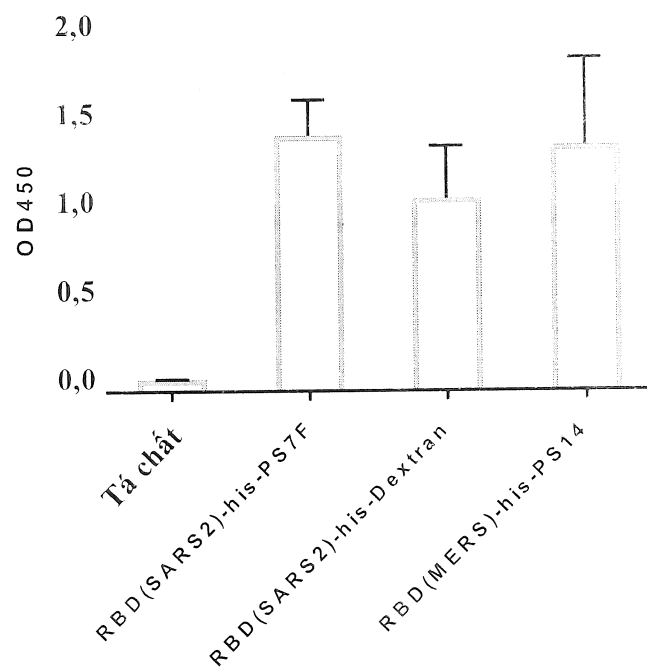


FIG.4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> SinoCellTech Ltd.

<120> PHƯƠNG PHÁP DÙNG ĐỂ CẢI THIỆN KHẢ NĂNG SINH MIỄN DỊCH CỦA KHÁNG NGUYÊN PROTEIN/PEPTIT

<130> PCT69222SXB

<160> 19

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 223

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 1

Arg Val Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn
1 5 10 15

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

Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser
35 40 45

Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val
50 55 60

Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln
85 90 95

Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr
100 105 110

Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly

115 120 125

Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys
130 135 140

Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr
145 150 155 160

Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser
165 170 175

Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val
180 185 190

Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly
195 200 205

Pro Lys Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe
210 215 220

<210> 2

<211> 234

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 2

Arg Val Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn
1 5 10 15

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

Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser
35 40 45

Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val
50 55 60

Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln
85 90 95

Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr
100 105 110

Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly
115 120 125

Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys
130 135 140

Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr
145 150 155 160

Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser
165 170 175

Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val
180 185 190

Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly
195 200 205

Pro Lys Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe Ala
210 215 220

His His His His His His His His His His
225 230

<210> 3

<211> 457

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 3

Arg Val Gln Pro Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn
1 5 10 15

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

Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser
35 40 45

Val Leu Tyr Asn Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val
50 55 60

Ser Pro Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Phe Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln
85 90 95

Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr
100 105 110

Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val Gly
115 120 125

Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys
130 135 140

Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala Gly Ser Thr
145 150 155 160

Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser
165 170 175

Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val
180 185 190

Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly

195 200 205

Pro Lys Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Phe Ala
210 215 220

Asp Asp Asp Asp Lys Ala Val Pro Arg Asp Ser Gly Cys Lys Pro Cys
225 230 235 240

Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
245 250 255

Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val
260 265 270

Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe
275 280 285

Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu
290 295 300

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His
305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala
325 330 335

Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg
340 345 350

Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met
355 360 365

Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro
370 375 380

Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn
385 390 395 400

Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val

405 410 415

Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr
420 425 430

Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu
435 440 445

Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 4
<211> 232
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 4

Asn His Lys Val Thr Ser Thr Thr Thr Ile Ile Gln Asp Ala Thr Ser
1 5 10 15

Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Ser Pro Gln Leu
20 25 30

Gly Ile Ser Pro Ser Asn Pro Ser Glu Ile Thr Ser Gln Ile Thr Thr
35 40 45

Ile Leu Ala Ser Thr Thr Pro Gly Val Lys Ser Thr Leu Gln Ser Thr
50 55 60

Thr Val Gly Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Ala Gln Pro Ser Lys
65 70 75 80

Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Ser Lys Pro Asn Asn
85 90 95

Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser
100 105 110

Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys
115 120 125

Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Phe Lys
130 135 140

Thr Ala Lys Glu Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Gly Ser Gly Glu Val
145 150 155 160

Pro Thr Thr Lys Pro Thr Gly Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys Thr
165 170 175

Asn Ile Thr Thr Thr Leu Leu Thr Ser Asn Thr Thr Arg Asn Pro Glu
180 185 190

Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly Asn
195 200 205

Pro Ser Pro Ser Gln Val Ser Ile Thr Ser Glu Tyr Leu Ser Gln Pro
210 215 220

Ser Ser Pro Pro Asn Thr Pro Arg
225 230

<210> 5

<211> 158

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 5

Ala Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser
1 5 10 15

Gly Ile Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr
20 25 30

Glu Ala Ala Asp Val Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val

35 40 45
 Arg Glu Gly Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu
 50 55 60
 Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His Val
 65 70 75 80
 Asp Leu Leu Val Gly Thr Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly
 85 90 95
 Asp Leu Cys Gly Ser Ile Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Phe Ser
 100 105 110
 Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro
 115 120 125
 Gly His Val Ser Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp
 130 135 140
 Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile
 145 150 155
 <210> 6
 <211> 278
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.
 <400> 6
 Glu Thr His Thr Thr Gly Arg Val Ala Gly His Thr Thr Ser Gly Phe
 1 5 10 15
 Thr Ser Leu Phe Ser Ser Gly Ala Ser Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn
 20 25 30
 Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp
 35 40 45

Ser Leu Gln Thr Gly Phe Phe Ala Ala Leu Phe Tyr Ala His Lys Phe
50 55 60

Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Arg Pro Ile Asp
65 70 75 80

Trp Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr Tyr Thr Lys Pro Asn Ser
85 90 95

Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly
100 105 110

Val Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro
115 120 125

Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Val Pro Thr Tyr
130 135 140

Ser Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Met Met Leu Leu Asn Asn Thr Arg
145 150 155 160

Pro Pro Gln Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly
165 170 175

Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Val Gly
180 185 190

Asn Arg Thr Leu Ile Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu
195 200 205

Ala Thr Tyr Thr Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys
210 215 220

Leu Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Leu Asn
225 230 235 240

Phe Ser Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg
245 250 255

Leu Asn Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asn Leu Glu
260 265 270

Asp Arg Asp Arg Ser Glu
275

<210> 7
<211> 347
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 7

Asp Arg Ile Cys Thr Gly Ile Thr Ser Ser Asn Ser Pro His Val Val
1 5 10 15

Lys Thr Ala Thr Gln Gly Glu Val Asn Val Thr Gly Val Ile Pro Leu
20 25 30

Thr Thr Thr Pro Thr Lys Ser His Phe Ala Asn Leu Lys Gly Thr Glu
35 40 45

Thr Arg Gly Lys Leu Cys Pro Lys Cys Leu Asn Cys Thr Asp Leu Asp
50 55 60

Val Ala Leu Gly Arg Pro Lys Cys Thr Gly Lys Ile Pro Ser Ala Arg
65 70 75 80

Val Ser Ile Leu His Glu Val Arg Pro Val Thr Ser Gly Cys Phe Pro
85 90 95

Ile Met His Asp Arg Thr Lys Ile Arg Gln Leu Pro Asn Leu Leu Arg
100 105 110

Gly Tyr Glu His Ile Arg Leu Ser Thr His Asn Val Ile Asn Ala Glu
115 120 125

Asn Ala Pro Gly Gly Pro Tyr Lys Ile Gly Thr Ser Gly Ser Cys Pro

130 135 140

Asn Ile Thr Asn Gly Asn Gly Phe Phe Ala Thr Met Ala Trp Ala Val
145 150 155 160

Pro Lys Asn Asp Lys Asn Lys Thr Ala Thr Asn Pro Leu Thr Ile Glu
165 170 175

Val Pro Tyr Ile Cys Thr Glu Gly Glu Asp Gln Ile Thr Val Trp Gly
180 185 190

Phe His Ser Asp Asn Glu Thr Gln Met Ala Lys Leu Tyr Gly Asp Ser
195 200 205

Lys Pro Gln Lys Phe Thr Ser Ser Ala Asn Gly Val Thr Thr His Tyr
210 215 220

Val Ser Gln Ile Gly Gly Phe Pro Asn Gln Thr Glu Asp Gly Gly Leu
225 230 235 240

Pro Gln Ser Gly Arg Ile Val Val Asp Tyr Met Val Gln Lys Ser Gly
245 250 255

Lys Thr Gly Thr Ile Thr Tyr Gln Arg Gly Ile Leu Leu Pro Gln Lys
260 265 270

Val Trp Cys Ala Ser Gly Arg Ser Lys Val Ile Lys Gly Ser Leu Pro
275 280 285

Leu Ile Gly Glu Ala Asp Cys Leu His Glu Lys Tyr Gly Gly Leu Asn
290 295 300

Lys Ser Lys Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala Ile Gly Asn
305 310 315 320

Cys Pro Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys Leu Ala Asn Gly Thr Lys
325 330 335

Tyr Arg Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg

340 345

<210> 8

<211> 511

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 8

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
1 5 10 15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
20 25 30

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
35 40 45

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
50 55 60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
65 70 75 80

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
100 105 110

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
115 120 125

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Thr Pro Ser Phe Phe
130 135 140

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Thr Tyr Pro Thr Ile
145 150 155 160

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp
165 170 175

Gly Ile His His Ser Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
180 185 190

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
195 200 205

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
210 215 220

Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
225 230 235 240

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
245 250 255

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Val Lys Ser Glu Val Glu Tyr Gly
260 265 270

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Ile Gly Ala Ile Asn Ser Ser
275 280 285

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
290 295 300

Tyr Val Lys Ser Asn Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
305 310 315 320

Pro Leu Thr Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
325 330 335

Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His
340 345 350

Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln
355 360 365

Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys
 370 375 380

Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu
 385 390 395 400

Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp
 405 410 415

Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg
 420 425 430

Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val
 435 440 445

Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe
 450 455 460

Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn
 465 470 475 480

Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg
 485 490 495

Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr Tyr Gln
 500 505 510

<210> 9

<211> 276

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 9

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

Asp Lys Leu Val Cys Arg Asp Lys Leu Ser Ser Thr Ser Gln Leu Lys

20 25 30

Ser Val Gly Leu Asn Leu Glu Gly Asn Gly Val Ala Thr Asp Val Pro
35 40 45

Thr Ala Thr Lys Arg Trp Gly Phe Arg Ala Gly Val Pro Pro Lys Val
50 55 60

Val Asn Tyr Glu Ala Gly Glu Trp Ala Glu Asn Cys Tyr Asn Leu Asp
65 70 75 80

Ile Lys Lys Ala Asp Gly Ser Glu Cys Leu Pro Glu Ala Pro Glu Gly
85 90 95

Val Arg Gly Phe Pro Arg Cys Arg Tyr Val His Lys Val Ser Gly Thr
100 105 110

Gly Pro Cys Pro Glu Gly Tyr Ala Phe His Lys Glu Gly Ala Phe Phe
115 120 125

Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Ile Ile Tyr Arg Ser Thr Thr Phe
130 135 140

Ser Glu Gly Val Val Ala Phe Leu Ile Leu Pro Glu Thr Lys Lys Asp
145 150 155 160

Phe Phe Gln Ser Pro Pro Leu His Glu Pro Ala Asn Met Thr Thr Asp
165 170 175

Pro Ser Ser Tyr Tyr His Thr Val Thr Leu Asn Tyr Val Ala Asp Asn
180 185 190

Phe Gly Thr Asn Met Thr Asn Phe Leu Phe Gln Val Asp His Leu Thr
195 200 205

Tyr Val Gln Leu Glu Pro Arg Phe Thr Pro Gln Phe Leu Val Gln Leu
210 215 220

Asn Glu Thr Ile Tyr Thr Asn Gly Arg Arg Ser Asn Thr Thr Gly Thr

225 230 235 240

Leu Ile Trp Lys Val Asn Pro Thr Val Asp Thr Gly Val Gly Glu Trp
 245 250 255

Ala Phe Trp Glu Asn Lys Lys Asn Phe Thr Lys Thr Leu Ser Ser Glu
 260 265 270

Glu Leu Ser Val
 275

<210> 10
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 10

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

Asp Gln Leu Val Cys Lys Asp His Leu Ala Ser Thr Asp Gln Leu Lys
 20 25 30

Ser Val Gly Leu Asn Leu Glu Gly Ser Gly Val Ser Thr Asp Ile Pro
 35 40 45

Ser Ala Thr Lys Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly Val Pro Pro Lys Val
 50 55 60

Val Ser Tyr Glu Ala Gly Glu Trp Ala Glu Asn Cys Tyr Asn Leu Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Lys Pro Asp Gly Ser Glu Cys Leu Pro Pro Pro Pro Asp Gly
 85 90 95

Val Arg Gly Phe Pro Arg Cys Arg Tyr Val His Lys Ala Gln Gly Thr
 100 105 110

Gly Pro Cys Pro Gly Asp Tyr Ala Phe His Lys Asp Gly Ala Phe Phe
115 120 125

Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Val Ile Tyr Arg Gly Val Asn Phe
130 135 140

Ala Glu Gly Val Ile Ala Phe Leu Ile Leu Ala Lys Pro Lys Glu Thr
145 150 155 160

Phe Leu Gln Ser Pro Pro Ile Arg Glu Ala Val Asn Tyr Thr Glu Asn
165 170 175

Thr Ser Ser Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Leu Glu Tyr Glu Ile Glu Asn
180 185 190

Phe Gly Ala Gln His Ser Thr Thr Leu Phe Lys Ile Asp Asn Asn Thr
195 200 205

Phe Val Arg Leu Asp Arg Pro His Thr Pro Gln Phe Leu Phe Gln Leu
210 215 220

Asn Asp Thr Ile His Leu His Gln Gln Leu Ser Asn Thr Thr Gly Arg
225 230 235 240

Leu Ile Trp Thr Leu Asp Ala Asn Ile Asn Ala Asp Ile Gly Glu Trp
245 250 255

Ala Phe Trp Glu Asn Lys Lys Asn Leu Ser Glu Gln Leu Arg Gly Glu
260 265 270

Glu Leu Ser Phe Glu Ala Leu Ser Leu Asn Glu Thr Glu Asp Asp Asp
275 280 285

Ala Ala Ser Ser Arg Ile Thr Lys Gly Arg Ile Ser Asp Arg Ala Thr
290 295 300

Arg Lys Tyr Ser Asp Leu Val Pro Lys Asn Ser Pro Gly Met Val Pro
305 310 315 320

Leu His Ile Pro Glu Gly Glu Thr Thr Leu Pro Ser Gln Asn Ser Thr
325 330 335

Glu Gly Arg Arg Val Gly Val Asn Thr Gln Glu Thr Ile Thr Glu Thr
340 345 350

Ala Ala Thr Ile Ile Gly Thr Asn Gly Asn His Met Gln Ile Ser Thr
355 360 365

Ile Gly Ile Arg Pro Ser Ser Ser Gln Ile Pro Ser Ser Ser Pro Thr
370 375 380

Thr Ala Pro Ser Pro Glu Ala Gln Thr Pro Thr Thr His Thr Ser Gly
385 390 395 400

Pro Ser Val Met Ala Thr Glu Glu Pro Thr Thr Pro Pro Gly Ser Ser
405 410 415

Pro Gly Pro Thr Thr Glu Ala Pro Thr Leu Thr Thr Pro Glu Asn Ile
420 425 430

Thr Thr Ala Val Lys Thr Val Leu Pro Gln Glu Ser Thr Ser Asn Gly
435 440 445

Leu Ile Thr Ser Thr Val Thr Gly Ile Leu Gly Ser Leu Gly Leu Arg
450 455 460

Lys Arg Ser Arg Arg
465

<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 11

Val Ser Tyr Ser Leu Cys Thr Ala Ala Phe Thr Phe Thr Lys Ile Pro

1 5 10 15

Ala Glu Thr Leu His Gly Thr Val Thr Val Glu Val Gln Tyr Ala Gly
20 25 30

Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ala Gln Met Ala Val Asp Met Gln
35 40 45

Thr Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Ile Thr
50 55 60

Glu Ser Thr Glu Asn Ser Lys Met Met Leu Glu Leu Asp Pro Pro Phe
65 70 75 80

Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Glu Lys Lys Ile Thr His
85 90 95

His Trp His Arg Ser Gly Ser Thr Ile Gly Lys
100 105

<210> 12

<211> 243

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 12

Asn His Lys Val Thr Ser Thr Thr Thr Ile Ile Gln Asp Ala Thr Ser
1 5 10 15

Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Ser Pro Gln Leu
20 25 30

Gly Ile Ser Pro Ser Asn Pro Ser Glu Ile Thr Ser Gln Ile Thr Thr
35 40 45

Ile Leu Ala Ser Thr Thr Pro Gly Val Lys Ser Thr Leu Gln Ser Thr
50 55 60

Thr Val Gly Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Ala Gln Pro Ser Lys
65 70 75 80

Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Ser Lys Pro Asn Asn
 85 90 95

Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser
 100 105 110

Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys
 115 120 125

Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Phe Lys
 130 135 140

Thr Ala Lys Glu Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Gly Ser Gly Glu Val
145 150 155 160

Pro Thr Thr Lys Pro Thr Gly Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys Thr
 165 170 175

Asn Ile Thr Thr Thr Leu Leu Thr Ser Asn Thr Thr Arg Asn Pro Glu
 180 185 190

Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly Asn
 195 200 205

Pro Ser Pro Ser Gln Val Ser Ile Thr Ser Glu Tyr Leu Ser Gln Pro
 210 215 220

Ser Ser Pro Pro Asn Thr Pro Arg Ala His His His His His His His
225 230 235 240

His His His

<210> 13

<211> 168

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 13

His His His His His His His His His His Ala Leu Glu Val Leu Phe
1 5 10 15

Gln Gly Pro Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Ile Tyr His Val Thr
20 25 30

Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Val Ile
35 40 45

Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ser Ser
50 55 60

Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser
65 70 75 80

Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Thr
85 90 95

Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Ile
100 105 110

Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Glu Thr
115 120 125

Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val Ser Gly His
130 135 140

Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu
145 150 155 160

Val Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile
165

<210> 14

<211> 289

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 14

Glu Thr His Thr Thr Gly Arg Val Ala Gly His Thr Thr Ser Gly Phe
1 5 10 15

Thr Ser Leu Phe Ser Ser Gly Ala Ser Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn
20 25 30

Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp
35 40 45

Ser Leu Gln Thr Gly Phe Phe Ala Ala Leu Phe Tyr Ala His Lys Phe
50 55 60

Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Arg Pro Ile Asp
65 70 75 80

Trp Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr Tyr Thr Lys Pro Asn Ser
85 90 95

Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly
100 105 110

Val Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro
115 120 125

Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Val Pro Thr Tyr
130 135 140

Ser Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Met Met Leu Leu Asn Asn Thr Arg
145 150 155 160

Pro Pro Gln Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly
165 170 175

Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Val Gly
180 185 190

Asn Arg Thr Leu Ile Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu
195 200 205

Ala Thr Tyr Thr Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys
210 215 220

Leu Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Leu Asn
225 230 235 240

Phe Ser Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg
245 250 255

Leu Asn Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asn Leu Glu
260 265 270

Asp Arg Asp Arg Ser Glu Ala His His His His His His His His
275 280 285

His

<210> 15

<211> 358

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 15

Asp Arg Ile Cys Thr Gly Ile Thr Ser Ser Asn Ser Pro His Val Val
1 5 10 15

Lys Thr Ala Thr Gln Gly Glu Val Asn Val Thr Gly Val Ile Pro Leu
20 25 30

Thr Thr Thr Pro Thr Lys Ser His Phe Ala Asn Leu Lys Gly Thr Glu

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

245 250 255

Lys Thr Gly Thr Ile Thr Tyr Gln Arg Gly Ile Leu Leu Pro Gln Lys
260 265 270

Val Trp Cys Ala Ser Gly Arg Ser Lys Val Ile Lys Gly Ser Leu Pro
275 280 285

Leu Ile Gly Glu Ala Asp Cys Leu His Glu Lys Tyr Gly Gly Leu Asn
290 295 300

Lys Ser Lys Pro Tyr Tyr Thr Gly Glu His Ala Lys Ala Ile Gly Asn
305 310 315 320

Cys Pro Ile Trp Val Lys Thr Pro Leu Lys Leu Ala Asn Gly Thr Lys
325 330 335

Tyr Arg Pro Pro Ala Lys Leu Leu Lys Glu Arg Ala His His His His
340 345 350

His His His His His His
355

<210> 16
<211> 522
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 16

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
1 5 10 15

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
20 25 30

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
35 40 45

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
50 55 60

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
65 70 75 80

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
85 90 95

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
100 105 110

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
115 120 125

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Thr Pro Ser Phe Phe
130 135 140

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Thr Tyr Pro Thr Ile
145 150 155 160

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp
165 170 175

Gly Ile His His Ser Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
180 185 190

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
195 200 205

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
210 215 220

Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
225 230 235 240

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
245 250 255

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Val Lys Ser Glu Val Glu Tyr Gly
260 265 270

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Ile Gly Ala Ile Asn Ser Ser
275 280 285

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
290 295 300

Tyr Val Lys Ser Asn Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
305 310 315 320

Pro Leu Thr Glu Thr Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile
325 330 335

Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His
340 345 350

Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln
355 360 365

Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys
370 375 380

Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu
385 390 395 400

Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp
405 410 415

Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg
420 425 430

Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val
435 440 445

Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe
450 455 460

Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn
465 470 475 480

Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg
485 490 495

Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr Tyr Gln Ala
500 505 510

His His His His His His His His His His
515 520

<210> 17

<211> 514

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 17

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

Asp Lys Leu Val Cys Arg Asp Lys Leu Ser Ser Thr Ser Gln Leu Lys
20 25 30

Ser Val Gly Leu Asn Leu Glu Gly Asn Gly Val Ala Thr Asp Val Pro
35 40 45

Thr Ala Thr Lys Arg Trp Gly Phe Arg Ala Gly Val Pro Pro Lys Val
50 55 60

Val Asn Tyr Glu Ala Gly Glu Trp Ala Glu Asn Cys Tyr Asn Leu Asp
65 70 75 80

Ile Lys Lys Ala Asp Gly Ser Glu Cys Leu Pro Glu Ala Pro Glu Gly
85 90 95

Val Arg Gly Phe Pro Arg Cys Arg Tyr Val His Lys Val Ser Gly Thr

100 105 110
Gly Pro Cys Pro Glu Gly Tyr Ala Phe His Lys Glu Gly Ala Phe Phe
115 120 125
Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Ile Ile Tyr Arg Ser Thr Thr Phe
130 135 140
Ser Glu Gly Val Val Ala Phe Leu Ile Leu Pro Glu Thr Lys Lys Asp
145 150 155 160
Phe Phe Gln Ser Pro Pro Leu His Glu Pro Ala Asn Met Thr Thr Asp
165 170 175
Pro Ser Ser Tyr Tyr His Thr Val Thr Leu Asn Tyr Val Ala Asp Asn
180 185 190
Phe Gly Thr Asn Met Thr Asn Phe Leu Phe Gln Val Asp His Leu Thr
195 200 205
Tyr Val Gln Leu Glu Pro Arg Phe Thr Pro Gln Phe Leu Val Gln Leu
210 215 220
Asn Glu Thr Ile Tyr Thr Asn Gly Arg Arg Ser Asn Thr Thr Gly Thr
225 230 235 240
Leu Ile Trp Lys Val Asn Pro Thr Val Asp Thr Gly Val Gly Glu Trp
245 250 255
Ala Phe Trp Glu Asn Lys Lys Asn Phe Thr Lys Thr Leu Ser Ser Glu
260 265 270
Glu Leu Ser Val Ala Asp Asp Asp Asp Lys Glu Pro Lys Ser Ser Asp
275 280 285
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
290 295 300
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

305 310 315 320

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 325 330 335

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 340 345 350

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 355 360 365

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 370 375 380

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
385 390 395 400

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 405 410 415

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 420 425 430

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 435 440 445

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 450 455 460

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
465 470 475 480

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 485 490 495

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 500 505 510

Gly Lys

<210> 18
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 18

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

Asp Gln Leu Val Cys Lys Asp His Leu Ala Ser Thr Asp Gln Leu Lys
 20 25 30

Ser Val Gly Leu Asn Leu Glu Gly Ser Gly Val Ser Thr Asp Ile Pro
 35 40 45

Ser Ala Thr Lys Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly Val Pro Pro Lys Val
 50 55 60

Val Ser Tyr Glu Ala Gly Glu Trp Ala Glu Asn Cys Tyr Asn Leu Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Lys Pro Asp Gly Ser Glu Cys Leu Pro Pro Pro Asp Gly
 85 90 95

Val Arg Gly Phe Pro Arg Cys Arg Tyr Val His Lys Ala Gln Gly Thr
 100 105 110

Gly Pro Cys Pro Gly Asp Tyr Ala Phe His Lys Asp Gly Ala Phe Phe
 115 120 125

Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Val Ile Tyr Arg Gly Val Asn Phe
 130 135 140

Ala Glu Gly Val Ile Ala Phe Leu Ile Leu Ala Lys Pro Lys Glu Thr
 145 150 155 160

Phe Leu Gln Ser Pro Pro Ile Arg Glu Ala Val Asn Tyr Thr Glu Asn
165 170 175

Thr Ser Ser Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Leu Glu Tyr Glu Ile Glu Asn
180 185 190

Phe Gly Ala Gln His Ser Thr Thr Leu Phe Lys Ile Asp Asn Asn Thr
195 200 205

Phe Val Arg Leu Asp Arg Pro His Thr Pro Gln Phe Leu Phe Gln Leu
210 215 220

Asn Asp Thr Ile His Leu His Gln Gln Leu Ser Asn Thr Thr Gly Arg
225 230 235 240

Leu Ile Trp Thr Leu Asp Ala Asn Ile Asn Ala Asp Ile Gly Glu Trp
245 250 255

Ala Phe Trp Glu Asn Lys Lys Asn Leu Ser Glu Gln Leu Arg Gly Glu
260 265 270

Glu Leu Ser Phe Glu Ala Leu Ser Leu Asn Glu Thr Glu Asp Asp Asp
275 280 285

Ala Ala Ser Ser Arg Ile Thr Lys Gly Arg Ile Ser Asp Arg Ala Thr
290 295 300

Arg Lys Tyr Ser Asp Leu Val Pro Lys Asn Ser Pro Gly Met Val Pro
305 310 315 320

Leu His Ile Pro Glu Gly Glu Thr Thr Leu Pro Ser Gln Asn Ser Thr
325 330 335

Glu Gly Arg Arg Val Gly Val Asn Thr Gln Glu Thr Ile Thr Glu Thr
340 345 350

Ala Ala Thr Ile Ile Gly Thr Asn Gly Asn His Met Gln Ile Ser Thr
355 360 365

Ile Gly Ile Arg Pro Ser Ser Ser Gln Ile Pro Ser Ser Ser Pro Thr
370 375 380

Thr Ala Pro Ser Pro Glu Ala Gln Thr Pro Thr Thr His Thr Ser Gly
385 390 395 400

Pro Ser Val Met Ala Thr Glu Glu Pro Thr Thr Pro Pro Gly Ser Ser
405 410 415

Pro Gly Pro Thr Thr Glu Ala Pro Thr Leu Thr Thr Pro Glu Asn Ile
420 425 430

Thr Thr Ala Val Lys Thr Val Leu Pro Gln Glu Ser Thr Ser Asn Gly
435 440 445

Leu Ile Thr Ser Thr Val Thr Gly Ile Leu Gly Ser Leu Gly Leu Arg
450 455 460

Lys Arg Ser Arg Arg Ala His His His His His His His His His His
465 470 475 480

<210> 19

<211> 345

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự này được tổng hợp nhân tạo.

<400> 19

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

Ala Glu Thr Leu His Gly Thr Val Thr Val Glu Val Gln Tyr Ala Gly
20 25 30

Thr Asp Gly Pro Cys Lys Val Pro Ala Gln Met Ala Val Asp Met Gln
35 40 45

Thr Leu Thr Pro Val Gly Arg Leu Ile Thr Ala Asn Pro Val Ile Thr

50 55 60

Glu Ser Thr Glu Asn Ser Lys Met Met Leu Glu Leu Asp Pro Pro Phe
65 70 75 80

Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Glu Lys Lys Ile Thr His
85 90 95

His Trp His Arg Ser Gly Ser Thr Ile Gly Lys Ala Asp Asp Asp Asp
100 105 110

Lys Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
115 120 125

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
130 135 140

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
145 150 155 160

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
165 170 175

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
180 185 190

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
195 200 205

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
210 215 220

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
225 230 235 240

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
245 250 255

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

260 265 270

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
275 280 285

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
290 295 300

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
305 310 315 320

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
325 330 335

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
340 345