



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

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

(11) 
1-0022562

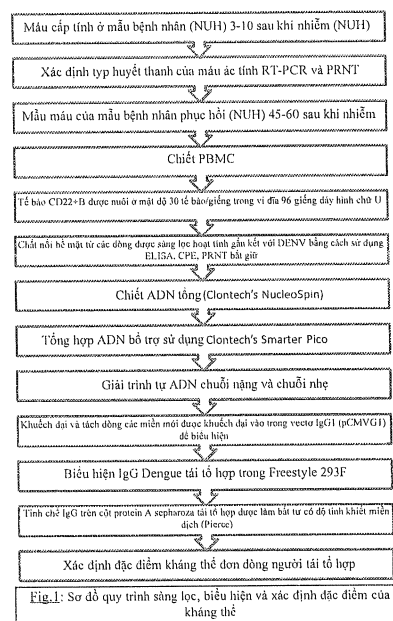
(51)⁷ **C07K 16/10, A61P 31/14, C12N 15/13,**
A61K 39/42, C12P 21/08, A61K 39/00,
45/06

(13) **B**

- (21) 1-2013-01818 (22) 14.12.2011
(86) PCT/SG2011/000436 14.12.2011 (87) WO2012/082073 21.06.2012
(30) 61/423,085 14.12.2010 US
(45) 25.12.2019 381 (43) 25.03.2014 312
(73) 1. NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE (SG)
21 Lower Kent Ridge Road, Singapore 119077, Singapore
2. DSO NATIONAL LABORATORIES (SG)
20 Science Park Drive, Singapore 118230, Singapore
(72) MACARY, Paul Anthony (GB), TEOH, Ee Ping Evelyn (SG), HANSON, Brendon
John (SG), TEO, En Wei (SG), LIM, Angeline Pei Chiew (SG), NG, Mah Lee Mary
(MY), LOK, Shee Mei (SG), KUKKARO, Petra Eveliina (FI)
(74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) **KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU VỚI PROTEIN VỎ TYP HUYẾT THANH 1 CỦA VIRUT DENGUE VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập hoặc mảnh của chúng có tính đặc hiệu với protein vỏ typ huyết thanh 1 của virus Dengue và dược phẩm chứa chúng để sử dụng trong điều trị bệnh nhiễm virus Dengue ở đối tượng động vật có xương sống. Cụ thể, kháng thể này là kháng thể đơn dòng trung hòa ở người kháng virus Dengue được phân lập từ các tế bào B được làm bất tử EBV có nguồn gốc từ bệnh nhân đã khỏi bệnh Dengue.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng trung hòa của người với virus Dengue, cụ thể là, typ huyết thanh 1. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm virus Dengue ở đối tượng động vật có xương sống.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh Dengue là bệnh mà chủ yếu do muỗi mang virus truyền nhiễm sang người. Hiện nay, có gần 2,5 tỷ người ở hơn 100 quốc gia có bệnh Dengue ở vùng vành đai nhiệt đới/cận nhiệt đới được xem là có nguy cơ nhiễm bệnh Dengue. Loài muỗi cư ngụ ở thành thị, *Aedes aegypti* là vật truyền nhiễm virus chính sang người. Bệnh nhiễm virus Dengue có thể gây ra nhiều biểu hiện lâm sàng từ bệnh nhiễm virus không có triệu chứng lây nhiễm đến sốt Dengue (dengue fever - DF), bệnh sốt cấp tính, đến sốt xuất huyết Dengue (dengue haemorrhagic fever - DHF) và hội chứng sốc Dengue (dengue shock syndrome - DSS) là các biến chứng nghiêm trọng, đe dọa mạng sống được đặc trưng bởi tình trạng rò rỉ thành mạch. Việc điều trị hiện nay bị giới hạn ở việc sử dụng thuốc giảm đau để làm giảm bớt triệu chứng và chưa có vaccin sẵn có. Các bệnh Dengue ảnh hưởng đến 50 triệu người mỗi năm, với dịch bộc phát thường xuyên và tái đi tái lại. Năm 1990 đã thấy sự trở lại của các bệnh Dengue ở các vùng khác nhau trên thế giới mặc dù đã kiểm soát muỗi nghiêm ngặt, đỉnh cao là sự kiện bùng phát vào năm 2005 ở Singapo. Trên 80% các trường hợp được báo cáo là ở người trưởng thành trẻ tuổi với các tác động liên quan đến khả năng làm việc của họ cộng thêm chi phí chăm sóc sức khỏe đáng kể để điều trị cho họ. Vì thế, các phương án thay thế cho vaccin Dengue, như liệu pháp kháng thể thụ động và/hoặc kháng virus là cấp thiết để hỗ trợ việc kiểm soát các bệnh liên quan đến Dengue trong giai đoạn trung hạn. Các phương pháp điều trị được đề xuất này có khả năng hỗ trợ số lượng lớn các cá thể bị nhiễm mặc dù chỉ được sử dụng cho các cá thể có nguy cơ phát triển các dạng nghiêm trọng của bệnh (khoảng 10% tổng số). Với sự phổ biến ngày càng tăng của bệnh Dengue ở các nước phát triển như Nam Mỹ và Úc, và việc thiếu vaccin, kháng thể này có thể là thuốc hữu dụng. Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người để thỏa mãn các nhu cầu này và nhu cầu khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm và phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm virus Dengue ở đối tượng động vật có xương sống.

Cụ thể là, sáng chế mô tả ví dụ về việc sản xuất kháng thể đơn dòng trung hòa hoàn toàn của người từ bệnh nhân mới phục hồi sau khi nhiễm Dengue typ huyết thanh 1. Kháng thể này thể hiện cả hoạt tính phòng bệnh và hoạt tính điều trị trong việc phong bế sự lây nhiễm Dengue typ huyết thanh 1 *in vitro* và *in vivo* và có thể là nền tảng cho các thuốc mới. Sáng chế sử dụng phương pháp tạo ra tế bào B nhớ được làm bất tử từ bệnh nhân đang hồi phục bằng cách tinh chế tế bào dương tính với CD22 của họ từ mẫu máu được lấy 60 ngày sau khi bệnh nhân khỏi bệnh nhiễm trùng. Sau đó, tế bào B đã tinh chế được làm bất tử, bằng cách gây nhiễm virus Epstein Barr (EBV). Phương pháp này tạo ra ô chứa các dòng tế bào B ghi nhớ được làm bất tử có khả năng tạo ra kháng thể hoàn toàn của người mà có thể được sàng lọc về tính đặc hiệu đối với virus Dengue. Các dòng tế bào B này sau đó có thể được sử dụng làm nguồn được làm giàu của khuôn globulin miễn dịch để nhận biết và tách dòng kháng thể đơn dòng tái tổ hợp có hoạt tính trung hòa đối với virus Dengue *in vitro* và *in vivo*. Như được mô tả ở đây, tác giả sáng chế mô tả đặc điểm của quá trình phân lập, sàng lọc, tách dòng và phân tích *in vitro/in vivo* của kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người thứ nhất đặc hiệu với typ huyết thanh 1 của virus Dengue.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh của chúng được phân lập mà gắn kết với protein vỏ có typ huyết thanh 1 của virus Dengue hoặc mảnh của chúng, trong đó kháng thể này là kháng thể người có hoạt tính trung hòa.

Theo các phương án khác nhau của khía cạnh này, kháng thể hoặc mảnh của chúng có thể là (a) phân tử globulin miễn dịch nguyên vẹn; (b) scFv; (c) mảnh Fab; (d) F(ab')₂; hoặc (e) Fv được liên kết disulfua.

Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh của chúng có thể bao gồm miền hằng định globulin miễn dịch chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm: (a) miền hằng định IgM ở người; (b) miền hằng định IgG1 ở người; (c) miền hằng định IgG2 ở người; (d) miền hằng định IgG3 ở người; (e) miền hằng định IgG4 ở người; hoặc (f) miền hằng định IgA1/2 ở người.

Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh của chúng có thể bao gồm miền hằng định globulin miễn dịch chuỗi nhẹ có thể là: (a) miền hằng định Ig kappa ở người; hoặc (b) miền hằng định Ig lambda ở người.

Theo một phương án bổ sung, kháng thể hoặc mảnh của chúng bao gồm chuỗi nặng bao gồm ít nhất một CDR được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự CDR được thể hiện trong Fig. 4(B).

Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh của chúng bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm ít nhất một CDR được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự CDR được thể hiện trong Fig. 4(B).

Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh của chúng bao gồm chuỗi nặng bao gồm ba trình tự CDR như được thể hiện trong Fig. 4(B).

Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh của chúng bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm ba trình tự CDR như được thể hiện trong Fig. 4(B).

Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh của chúng bao gồm vùng khung chuỗi nặng của IGHV1-2*02 và ít nhất một trình tự trong số các trình tự CDR như được thể hiện trong Fig. 4(B).

Theo một phương án khác nữa, kháng thể hoặc mảnh của chúng bao gồm vùng khung chuỗi nhẹ của IGKV3-20*01 và ít nhất một trình tự trong số các trình tự CDR như được thể hiện trong Fig. 4(B).

Theo một phương án, kháng thể bao gồm trình tự chuỗi nặng được thể hiện trong Fig. 4(B).

Theo một phương án khác, kháng thể bao gồm trình tự chuỗi nhẹ được thể hiện trong Fig. 4(B).

Theo một phương án khác nữa, kháng thể là 14c10, dòng 8.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh của chúng gắn kết với kháng nguyên với hằng số ái lực (K_D) nhỏ hơn 1×10^{-8} M.

Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh của chúng gắn kết với kháng nguyên với hằng số ái lực (K_D) nhỏ hơn 1×10^{-9} M.

Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh của chúng có nguồn gốc từ tế

bào B của bệnh nhân đã phục hồi sau khi nhiễm virus Dengue.

Theo một phương án khác, kháng thể hoặc mảnh của chúng gắn kết chéo hai protein vỏ ở virus. Theo một số phương án, sự liên kết chéo hai protein vỏ bao gồm việc gắn kết với DI và khớp nối giữa DI và II trên một protein E và DIII của protein E bên cạnh.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh của chúng mà gắn kết với virus Dengue có tính đặc hiệu gắn kết của 14c10, dòng 8.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh của chúng theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh và các phương án có liên quan nêu trên và chất mang dược dụng có hiệu quả làm giảm hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm virus Dengue ở đối tượng. Theo một số phương án, dược phẩm này có thể còn bao gồm chất thứ hai, ví dụ, thuốc kháng virus hoặc thuốc giảm đau.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp gây miễn dịch thụ động bao gồm bước sử dụng cho đối tượng lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc mảnh của chúng theo khía cạnh và phương án bất kỳ trong số các khía cạnh và phương án có liên quan nêu trên.

Theo khía cạnh bổ sung, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh nhiễm virus Dengue bao gồm bước sử dụng cho đối tượng có nhu cầu một lượng kháng thể hoặc mảnh của chúng theo khía cạnh và phương án bất kỳ trong số các khía cạnh và phương án có liên quan nêu trên, có hiệu quả làm giảm hoặc ngăn ngừa bệnh này.

Theo một số phương án, kháng thể này được sử dụng trong tĩnh mạch (IV), dưới da (SC), trong cơ (IM), qua da, hoặc qua đường miệng.

Theo một phương án khác, kháng thể được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/kg cân nặng của đối tượng.

Việc sử dụng này có thể còn bao gồm việc sử dụng chất thứ hai, mà có thể, ví dụ, là thuốc kháng virus hoặc thuốc giảm đau.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể trung hòa kháng virus Dengue bao gồm bước: (a) nhận biết cá thể vừa khỏi bệnh nhiễm virus Dengue; (b) thu nhận tế bào B từ cá thể này; (c) làm bất tử tế bào B từ bước (b);

và (d) thử nghiệm tế bào B được làm bất tử từ bước (c) về khả năng trung hòa virus Dengue.

Theo các phương án của khía cạnh này, tế bào B là CD 22+. Theo các phương án khác, tế bào B được làm bất tử bằng EBV.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể hoặc mảnh của chúng theo khía cạnh và phương án bất kỳ trong số các khía cạnh và phương án có liên quan nêu trên. Các axit nucleic được phân lập này có thể được chứa trong vector biểu hiện. Các vector biểu hiện có thể được chứa trong tế bào chủ, như tế bào vi khuẩn, nhân chuẩn, hoặc tế bào động vật có vú.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Đồ thị thể hiện quy trình sàng lọc, biểu hiện và phân tích kháng thể. Các tế bào CD22+ B từ bệnh nhân đã nhiễm bệnh Dengue được nhận bởi Bệnh viện đại học quốc gia (National University Hospital-NUH) được phân lập. Các tế bào B này được làm bất tử bằng EBV với sự có mặt của yếu tố hoạt hóa tế bào B đa dòng (2,5µg/ml trình tự CpG, IL2 và IL4) mà được bổ sung để tăng cường hiệu quả của việc làm bất tử. Các tế bào B đưa vào đĩa với mật độ 30 tế bào/giếng trong giếng đáy tròn 96 giếng với 1×10^5 , PBMC được chiếu xạ, ngoại sinh thu được từ lớp vầng máu ly tâm. Sau hai tuần, chất nổi bề mặt từ các dòng này được sàng lọc bằng ELISA, PRNT và CPE đối với hoạt tính gắn kết/trung hòa. mARN của dòng tế bào B dương tính này được chiết và các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được tách dòng vào vector pCMV nội bộ và được chuyển nhiễm vào tế bào Freestyle® 293F để tạo ra các nồng độ cao của kháng thể tái tổ hợp. Các kháng thể tái tổ hợp có tính đặc hiệu mong muốn được nhận biết và được phân tích thêm.

Fig. 2: Sàng lọc chất nổi bề mặt từ dòng tế bào B được làm bất tử bằng CPE và PRNT về hoạt tính trung hòa Dengue. (A) các tế bào BHK-21 được gây nhiễm bằng DV với sự có mặt của chất nổi bề mặt có nguồn gốc từ dòng tế bào B được làm bất tử bằng EBV. (2000 dòng tế bào cho mỗi bệnh nhân được sàng lọc bằng cách sử dụng phương pháp này). Tác dụng gây bệnh tế bào được đánh giá bằng cách nhuộm tế bào nguyên vẹn còn lại bằng chất rửa giải tím tinh thể với axit axetic và xác định độ hấp thụ ở bước sóng 595nm. Điểm kết thúc thử nghiệm được xác định là 50% tác dụng gây bệnh tế bào và nồng độ virus được tối ưu hóa. Chất nổi bề mặt thử nghiệm được sàng

lọc ban đầu ở độ pha loãng 1:4. 10% các dòng cao nhất được thử nghiệm lại bằng PRNT. (B) Tạo ra dòng tế bào lympho bào B ở người tiết kháng thể trung hòa ở người kháng Dengue. Các tế bào BHK ở mức hợp dòng 80% được gây nhiễm virus Dengue trong 3 ngày. Các mảng virus được quan sát bằng mắt bằng cách sử dụng thuốc nhuộm tím tinh thể (Sigma- Aldrich, Singapo) mà gắn kết với các tế bào còn sống. Chất nổi bề mặt từ các dòng tế bào B (có nguồn gốc từ cá thể nhiễm bệnh Dengue 1 đang hồi phục) được thử nghiệm về hoạt tính trung hòa. Dengue 1 (50 pfu) được ủ với chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào (được pha loãng $\frac{1}{4}$) trong 1 giờ trước khi bổ sung vào tế bào BHK. Dòng tế bào 14c10 được phát hiện là tiết kháng thể mà làm giảm đáng kể số lượng mảng.

Fig. 3: Các khuôn kháng thể được biểu hiện bởi dòng tế bào B 14C10 và trình tự axit amin CDR kết hợp. (A) Bản đồ plasmit thể hiện các vị trí enzym giới hạn và tách dòng các đột biến chèn chuỗi nặng và chuỗi nhẹ để tạo ra kháng thể IgG1 ở người tái tổ hợp bằng cách sử dụng các khuôn được xác định từ 14c10. (B) Tất cả trình tự chuỗi nặng (SEQ ID NO 13-24, tương ứng, theo thứ tự xuất hiện) và chuỗi nhẹ (SEQ ID NO 1-12, tương ứng, theo thứ tự xuất hiện) được nhận biết và được tách dòng của 14c10 với các vùng CDR của nó (CDR 1, CDR 2 và CDR 3 tương ứng) cộng với 12 sự hoán vị của tổ hợp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ để tạo ra các kháng thể tái tổ hợp khác nhau.

Fig. 4: Khuôn kháng thể 14c10.8 mã hóa kháng thể tái tổ hợp có hoạt tính gắn kết đối với Dengue typ huyết thanh 1. (A) ELISA dạng bánh kẹp được sử dụng để thử nghiệm tất cả kháng thể được biểu hiện tái tổ hợp có nguồn gốc từ dòng tế bào B 14c10 được biểu hiện và được tinh chế từ chất nổi bề mặt của 293F. Khuôn số 8 rõ ràng tạo ra tín hiệu dương tính đối với typ huyết thanh 1 của virus Dengue. (B) Trình tự nucleotit và axit amin đầy đủ của các chuỗi nặng (SEQ ID NO 25 và 17, tương ứng) và các chuỗi nhẹ (SEQ ID NO 26 và 27, tương ứng) 14c10.8 với các vùng CDR được đánh dấu.

Fig. 5: Tính đặc hiệu typ huyết thanh của kháng thể 14c10.8 tái tổ hợp với PRNT và ELISA. (A) ELISA dạng bánh kẹp thể hiện tính đặc hiệu của kháng thể 14c10 IgG1 tái tổ hợp kháng typ huyết thanh 1 của virus Dengue sống nguyên vẹn. Không quan sát thấy hoạt tính gắn kết đối với Dengue typ huyết thanh 2, 3 hoặc 4. (B)

Số liệu PRNT thể hiện tính đặc hiệu của kháng thể 14c10.8 tái tổ hợp kháng typ huyết thanh 1 của virus Dengue Westpac 74. Không phát hiện được hoạt tính trung hòa đáng kể đối với Dengue typ huyết thanh 2, 3 hoặc 4. (C) Số liệu thô của PRNT thể hiện tính đặc hiệu typ huyết thanh của 14c10.8 đối với typ huyết thanh 1 của virus Dengue.

Fig. 6: 14c10.8 biểu hiện tác dụng tăng cường phụ thuộc kháng thể cùng loại (ADE) nhưng không biểu hiện tác dụng tăng cường phụ thuộc kháng thể khác loại đối với bệnh nhiễm Dengue *in vitro*. Kháng thể 14c10.8 được pha loãng từng bậc được ủ với thể tích tương đương của virus (MOI bằng 1) trong 1 giờ ở 37°C sau đó được truyền sang dòng tế bào tủy đơn bào người K562 (dòng tế bào này thường được sử dụng cho thử nghiệm ADE) và được ủ ở 37°C trong 4 ngày. Chất nổi bề mặt sau đó được thu hoạch từ các tế bào K562 đã được gây nhiễm và hiệu giá virus thu được được đánh giá bằng PRNT. ADE được định nghĩa là hiệu giá virus tăng so với đối chứng trong đó không bổ sung kháng thể (đường chấm chấm màu xanh). Các số liệu đã chứng tỏ sự có mặt của ADE trong typ huyết thanh 1 của virus Dengue, nhưng không có trong typ huyết thanh 2, 3 và 4. Quan sát này đã gợi ý rằng 14c10.8 có thể là kháng thể an toàn để sử dụng cho các bệnh nhân bị nhiễm Dengue 1 miễn là nó được sử dụng ở nồng độ trung hòa mà không phải là nồng độ tăng cường.

Fig. 7: Sự chuyển hóa 14c10.8 thành các phân nhóm IgG người khác nhau có ảnh hưởng đến hoạt tính tăng cường cùng loại của nó. Các tác giả sáng chế chuyển hóa 14c10 từ IgG1 ở người thành IgG3 ở người và IgG4 ở người bằng cách sử dụng các cấu trúc đã được trình bày. Các cấu trúc này được biểu hiện dưới dạng kháng thể tái tổ hợp trong các tế bào 293F sau đó được tinh chế trên các cột Protein-A sepharosa để thử nghiệm thêm. Các tác giả sáng chế tiến hành thử nghiệm tác dụng tăng cường cùng loại bằng cách sử dụng dòng tế bào K562 như được mô tả trong Fig 6. IgG3 biểu hiện hoạt tính tăng cường tối đa trong khi IgG1 ở mức giữa và IgG4 có mức hoạt tính tăng cường thấp nhất.

Fig. 8: 14c10.8 đặc hiệu với protein E của virus Dengue. (i) Các tế bào được gây nhiễm DV trong hai ngày. Sau đó, các tế bào được dung giải và S³² metionin được bổ sung vào hỗn hợp chứa virus để kết hợp hợp chất có hoạt tính phóng xạ. Kháng thể được bổ sung vào hỗn hợp sau đó bổ sung các hạt protein A-agarosa sau đó được bổ sung vào và được ủ trong 1 giờ ở 4°C. Sau khi rửa, protein được rửa giải với chất đệm

nap không khử và được chạy trên gel SDS–polyacrylamit 15% sau đó nhuộm bạc theo hướng dẫn của nhà sản xuất (bộ kit nhuộm màu SilverQuest, Invitrogen). Dải 56Kd tương ứng với protein E của virus Dengue. (ii) Virus Dengue nguyên vẹn đã tinh chế (được làm biến tính và không biến tính) được nạp trên gel không biến tính và được chuyển sang màng được thấm tách bằng kháng thể 14C10. Các kết quả đã thể hiện rằng 14C10 có sự gắn kết yếu với epitop mạch thẳng trên protein E Dengue.

Fig. 9: Hoạt tính trung hòa của kháng thể 14c10 tái tổ hợp kháng các kiểu gen Dengue typ huyết thanh 1 khác nhau. Các nồng độ tăng dần của kháng thể được bổ sung vào 50 đơn vị tạo mảng (p.f.u.) thuộc các kiểu gen khác nhau của typ huyết thanh 1 của virus Dengue (tên kiểu gen của virus được cung cấp trong ngoặc) và được ủ ở 37°C trong 1 giờ. 100µl hỗn hợp được bổ sung vào lớp đơn của các tế bào BHK-21 trong đĩa 24 giếng và được ủ trong 1 giờ ở 37°C. Chất nổi bề mặt được lấy ra và 1ml carboxyl methyl xenluloza 2% (khối lượng/thể tích) trong RPMI cộng FBS 2% được tạo lớp trên các tế bào bị nhiễm. Sau khi ủ thêm ở 37°C trong 4 ngày, các giếng được nhuộm bằng tím tinh thể 0,5% (khối lượng/thể tích) được hòa tan trong formaldehyt 25% (thể tích/thể tích) để quan sát các mảng. Fig. 9 thể hiện SEQ ID NO 28-32, tương ứng, theo thứ tự xuất hiện.

Fig. 10: 14c10 biểu hiện cả hoạt tính phòng bệnh và điều trị *in vivo*: (A) Hoạt tính phòng bệnh của 14c10.8 được quan sát bằng cách tiêm chuột AG129 (n=6) bằng các nồng độ kháng thể khác nhau 24 giờ trước khi gây nhiễm bằng Dengue typ huyết thanh 1. Liệu điều trị duy nhất bằng 250µg/chuột của kháng thể được sử dụng cho một nhóm duy nhất (n=6) 24 giờ sau khi nhiễm virus Dengue. Virus huyết thu được được định lượng trong huyết thanh máu của chuột bị nhiễm bởi PRNT 4 ngày sau khi nhiễm. (B) 14c10.8 biểu hiện hoạt tính phòng bệnh ở các nồng độ bằng 1-5µg/chuột. Ở nồng độ kháng thể thấp hơn, có một số bằng chứng về bệnh nhiễm virus bị gia tăng.

Fig. 11: HM14c10 là kháng thể ở người đặc hiệu với DENV1. (A) HM14c10 biểu hiện hoạt tính trung hòa đặc hiệu với DENV1 với các giá trị PRNT 50% và 90% lần lượt bằng 0,328µg/ml và 1,313µg/ml. (B) HM14c10 cảm ứng ADE cùng loại với DENV1 ở nồng độ dưới mức trung hòa nhưng không cảm ứng ADE khác loại với DENV2, DENV3 hoặc DENV4. HM4G2 cảm ứng hoạt tính ADE với cả 4 typ huyết thanh (C) (a) Mảnh hoặc đột biến Fab (N297Q) của vùng Fc IgG1 của HM14c10 làm

giảm đáng kể ADE cùng loại. (b) các phân nhóm khác nhau của IgG ở người (HM14c10) gây ra các mức ADE cùng loại khác nhau. (D) HM14c10 trung hòa cao với nhiều kiểu gen DENV1 so với HM4G2. Các kiểu gen được thể hiện trong dấu ngoặc đơn bên cạnh ký hiệu virus. Thanh sai số thể hiện độ lệch chuẩn của các mẫu bộ ba, và các thử nghiệm được tiến hành ít nhất ba lần.

Fig. 12: HM14c10 gắn kết epitop phụ thuộc cấu trúc bậc bốn của virus. (A) bản đồ CryoEM của phức hợp Fab 14c10:DENV1 thể hiện 120 Fab (màu xanh) gắn kết với 180 protein E trên bề mặt của virus (màu lục lam). Hình tam giác màu đen thể hiện đơn vị bất đối xứng. (B) Hình ảnh mật độ liên kết của Fab HM14c10(I) với epitop protein E (hình cầu màu tím). Protein E E-DI, E-DII và E-DIII được tô màu đỏ, vàng và màu xanh, tương ứng. (C) Mật độ của phân tử Fab trên các chuỗi C α protein E trong hai đơn vị bất đối xứng. Fab HM14c10(I) và HM14c10(II) là hai phân tử độc lập trong đơn vị bất đối xứng. (D) Epitop của Fab HM14c10(I) (hình cầu màu tím) và HM14c10(II) (hình cầu màu lục lam) trên ba protein E (bóng mờ màu ghi) trong đơn vị bất đối xứng.

Fig. 13: HM14c10 phong bế sự gắn DENV1 vào các tế bào BHK và biểu hiện hoạt tính bảo vệ mạnh *in vivo*. (A) Kính hiển vi đồng tiêu đo thời gian hoạt động của tế bào chứng tỏ sự nhiễm DENV1 của các tế bào chủ BHK khi có mặt (a) đối chứng isotyp mAb, (b) HM4G2 và (c) HM14c10 mAb. Bảng bên trái: DENV1 và Mab được đánh dấu bằng Alexafluor-647 (màu đỏ) và Alexafluor-488 (màu xanh), tương ứng. Bảng bên phải thể hiện ranh giới tế bào (các đường chấm trắng) và sự phân bố của DENV1 trong các tế bào. (B) Hình ảnh cận cảnh các sự kiện gây nhiễm virus sống. DENV1 được quan sát bên trong các tế bào BHK từ 18 phút trong các đối chứng isotyp và từ phút 28 với phức hợp HM4G2. Phức hợp HM14c10:DENV1 không thể gắn vào với các tế bào BHK. (C) Cường độ phát huỳnh quang màu đỏ bên trong của 120 tế bào được lựa chọn ngẫu nhiên được định lượng như là phép đo sự nhập nội virus trong 1 giờ. ANOVA 1 chiều được sử dụng để so sánh 3 nhóm. $^{**}p<0,0001$. (D) HM14c10 được thử nghiệm để dùng làm chất phòng bệnh và điều trị; kháng thể được sử dụng cho chuột AG129 bị nhiễm DENV1 ở ngày 0 và ngày 2 sau khi nhiễm, tương ứng. HM14c10 thể hiện đáp ứng bảo vệ dù virus được tiêm (a) dưới da hay (b) trong màng bụng. Mức virus huyết trong máu được thử nghiệm lần lượt ở ngày 3 hoặc 4 sau

khi gây nhiễm bởi thử nghiệm mảng. $N=5$ trong cả hai mẫu và thử nghiệm T được sử dụng để so sánh các tập hợp mẫu, $** p<0,0001$, $* p<0,05$ so với các đối chứng PBS.

Fig. 14: Nhận biết và biểu hiện tái tổ hợp kháng thể hoàn toàn của người có hoạt tính trung hòa đối với virus Dengue. (A) (a) 2000 dòng tế bào B-EBV được tạo ra từ bệnh nhân bị nhiễm DENV1 và chất nổi bề mặt được sàng lọc bằng ELISA đối với hoạt tính gắn kết với DENV1 nhưng không gắn kết với DENV2, 3 hoặc 4. Bảy dòng tế bào dương tính BCL-EBV được nhận biết. (b) Thử nghiệm trung hòa giảm mảng (PRNT) được tiến hành để thử nghiệm hoạt tính trung hòa. Số liệu được thể hiện bằng PRNT100 (tức là trung hòa hoàn toàn) ở hệ số pha loãng cao nhất và là giá trị trung bình từ 3 thử nghiệm. (B) (a) Sơ đồ của vector pTT5 được sử dụng để biểu hiện các khuôn chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể có nguồn gốc từ EBV-BCL trong các tế bào HEK293. (b) 12 mAb IgG1 ở người tái tổ hợp được tách dòng và được biểu hiện từ dòng tế bào EBV-BCL 14c10 và được thử nghiệm về hoạt tính gắn kết với DENV1 bằng ELISA. Kháng thể 4G2 đơn dòng của chuột được làm tương thích với người (HM4G2) được sử dụng để làm đối chứng dương. Khuôn kháng thể tái tổ hợp số 8 (được gọi là HM14c10) biểu hiện hoạt tính gắn kết với DENV1. (C) (a) Hoạt tính PRNT của HM14c10 trên DENV1, 2, 3 và 4. (b) HM14c10 được thử nghiệm hoạt tính gắn kết với DENV1, 2, 3 và 4 bởi ELISA. Các số liệu này thể hiện giá trị trung bình của 3 thử nghiệm và thanh sai số bằng độ lệch chuẩn từ giá trị trung bình của bộ ba mẫu.

Fig. 15: HM14c10 biểu hiện hoạt tính gắn kết với nhiều thể phân lập lâm sàng DENV1. Hoạt tính gắn kết HM14c10 đối với vài thể phân lập DENV1 được so sánh với kháng thể đơn dòng HM4G2 của chuột được làm tương thích với người ở các nồng độ khác nhau bằng cách sử dụng quy trình ELISA đã công bố. Tất cả các thể phân lập DENV1 được sử dụng ở nồng độ 1×10^6 pfu/ml và được phủ qua đêm ở 4°C bằng HB112 được sử dụng làm chất bắt giữ. Kháng thể HM14c10 hoặc HM4G2 được bổ sung ở nồng độ $5 \mu\text{g/ml}$ và các thể liên hợp HRP kháng IgG ở người được sử dụng để phát hiện hoạt tính gắn kết.

Fig. 16: Khớp cấu trúc tinh thể sau dung hợp của protein E DENV1 vào bản đồ cryoEM của Fab HM14c10 được tạo phức với virus Dengue 1. (A) hình ảnh nhìn từ phía trên của protein E Dengue 1 đã khớp. Bản đồ cryoEM được biểu hiện ở mức

đường đồng mức cao bằng 5,5 σ do đó đường bao rõ ràng của mật độ protein E có thể được quan sát thấy. Ở mức đường đồng mức này, mật độ Fab không biểu hiện, cho thấy rằng không phải tất cả epitop protein E sẵn có được sử dụng bởi phân tử Fab trên bề mặt virus. Mật độ electron trên bề mặt virus được giải thích bằng cách khớp vào cấu trúc tinh thể của cấu trúc sau dung hợp của protein E DENV1 (18). Do cấu trúc tinh thể của protein E sau dung hợp DENV1 không khớp vào bản đồ cryoEM dưới dạng thể rắn, ba miền của protein E phải được khớp một cách riêng biệt. Các miền I, II và III của protein E được tô màu đỏ, vàng và màu xanh, tương ứng. Protein E từ hai đơn vị bất đối xứng được thể hiện ở đây với một đơn vị bất đối xứng được thể hiện bằng hình tam giác. (B) Hình ảnh mặt bên của protein E đã khớp trên bề mặt của DENV1. Các mật độ của phân tử Fab, miền ngoài protein E và chuỗi xoắn xuyên màng (Tm) có thể được quan sát thấy. Mật độ tương ứng với glycan ở vị trí Asn159 trên hai protein E liền kề được đánh dấu bằng đầu mũi tên và vị trí của tờ chú giải bên ngoài và bên trong của lớp kép lipid được thể hiện. Bản đồ cryoEM được thể hiện ở đường đồng mức 2,5 σ .

Fig. 17: Biểu đồ lập thể của Fab HM14c10 và bề mặt chung gắn kết protein E. Mật độ Fab HM14c10(II) thể hiện sự liên kết rõ ràng với protein E trên bề mặt virus. Các góc tiếp xúc được thể hiện bằng hình cầu. Mật độ CryoEM được thể hiện ở mức đường đồng mức 2,5 σ .

Fig. 18: Sự chồng chất của các vùng biến đổi của mô hình tương đồng của HM14c10 (xanh lá cây) với kháng thể đơn dòng ở người tham chiếu (PDB mã 2GHW) (màu xanh lam). Hình vẽ thể hiện hình chiếu bên (A) và hình chiếu từ trên xuống (B) của các vùng biến đổi kháng thể.

Fig. 19: Khớp mô hình tương đồng của vùng biến đổi HM14c10 vào HM14c10: bản đồ mật độ cryoEM DENV1. (A) Mật độ tương ứng với các chuỗi riêng biệt (a và b) của vùng biến đổi kháng thể được khoanh tròn từ bản đồ cryoEM. Các góc tiếp xúc của protein E đã khớp được thể hiện bằng hình cầu màu xanh lục. E-DI, E-DII và E-DIII được tô màu đỏ, vàng và xanh lam, tương ứng. (B) chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mô hình tương đồng được khớp riêng vào vùng biến đổi của mật độ cryoEM Fab. ^a với ký hiệu vị trí Fab xem Fig. 12. ^b với ký hiệu mật độ Fab xem (A). ^c Sự khớp của mô hình tương đồng vào bản đồ cryoEM HM14c10:DENV1 (thiết lập ở đường đồng mức bằng

3σ) được tối ưu hóa bằng cách sử dụng chức năng khớp trong bản đồ ở thể khảm (35). (C) Mô hình tương đồng vùng biến đổi HM14c10 đã khớp (xanh lá cây) thể hiện CDR ở màu đỏ tươi. Sự khớp được thể hiện có chuỗi nhẹ trong mật độ Fab a, và chuỗi nặng trong mật độ Fab b.

Fig. 20: Epitop HM14c10 trên Dengue typ huyết thanh 1 (kiểu gen PVP159) và sự so sánh epitop này với (A) các kiểu gen DENV1 khác (SEQ ID NO 33-38, tương ứng, theo thứ tự xuất hiện) và (B) typ huyết thanh Dengue và virus West Nile (WNV) (SEQ ID NO 34 và 39-42, tương ứng, theo thứ tự xuất hiện). Các gốc axit amin thông thường giữa các epitop được nhận biết bởi Fab HM14c10(I) và Fab HM14c10(II) trong đơn vị bất đối xứng được tô màu xanh lá cây. Các gốc được nhận biết duy nhất bởi Fab HM14c10(I) hoặc Fab HM14c10(II) được tô màu tím và màu lục, tương ứng. Trình tự axit amin của epitop được nhận biết bởi Fab HM14c10 được bảo toàn trong các kiểu gen DENV1, nhưng không phản ứng chéo với các typ huyết thanh Dengue hoặc virus West Nile. Điều này phù hợp với sự quan sát thấy rằng Fab HM14c10 gắn kết với hầu hết các kiểu gen Dengue 1, nhưng không phản ứng chéo với các typ huyết thanh Dengue khác hoặc flavivirus có dấu ấn kháng thể mờ (a) ở vị trí X1 và II hoặc (b) vị trí X2 và I.

Fig. 21: Khả năng gây nhiễm và hiệu quả *in vivo* của DENV1 được đánh dấu. (A) Việc đánh dấu DENV sống được tiến hành như được mô tả ở trên (22). Khả năng gây nhiễm và khả năng sống sót của virus được đánh dấu được thử nghiệm bằng thử nghiệm mảng qua hiệu giá trên các tế bào BHK. (B) Hiệu quả *in vivo* của HM14c10 được thử nghiệm trong hai mô hình *in vivo* sử dụng các chủng/nồng độ khác nhau của virus DENV1 cộng với các kiểu phân phối virus khác nhau. Sơ đồ của các mô hình này được thể hiện. (a) Trong mô hình 1, 1×10^6 pfu của chủng EHID1 được tiêm dưới da (S.C.) và virus huyết thanh được theo dõi bởi thử nghiệm mảng 4 ngày sau đó. Phương pháp phòng bệnh được thực hiện 24 giờ trước khi cho nhiễm DENV1 và các ứng dụng trị liệu ở ngày cộng 2 sau khi nhiễm. (b) Mô hình gây nhiễm DENV1 mạnh hơn thứ hai cũng được sử dụng. Chuột được tiêm trong màng bụng với $1,25 \times 10^7$ pfu chủng Westpac của DENV1. Việc gây nhiễm virus cộng với phương pháp phòng bệnh và điều trị được sử dụng bằng cách tiêm trong màng bụng (I.P.) tại các thời điểm giống như mô hình 1. Trong mô hình này, pic virus huyết thanh ở ngày +3 sau khi gây

nhiễm và đây là vị trí mà hiệu quả của kháng thể được sử dụng trên virus huyết huyết thanh được xác định. Các đối chứng trong cả hai nhóm được sử dụng thể tích nước muối vô trùng tương đương.

Fig. 22: So sánh epitop được liên kết bởi kháng thể CR4354 virus West Nile và Dengue 1 đặc hiệu HM14c10. (A) Sự khớp của HM CR4354 và HM 14c10 với protein E trên WNV (trái) (25) và DENV (phải), tương ứng. Mật độ CryoEM được biểu hiện ở mức đường đồng mức 2,8 σ (CR4354:WNV) hoặc 2,5 σ (HM14c10:DENV1). (B) Đơn vị bất đối xứng của WNV (trái) và DENV1 (phải) với dấu ấn kháng thể CR4354 hoặc HM14c10 được thể hiện bằng hình cầu. Epitop ở hai vị trí gắn kết độc lập trong đơn vị bất đối xứng được tô màu tím và xanh lục. Ba protein E trong đơn vị bất đối xứng được đánh bóng bằng màu xám. Sự bất đối xứng được thể hiện bằng hình tam giác màu đen. (C) So sánh các gốc trong hai epitop độc lập (a (SEQ ID NO 33 và 42, tương ứng) và b (SEQ ID NO 33 và 42, tương ứng)) giữa CR4354 (trên WNV) và HM 14c10 (trên DENV). Các gốc trên hai epitop độc lập được tô màu như trong (B).

Mô tả chi tiết sáng chế

Nói chung, sáng chế đề cập đến chế phẩm và phương pháp để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm virus Dengue ở đối tượng động vật có xương sống. Cụ thể, các tác giả sáng chế đã phân lập các tế bào CD22⁺ B từ bệnh nhân đã nhiễm bệnh Dengue được nhận vào khoa bệnh truyền nhiễm của Bệnh viện đại học quốc gia (Infectious disease division of National University Hospital-NUH). Các tế bào B này được làm bất tử thành dòng tế bào đa dòng bằng EBV *in vitro*. Yếu tố hoạt hóa tế bào B đa dòng (trình tự CpG) được bổ sung để tăng cường hiệu quả của việc làm bất tử các tế bào B cùng với yếu tố sinh trưởng tế bào B của người, Interleukin 2 và Interleukin 4 (mỗi loại 1000U/ml). Dòng tế bào B của người này được tạo ra trong đĩa đáy tròn 96 giếng. Sau hai tuần, chất nổi bề mặt từ các dòng này được sàng lọc bằng thử nghiệm hấp thu miễn dịch được liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm trung hòa giảm mảng (PRNT) và thử nghiệm tác dụng gây bệnh tế bào (CPE) để phân tích hoạt tính gắn kết/trung hòa của virus Dengue. Dòng tế bào B tạo ra kháng thể dương tính được sử dụng làm nguồn mARN để khuếch đại gen của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể. Các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được tách dòng vào vectơ pCMV nội bộ và được chuyển nhiễm vào các tế bào Freestyle[®] 293F để tạo ra các nồng độ cao của

kháng thể tái tổ hợp. Bằng cách sử dụng hệ phương pháp này, các tác giả sáng chế đã tách dòng và biểu hiện kháng thể tái tổ hợp mà đặc hiệu cao với Dengue typ huyết thanh 1 và có tính đặc hiệu rộng cho các kiểu gen Dengue typ huyết thanh 1 khác nhau. Kháng thể này không gắn kết với các virus khác trong chi Flavivirus và, do đó, biểu hiện ít hoặc không biểu hiện sự tăng cường gây nhiễm của đại thực bào với các flavivirus khác vượt mong đợi với Dengue typ huyết thanh 1. Thử nghiệm *in vivo* đã thể hiện hiệu quả phòng bệnh và điều trị vượt trội ở mô hình chuột mắc bệnh nhiễm Dengue. Do đó, kháng thể này là lựa chọn điều trị hiện có tốt nhất đối với bệnh nhiễm Dengue 1 hiện nay.

Định nghĩa

Nên hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn bởi phương pháp, chất phản ứng, hợp chất, chế phẩm hoặc hệ thống sinh học cụ thể, mà có thể, tất nhiên, thay đổi. Cũng có thể hiểu rằng các thuật ngữ được sử dụng ở đây chỉ nhằm mục đích mô tả các khía cạnh cụ thể, và không nhằm mục đích làm giới hạn. Như được sử dụng trong bản mô tả và bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít “một” bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi được quy định rõ ràng theo cách khác.

Thuật ngữ “khoảng” như được sử dụng ở đây để chỉ giá trị đo được như lượng, khoảng thời gian, và tương tự, có nghĩa là bao gồm các thay đổi $\pm 20\%$ hoặc $\pm 10\%$, tốt hơn nữa là $\pm 5\%$, còn tốt hơn nữa là $\pm 1\%$, và vẫn còn tốt hơn nữa là $\pm 0,1\%$ từ giá trị xác định, do đó các biến đổi là thích hợp để thực hiện phương pháp được mô tả.

Trừ khi được xác định khác, tất cả thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây có nghĩa tương tự như cách hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế đề cập đến. Mặc dù phương pháp và vật liệu bất kỳ tương tự và tương đương với phương pháp và vật liệu được mô tả ở đây có thể được sử dụng để thực hiện thử nghiệm sáng chế, vật liệu và phương pháp được ưu tiên được mô tả ở đây.

“Động vật có xương sống,” “động vật có vú,” “đối tượng,” “đối tượng động vật có vú,” hoặc “bệnh nhân” được sử dụng thay thế cho nhau và để chỉ động vật có vú như người bệnh và linh trưởng không phải người, cũng như động vật thử nghiệm như thỏ, chuột cống, và chuột nhắt, bò, ngựa, dê, và các động vật khác. Động vật bao gồm

động vật có xương sống, ví dụ, động vật có vú và động vật không có vú, như chuột, cừu, chó, bò, các loài gia cầm, vịt, ngỗng, lợn, gà, lưỡng cư, và bò sát.

“Điều trị” hoặc “việc điều trị” thường để chỉ (i) việc ngăn ngừa bệnh nhiễm trùng hoặc tái nhiễm trùng, ví dụ, phương pháp phòng bệnh, hoặc (ii) việc làm giảm hoặc loại trừ triệu chứng bệnh mong muốn, ví dụ, liệu pháp điều trị. Việc điều trị cho đối tượng bằng chế phẩm theo sáng chế có thể ngăn ngừa hoặc làm giảm nguy cơ nhiễm virus Dengue, cụ thể là typ huyết thanh 1. Việc điều trị có thể là phòng bệnh (để ngăn ngừa hoặc làm chậm sự khởi phát của bệnh, hoặc để ngăn ngừa sự biểu hiện của triệu chứng lâm sàng hoặc cận lâm sàng của chúng) hoặc điều trị ức chế hoặc làm dịu triệu chứng sau sự biểu hiện của bệnh.

“Ngăn ngừa” hoặc “việc ngăn ngừa” để chỉ việc sử dụng chế phẩm theo sáng chế để phòng bệnh.

“Lượng có tác dụng trị liệu” hoặc “lượng hữu hiệu để làm giảm hoặc loại bỏ bệnh nhiễm trùng” hoặc “lượng hữu hiệu” để chỉ một lượng chế phẩm kháng thể đủ để ngăn ngừa bệnh nhiễm virus Dengue hoặc để làm dịu (ví dụ, làm dịu, làm giảm, giảm bớt) ít nhất một triệu chứng liên quan đến bệnh nhiễm trùng này. Không nhất thiết là việc sử dụng chế phẩm loại bỏ các triệu chứng của bệnh nhiễm Dengue, miễn là lợi ích của việc sử dụng chế phẩm nhiều hơn tác dụng có hại. Tương tự, các thuật ngữ “điều trị” và “việc điều trị” liên quan đến bệnh nhiễm Dengue, như được sử dụng ở đây, không có nghĩa là đối tượng phải được chữa khỏi bệnh nhiễm trùng hoặc tất cả các dấu hiệu lâm sàng của chúng được loại bỏ, việc sử dụng chế phẩm chỉ cần làm dịu hoặc cải thiện tình trạng bệnh của đối tượng.

“Tính miễn dịch thụ động” thường để chỉ sự truyền tính miễn dịch dịch thể chủ động ở dạng kháng thể được tạo ra trước từ một cá thể sang cá thể khác. Vì thế, tính miễn dịch thụ động là dạng gây miễn dịch trong thời gian ngắn có thể đạt được bằng cách truyền kháng thể, mà có thể được sử dụng ở một số dạng có thể, ví dụ, như huyết thanh hoặc huyết tương máu người hoặc động vật, như globulin miễn dịch ở động vật hoặc người được tập hợp để sử dụng trong tĩnh mạch (IVIG) hoặc trong cơ (IG), như IVIG hoặc IG động vật hoặc người hiệu giá cao từ đối tượng được chủng ngừa hoặc từ động vật hiến tặng đã khỏi bệnh, và như kháng thể đơn dòng. Việc truyền thụ động có thể được sử dụng theo cách phòng bệnh để ngăn ngừa sự phát bệnh, cũng như, trong

điều trị một số loại bệnh nhiễm trùng cấp tính. Thông thường, tính miễn dịch thu được từ miễn dịch thụ động chỉ kéo dài trong khoảng thời gian ngắn, và tạo ra tác dụng bảo vệ tức thì, nhưng cơ thể không phát triển sự ghi nhớ, do đó bệnh nhân vẫn có nguy cơ nhiễm cùng mầm bệnh này sau đó.

Kháng thể

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể” để chỉ globulin miễn dịch hoặc phân tử nguyên vẹn bất kỳ cũng như mảnh của chúng gắn kết với epitop đặc hiệu. Kháng thể này bao gồm, nhưng không giới hạn ở các kháng thể đa dòng, đơn dòng, thể khảm, được làm tương thích với người, chuỗi đơn, mảnh Fab, Fab', F(ab)'² và/hoặc các phần F(v) của kháng thể nguyên vẹn và các biến thể của chúng. Tất cả isotyp được bao gồm bởi thuật ngữ này, bao gồm IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “mảnh kháng thể” chỉ cụ thể phần được phân lập của kháng thể mà vẫn giữ được chức năng gắn kết kháng nguyên của kháng thể mẹ. Ví dụ về mảnh kháng thể bao gồm mảnh Fab, Fab', F(ab')₂, và Fv; kháng thể kép; kháng thể dạng thẳng; phân tử kháng thể chuỗi đơn; và kháng thể đa đặc hiệu được tạo thành từ mảnh kháng thể.

“Kháng thể” nguyên vẹn bao gồm ít nhất hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được liên kết với nhau bằng các liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (được viết tắt ở đây là HCVR hoặc V_H) và vùng hằng định chuỗi nặng. Vùng hằng định chuỗi nặng bao gồm ba miền, CH₁, CH₂ và CH₃. Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (được viết tắt ở đây là LCVR hoặc V_L) và vùng hằng định chuỗi nhẹ. Vùng hằng định chuỗi nhẹ bao gồm một miền, C_L. Các vùng V_H và V_L có thể còn được chia nhỏ thành các vùng siêu biến, được gọi là các vùng quyết định bổ sung (CDR), nằm rải rác với các vùng được bảo tồn nhiều hơn, được gọi là vùng khung (FR). Mỗi V_H và V_L bao gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxyl theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng biến đổi của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ chứa miền gắn kết tương tác với kháng nguyên. Vùng hằng định của kháng thể có thể gây ra việc gắn kết của globulin miễn dịch với mô hoặc các yếu tố vật chủ, bao gồm các tế bào khác nhau của hệ miễn dịch (ví dụ, các tế bào hiệu ứng) và thành phần thứ nhất (Clq) của hệ thống bổ thể thông thường. Thuật ngữ kháng thể bao gồm các phần gắn kết kháng nguyên của

kháng thể nguyên vẹn mà giữ được khả năng gắn kết. Ví dụ về gắn kết bao gồm (i) mảnh Fab, mảnh hóa trị một bao gồm các miền V_L , V_H , C_L và $CH1$; (ii) mảnh $F(ab')_2$, mảnh hóa trị hai bao gồm hai mảnh Fab được liên kết bởi cầu nối disulfua ở vùng khớp nối; (iii) mảnh Fd bao gồm các miền VH và $CH1$; (iv) mảnh Fv bao gồm các miền V_L và V_H của một nhánh của kháng thể, (v) mảnh dAb (Ward *et al.*, Nature, 341:544-546 (1989)), mà bao gồm miền VH ; và (vi) vùng quyết định bổ cứu được phân lập (CDR).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể chuỗi đơn” hoặc “Fv chuỗi đơn (scFv)” để chỉ phân tử dung hợp kháng thể gồm hai miền của mảnh Fv, V_L và V_H . Mặc dù hai miền của mảnh Fv, V_L và V_H , được mã hóa bằng các gen riêng rẽ, chúng có thể được nối, bằng cách sử dụng phương pháp tái tổ hợp, bằng cầu nối tổng hợp mà cho phép chúng có thể được tạo ra dưới dạng chuỗi protein đơn trong đó các vùng V_L và V_H bắt cặp để tạo thành phân tử hóa trị một (được biết là Fv chuỗi đơn (scFv); xem, ví dụ Bird *et al.*, Science, 242:423-426 (1988); và Huston *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879-5883 (1988)). Kháng thể chuỗi đơn này được bao gồm bằng cách tham khảo thuật ngữ mảnh “kháng thể” và có thể được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp hoặc phân cắt bằng enzym hoặc hóa học kháng thể nguyên vẹn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể trình tự người” bao gồm kháng thể có các vùng hằng định và vùng biến đổi (nếu có) có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm ở người. Kháng thể trình tự người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi trình tự globulin miễn dịch dòng mầm ở người (ví dụ đột biến được đưa vào bằng kỹ thuật gây đột biến đặc hiệu vị trí hoặc ngẫu nhiên *in vitro* hoặc bằng kỹ thuật gây đột biến soma *in vivo*). Kháng thể này có thể được tạo ra ở động vật chuyển gen không phải người, ví dụ, như được mô tả trong công bố đơn PCT số WO 01/14424 và WO 00/37504. Tuy nhiên, thuật ngữ “kháng thể trình tự người”, như được sử dụng ở đây, không dự định để bao gồm kháng thể trong đó các trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của loài động vật có vú khác, như chuột, được ghép vào trình tự khung ở người (ví dụ, kháng thể được làm tương thích với người).

Tương tự, globulin miễn dịch tái tổ hợp có thể được tạo ra. Xem, Cabilly, patent Mỹ số 4,816,567, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn và cho tất cả các mục đích; và

Queen *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 86:10029-10033 (1989).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” để chỉ chế phẩm gồm các phân tử kháng thể của một thành phần phân tử duy nhất. Thành phần kháng thể đơn dòng biểu hiện tính đặc hiệu gắn kết đơn và ái lực với một epitop cụ thể. Do đó, thuật ngữ “kháng thể đơn dòng ở người” để chỉ kháng thể biểu hiện tính đặc hiệu gắn kết đơn có các vùng hằng định và vùng biến đổi (nếu có) có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm ở người. Theo một khía cạnh, kháng thể đơn dòng ở người được sản sinh bởi thể lai bao gồm tế bào B thu được từ động vật chuyển gen không phải người, ví dụ, chuột chuyển gen, có bộ gen chứa gen chuyển chuỗi nặng và gen chuyển chuỗi nhẹ ở người được dung hợp với tế bào được làm bất tử.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng nguyên” để chỉ chất mà gây ra sự sản sinh kháng thể và có thể gây đáp ứng miễn dịch. Nó có thể được sử dụng thay thế cho nhau trong sáng chế với thuật ngữ “chất sinh miễn dịch”. Trong ngữ cảnh nghiêm ngặt, chất sinh miễn dịch là chất gây ra đáp ứng từ hệ miễn dịch, trong khi đó kháng nguyên được định nghĩa là chất gắn kết với kháng thể đặc hiệu. Kháng nguyên hoặc mảnh của chúng có thể là phân tử (tức là, epitop) mà tiếp xúc với kháng thể cụ thể. Khi protein hoặc mảnh protein được sử dụng để gây miễn dịch động vật chủ, nhiều vùng của protein này có thể cảm ứng việc sản xuất kháng thể (tức là, gây ra đáp ứng miễn dịch), mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên (các vùng đã cho hoặc cấu trúc ba chiều trên protein này).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể được làm tương thích với người,” để chỉ ít nhất một phân tử kháng thể trong đó trình tự axit amin trong các vùng không gắn kết kháng nguyên và/hoặc các vùng gắn kết kháng nguyên được biến đổi sao cho kháng thể giống với kháng thể ở người nhiều hơn, và vẫn giữ được khả năng gắn kết ban đầu của nó.

Ngoài ra, kỹ thuật được phát triển để sản xuất “kháng thể khảm” (Morrison, *et al.*, Proc Natl Acad Sci, 81:6851-6855 (1984), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) bằng cách cắt nối gen từ phân tử kháng thể ở chuột có tính đặc hiệu kháng nguyên thích hợp cùng với gen từ phân tử kháng thể ở người có hoạt tính sinh học thích hợp có thể được sử dụng. Ví dụ, gen từ phân tử kháng thể ở chuột đặc hiệu với chất tự cảm ứng có thể được cắt nối cùng với gen từ phân tử kháng thể ở người có hoạt tính sinh

học thích hợp. Kháng thể khảm là phân tử trong đó các phần khác nhau có nguồn gốc từ các loài động vật khác nhau, như phân tử có vùng biến đổi có nguồn gốc từ mAb chuột và vùng hằng định globulin miễn dịch người.

Ngoài ra, kỹ thuật đã được phát triển để tạo ra kháng thể được làm tương thích với người (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,585,089 và patent Mỹ số 5,225,539, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ). Vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch bao gồm “vùng khung” bị gián đoạn bởi ba vùng siêu biến, được gọi là các vùng quyết định bổ cứu (CDR). Tóm lại, kháng thể được làm tương thích với người là phân tử kháng thể từ các loài không phải người có một hoặc nhiều CDR từ loài không phải người và vùng khung từ phân tử globulin miễn dịch ở người.

Theo cách khác, kỹ thuật được mô tả để tạo ra kháng thể chuỗi đơn có thể được làm phù hợp để tạo ra kháng thể chuỗi đơn kháng lại thể liên hợp gây miễn dịch của sáng chế. Kháng thể chuỗi đơn được tạo ra bằng cách liên kết mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của vùng Fv thông qua cầu nối axit amin, tạo ra polypeptit chuỗi đơn. Các phần Fab và F(ab')₂ của phân tử kháng thể có thể được tạo ra bằng phản ứng phân giải protein của papain và pepsin, tương ứng, trên phân tử kháng thể hầu như nguyên vẹn bằng phương pháp đã biết. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,342,566. Các phần phân tử kháng thể Fab' cũng được biết rộng rãi và được sản xuất từ các phần F(ab')₂ sau đó khử các liên kết disulfua mà liên kết hai phần chuỗi nặng bằng mercaptoetanol, sau đó alkyl hóa protein mercaptan thu được bằng chất phản ứng như iotaxetamit.

Thử nghiệm kháng thể

Nhiều thử nghiệm sàng lọc đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để thử nghiệm kháng thể cần quan tâm để xác nhận tính đặc hiệu và ái lực của chúng và để xác định các kháng thể đó có phản ứng chéo với các protein khác hay không.

Thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu” hoặc “gắn kết một cách đặc hiệu” để chỉ sự tương tác giữa kháng nguyên và kháng thể tương ứng của nó. Sự tương tác này phụ thuộc vào sự có mặt của cấu trúc cụ thể của protein được nhận biết bởi phân tử gắn kết (tức là, kháng nguyên hoặc epitop). Để việc gắn kết là đặc hiệu, nó nên bao gồm sự gắn kết kháng thể của (các) epitop cần quan tâm và không phải các kháng nguyên nền.

Khi kháng thể được tạo ra, chúng được thử nghiệm để xác nhận rằng chúng đặc hiệu với kháng nguyên cần quan tâm và để xác định chúng có biểu hiện khả năng phản ứng chéo với các kháng nguyên khác hay không. Một phương pháp tiến hành thử nghiệm này là thử nghiệm sàng lọc huyết thanh như được mô tả trong công bố đơn sáng chế Mỹ số 2004/0126829, nội dung của nó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Tuy nhiên, các phương pháp thử nghiệm khác để kiểm soát định lượng cũng được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và do đó cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Kháng thể, hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, các biến thể hoặc dẫn xuất của chúng theo sáng chế cũng có thể được mô tả hoặc được xác định về ái lực gắn kết của chúng với kháng nguyên. Ái lực của kháng thể với kháng nguyên có thể được xác định qua thực nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ. (xem, ví dụ, Berzofsky *et al.*, "Antibody-Antigen Interaction", In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman và Company: New York, N.Y. (1992); và phương pháp được mô tả ở đây). Ái lực đo được của sự tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể có thể thay đổi nếu được đo trong các điều kiện khác nhau (ví dụ, nồng độ muối, độ pH). Vì thế, phép đo ái lực và các thông số gắn kết kháng nguyên khác (ví dụ, K_D , K_a , K_d) tốt hơn được thực hiện bằng dung dịch kháng thể và kháng nguyên được chuẩn hóa, và chất đệm được chuẩn hóa.

Hằng số gắn kết ái lực (K_{aff}) có thể được xác định bằng cách sử dụng công thức sau đây:

$$K_{aff} = \frac{(n-1)}{2(n[mAb']_i - [mAb]_i)}$$

trong đó:

$$n = \frac{[mAg]_i}{[mAg']_i}$$

$[mAb]$ là nồng độ của vị trí không gắn kết kháng nguyên, và $[mAg]$ là nồng độ của vị trí không gắn kết kháng thể đơn dòng tự do khi được xác định ở hai nồng độ kháng nguyên khác nhau (tức là, $[mAg]_i$ và $[mAg']_i$) (Beatty *et al.*, J Imm Meth, 100:173-179 (1987)).

Thuật ngữ “ái lực cao” đối với kháng thể đề chỉ hằng số liên kết cân bằng (K_{aff}) ít nhất khoảng 1×10^7 l/mol, hoặc ít nhất bằng khoảng 1×10^8 l/mol, hoặc ít nhất khoảng 1×10^9 l/mol, hoặc ít nhất khoảng 1×10^{10} l/mol, hoặc ít nhất khoảng 1×10^{11} l/mol, hoặc ít nhất khoảng 1×10^{12} l/mol, hoặc ít nhất khoảng 1×10^{13} l/mol, hoặc ít nhất khoảng 1×10^{14} l/mol hoặc lớn hơn. Sự gắn kết “ái lực cao” có thể khác nhau đối với các isotyp kháng thể. K_D , hằng số phân ly cân bằng, là thuật ngữ mà cũng được sử dụng để mô tả ái lực kháng thể và là nghịch đảo của K_{aff} .

K_D , hằng số phân ly cân bằng, là thuật ngữ mà cũng được sử dụng để mô tả ái lực kháng thể và là nghịch đảo của K_{aff} . Nếu K_D được sử dụng, thuật ngữ “ái lực cao” đối với kháng thể đề chỉ hằng số phân ly cân bằng (K_D) nhỏ hơn khoảng 1×10^{-7} mol/l, hoặc nhỏ hơn khoảng 1×10^{-8} mol/l, hoặc nhỏ hơn khoảng 1×10^{-9} mol/l, hoặc nhỏ hơn khoảng 1×10^{-10} mol/l, hoặc nhỏ hơn khoảng 1×10^{-11} mol/l, hoặc nhỏ hơn khoảng 1×10^{-12} mol/l, hoặc nhỏ hơn khoảng 1×10^{-13} mol/l, hoặc nhỏ hơn khoảng 1×10^{-14} mol/l hoặc nhỏ hơn.

Phương pháp sản sinh kháng thể theo sáng chế tạo ra kháng thể có các đặc điểm của các kháng thể được sản sinh ra trong quá trình đáp ứng miễn dịch sinh lý của người, tức là tính đặc hiệu kháng thể chỉ có thể được chọn lọc bởi hệ miễn dịch của người. Trong trường hợp này, nó bao gồm đáp ứng với virus Dengue gây bệnh cho người, typ huyết thanh 1. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có đặc điểm của kháng thể được tạo ra trong quá trình đáp ứng với sự nhiễm virus Dengue. Các kháng thể này có thể được sử dụng làm chất phòng bệnh hoặc điều trị ở dạng bào chế thích hợp.

Liên quan đến yếu tố gây bệnh cụ thể, “kháng thể trung hòa”, “kháng thể trung hòa phổ rộng”, hoặc “kháng thể đơn dòng trung hòa”, tất cả chúng đều được sử dụng thay thế cho nhau ở đây, là kháng thể có thể trung hòa khả năng của yếu tố gây bệnh gây ra và/hoặc duy trì bệnh nhiễm trùng ở vật chủ. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng được sản xuất theo sáng chế có hoạt tính trung hòa, mà kháng thể có thể trung hòa ở nồng độ bằng $10^{-9}M$ hoặc nhỏ hơn (ví dụ, $10^{-10}M$, $10^{-11}M$, $10^{-12}M$ hoặc nhỏ hơn).

Phân tử globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là typ (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA và IgY), nhóm (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2), hoặc phân

nhóm bất kỳ của phân tử globulin miễn dịch. Theo một số phương án, kháng thể là mảnh kháng thể gắn kết kháng nguyên (ví dụ, người) và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Fab, Fab' và $F(ab')_2$, Fd, Fvs chuỗi đơn (scFv), kháng thể chuỗi đơn, Fvs được liên kết disulfua (sdFv) và mảnh bao gồm miền V_L hoặc V_H . Mảnh kháng thể gắn kết kháng nguyên, bao gồm kháng thể chuỗi đơn, có thể chỉ bao gồm (các) vùng biến đổi hoặc kết hợp với toàn bộ hoặc một phần sau đây: vùng khớp nối, các miền CH1, CH2, và CH3. Sáng chế cũng bao gồm mảnh gắn kết kháng nguyên bao gồm sự kết hợp bất kỳ của (các) vùng biến đổi với vùng khớp nối, các miền CH1, CH2, và CH3.

Phân lập tế bào B

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tế bào B”, “tế bào nhớ B”, “lympho bào B”, “lympho bào ghi nhớ B”, “các tế bào nhớ”, “tế bào B nhớ”, và các biến thể của chúng được sử dụng thay thế cho nhau và để chỉ các tế bào B của đáp ứng miễn dịch dịch thể. Như được hiểu trong lĩnh vực kỹ thuật này, các tế bào B là các lympho bào đóng vai trò trong đáp ứng miễn dịch dịch thể (ngược với đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào, được điều khiển bởi các tế bào T). Ít nhất một chức năng của các tế bào B là để tạo ra các kháng thể kháng kháng nguyên, thực hiện vai trò của các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) và sau cùng phát triển thành các tế bào B nhớ sau khi hoạt hóa bằng cách tương tác kháng nguyên. Các tế bào B là một thành phần của hệ miễn dịch thích nghi.

Cụm từ “tế bào B sơ cấp” có thể chỉ, theo một số phương án, tế bào B được lấy trực tiếp từ sinh vật sống (ví dụ, người). Theo một số phương án, tế bào B sơ cấp có thể được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy tế bào sơ cấp. Tế bào B sơ cấp có thể có nguồn gốc, có thể thu được hoặc thu gom từ đối tượng theo cách bất kỳ đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, tế bào B sơ cấp được thu từ đối tượng bị nhiễm hoặc có kháng nguyên cần quan tâm.

Phương pháp theo sáng chế có thể được áp dụng để nhận biết kháng thể đơn dòng được biểu hiện bởi các tế bào B ở người được chọn từ người hiến tặng, như bệnh nhân phơi nhiễm với chất gây nhiễm, ví dụ, virus Dengue. Vì thế, người hiến tặng có thể là chưa bị nhiễm, được chủng ngừa, bị mắc một hoặc nhiều bệnh hoặc bệnh nhiễm trùng, đã tiếp xúc và/hoặc kháng với phương pháp điều trị cụ thể, thể hiện chỉ số hoặc tình trạng lâm sàng cụ thể, tình cờ bị tiếp xúc với yếu tố gây bệnh, v.v..

Huyết thanh của người hiến tặng có thể được sử dụng để xác định ban đầu sự dương tính huyết thanh của chúng với kháng nguyên, do tính đặc hiệu và sự duy trì lâu dài các đáp ứng miễn dịch thích nghi (thậm chí nhiều năm sau lần phơi nhiễm cuối cùng với kháng nguyên này) có thể cho phép xác định định tính đủ để chọn lọc người hiến tặng. Bản chất và độ nhạy của thử nghiệm sàng lọc được sử dụng là quan trọng để nhận biết người hiến tặng thích hợp nhất và, tốt hơn là, thử nghiệm được sử dụng để sàng lọc huyết thanh người hiến tặng nên giống với thử nghiệm được sử dụng để sàng lọc chất nổi bề mặt từ các tế bào B tiết kháng thể được làm bất tử và được thiết kế để phát hiện kháng thể có hoạt tính chức năng mong muốn (tức là, hoạt tính trung hòa).

Việc lựa chọn mô hoặc cơ quan mà từ đó các tế bào được tinh chế có thể bị ảnh hưởng bởi tính khả dụng của các tế bào thích hợp với lượng thích hợp. Các tế bào có thể thu được từ các mẫu tươi hoặc đông lạnh và/hoặc từ các mẫu thu được từ nhiều cá thể mà đã được gộp lại để cung cấp đủ nguyên liệu ban đầu.

Việc sàng lọc sơ bộ có thể được thực hiện trên panen của người hiến tặng, sử dụng các mẫu chứa các tế bào tiết kháng thể (như huyết thanh hoặc máu ngoại vi toàn thân). Cụ thể, các tế bào đơn nhân có thể được phân lập từ mô bạch huyết hoặc máu sử dụng kỹ thuật phân tách chuẩn để phân lập các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC), như ly tâm theo gradien. Sau và/hoặc trước bước tách này, các mẫu huyết thanh (hoặc huyết tương), chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào, hoặc các tế bào (thu được từ các bệnh nhân khác nhau, từ các mô khác nhau, và/hoặc ở các thời điểm khác nhau) có thể được sàng lọc trước bằng cách sử dụng các công nghệ chuẩn để phát hiện sự có mặt của kháng thể và các tế bào tiết kháng thể (ví dụ, ELISA, BIACORE, phương pháp thẩm tách Tây, FACS, SERPA, các dãy kháng nguyên, trung hòa sự nhiễm virus trong hệ thống nuôi cấy tế bào, hoặc thử nghiệm ELISPOT).

Ví dụ trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, ví dụ, sử dụng ELISPOT để phân tích đáp ứng miễn dịch ở người hiến tặng được chủng ngừa (Crotty S et al., 2004), sử dụng vi dãy kháng nguyên làm công cụ chẩn đoán cho các bệnh nhân nhiễm mới (Mezzasoma L et al., 2002), và các kỹ thuật khác để đo đáp ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên (Kern F et al., 2005).

Phân tích định tính sơ bộ đáp ứng kháng thể với đích điều trị nên cho phép nhận

biết người hiến tặng có tế bào B biểu hiện hiệu giá kháng thể cao hơn được hướng tới kháng nguyên được tinh chế mong muốn (ví dụ, protein virus tái tổ hợp đặc hiệu), hỗn hợp của các kháng nguyên liên quan (ví dụ, thu được từ chế phẩm virus được tinh chế một phần), hoặc thử nghiệm sinh học (ví dụ, trung hòa khả năng gây nhiễm của virus).

Khi một hoặc nhiều người hiến tặng được lựa chọn, nguồn tế bào B có thể là lá lách, máu, hạch bạch huyết, tủy xương, lympho bào xâm nhập khối u, lympho bào từ các vị trí nhiễm trùng/viêm mạn tính. Tuy nhiên, máu ngoại vi thường dễ dàng hơn trong việc thu được từ người hiến tặng, lưu giữ, và theo dõi đối với đáp ứng huyết thanh kháng kháng nguyên trong khoảng thời gian xác định.

Ví dụ, bắt đầu từ 5-50 ml máu ngoại vi, khoảng 10-100 triệu PBMC (các tế bào đơn nhân máu ngoại vi) có thể được tinh chế, nhiều tế bào mà cho phép nhóm các tế bào tiết kháng thể đủ lớn để được sàng lọc sau khi được làm bất tử bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả ở đây.

Sau khi phân lập PBMC từ các mẫu sinh học, việc chọn lọc đặc hiệu các tế bào tiết kháng thể có thể được thực hiện, sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, trên cơ sở của sự biểu hiện chất đánh dấu bề mặt tế bào trên bề mặt của chúng và, nếu thích hợp, của protein khác, cũng như hoạt tính tăng sinh, tình trạng chuyển hóa và/hoặc hình thái của các tế bào này.

Cụ thể, các kỹ thuật khác nhau để tinh chế các tế bào tiết kháng thể từ các mẫu của người sử dụng các phương pháp và điều kiện khác nhau để chọn lọc dương tính hoặc âm tính. Các tế bào này có thể được chọn lọc hiệu quả bằng cách phân tách vật lý tế bào biểu hiện chất đánh dấu bề mặt tế bào đặc hiệu với các tế bào biểu hiện và tiết kháng thể (ví dụ, các tế bào B của người). Quy trình cụ thể có thể được tìm thấy trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem, ví dụ, Callard R và Kotowicz K “Human B-cell responses to cytokines” trong *Cytokine Cell Biology: A practical Approach*. Balkwill F. (ed.) Oxford University Press, 2000, pg. 17-31).

Việc chọn lọc có thể được thực hiện sử dụng kháng thể gắn kết đặc hiệu với một trong các protein bề mặt tế bào và có thể được liên kết với giá thể rắn (ví dụ, vi hạt hoặc đĩa nhựa) hoặc được đánh dấu bằng chất phát quang có thể được phát hiện bằng cách sử dụng máy phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS). Ví dụ, các tế bào B ở người được chọn lọc trên cơ sở ái lực của nó đối với giá thể (như vi hạt)

gắn kết vi hạt CD19, CD27, và/hoặc CD22, hoặc thiếu ái lực gắn kết với kháng thể đặc hiệu với một số isotyp trước khi làm bất tử EBV (Li H et al., 1995, Bemasoni N et al., 2003; Traggi E et al., 2004).

Như được thể hiện ở đây, CD22, là protein xuyên màng giới hạn tế bào B mà kiểm soát con đường dẫn truyền tín hiệu liên quan đến việc nhận diện kháng nguyên và hoạt hóa tế bào B (Nitschke L, 2005), có thể được sử dụng để chọn lọc tế bào B ban đầu. Do nhóm CD22 dương tính chứa các tế bào biểu hiện kháng thể có isotyp và tính đặc hiệu khác nhau, các chất đánh dấu bề mặt tế bào khác cũng có thể được sử dụng để chọn lọc các tế bào.

Theo cách khác hoặc ngoài ra, việc làm giàu đặc hiệu các tế bào tiết kháng thể có thể thu được bằng cách áp dụng phương pháp chọn lọc dựa trên CD27 ngoài phương pháp chọn lọc dựa trên CD22. CD27 được biết là chất đánh dấu đối với các tế bào B ở người mà có gen vùng biến đổi được gây đột biến soma (Borst J et al., 2005). Các chất đánh dấu bổ sung như CD5, CD24, CD25, CD86, CD38, CD45, CD70, hoặc CD69 có thể được sử dụng để làm nghèo hoặc làm giàu cho các nhóm tế bào mong muốn. Vì thế, sự phụ thuộc vào tiền sử của thể cho trong việc tiếp xúc với kháng nguyên (ví dụ, virus, vi khuẩn, ký sinh trùng), hiệu giá kháng thể, các tế bào B toàn phần, tế bào B được làm giàu CD22, hoặc phân nhóm tế bào B được làm giàu thêm như các tế bào B dương tính CD27 có thể được sử dụng.

Biến nạp EBV của tế bào B

Nhóm tế bào được chọn lọc và được kích thích biểu hiện kháng thể có isotyp đặc hiệu có thể được làm bất tử sử dụng chất làm bất tử virus. Chất làm bất tử khác nhau có thể được sử dụng trên các tế bào tiết kháng thể để thu được các tế bào tiết kháng thể được làm bất tử.

Trong số các chất làm bất tử virus, virus mà gây nhiễm và làm bất tử các tế bào tiết kháng thể có thể được sử dụng ưu tiên trong thực hành sáng chế. Các virus thường được sử dụng là virus ưa tế bào lympho, được phân nhóm vào lớp gamma của virus ecpet. Thành viên của họ virus này gây nhiễm lympho bào theo cách đặc hiệu loài, và liên quan đến rối loạn tăng sinh mô bạch huyết và sự phát triển của nhiều thể ác tính (Nicholas J, 2000; Rickinson A, 2001).

EBV (virut Epstein-Barr, còn được biết là virut ecpet 4), và HHV-8 (virut ecpet 8 ở người, còn được biết là KSHV, virut ecpet gây bệnh sacôm Kapos) và làm bất tử các lympho bào người. MHV-68 (virut ecpet 68 của chuột), HVS (virut ecpet Samiri), RRV (Rhesus Rhadino virut), LCV (Lymphocrypto virut linh trưởng), EHV-2 (virut ecpet 2 của ngựa), HVA (virut ecpet Ateles), và AHV-1 (virut ecpet 1 Alcelaphin) là virut ecpet gây ung thư, ưa tế bào lympho khác có các đặc tính di truyền thông thường được bảo tồn trong số đó và hiệu quả gây bệnh tương tự ở nhiều tế bào chủ của động vật có vú khác nhau. Các virut này có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế.

Ngoài việc sử dụng virut nguyên vẹn, các cấu trúc ADN tái tổ hợp chứa protein virut đặc hiệu được sử dụng thành công để làm bất tử các tế bào B (Damania B 2004; Kilger E et al., 1998). Vector chứa gen virut có thể được tải nạp vào các tế bào, đôi khi sử dụng hệ retrovirut hoặc dòng tế bào đóng gói mà cung cấp tất cả các yếu tố cần thiết trong quá trình tải nạp để tạo ra các hạt giống virut, cũng có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế.

Việc làm bất tử qua trung gian EBV là quy trình phức tạp bao gồm bước làm bất tử tế bào B do các protein được biểu hiện bởi EBV, và được điều hòa bởi sự tương tác giữa EBV và protein tế bào chủ (Sugimoto M et al., 2004; Bishop G E, và Busch L K, 2002). Nếu muốn, quy trình làm bất tử có thể được tiếp tục bằng cách đo sự biểu hiện của protein EBV đặc hiệu và các bản sao như EBNA2, EBNA1, LMP2, LMP1, hoặc EBER (Thorley-Lawson D A, 2001). Các protein này có thể được phát hiện bằng PCR, miễn dịch huỳnh quang, phương pháp thẩm tách Tây, hoặc phương pháp khác cho phép phát hiện ADN EBV và protein trong các tế bào bị gây nhiễm (Schlee M et al., 2004; Park C H et al., 2004; Humme S et al., 2003; Konishi K et al., 2001; Haan K et al., 2001).

Sàng lọc và phân lập các tế bào B được biến nạp

Theo một số phương án, tế bào B được biến nạp và/hoặc được hoạt hóa có thể được sàng lọc đối với các tế bào có tính đặc hiệu kháng nguyên mong muốn, và các dòng tế bào B riêng biệt sau đó có thể được sản xuất từ các tế bào dương tính. Bước sàng lọc có thể được tiến hành bằng ELISA, bằng cách nhuộm mô hoặc các tế bào (bao gồm các tế bào được chuyển nhiễm), thử nghiệm trung hòa, và/hoặc một trong số nhiều phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để nhận biết tính đặc hiệu

kháng nguyên mong muốn. Thử nghiệm này có thể lựa chọn trên cơ sở nhận diện kháng nguyên đơn giản, hoặc có thể chọn lọc trên cơ sở bổ sung là chức năng mong muốn, ví dụ kháng thể trung hòa hơn là chỉ kháng thể gắn kết kháng nguyên.

Theo một số phương án, bước tách dòng để phân tách các dòng đơn lẻ từ hỗn hợp của các tế bào dương tính có thể được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp pha loãng giới hạn, vi thao tác, lắng tế bào đơn bằng cách phân loại tế bào, và/hoặc bằng phương pháp bất kỳ đã biết khác trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, việc tách dòng được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp pha loãng giới hạn. Theo một số phương án, các tế bào B được tách dòng có nguồn gốc từ tế bào B được làm bất tử bằng cách sử dụng kỹ thuật biến nạp EBV kết hợp với sự ức chế đáp ứng bẩm sinh của vật chủ với tín hiệu tăng sinh qua trung gian chất hoạt hóa.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản sinh các tế bào B được làm bất tử mà tạo ra kháng thể có tính đặc hiệu kháng nguyên cần quan tâm. Các tế bào B này có thể được sử dụng theo nhiều cách khác nhau, ví dụ, làm nguồn kháng thể đơn dòng, làm nguồn axit nucleic (ADN hoặc mRNA) mã hóa kháng thể đơn dòng cần quan tâm, để phân phối đến đối tượng liệu pháp tế bào, như chất trị liệu hoặc thuốc.

Theo một số phương án, chất nổi bề mặt từ các tế bào B được hoạt hóa trong môi trường nuôi cấy có thể được sàng lọc đối với kháng thể cần quan tâm bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Việc sàng lọc được tiến hành để nhận biết một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng có khả năng gắn kết với kháng nguyên cần quan tâm. Việc sàng lọc này có thể được thực hiện trên chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy và/hoặc kháng thể được tinh chế. Theo cách khác, việc sàng lọc có thể được tiến hành bằng cách sử dụng chất nổi bề mặt môi trường nuôi cấy và/hoặc kháng thể được tinh chế từ các tế bào B được hoạt hóa và/hoặc được làm bất tử. Ngoài ra, kháng thể phản ứng chéo được quan tâm, khả năng của kháng thể đơn dòng phản ứng chéo với hai hoặc nhiều kháng nguyên khác nhau có thể được xác định. Ngoài ra, theo một số phương án, có thể mong muốn sàng lọc kháng thể có một số đặc điểm chức năng (ví dụ, hoạt tính trung hòa).

Tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể đơn dòng được sản xuất bởi sáng chế có thể, ví dụ, được xác định trong thử nghiệm miễn dịch, ví dụ, bằng phương pháp kết tủa

miễn dịch hoặc thử nghiệm gắn kết *in vitro* khác, như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc thử nghiệm hấp thu miễn dịch được liên kết với enzym (ELISA).

Các nhóm chung điển hình của phương pháp sàng lọc mà có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, (a) thử nghiệm bắt giữ kháng thể; (b) thử nghiệm bắt giữ kháng nguyên; và (c) sàng lọc chức năng.

Trong thử nghiệm bắt giữ kháng thể, kháng nguyên có thể được gắn kết với pha rắn, kháng thể đơn dòng được thử nghiệm được cho phép gắn kết với kháng nguyên, kháng thể không gắn được loại bỏ bằng cách rửa, và sau đó kháng thể được gắn kết được phát hiện, ví dụ, bằng chất phản ứng thứ cấp như kháng thể được đánh dấu nhận diện đặc hiệu kháng thể này.

Đối với thử nghiệm bắt giữ kháng nguyên, kháng nguyên này có thể được đánh dấu trực tiếp. Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được thử nghiệm có thể được gắn kết với pha rắn và sau đó được phản ứng với kháng nguyên được đánh dấu tùy ý. Theo cách khác, phức hợp kháng thể-kháng nguyên có thể được cho phép tạo ra bằng cách kết tủa miễn dịch trước khi gắn kết kháng thể đơn dòng cần thử nghiệm với pha rắn. Khi phức hợp kháng thể-kháng nguyên được gắn kết với pha rắn, kháng nguyên không gắn kết có thể được loại bỏ bằng cách rửa và sự dương tính có thể được nhận biết bằng cách phát hiện kháng nguyên.

Các thử nghiệm sàng lọc chức năng khác nhau hiện đã có để nhận biết kháng thể đơn dòng có các hoạt tính mong muốn. Trong sáng chế, thử nghiệm sàng lọc này, như được mô tả trong các ví dụ, là thử nghiệm trung hòa.

Sự biểu hiện tái tổ hợp

Phương pháp theo sáng chế còn thu được và/hoặc giải trình tự axit nucleic của kháng thể từ dòng tế bào B đã chọn lọc; và sử dụng axit nucleic này để tạo ra tế bào chủ có thể biểu hiện kháng thể cần quan tâm.

Theo một số phương án, trình tự nucleotit mã hóa kháng thể mong muốn có thể được giải trình tự và sau đó được sử dụng trong hệ biểu hiện khác loại, ví dụ, tế bào 293 hoặc các tế bào CHO. Theo một số phương án, kháng thể có thể được biểu hiện tái tổ hợp bằng cách thu được một hoặc nhiều axit nucleic (ví dụ, gen chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ) từ dòng tế bào B mã hóa kháng thể cần quan tâm và gắn chèn axit nucleic

này vào trong tế bào chủ để cho phép biểu hiện kháng thể cần quan tâm trong vật chủ đó.

Việc sản xuất kháng thể bằng cách sử dụng phương pháp ADN tái tổ hợp được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 4,816,567. Để sản xuất tái tổ hợp kháng thể, axit nucleic mã hóa nó được phân lập và được gắn chèn vào vectơ sao chép được để tách dòng thêm (khuếch đại ADN) hoặc biểu hiện. ADN mã hóa kháng thể đơn dòng dễ dàng được phân lập và được giải trình tự bằng cách sử dụng quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng mẫu dò oligonucleotit có khả năng gắn kết đặc hiệu với gen mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể). Vectơ có thể thường được sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều trong số: trình tự tín hiệu, gốc sao chép, một hoặc nhiều gen đánh dấu, yếu tố tăng cường, gen khởi đầu, và trình tự kết thúc phiên mã. Ví dụ về các thành phần của hệ biểu hiện này được mô tả trong, ví dụ, patent Mỹ số 5,739,277. Tế bào chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện ADN trong vectơ ở đây là tế bào tiền nhân, nấm men, hoặc các tế bào nhân chuẩn bậc cao (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,739,277).

Dược phẩm

Sáng chế mô tả đối tượng là dược phẩm bao gồm kháng thể được sản xuất theo sáng chế. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm các tế bào B được biến nạp và/hoặc được hoạt hóa. Theo một số phương án, dược phẩm có thể bao gồm một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng được sản xuất bằng các phương pháp được mô tả ở đây. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng cũng như tế bào B được biến nạp và/hoặc được hoạt hóa của đối tượng được mô tả có thể được bao gồm trong dược phẩm. Theo một số phương án, panen kháng thể đơn dòng được sản xuất theo sáng chế có thể được bao gồm trong dược phẩm. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng và/hoặc tế bào B được sản xuất theo sáng chế có thể được bao gồm với một hoặc nhiều chất bổ sung, ví dụ, thuốc kháng virus hoặc thuốc giảm đau.

Theo một số phương án, dược phẩm cũng có thể chứa chất mang hoặc tá dược được dụng để sử dụng kháng thể. Theo một số phương án, chất mang là được dụng để sử dụng cho người. Bản thân chất mang hoặc tá dược không nên cản trở việc sản xuất kháng thể có hại cho cá thể nhận chế phẩm này và không độc. Chất mang thích hợp có thể là đại phân tử lớn, được chuyển hóa chậm như protein, polypeptit, liposom,

polysacarit, axit polylactic, axit polyglycolic, axit amin kiểu polyme, copolyme axit ammo và các hạt virus bất hoạt.

Muối được dùng có thể được sử dụng, ví dụ muối axit khoáng, như hydroclorua, hydro bromua, phosphat và sulphat, hoặc muối của axit hữu cơ, như axetat, propionat, malonat và benzoat.

Chất mang được dùng trong dược phẩm có thể còn chứa chất lỏng như nước, nước muối, glyxerol và etanol. Ngoài ra, chất phụ trợ, như chất làm ướt hoặc chất nhũ hóa hoặc chất đệm pH, có thể có mặt trong các chế phẩm này. Các chất mang này cho phép dược phẩm được bào chế thành viên nén, viên tròn, viên bao đường, viên nang, chất lỏng, gel, xi rô, hỗn dịch và huyền phù, để tiêu hóa bởi bệnh nhân.

Các chế phẩm của đối tượng được mô tả ở đây có thể còn bao gồm chất mang để tạo điều kiện thuận lợi để bào chế và sử dụng chế phẩm. Chất mang hoặc tá dược lỏng thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng, bao gồm, nhưng không giới hạn ở vi nang, ví dụ vi cầu hoặc hạt cầu có kích thước nano (Manome et al. (1994) *Cancer Res* 54:5408-5413; Saltzman & Fung (1997) *Adv Drug Deliv Rev* 26:209-230), glycosaminoglycan (patent Mỹ số 6,106,866), axit béo (patent Mỹ số 5,994,392), nhũ tương béo (patent Mỹ số 5,651,991), lipid hoặc dẫn xuất lipid (patent Mỹ số 5,786,387), collagen (patent Mỹ số 5,922,356), polysacarit hoặc dẫn xuất của chúng (patent Mỹ số 5,688,931), huyền phù nano (patent Mỹ số 5,858,410), mixen polyme hoặc thể liên hợp (Goldman et al. (1997) *Cancer Res* 57:1447-1451 và các patent Mỹ số 4,551,482, 5,714,166, 5,510,103, 5,490,840, và 5,855,900), và polysome (patent Mỹ số 5,922,545).

Trình tự kháng thể có thể được ghép cặp với hoạt chất hoặc chất mang bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm nhưng không giới hạn ở phản ứng liên hợp carbodiimite, este hóa, oxy hóa natri periodat sau đó khử alkyl hóa, và liên kết chéo glutaraldehyt (Goldman et al. (1997) *Cancer Res* 57:1447-1451; Cheng (1996) *Hum. Gene Ther.* 7:275-282; Neri et al. (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:1271-1275; Nabel (1997) *Vector for Gene Therapy*. In *Current Protocol in Human Genetics*, John Wiley & Sons, New York; Park et al. (1997) *Adv. Pharmacol.* 40:399-435; Pasqualini et al. (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:542-546; Bauminger & Wilchek

(1980) Meth. Enzymol. 70:151-159; patent Mỹ số 6,071,890; và patent châu Âu số 0 439 095).

Dược phẩm theo sáng chế bao gồm theo một số phương án, dược phẩm bao gồm chất mang dược dụng. Các dạng bào chế thích hợp bao gồm dung dịch tiêm vô trùng chứa nước và không chứa nước có thể chứa chất chống oxy hóa, chất đệm, chất kìm hãm vi khuẩn, chất kháng sinh diệt khuẩn và chất hòa tan làm cho chế phẩm đẳng trương với dịch cơ thể của động vật nhận dự định; và huyền phù vô trùng chứa nước và không chứa nước có thể bao gồm chất tạo huyền phù và chất làm đặc. Các chế phẩm có thể được trình bày ở dạng vật chứa đơn liều hoặc đa liều, ví dụ ống thuốc tiêm và lọ nhỏ được bịt kín, và có thể được bảo quản trong điều kiện đông lạnh hoặc đông khô (làm khô lạnh) chỉ cần bổ sung chất mang lỏng vô trùng ngay trước khi sử dụng, ví dụ nước để tiêm. Một số thành phần làm ví dụ là SDS theo một số phương án nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10mg/ml, theo một số phương án khoảng 2,0mg/ml; và/hoặc manitol hoặc đường khác theo một số phương án nằm trong khoảng từ 10 đến 100mg/ml, theo một số phương án khoảng 30mg/ml; và/hoặc nước muối đệm phosphat (PBS). Chất khác bất kỳ thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này liên quan đến loại chế phẩm được đề cập tới có thể được sử dụng. Theo một số phương án, chất mang là dược dụng. Theo một số phương án chất mang là dược dụng để sử dụng cho người.

Dược phẩm theo sáng chế có thể có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 8,5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 6 đến 8, và tốt hơn nữa là khoảng 7. Độ pH có thể được duy trì bằng cách sử dụng chất đệm. Chế phẩm có thể là vô trùng và/hoặc không chứa chất gây sốt. Chế phẩm có thể là đẳng trương với người. Dược phẩm theo sáng chế có thể được cung cấp trong vật chứa được bịt kín.

Dược phẩm có thể bao gồm một lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều kháng thể như được mô tả ở đây. Theo một số phương án, dược phẩm có thể bao gồm lượng thích hợp để điều trị, cải thiện, hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh mong muốn, hoặc để biểu hiện hiệu quả điều trị phát hiện được. Hiệu quả điều trị cũng bao gồm việc làm giảm triệu chứng cơ thể. Lượng hữu hiệu chính xác cho đối tượng cụ thể bất kỳ sẽ phụ thuộc vào kích cỡ cơ thể và sức khỏe, bản chất và mức độ của tình trạng bệnh, và liệu pháp điều trị hoặc sự kết hợp các liệu pháp điều trị được chọn để sử dụng. Lượng hữu hiệu cho tình trạng cụ thể được xác định bằng thử nghiệm thông

thường như được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phác đồ điều trị: Dược động học

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng trong nhiều dạng liều đơn vị khác nhau phụ thuộc vào phương pháp sử dụng. Liều của dược phẩm kháng thể điển hình đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Liều này thường dựa trên bản chất và được điều chỉnh phụ thuộc vào tình trạng điều trị cụ thể hoặc khả năng dung nạp của bệnh nhân. Lượng kháng thể đủ để đạt được điều này được xác định là “liều có tác dụng trị liệu”. Lịch sử dụng liều và lượng hữu hiệu cho ứng dụng này, tức là, “phác đồ sử dụng liều”, sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm giai đoạn bệnh hoặc tình trạng bệnh, mức độ nghiêm trọng của bệnh hoặc tình trạng bệnh, tình trạng chung của sức khỏe bệnh nhân, tình trạng sinh lý của bệnh nhân, tuổi, dược phẩm và nồng độ hoạt chất, và các yếu tố tương tự. Khi tính toán phác đồ liều cho bệnh nhân, đường sử dụng cũng được xem xét. Phác đồ liều cũng phải xem xét về dược động học, tức là, tốc độ hấp thụ, sinh khả dụng, sự chuyển hóa, sự thanh thải của chế phẩm, và các yếu tố tương tự. Xem, ví dụ, ấn phẩm mới nhất của Remington's; Egleton, Peptides 18: 1431-1439, 1997; Langer, Science 249: 1527-1533, 1990.

Với mục đích của sáng chế, lượng hữu hiệu để điều trị của chế phẩm bao gồm kháng thể, chứa protein với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 1500 μ g, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 đến 1000 μ g, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 30 đến 500 μ g và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 40 đến 300pg, hoặc số nguyên bất kỳ nằm giữa các giá trị này. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng với liều nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 μ g đến khoảng 200mg, ví dụ, từ khoảng 0,1 μ g đến khoảng 5 μ g, từ khoảng 5 μ g đến khoảng 10 μ g, từ khoảng 10 μ g đến khoảng 25 μ g, từ khoảng 25 μ g đến khoảng 50 μ g, từ khoảng 50 μ g đến khoảng 100 μ g, từ khoảng 100 μ g đến khoảng 500 μ g, từ khoảng 500 μ g đến khoảng 1mg, từ khoảng 1 mg đến khoảng 2 mg, với liều tăng cường tùy ý được cung cấp ở, ví dụ, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 2 tháng, 3 tháng, 6 tháng và/hoặc một năm sau đó. Được hiểu rằng mức liều cụ thể cho bệnh nhân cụ thể bất kỳ phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm hoạt tính của kháng thể đặc hiệu được sử dụng, tuổi, cân nặng, sức khỏe chung, giới tính, chế độ ăn,

thời gian sử dụng, đường sử dụng, và tốc độ bài tiết, hỗn hợp thuốc và mức độ nghiêm trọng của bệnh cụ thể đang điều trị.

Các đường sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, miệng, tại chỗ, dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, dưới da, trong da, qua da và dưới da. Phụ thuộc vào đường sử dụng, thể tích mỗi liều tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,001 đến 10ml, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 5ml, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 3ml. Chế phẩm có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị đơn liều hoặc đa liều theo lịch và trong khoảng thời gian phù hợp với tuổi, cân nặng và tình trạng của đối tượng, chế phẩm kháng thể cụ thể được sử dụng, và đường sử dụng.

Bộ kit

Sáng chế đề cập đến bộ kit bao gồm kháng thể được tạo ra theo sáng chế mà có thể được sử dụng, ví dụ, cho các ứng dụng điều trị được mô tả ở trên. Vật phẩm bao gồm vật chứa có nhãn hiệu. Vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ nhỏ, và ống thử nghiệm. Vật chứa có thể được tạo thành từ nhiều vật liệu như thủy tinh hoặc nhựa. Vật chứa mang chế phẩm mà bao gồm hoạt chất hữu hiệu cho các ứng dụng điều trị, như được mô tả ở trên. Hoạt chất trong chế phẩm có thể bao gồm kháng thể. Nhãn trên vật chứa cho biết chế phẩm được sử dụng cho ứng dụng điều trị hoặc không điều trị cụ thể hoặc phi trị liệu, và cũng có thể thể hiện hướng dẫn sử dụng *in vivo* hoặc *in vitro*, như được mô tả ở trên.

Các ví dụ sau đây về các khía cạnh cụ thể để thực hiện sáng chế chỉ được nêu nhằm mục đích minh họa sáng chế, và không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phương pháp và nguyên liệu

Tiêu chuẩn đạo đức

Đã đạt được sự đồng thuận và tất cả quy trình được tiến hành theo quy trình được phê chuẩn của The National University Institutional Review Board (số NUS-IRB là 06-196).

Các tế bào và virus

Các tế bào C6/36 và các tế bào BHK-21 được nuôi cấy như đã được mô tả ở trên (28). Tất cả chủng Dengue ngoại trừ chủng EHI và PVP 159 thu được từ Viện các bệnh nhiệt đới Novartis, Singapo (Novartis Institute of Tropical Diseases - NITD). Chủng EHI thu được từ Viện sức khỏe môi trường, Singapo (Environmental Health Institute - EHI) và PVP 159 (DENV1/SG/07K3640DK1/2008) từ nhóm bệnh nhân EDEN (29).

Tách dòng tế bào B

Việc phân lập và làm bất tử tế bào B được tiến hành như đã được mô tả ở trên (10). Sau 15 ngày nuôi cấy, chất nổi bề mặt được sàng lọc đối với kháng thể đặc hiệu DENV bằng ELISA và PRNT.

Thử nghiệm gắn kết ELISA

Các đĩa đáy phẳng 96 giếng (đĩa Maxisorp, Nunc) được phủ bằng kháng thể 4G2 ở chuột qua đêm với nồng độ 5µg/ml qua đêm. Các đĩa được rửa ba lần bằng PBS/Tween-20 nồng độ 0,01%. Các chủng DENV khác nhau được bổ sung ở nồng độ 1×10^5 pfu trong 50µl mỗi giếng và được ủ thêm trong 2 giờ. Các đĩa được rửa ba lần bằng PBS/Tween-20 nồng độ 0,01%. HM14C10 được bổ sung vào các đĩa và được ủ thêm 1 giờ. Các đĩa được rửa ba lần bằng PBS/Tween-20 nồng độ 0,01%. HRP được liên hợp với kháng thể kháng IgG ở người (Pierce, Singapo) được bổ sung và được ủ trong 1 giờ. Cơ chất TMB (GE healthcare, Singapo) được bổ sung và axit sulphuric 0,1M được sử dụng để ngừng phản ứng.

Sản xuất HM14c10 tái tổ hợp

ARN từ các tế bào B được chiết bằng cách sử dụng bộ kit chiết ARN (Qiagen). Việc tách dòng và biểu hiện kháng thể tái tổ hợp được tiến hành như được mô tả ở trên (30).

Thử nghiệm tăng cường phụ thuộc kháng thể

Virut Dengue (5×10^2 pfu/ml) được ủ trước với môi trường, kháng thể đơn dòng riêng biệt (HM4G2, HM14c10 hoặc HM14c10 N297Q) hoặc phân lớp của kháng thể đơn dòng HM14c10 (IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4) và sau đó được bổ sung vào 10^5 tế bào K562. Sau một giờ, các tế bào được rửa kỹ bằng PBS để loại bỏ virut và

kháng thể đơn dòng không gắn kết. Sau 48 giờ nữa, chất nổi bề mặt được thu gom và hiệu giá virus được xác định bằng thử nghiệm mảng trên các tế bào BHK-21.

Thử nghiệm *in vivo* trên chuột

Chuột AG129 thiếu hụt thụ thể IFN- α/β và $-\gamma$ (31). Chuột được xử lý theo khuyến cáo của Ủy ban chăm sóc và sử dụng động vật thí nghiệm (quy trình IACUC số: 018/11). Sơ đồ chi tiết các ứng dụng phòng bệnh và điều trị của HM14c10 so với đối chứng được điều trị PBS được thể hiện trong Fig. 21. Chuột bị làm chết và virus huyết được định lượng bằng thử nghiệm mảng đã công bố (32).

Chụp ảnh tế bào sống đồng tiêu theo thời gian sống của tế bào

Việc sử dụng kính hiển vi cho các tế bào sống theo thời gian sống của tế bào được thực hiện trên kính hiển vi đồng tiêu đảo ngược A1Rsi (Nikon, Nhật Bản) sử dụng thấu kính có độ mở số (N.A) Plan-Apochromat 100X 1.4. Việc chụp ảnh tế bào sống được thực hiện với các tế bào BHK sống, không được cố định được nuôi trên lá kính bằng thủy tinh 25mm (Marienfeld GmbH, Đức) được gắn trên giá đỡ của buồng (Nikon, Nhật Bản). Các tế bào được gieo ở mật độ 4×10^4 /giếng 1 ngày trước khi thử nghiệm và được nuôi cấy trong RPMI 1640 được bổ sung FCS nồng độ 10%. Để phát hiện đồng thời kháng thể được đánh dấu Alexa Fluor-488 và virus DEN1 được đánh dấu Alexa Fluor-647, dòng 488nm laser ion argon và ánh sáng laser neon heli 633nm được hướng lên thiết bị phun xạ chùm HFT UV/488/633, và sự phát huỳnh quang được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị phun xạ chùm NFT 545 kết hợp với bộ lọc thông dải 505–530 để phát hiện Alexa Fluor-488 và bộ lọc thông bước sóng 650 để phát hiện Alexa Fluor-647. Các ảnh được chụp ở các khoảng cách 30 giây ở tốc độ 1 khung mỗi giây (fps) trong thời gian từ 30 đến 60 phút. Tất cả thử nghiệm chụp ảnh tế bào sống được thực hiện bằng cách sử dụng các tế bào được ủ ở 37°C trong hệ thống ủ lồng kính hiển vi CO₂ 5% (OkoLab, Ý). Các ảnh được phân tích và được xử lý bằng Phần mềm phân tử phần mềm chụp ảnh Nikon (NIS) C (64 bit, phiên bản 3, SP7/thiết kế 547) [Nikon, Nhật Bản].

Định lượng sự phát huỳnh quang nội bào

Tác dụng của kháng thể trên quá trình nhập bào của DENV1 được đánh giá bằng cách xác định mức độ phát huỳnh quang tương đối trong các tế bào sống. Sau khi

điều trị bằng kháng thể tương ứng, các ảnh của ít nhất 100 tế bào thu được ngẫu nhiên bằng cách sử dụng kính hiển vi đồng tiêu A1Rsi từ ba thử nghiệm độc lập. Vùng nội bào của các tế bào này sau đó được phân ranh giới riêng biệt bằng cách thủ công sử dụng chức năng “vùng cần quan tâm” [ROI] của phần mềm phân tử NIS (Nikon, Nhật Bản) và mức độ phát huỳnh quang tương đối của Alexa Fluor-488 trong mỗi tế bào được xác định bằng cách sử dụng chức năng thống kê ROI của phần mềm. Độ lệch chuẩn trung bình, và kiểm định t student được tính toán cho mỗi nhóm tế bào bằng cách sử dụng Microsoft Excel. Sự phát huỳnh quang từ các nhóm tế bào không được điều trị bị nhiễm DEN1 được chuẩn hóa đến 100% và được sử dụng để so sánh với các tế bào bị gây nhiễm được điều trị bằng kháng thể.

CryoEM

Virut Dengue (chủng PVP 159) được tạo ra như đã được mô tả ở trên (3). Virut được trộn với Fab HM14c10 với tỷ lệ mol bằng 1:1, được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút, và sau đó được ủ ở nhiệt độ 4°C trong 2 giờ. Sau đó, phức hợp được làm đông lạnh nhanh trong etan lỏng trên lưới cacbon lacey, lưới này được phủ với lớp mỏng cacbon liên tục. Các hạt virut được chụp bằng 300 kV FEI Titan Krios trong các điều kiện sau: liều electron bằng $16 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$, độ phóng đại bằng 47.000, khoảng mất tiêu cự từ 1 μm đến 3 μm . Các ảnh được ghi lại ở độ phân giải 4K bằng máy ảnh Gatan CCD 4K thu được kích thước điểm ảnh bằng 1,9 $\text{\AA}$ mỗi điểm ảnh. Tổng là 5.566 hạt được đóng hộp và các thông số chức năng chuyển tương phản được xác định bằng cách sử dụng hộp chương trình và ctfit, tương ứng, trong dãy chương trình EMAN (33). Hướng của các hạt được xác định bằng cách sử dụng quy trình mô phỏng luyện kim nhiều đường (multi-path simulated annealing - MPSA) (34). Virut West Nile được sử dụng làm mô hình ban đầu (26). Bản đồ ba chiều được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình make3d trong EMAN. Độ phân giải của bản đồ cuối cùng được phát hiện bằng độ phân giải 7 $\text{\AA}$ như được xác định bằng ngưỡng hệ số vô fourier bằng 0,5. Cấu trúc tinh thể protein E sau dung hợp DENV1 (18) không khớp vào bản đồ mật độ cryoEM dưới dạng khối rắn, các miền trong protein E do đó được phá vỡ và sau đó được khớp một cách riêng biệt. Sự khớp của phân tử vào bản đồ cryoEM (thiết lập ở đường đồng mức 4 σ) sau đó được tối ưu hóa bằng cách sử dụng chức năng “khớp trong bản đồ” của thể khảm (35). Để tạo ra mô hình tương đồng của vùng biến đổi

HM14c10, cấu trúc có sự bất cập trình tự cao nhất được chọn (PDB mã 2GHW) và mô hình tương đồng được tạo ra bằng cách sử dụng Modeller (19). Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của mô hình tương đồng được khớp một cách riêng biệt vào bản đồ cryoEM (được thiết lập ở đường đồng mức 3σ) theo hai hướng có thể của Fab (Fig. 19).

Ví dụ 1: Phân lập kháng thể đặc hiệu DENV1 trung hòa mạnh 14c10 từ bệnh nhân bị nhiễm DENV1 đang hồi phục

Một nhóm dòng tế bào lympho B tiết kháng thể có hoạt tính trung hòa và gắn kết đặc hiệu typ huyết thanh cho DENV1 được nhận biết, được tách dòng phụ và được nhân rộng. Một trong các dòng tế bào này, BCL-14c10 sản sinh, IgG có hoạt tính gắn kết và trung hòa mạnh hơn đáng kể so với các dòng khác (Fig. 14A). Dòng tế bào này được sử dụng làm nguồn của các khung gen globulin miễn dịch để khuếch đại PCR và biểu hiện IgG1 ở người tái tổ hợp (Fig. 14B(a)). Một kháng thể ở người tái tổ hợp (HM) 14c10 có hoạt tính gắn kết tương đương với DENV1 có BCL-14c10 mẹ (Fig. 14B(b)). HM14c10 trung hòa và gắn kết với DENV1 nhưng không trung hòa và gắn kết với DENV2, 3 hoặc 4 (Fig. 14C), và thể hiện hoạt tính trung hòa mạnh với PRNT₅₀ bằng 0,328 $\mu\text{g/ml}$ *in vitro* (Fig. 11A).

Hoạt tính ADE liên quan đến sự phát triển của DHF và DSS đã được đề xuất là diễn ra khi nồng độ dưới mức trung hòa của kháng thể và DENV tạo thành các phức hợp gắn kết với các tế bào mang thụ thể Fc. Điều này dẫn tới việc tăng sự hấp thụ virus và tiết cytokin và chemokin tiền viêm (11). Các tác giả sáng chế so sánh hoạt tính ADE của HM14c10 với HM4G2 kháng thể đơn dòng kháng flavivirus được làm tương thích với người bằng cách sử dụng thử nghiệm *in vitro* đã công bố sử dụng dòng tế bào đơn nhân tủy biểu hiện Fc γ R K562 (12). HM4G2 có hoạt tính gắn kết chéo typ huyết thanh và gắn đích vòng dung hợp được bảo toàn của E-DII trên DENV1-4 (13). Các tác giả sáng chế quan sát thấy rằng HM14c10 biểu hiện sự tăng nhiễm DENV1 cùng kiểu ở nồng độ dưới mức trung hòa nhưng không làm tăng hoạt tính đối với DENV2, 3 hoặc 4, mà nó không gắn kết vào. Ngược lại, HM4G2 gây ra sự tăng của cả bốn typ huyết thanh ở nồng độ dưới mức trung hòa (Fig. 11B). Để nghiên cứu sự đóng góp của K562 Fc γ R vào hoạt tính ADE cùng kiểu của HM14c10 được quan sát thấy, tác giả sáng chế tiến hành biểu hiện kháng thể dưới dạng mảnh Fab hoặc sự gắn kết Fc γ R giảm bằng cách loại bỏ vị trí glycosyl hóa trên IgG1 ở người thông qua đột biến thể

của gốc asparagin (N) ở vị trí 297 cho glutamin (Q) (14). Cả HM14c10Fab và đột biến N297Q biểu hiện sự giảm hoạt tính ADE cùng kiểu của chúng so với mẫu đối chứng IgG1 nguyên vẹn (Fig. 11C(a)). Tiếp theo, tác giả sáng chế so sánh sự ảnh hưởng của phần nhóm IgG trên hoạt tính ADE và quan sát sự tương quan một phần với các hoạt tính gắn kết đã được báo cáo cho FcγRIIA trên K562 (15). Hoạt tính ADE có thể được xếp hạng như sau: IgG3>IgG1>IgG2>IgG4 với IgG3 là cao nhất và IgG4 là thấp nhất (Fig. 11C(b)). Vì thế, hoạt tính ADE của kháng thể kháng DENV trung hòa này phụ thuộc vào sự gắn kết FcγR mặc dù nên lưu ý là sự ảnh hưởng của FcγR1 ái lực cao và các thành phần bổ thể trên sự trung hòa virus không được đề cập đến trong các thử nghiệm này (16).

Sự phức tạp thêm ở DENV là sự có mặt của nhiều kiểu gen trong một typ huyết thanh. Các kiểu gen DENV1 có thể thay đổi lên tới 3% trong thành phần axit amin của chúng và báo cáo trước đó về các kháng thể kháng DENV ở chuột đã chỉ ra rằng hoạt tính bảo vệ có thể khác nhau giữa các kiểu gen (17). Các tác giả sáng chế so sánh hoạt tính gắn kết của HM14c10 với nhiều thể phân lập DENV1 lâm sàng thể hiện hai kiểu gen DENV1 khác nhau (I và IV) với HM4G2. Cả HM14c10 và HM4G2 đều biểu hiện hoạt tính gắn kết đối với các kiểu gen được thử nghiệm, với HM4G2 biểu hiện đặc tính gắn kết tốt hơn trong tất cả các trường hợp (Fig. 15). Ngược lại, HM14c10 biểu hiện hoạt tính trung hòa vượt trội so với HM4G2 đối với tất cả các thể phân lập/các kiểu gen được thử nghiệm (Fig. 11D).

Ví dụ 2: HM14c10 gắn kết epitop phụ thuộc cấu trúc bậc bốn

Bản chất chính xác của sự tương tác giữa kháng thể cho trước và DENV là chìa khóa để giải thích cơ chế trung hòa. Để xác định cơ chế này, cấu trúc hiển vi điện tử đông lạnh (cryoEM) của phức hợp Fab HM14c10:DENV1 được phân tích đến độ phân giải 7Å (Fig. 12A). Ở mức chiếm hoàn toàn, 120 bản sao của Fab HM14c10 gắn kết với tất cả 180 bản sao hiện có của protein E trên bề mặt virus. Để nhận biết dấu ấn của HM14c10 trên protein E, cấu trúc tinh thể của protein E DENV1 (18) được khớp vào bản đồ mật độ cryoEM (Fig. 16 và bảng 1). Bản đồ cryoEM độ phân giải 7Å đã thể hiện sự liên kết mật độ rõ ràng giữa HM14c10 Fab và protein E, cho phép nhận biết các gốc protein E ở bề mặt chung tương tác (Fig. 12B và Fig. 17). Epitop được nhận biết bởi HM14c10 phụ thuộc vào cấu trúc bậc bốn của virus. Hai fab của HM14c10

gắn kết với ba protein E trong đơn vị virus bất đối xứng (Fig. 12C và D). Mỗi kháng thể gắn kết chéo với hai protein E liền kề với một nửa epitop trên E-DIII và một nửa trên E-DI và khớp nối E-DI-E-DII của protein E bên cạnh.

Để hiểu được sự tương tác Fab với protein E, mô hình tương đồng của vùng biến đổi của HM14c10 được tạo ra (Fig. 18) dựa trên cấu trúc kháng thể tham chiếu của người (PDB mã 2GHW) bằng cách sử dụng Modeller (19). Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của mô hình tương đồng sau đó được khớp vào mật độ cryoEM. Mặc dù các cấu trúc của cả hai chuỗi là giống nhau, có sự khớp phân biệt để tạo ra sự tương quan tốt hơn với mật độ (Fig. 19A và B). Phân tích bề mặt chung Fab-protein E đề xuất rằng tất cả các vùng quyết định bổ sung (CDR) của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đều tham gia vào sự tương tác (Fig. S6C).

Bảng 1: Khớp các miền protein E DENV 1 vào mật độ cryoEM HM14c10:DENV1

Protein E trong đơn vị bất đối xứng ^a	Miền protein E	Số nguyên tử được khớp	Giá trị bản đồ trung bình ở vị trí nguyên tử trước ^b / sau khi khớp ^c	Số lượng các nguyên tử bên ngoài đường đồng mức trước ^b / sau khi khớp ^c	Biến đổi từ vị trí trước đó (Å)	Quay từ vị trí trước (°)
A	I	889	3,790 / 4,291	447 / 362	2,63	16,1
	II	1.260	4,635 / 5,212	533 / 424	2,16	3,02
	III	1.522	3,592 / 4,141	816 / 695	2,98	6,07
B	I	889	4,126 / 4,368	403 / 368	1,37	12,7
	II	1.260	4,715 / 5,359	539 / 409	2,30	4,51
	III	1.522	4,185 / 4,380	685 / 648	1,48	4,75
C	I	889	4,033 / 4,261	407 / 379	1,93	10,2
	II	1.260	4,744 / 5,098	499 / 428	1,06	7,37
	III	1.522	4,100 / 4,345	739 / 668	1,64	6,03

^a Đối với ký hiệu vị trí protein E xem Fig. 12.

^b Các miền protein E Dengue 1 đầu tiên được xếp chồng trên các vị trí protein E của cấu trúc cryoEM của virus Dengue 2 thành thực (27).

^c Sự khớp các miền protein E Dengue 1 vào bản đồ HM14c10:DENV1 cryoEM (được thiết lập ở đường đồng mức bằng 4σ) được tối ưu hóa bằng cách sử dụng chức năng khớp trong bản đồ trong thể khảm (35).

Các dấu ấn gắn kết của hai HM14c10 Fab trong đơn vị bất đối xứng không giống nhau (Fig. 12D), với 12 axit amin chung cho cả hai bề mặt chung nhưng có bốn

axit amin là đơn nhất (bảng 2). So sánh trình tự các gốc epitop giữa các thể phân lập DENV1 khác nhau cho thấy rằng hầu hết các gốc được bảo toàn (Fig. 20A), phù hợp với hoạt tính trung hòa được quan sát thấy của HM14c10. Ngược lại, các gốc này không được bảo toàn trong các typ huyết thanh DENV khác hoặc virus West Nile (WNV) (Fig. 20B).

Bảng 2. Epitop Fab HM14c10 trên protein DENV 1 E.

Fab	Phân tử protein E trong đơn vị bất đối xứng	Miền Protein E	Các gốc protein E *
HM14c10(I)	A	I	T51, L135, K136, G159, T160, T165, P166, Q167, E172, I173, T275
	A	II	N52, G274
	B	III	K310, E384, K385
HM14c10(II)	B	I	T51, Q131, Y132, G159, T160, T165, P166, Q167, E172, I173, L175, T275
	B	II	N52, G274
	C	III	L308, K310

*Các gốc chung ở cả hai epitop được liên kết bởi Fab HM14c10(I) và HM14c10(II) được thể hiện bằng cách in đậm.

Ví dụ 3: Kỹ thuật soi kính hiển vi đồng tiêu theo thời gian sống của tế bào thể hiện cơ chế trung hòa của HM14c10

Kháng thể có thể trung hòa sự nhiễm virus bằng các cơ chế đa dạng bao gồm việc ức chế sự bám dính virus hoặc sự dung hợp với màng bóng nhập bào, hoặc thông qua việc phong bế sự thay đổi cấu hình gây ra bởi virus của glycoprotein bề mặt (20, 21). Để hiểu được cơ chế trung hòa DENV1 của HM14c10, kỹ thuật soi kính hiển vi đồng tiêu theo thời gian sống của tế bào được sử dụng để theo dõi sự nhiễm vào các tế bào này DENV sống, được gắn chất phát huỳnh quang (22) (Fig. 13 và 21A). Khi các tế bào BHK được ủ với DENV1 và Mab đối chứng isotyp (không gắn kết DENV), virus kết hợp lại trong nhiều khoang nội bào chủ yếu là quanh nhân (Fig. 14A(a)). Nồng độ trung hòa của HM4G2 gây ra sự hình thành của các khối kết tụ virus trong không gian ngoại bào nhưng chúng cũng được nhập nội thành công, xác nhận rằng HM4G2 không ức chế sự bám dính /sự nhập nội virus (Fig. 13A(b)). Ngược lại, HM14c10 gây ra sự hình thành các khối kết tụ nhỏ hơn, nhưng phong bế sự bám dính

một cách hiệu quả, với hầu hết các hạt virus nhỏ vẫn còn trong không gian ngoại bào sau một giờ (Fig. 13A(c)). HM4G2 làm trễ sự tích tụ của virus nội bào so với đối chứng isotyp (Fig. 13B, các panen trên và giữa). Phức hợp HM14c10:DENV1 không thể đi vào tế bào, nhưng có thể được nhìn thấy lệch ra khỏi bề mặt của chúng (Fig. 13B, panen dưới). Mức độ DENV1 phát huỳnh quang được nhập nội trong cả ba điều kiện được định lượng (Fig. 13C). Các số liệu này đề xuất rằng kiểu ức chế cơ bản DENV1 bởi HM14c10 là thông qua việc phong bế sự bám dính virus với các tế bào chủ.

Ví dụ 4: HM14c10 biểu hiện hoạt tính phòng bệnh và điều trị mạnh trên *in vivo*

DENV không phải là yếu tố gây bệnh tự nhiên ở loài gặm nhấm miễn dịch bình thường, nó có thể cảm ứng virus huyết phụ thuộc liều ở chuột AG129 thiếu hụt thụ thể đối với typ I/II IFN. Các con chuột này được tiêm DENV1 không biến đổi dưới da (kiểu I, Fig. 21B(a)) hoặc trong màng bụng (kiểu II, Fig. 21B(b)) sau đó virus huyết được định lượng 3 đến 4 ngày tương ứng sau đó (20). Hai thể phân lập lâm sàng DENV1, thể hiện các kiểu gen khác nhau (EHI-D1 kiểu gen I so với Westpac kiểu gen IV), được sử dụng để xác định hiệu quả *in vivo* của HM14c10. Ở cả hai mô hình, HM14c10 ngăn chặn bệnh khi được sử dụng cho chuột 24 giờ trước khi nhiễm DENV1, hoặc khi được sử dụng 48 giờ sau khi nhiễm (Fig. 13D). Nồng độ thấp nhất của HM14c10 tại đó sự giảm đáng kể virus huyết được quan sát thấy là 0,6µg mỗi con chuột (hoặc 160 pM), thể hiện hiệu lực *in vivo* mà không đạt được bởi chế phẩm điều trị kháng DENV bất kỳ khác đã được báo cáo.

Thảo luận

Các báo cáo gần đây về các đáp ứng dịch thể được gây ra do sự nhiễm DENV (23, 24) chỉ ra rằng có sự chiếm ưu thế của kháng thể mà chủ yếu phản ứng chéo typ huyết thanh DENV với hoạt tính trung hòa yếu. Mặc dù rất hiếm khi tìm thấy trong huyết thanh của người, kháng thể E-DIII được đề xuất để bảo vệ chống lại sự nhiễm DENV (23, 24) và điều này phù hợp với các nghiên cứu trên các đáp ứng kháng thể chuột với DENV (7). Kháng thể ở người đã phân tích chủ yếu có tính đặc hiệu với DI và DII của protein E của virus. Số lượng nhỏ của kháng thể đã phân tích được quan sát thấy là có gắn kết với virus nguyên vẹn, nhưng không gắn kết với protein E tái tổ hợp gợi ý về tính đặc hiệu với epitop phụ thuộc cấu trúc bậc bốn (23). Trong thử nghiệm

này, các tác giả sáng chế đã phân lập và phân tích toàn bộ kháng thể trung hòa hiệu quả kháng typ huyết thanh 1 DENV. Kháng thể này trung hòa cao ở cả hệ thống *in vitro* và *in vivo*. Do nó chỉ gắn kết với DENV1, nó không làm tăng sự nhiễm các tế bào đơn nhân tủy bởi các typ huyết thanh DENV khác.

Cấu trúc cryoEM ở độ phân giải 7Å của Fab HM14c10 được tạo phức với DENV1, đã thể hiện chi tiết sự gắn kết giữa Fab và protein E. Mức độ chi tiết không được quan sát thấy trong các cấu trúc cryoEM trước đây của các phức hợp kháng thể flavivirut. Dấu ấn của vùng HM14c10 kéo dài qua E-DIII và E-DI:E-DII từ protein E bên cạnh (Fig. 12D). Báo cáo về kháng thể người CR4354 đặc hiệu với WNV cũng ám chỉ vùng này là đích của việc gây miễn dịch (25). Mặc dù cấu trúc cryoEM của WNV được tạo phức với Fab CR4354 được phân tích đến độ phân giải thấp hơn (độ phân giải 14Å) (Fig. 22A), việc khớp cấu trúc tinh thể Fab CR4354 tạo ra cấu trúc phân giải giả nguyên tử. Điều này cho phép nhận biết của các gốc tương tác. So sánh epitop CR4354 trên WNV và epitop HM14c10 trên DENV1 (Fig. 22B) đã thể hiện rằng CR4354 có tỷ lệ dấu ấn lớn hơn trên E-DIII trong khi đó HM14c10 có hầu hết các gốc tương tác trên E-DI. So sánh trình tự của các epitop đã thể hiện rằng chỉ khoảng 20% CR4354 trùng với epitop HM14c10, và các gốc trùng hầu như không được bảo toàn (Fig. 22C).

Mặc dù epitop CR4354 và HM14c10 không giống nhau, sự gắn kết của các kháng thể này nên giữ các protein E lân cận với nhau nhờ đó phong bế cấu trúc virut và ngăn ngừa sự thay đổi cấu hình cần thiết để gây nhiễm hữu hiệu, tức là, sự bám dính virut với thụ thể vật chủ và sự dung hợp trong con đường nhập bào tế bào chủ. Kỹ thuật soi kính hiển vi đồng tiêu chụp ảnh trực tiếp theo thời gian sống của tế bào thể hiện rằng HM14c10 ức chế sự gắn bám của DENV với tế bào chủ. Ngược lại CR4354 được chỉ ra là ức chế ưu tiên sự dung hợp WNV gợi ý rằng việc gắn đích vùng này bằng kháng thể gây ra nhiều hơn một cơ chế ức chế.

Các protein bề mặt của DENV được gợi ý là trải qua sự thay đổi không đổi về điều kiện sinh lý học - được gọi là “hô hấp” (21). Có thể là việc hô hấp có thể đóng vai trò tạo điều kiện thuận lợi cho sự gắn bám của virut với các tế bào. Do HM14c10 liên kết chéo bề mặt protein E, sau đó nó có thể ức chế sự gắn bám bằng cách ngăn cản các protein bề mặt trải qua sự hô hấp. Theo cách khác, E-DIII đã được chỉ ra là quan trọng

với sự gắn bám tế bào chủ, sự gắn kết của HM14c10 với E-DIII do đó có thể gây cản trở quá trình này về mặt không gian. HMAb CR4354, mặc dù việc gắn kết với vùng tương tự như HM14c10, không ức chế sự gắn bám WNV. Điều này ám chỉ rằng WNV gây bệnh viêm não và DENV gây ra chứng sốt rét có chung quyết định gắn kết thụ thể giống nhau.

HMAb CR4354 được chỉ ra là ngăn ngừa sự dung hợp của virus với màng bóng nhập bào ở độ pH thấp (25). Do HM14c10 cũng gắn kết chéo các protein E lân cận, khả năng HM14c10 có thể ức chế sự tái sắp xếp của các cấu trúc E dimer thành trimer trong quá trình dung hợp không thể bị loại trừ. Khả năng ức chế cả sự gắn kết thụ thể và sự dung hợp thụ thể có thể giải thích hiệu quả *in vivo* khác thường của HM14c10.

Hầu hết protein E của flavivirus có cấu trúc bậc bốn tương tự dựa trên mức độ tương đồng cao giữa các cấu trúc cryoEM của WNV (26) và DENV (27). Do đó, tất cả protein E bề mặt của flavivirus có thể trải qua sự tái sắp xếp cấu trúc giống nhau trong chu kỳ gây nhiễm của chúng. Các kháng thể gắn đích các vùng tương tự với HM14c10 hoặc CR4354 trong các flavivirus khác do đó có thể được bảo vệ. Do kháng thể HM14c10 và CR4354 chỉ là hai kháng thể được phân tích có hoạt tính gắn kết này và đều có nguồn gốc từ người, điều này chỉ ra rằng loại epitop này có thể là yếu tố quyết định cho khả năng gây miễn dịch của flavivirus theo cách khái quát hóa. Điều này có mối liên quan quan trọng để thiết kế và đánh giá các vaccine tương lai.

Cuối cùng, vì HM14c10 có profin trung hòa mạnh kháng hầu hết các thể phân lập DENV1 lâm sàng và có hiệu quả *in vivo* vượt trội, kháng thể này là lựa chọn điều trị tốt để điều trị cho bệnh nhân bị nhiễm DENV1.

Mặc dù các khía cạnh cụ thể của sáng chế được mô tả và được minh họa, các khía cạnh này được xem là chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế và không làm giới hạn sáng chế như được hiểu theo phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Tất cả các công bố đơn và đơn yêu cầu cấp patent được nêu trong bản mô tả này được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn cho tất cả các mục đích giống như mỗi công bố đơn hoặc đơn yêu cầu cấp patent riêng lẻ được chỉ ra một cách cụ thể và riêng biệt là được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn cho tất cả các mục đích.

Mặc dù sáng chế trên đây được mô tả chi tiết hơn nhằm mục đích minh họa và

lấy ví dụ nhằm mục đích để hiểu rõ ràng, nhưng rõ ràng rằng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này là nhờ bản mô tả sáng chế nhiều thay đổi và biến đổi có thể được tạo ra, mà không vượt ra khỏi phạm vi hoặc tinh thần của phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh của chúng mà gắn kết với protein vỏ có typ huyết thanh 1 của virus Dengue hoặc mảnh của chúng, trong đó kháng thể là kháng thể người có hoạt tính trung hòa mà gắn kết chéo hai protein E trong virus, trong đó sự gắn kết chéo hai protein E bao gồm gắn kết với DI và vùng khớp nối giữa DI và II trên một protein E và DIII của protein E lân cận.

2. Kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh của chúng được chọn từ nhóm bao gồm: (a) phân tử globulin miễn dịch nguyên vẹn; (b) scFv; (c) mảnh Fab; (d) F(ab')₂; và (e) Fv được liên kết disulfua.

3. Kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh của chúng bao gồm miền hằng định globulin miễn dịch chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm: (a) miền hằng định IgM ở người; (b) miền hằng định IgG1 ở người; (c) miền hằng định IgG2 ở người; (d) miền hằng định IgG3 ở người; (e) miền hằng định IgG4 ở người; và (f) miền hằng định IgA1/2 ở người.

4. Kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh của chúng bao gồm:

chuỗi nặng bao gồm ít nhất một CDR được chọn từ nhóm bao gồm các CDR có trình tự axit amin SYGMH, VIWYDGSKTYYGDSVKG hoặc GIAGGWAFW.

5. Kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh của chúng bao gồm:

chuỗi nặng bao gồm ba CDR có trình tự axit amin SYGMH, VIWYDGSKTY YGDSVKG và GIAGGWAFW.

6. Kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh của chúng bao gồm:

chuỗi nặng có các trình tự axit amin

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEW
VAVIWYDGSKTYYGDSVKGRFTISKDNSKKMVNLQMDSLGVEDTAFY
YCARGIAGGWAFWIGIDLWGQGTLLTVSS.

7. Kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh của chúng bao gồm:

khung chuỗi nặng của IGHV1-2*02 và ít nhất một trong số các CDR có các trình tự axit amin SYGMH, VIWYDGSKTTYGDSVKG hoặc GIAGGWAFW.

8. Kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh của chúng bao gồm:

miền hằng định globulin miễn dịch chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm: (a) miền hằng định kappa Ig ở người; và (b) miền hằng định lambda Ig ở người.

9. Kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh của chúng bao gồm:

chuỗi nhẹ bao gồm ít nhất một CDR được chọn từ nhóm bao gồm các CDR có các trình tự axit amin RASQNVYSYLG, GVTSRAT hoặc QQYAG.

10. Kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh của chúng bao gồm:

chuỗi nhẹ bao gồm ba CDR có các trình tự axit amin RASQNVYSYLG, GVTSRAT và QQYAG.

11. Kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh của chúng bao gồm:

chuỗi nhẹ có trình tự axit amin

DVVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQNVYSYLGWYQHKPGRSPRLLIF
GVTSRATGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAGSAYTF
GQGTKVEIKR

hoặc

DIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQNVYSYLGWYQHKPGRSPR
LLIFGVTSRATGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYA
GSAYTFGQGTKVEIKR.

12. Kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh của chúng bao gồm:

khung chuỗi nhẹ của IGKV3-20*01 và ít nhất một trong số các CDR có trình tự axit amin RASQNVYSYLG, GVTSRAT hoặc QQYAG.

13. Kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó kháng thể này:

gắn kết với virus Dengue có tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể có trình tự axit amin chuỗi nặng

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEW
VAVIWYDGSKTYYGDSVKGRFTISKDNSKKMVNLQMDSLGVEDTAFY
YCARGIAGGWAFWGIDLWGQGTLVTVSS;

và trình tự axit amin chuỗi nhẹ

DVVMQTQSPGTLSPGERATLSCRASQNVYSYLGWYQHKPGRSPRLIF
GVTSRATGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAGSAYTF
GQGTKVEIKR

hoặc

DIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQNVYSYLGWYQHKPGRSPR
LLIFGVTSRATGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYA
GSAYTFGQGTKVEIKR.

14. Kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó kháng thể này:

là kháng thể có trình tự axit amin chuỗi nặng

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEW
VAVIWYDGSKTYYGDSVKGRFTISKDNSKKMVNLQMDSLGVEDTAFY
YCARGIAGGWAFWGIDLWGQGTLVTVSS;

và trình tự axit amin chuỗi nhẹ

DVVMQTQSPGTLSPGERATLSCRASQNVYSYLGWYQHKPGRSPRLIF
GVTSRATGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAGSAYTF
GQGTKVEIKR

hoặc

DIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQNVYSYLGWYQHKPGRSPR
 LLIFGVTSRATGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYA
 GSAYTFGQGTKVEIKR.

15. Kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó kháng thể hoặc mảnh của chúng gắn kết với kháng nguyên với hằng số ái lực (K_D) nhỏ hơn 1×10^{-8} M.

16. Kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó kháng thể hoặc mảnh của chúng gắn kết với kháng nguyên với hằng số ái lực (K_D) nhỏ hơn 1×10^{-9} M.

17. Kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, trong đó kháng thể này có nguồn gốc từ tế bào B của bệnh nhân đã phục hồi sau khi nhiễm virus Dengue.

18. Dược phẩm bao gồm kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17 và chất mang dược dụng có hiệu quả làm giảm hoặc ngăn ngừa bệnh nhiễm virus Dengue ở đối tượng.

19. Dược phẩm theo điểm 18, trong đó dược phẩm này còn bao gồm chất thứ hai.

20. Dược phẩm theo điểm 19, trong đó chất thứ hai là thuốc kháng virus hoặc thuốc giảm đau.

21. Phương pháp sản xuất kháng thể trung hòa hoặc mảnh của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17 kháng virus Dengue, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) làm bất tử tế bào B thu được từ cá thể mà vừa khỏi bệnh nhiễm virus Dengue, và

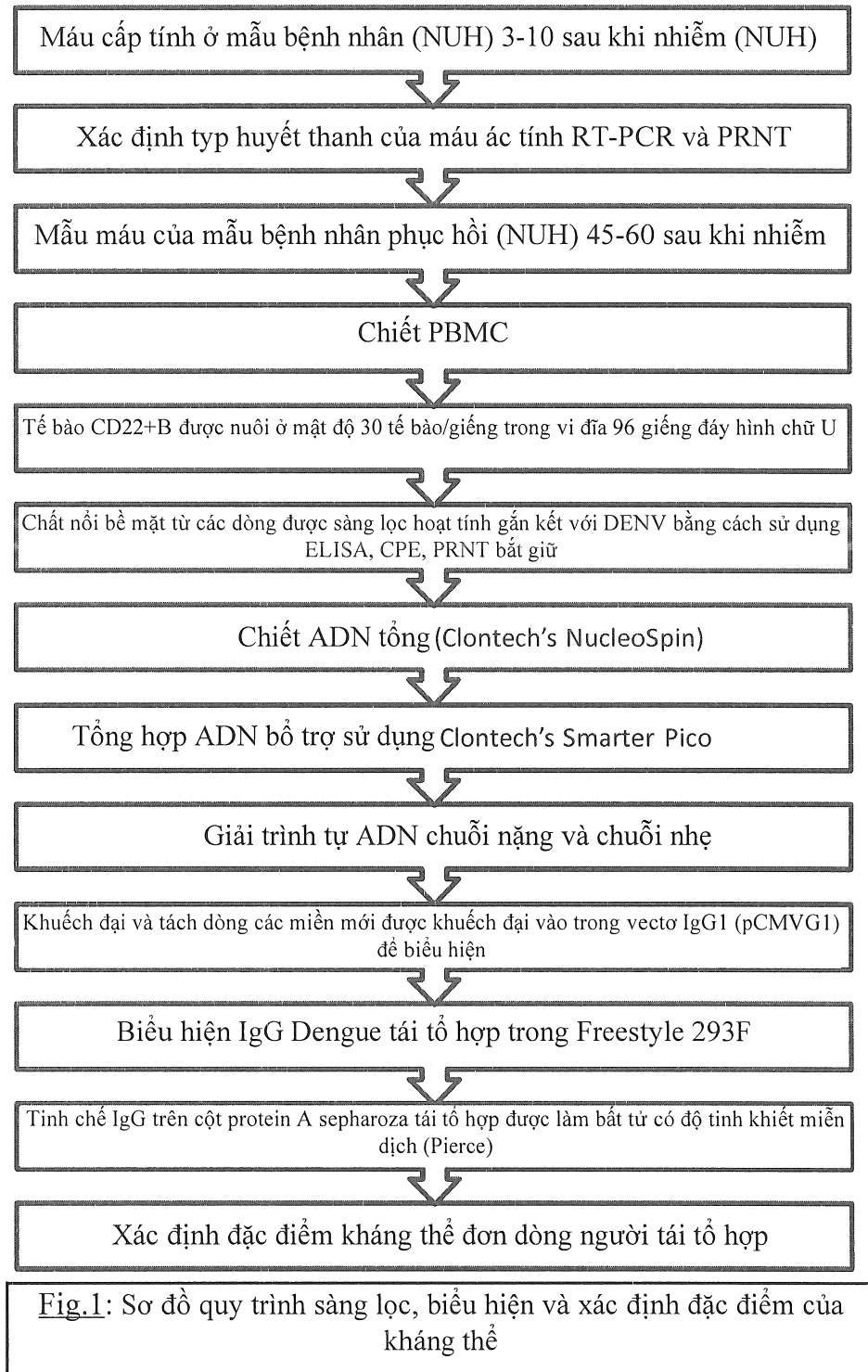
(b) thử nghiệm tế bào B được làm bất tử từ bước (a) về tác dụng trung hòa virus Dengue.

22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó tế bào B là CD 22+.

23. Phương pháp theo điểm 21, trong đó tế bào B được làm bất tử bằng EBV.

24. Axit nucleic phân lập mã hóa kháng thể hoặc mảnh của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17.

25. Vectơ biểu hiện bao gồm axit nucleic theo điểm 24.
26. Tế bào chủ bao gồm vectơ biểu hiện theo điểm 25.
27. Tế bào chủ theo điểm 26 trong đó tế bào chủ là tế bào vi khuẩn.
28. Tế bào chủ theo điểm 26, trong đó tế bào chủ là tế bào nhân chuẩn.
29. Tế bào chủ theo điểm 26, trong đó tế bào chủ là tế bào động vật có vú.



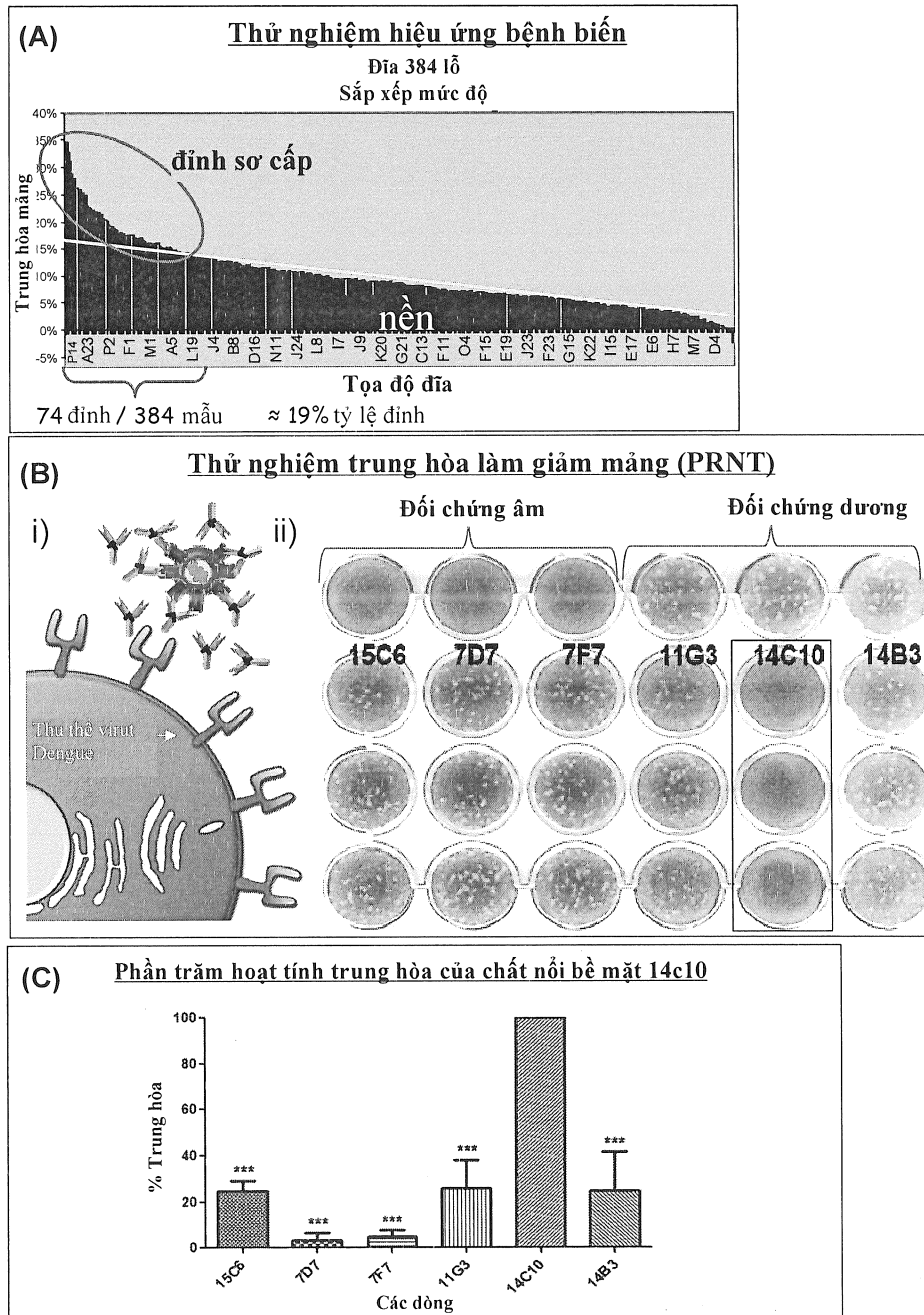
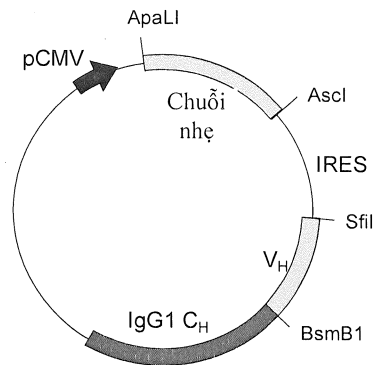


Fig.2: Sàng lọc chất nổi bề mặt từ các dòng tế bào B được làm bất tử bằng thử nghiệm CPE và PRNT

3/24

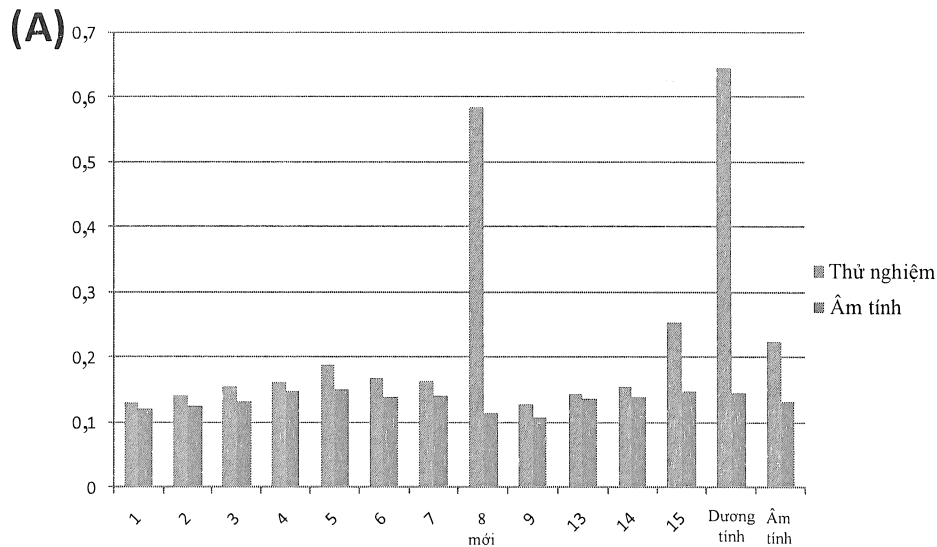
(A)



(B)

Dòng	Trình tự chuỗi nhẹ	Trình tự chuỗi nặng
1	DIVMTQSP SL SVTPGQPASISCRSSQSL LHSDGRT SLDWFLLRPGQFPQVKIS ELSRRES GVPDRVSGSG SGTDFTLKISRGEAEDVRAFYCY Q YIVGRSAKGPS WRSN	QVQLVQSGAEVKKPGT SVK VSCASGYNFTDYYVH WVRQ APGQGLEWM AWINPNSGGSKYAQMFQGR ISL TRDT SISTA YLELFSLTSDDTAVYYCAD LTAEDVW GGGTLTVTVSS
2	DIVMTQSP SL SVTPGQPASISCRSSQSL LHSDGRT SLDWFLLRPGQFPQVKIS ELSRRES GVPDRVSGSG SGTDFTLKISRGEAEDVRAFYCY Q YIVGRSAKGPS WRSN	EVQLVESGGGVWQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMH WVR QAPGKGLEWVA VIWYD SGSKTY YGDSV KGRFTISKD NSKK MVNLQMDSLGVEDTAFYYCARG AGGWA FWGIDLWGQGT LTVSS
3	DIVMTQSP SL SVTPGQPASISCRSSQSL LHSDGRT SLDWFLLRPGQFPQVKIS ELSRRES GVPDRVSGSG SGTDFTLKISRGEAEDVRAFYCY Q YIVGRSAKGPS WRSN	EVQLVQSGGGVWRPGKSLRLSCAASGFTFD DDY GMSW VR QAPGKGLEWVA VIWYD SGSKTY YGDSV KGRFTISK DNSKK SLYLQMNSLRAEDTAFYYCAREY GSGSYINWF DPWGQGT LTVSS
4	DIQMTQSP SL SVTPGEPASISCRSSQSL LHTNGNN YLDWYLQKPGQSPQLLIY LGSNRASG VPDRFSGS SGTDFTLKISRVEAEDVGYVC QALQ TKTTFGQ GTKLEIKR	QVQLVQSGAEVKKPGT SVK VSCASGYNFTDYYVH WVRQ APGQGLEWM AWINPNSGGSKYAQMFQGR ISL TRDT SISTA YLELFSLTSDDTAVYYCAD LTAEDVW GGGTLTVTVSS
5	DIQMTQSP SL SVTPGEPASISCRSSQSL LHTNGNN YLDWYLQKPGQSPQLLIY LGSNRASG VPDRFSGS SGTDFTLKISRVEAEDVGYVC QALQ TKTTFGQ GTKLEIKR	EVQLVESGGGVWQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMH WVR QAPGKGLEWVA VIWYD SGSKTY YGDSV KGRFTISK DNSKK MVNLQMDSLGVEDTAFYYCARG AGGWA FWGIDLWGQGT LTVSS
6	DIQMTQSP SL SVTPGEPASISCRSSQSL LHTNGNN YLDWYLQKPGQSPQLLIY LGSNRASG VPDRFSGS SGTDFTLKISRVEAEDVGYVC QALQ TKTTFGQ GTKLEIKR	EVQLVQSGGGVWRPGKSLRLSCAASGFTFD DDY GMSW VR QAPGKGLEWVA VIWYD SGSKTY YGDSV KGRFTISK DNSKK SLYLQMNSLRAEDTAFYYCAREY GSGSYINWF DPWGQGT LTVSS
7	DIVMTQSPGTL SL SPGERATLSC RASQNV SYLGW YQHKGPRSPRLIF GVTSRATG VPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYC QQYAG SAYTFGQGTKVEI K	QVQLVQSGAEVKKPGT SVK VSCASGYNFTDYYVH WVRQ APGQGLEWM AWINPNSGGSKYAQMFQGR ISL TRDT SISTA YLELFSLTSDDTAVYYCAD LTAEDVW GGGTLTVTVSS
8*	DIVMTQSPGTL SL SPGERATLSC RASQNV SYLGW YQHKGPRSPRLIF GVTSRATG VPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYC QQYAG SAYTFGQGTKVEI K	EVQLVESGGGVWQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMH WVR QAPGKGLEWVA VIWYD SGSKTY YGDSV KGRFTISK DNSKK MVNLQMDSLGVEDTAFYYCARG AGGWA FWGIDLWGQGT LTVSS
9	DIVMTQSPGTL SL SPGERATLSC RASQNV SYLGW YQHKGPRSPRLIF GVTSRATG VPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYC QQYAG SAYTFGQGTKVEI K	EVQLVQSGGGVWRPGKSLRLSCAASGFTFD DDY GMSW VR QAPGKGLEWVA VIWYD SGSKTY YGDSV KGRFTISK DNSKK SLYLQMNSLRAEDTAFYYCAREY GSGSYINWF DPWGQGT LTVSS
10	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL HSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESG VPDRFSG SGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC QQYSA PHKFG QGKLEIK	QVQLVQSGAEVKKPGT SVK VSCASGYNFTDYYVH WVRQ APGQGLEWM AWINPNSGGSKYAQMFQGR ISL TRDT SISTA YLELFSLTSDDTAVYYCAD LTAEDVW GGGTLTVTVSS
11	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL HSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESG VPDRFSG SGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC QQYSA PHKFG QGKLEIK	EVQLVESGGGVWQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMH WVR QAPGKGLEWVA VIWYD SGSKTY YGDSV KGRFTISK DNSKK MVNLQMDSLGVEDTAFYYCARG AGGWA FWGIDLWGQGT LTVSS
12	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL HSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESG VPDRFSG SGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC QQYSA PHKFG QGKLEIK	EVQLVQSGGGVWRPGKSLRLSCAASGFTFD DDY GMSW VR QAPGKGLEWVA VIWYD SGSKTY YGDSV KGRFTISK DNSKK SLYLQMNSLRAEDTAFYYCAREY GSGSYINWF DPWGQGT LTVSS

Fig.3: Xác định và biểu hiện tái tổ hợp khung chuỗi nhẹ và chuỗi nặng kháng thể từ dòng tế bào B 14c10



(B)

Chuỗi nặng : IGHV1-2*02

```

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG 70
E V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A

CGTCTGGATTTCAGCTTCAGCAGTTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCCCAAGGGGCTGGAGTG 140
A S G F S F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E W

GGTGGCAGTGATATGGTATGATGGAAGTAAACGTATTATGGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATC 210
V A V I W Y D G S K T Y Y G D S V K G R F T I

TCCAAAGACAATTCCAAGAAAATGGTGAATCTCCAATGGACAGCCTGGGAGTCGAGGACACGGCTTTT 280
S K D N S K K M V N L Q M D S L G V E D T A F

ATTACTGTGCAAGAGGGATAGCCGGTGGCTGGGCGTTTTTGGGGATTGACCTCTGGGGCCAGGGAACCT 350
Y Y C A R G I A G G W A F W G I D L W G Q G T L

GGTCACCGTCTCCTCA 366
V T V S S

```

Chuỗi nhẹ : IGKV3-20*01

```

GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCA 70
D V V M T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C

GGGCCAGCCAGAATGTTTACAGCTACTTAGGCTGGTACCAGCACAAACCTGGCCGGTCTCCCAGGCTCCT 140
R A S Q N V Y S Y L G W Y Q H K P G R S P R L L

CATCTTTGGTGTCAACAGCAGGGCCACTGGCGTCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC 210
I F G V T S R A T G V P D R F S G S G S G T D

TTCACTCTCAACATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGGCGTGTACTACTGTGAGCAGTACGCTGGGT 280
F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y A G

CAGCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGT 324
S A Y T F G Q G T K V E I K R

```

Fig.4: Kháng thể tái tổ hợp số 8 từ dòng tế bào B 14c10 có hoạt tính trung hòa đối với typ huyết thanh 1 của virus Dengue

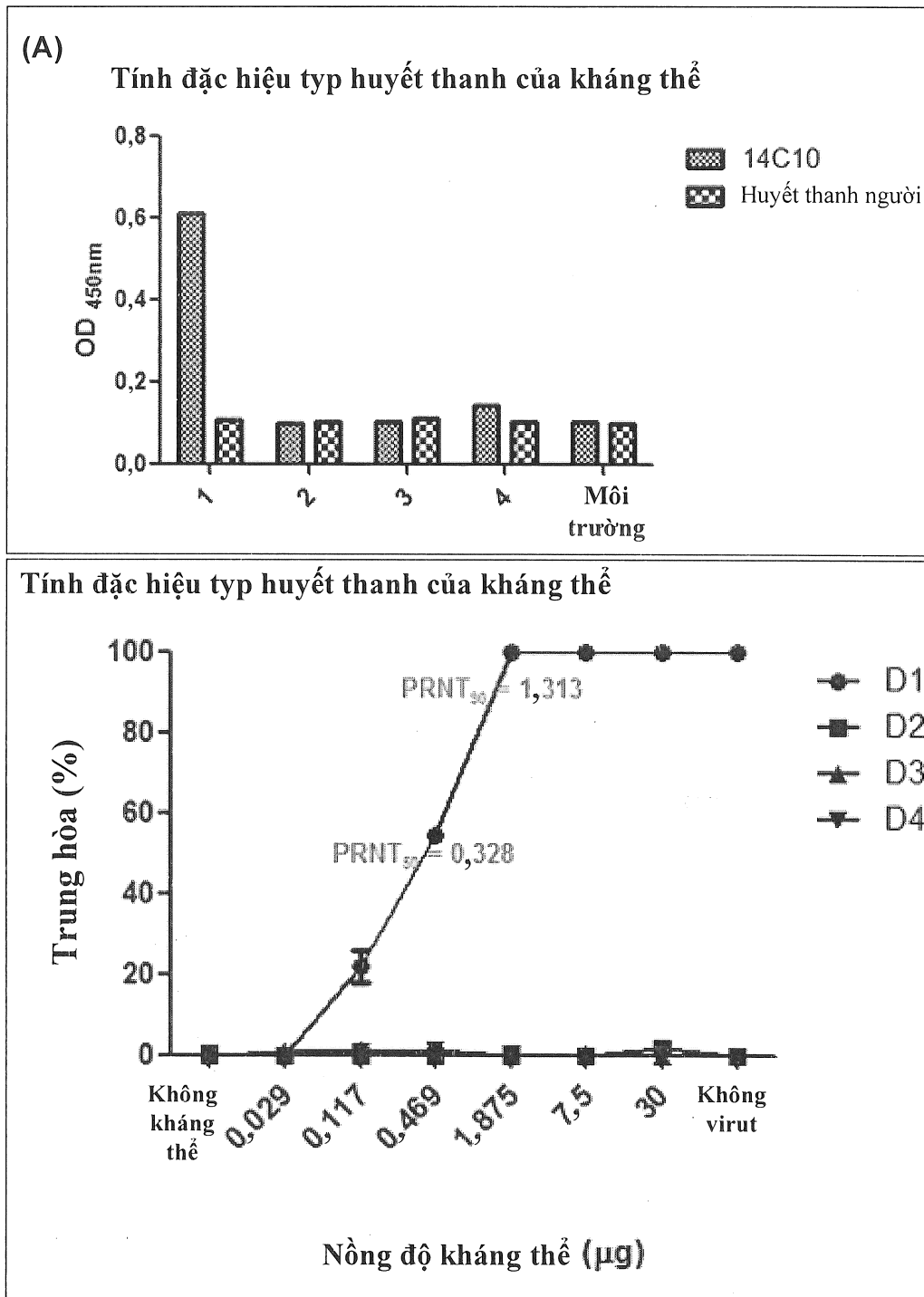


Fig.5: Tính đặc hiệu của typ huyết thanh của kháng thể 14C10.8 tái tổ hợp được thử nghiệm bằng PRNT và ELIZA

(C)

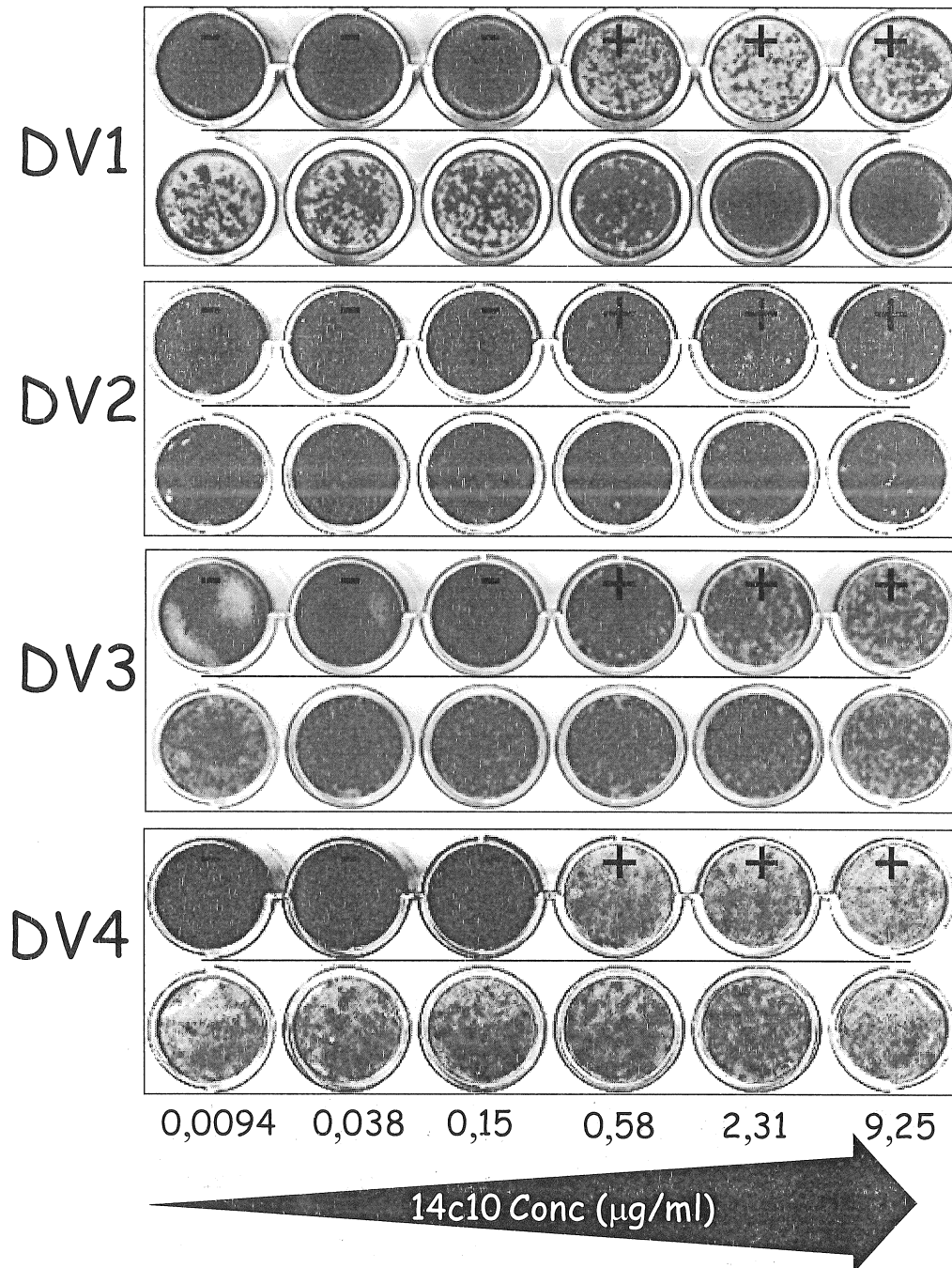


Fig.5 tiếp: Tính đặc hiệu của typ huyết thanh của kháng thể 14C10.8 tái tổ hợp được thử nghiệm bằng PRNT và ELIZA

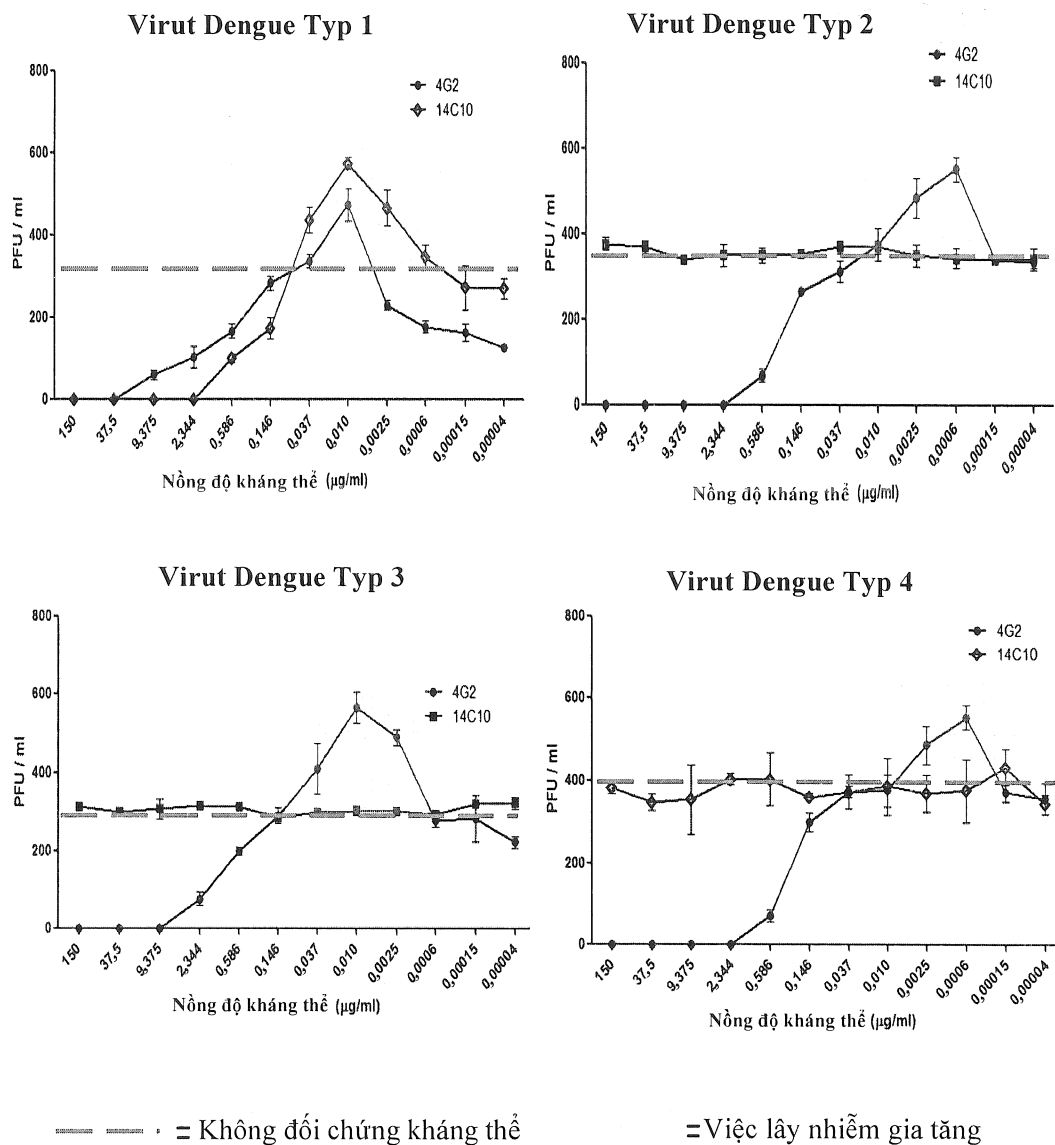
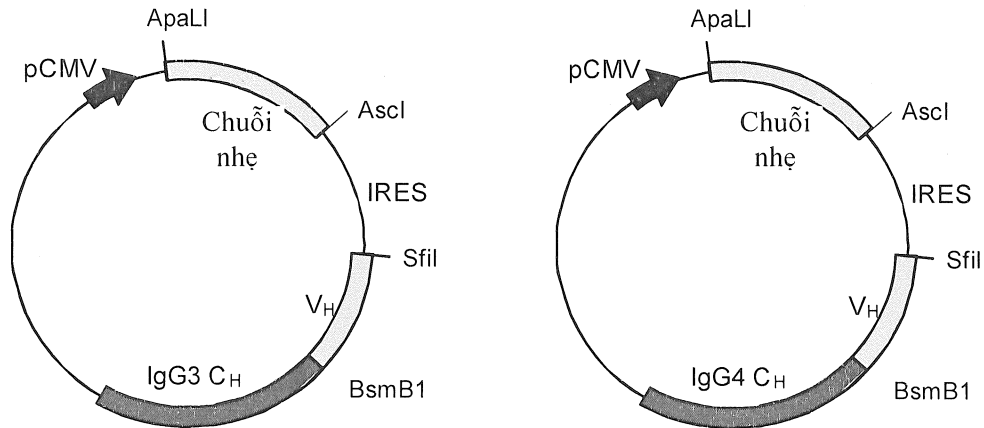


Fig.6: Sự tăng cường phụ thuộc kháng thể *in vitro* của typ huyết thanh 1 2 3 4 virut Dengue của tế bào K562 bởi 14c10 đối với 4G2



ADE của IgG nhóm phụ

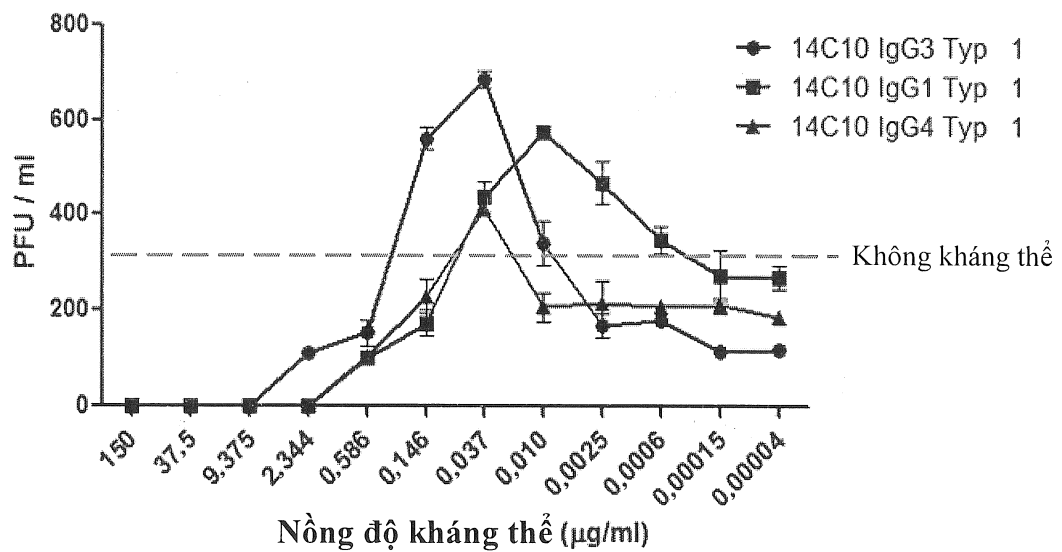


Fig.7: Sự tăng cường phụ thuộc kháng thể *in vitro* của typ huyết thanh 1 virus Dengue, sự nhiễm của tế bào K562 bởi 14c10.8 được biểu hiện thành IgG1, IgG3 hoặc IgG4 người tái tổ hợp

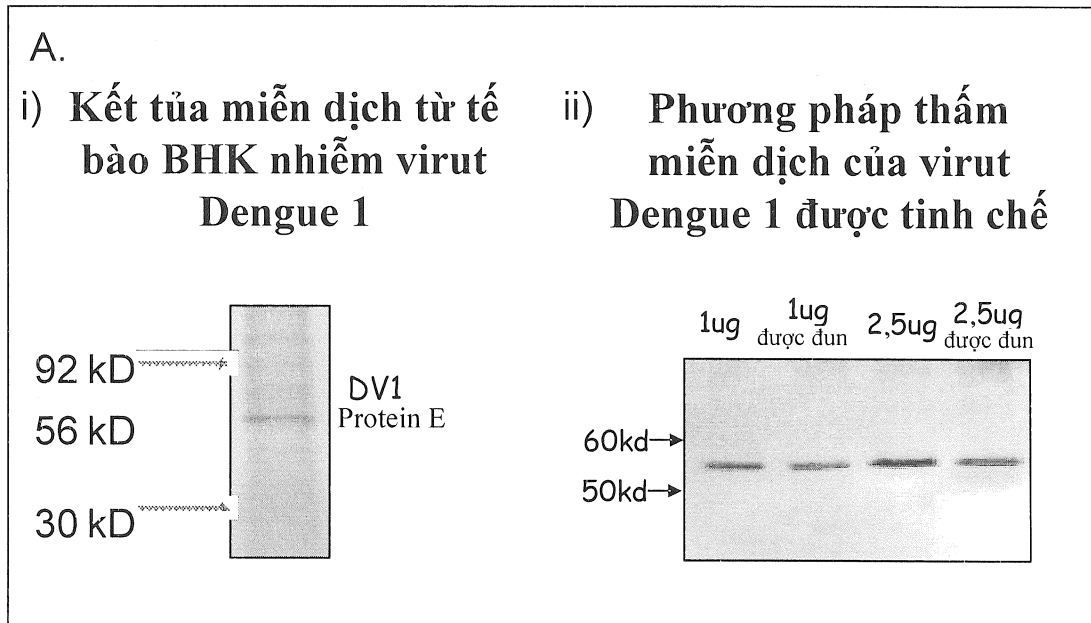


Fig.8: 14C10.8 đặc hiệu với epitop thẳng trên protein E typ huyết thanh 1 của virus Dengue

10/24

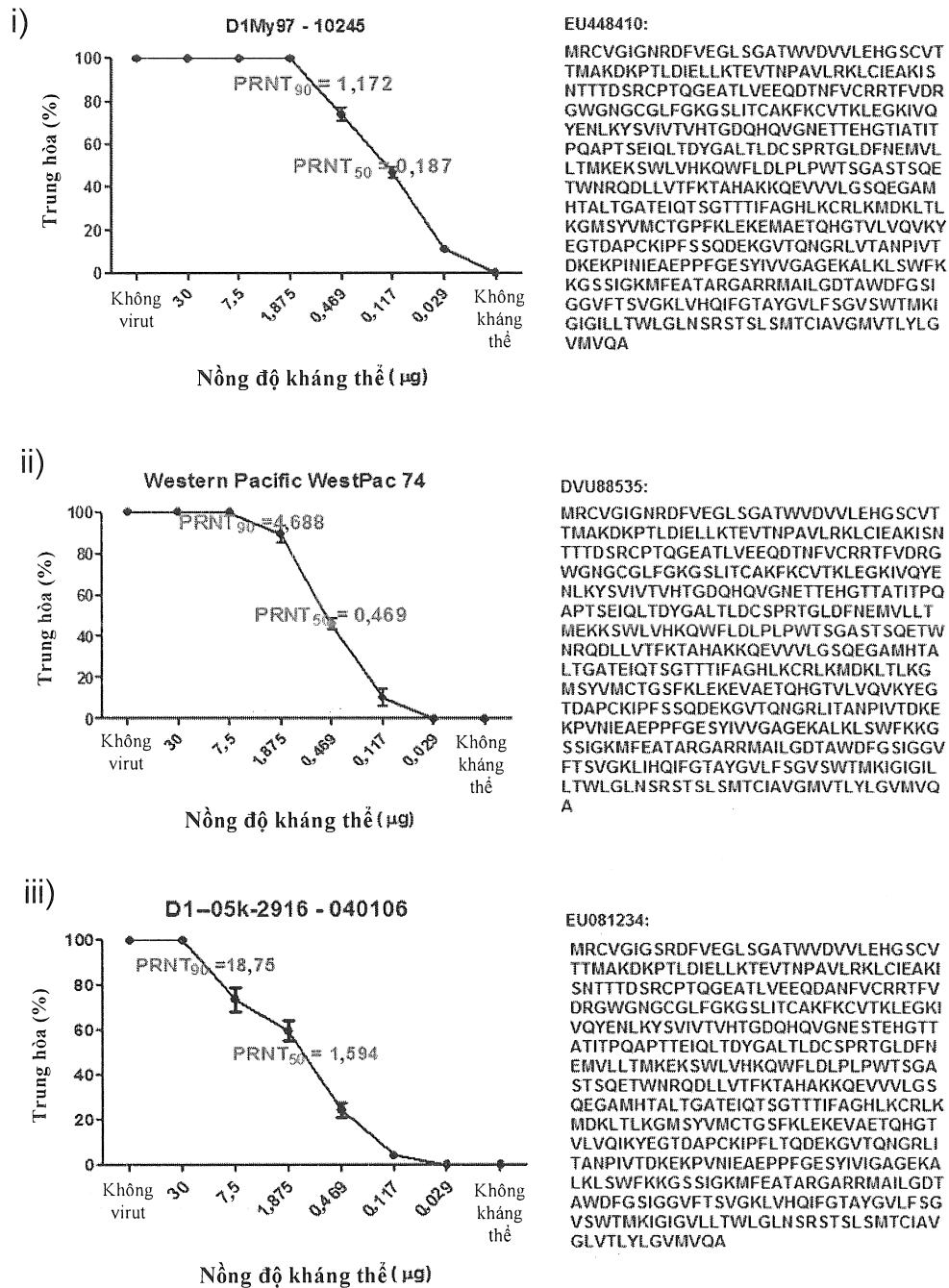
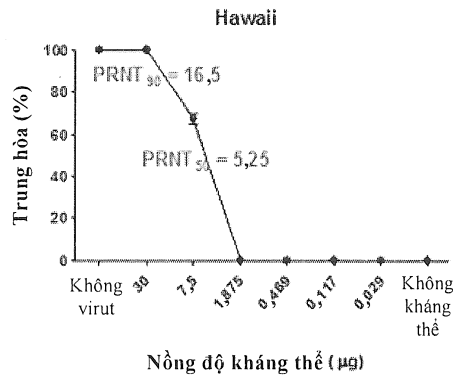


Fig.9: Hoạt tính trung hòa của 14c10 tái tổ hợp đối với các kiểu gen khác nhau

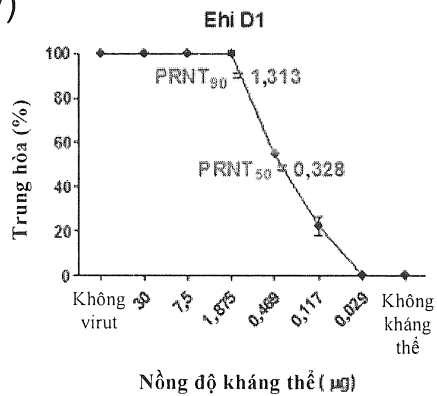
iv)



AF425619:

MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVLEHGSCVTTMAK
 DKPTLDIELLKTEVTNPAVLRLKLCIEAKISNTTDSRCPT
 QGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGS
 LITCAKFKCVTKLEGKIVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQV
 GNETTEHGTIATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTG
 LDFNEMVLLTMKEKSWLVHKQWFLDLPLPWTSGAST
 PQETWNRDILLVTFKTAHAKKQEVAVLG SQEGAMHT
 ALTGATEIQTSGTTKIFAGHLKCRCLKMDKLT LKGM SYV
 MCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVQYEGTDAPCKIPFS
 TQDEKGVTONGRILITANPIVTDKEKPVNIEAEPFGE SY
 IVVGAGEKALKLSWFKKGS SIGKMLEATARGARRMAI
 LGDTAWDFG SIGGVFTSVGKLVHQIFGTAYGVLF SGV
 SWTMKIGIGILLTWLGLNSRSA SL SMT CIAVGMVTLYL
 GVMVQA

v)



GQ357687:

MRCVGIGSRDFVEGLSGATWVDVLEHGSCVTTMA
 KDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRLKLCIEAKISNTTDSRC
 PTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRGWGNGCGLFG
 KGS LITCAKFKCVTKLEGKIVQYENLKYSVIVTVHTGD
 QHQVGNE STEHGTATITPQAPTTEIQLTDYGALTLDC
 CSPRTGLDFNEMVLLTMKEKSWLVHKQWFLDLPLP
 WTSGAST SQETWNRQDLLVTFKTAHAKKQEVVVLG
 SQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTIFAGHLKCRCLKMDK
 LTLKGM SYVMCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQIKYE
 GTDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRILITANPIVTDKEK
 VNIEAEPFGE SYVIGAGEKALKLSWFKKGS SIGKM
 FEATARGARRMAILGDTAWDFG SIGGVFTSVGKLVH
 QIFGTAYGVLF SGVSWTMKIGIGVLLTWLGLNSRST
 SL SMT CIAVGLVTLYLGVMVQA

Fig.9 tiếp theo: Hoạt tính trung hòa của 14c10 tái tổ hợp đối với các kiểu gen khác nhau

12/24

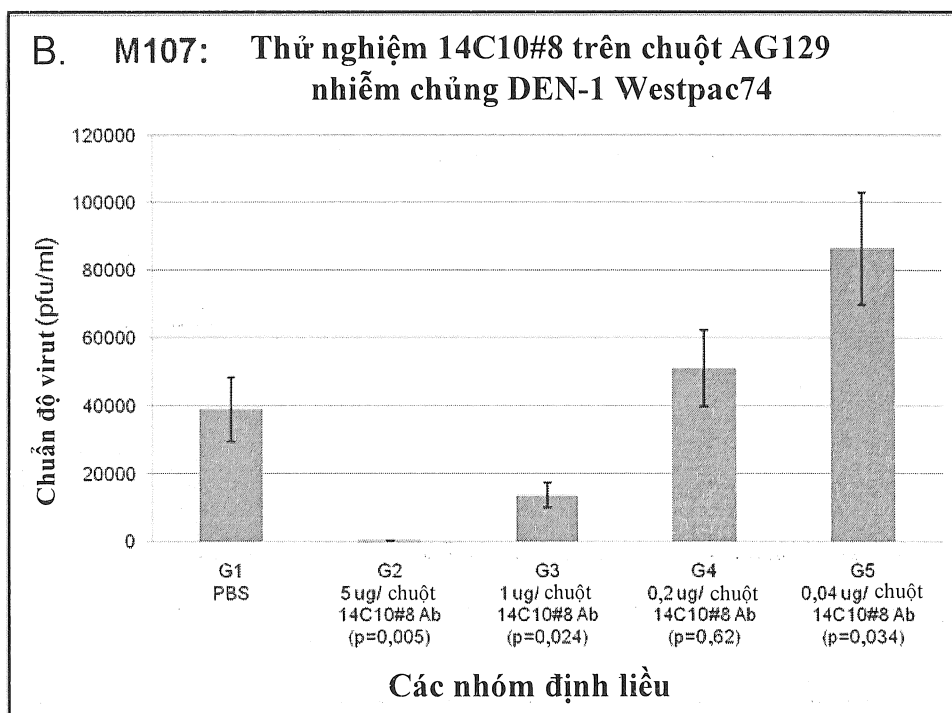
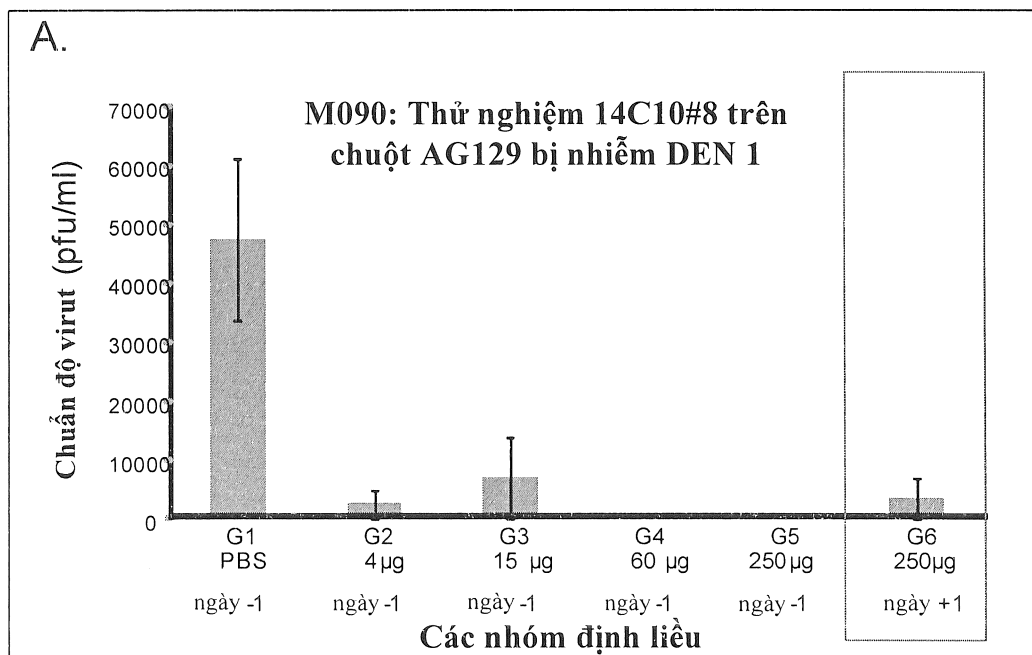


Fig.10: 14c10 có hoạt tính phòng bệnh và điều trị *in vivo*

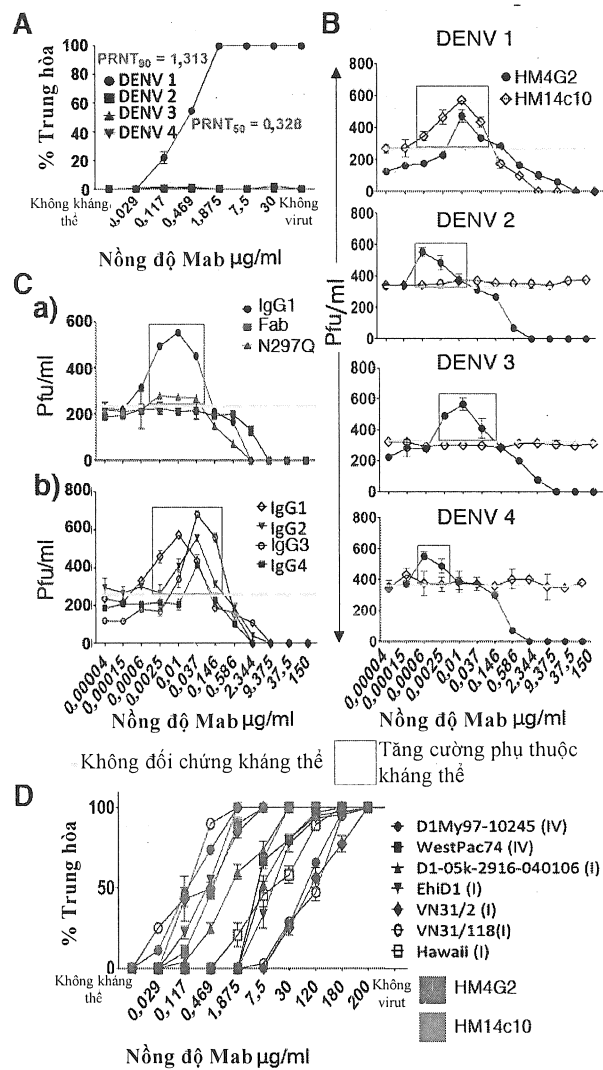


Fig. 11

14/24

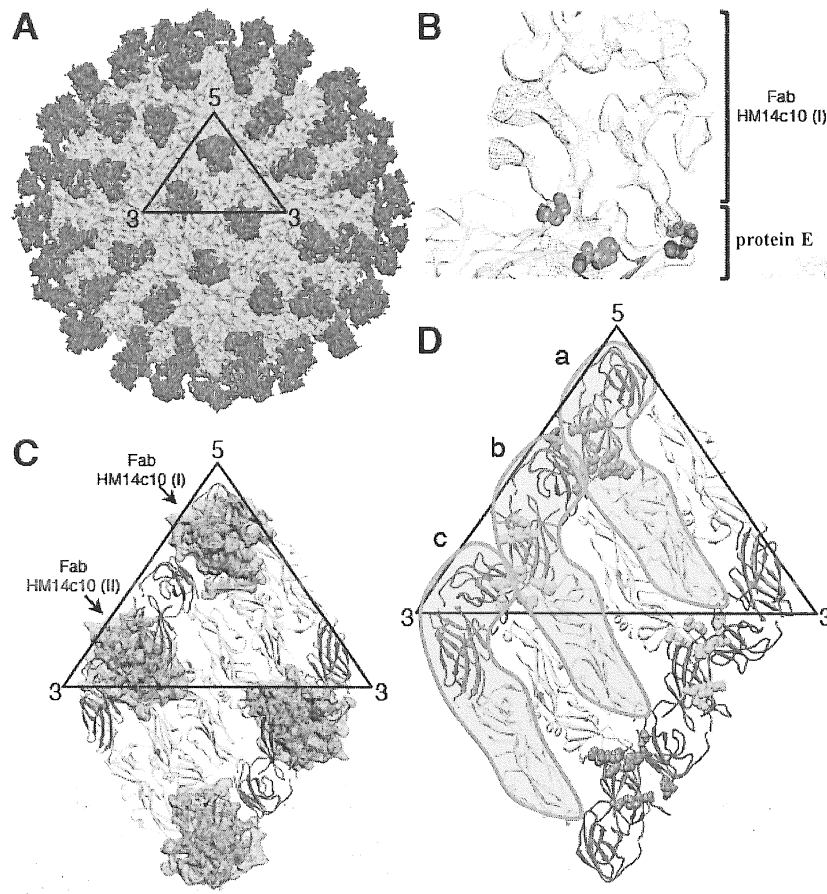


Fig. 12

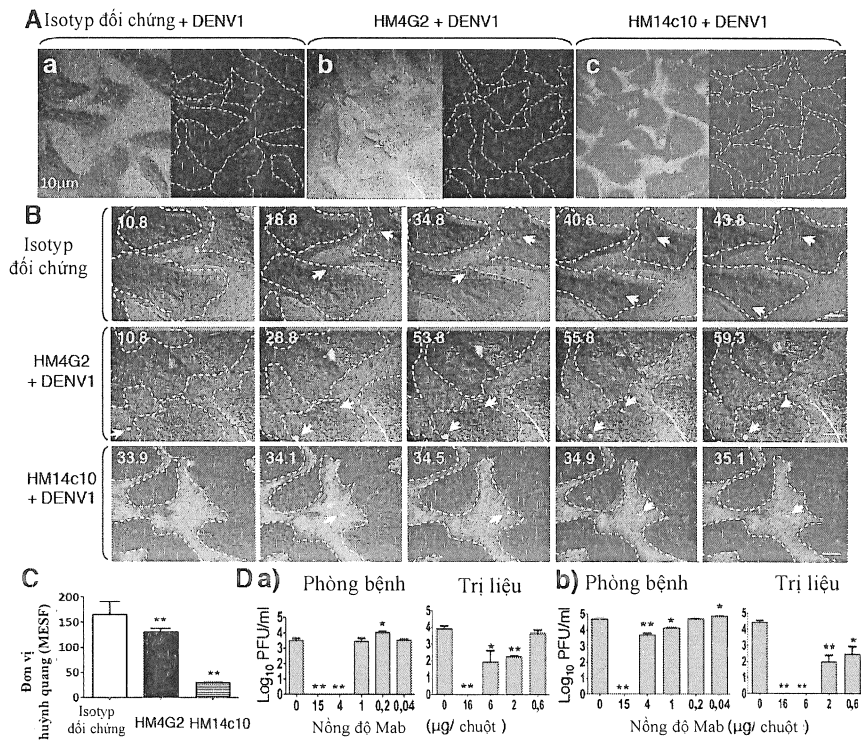


Fig. 13

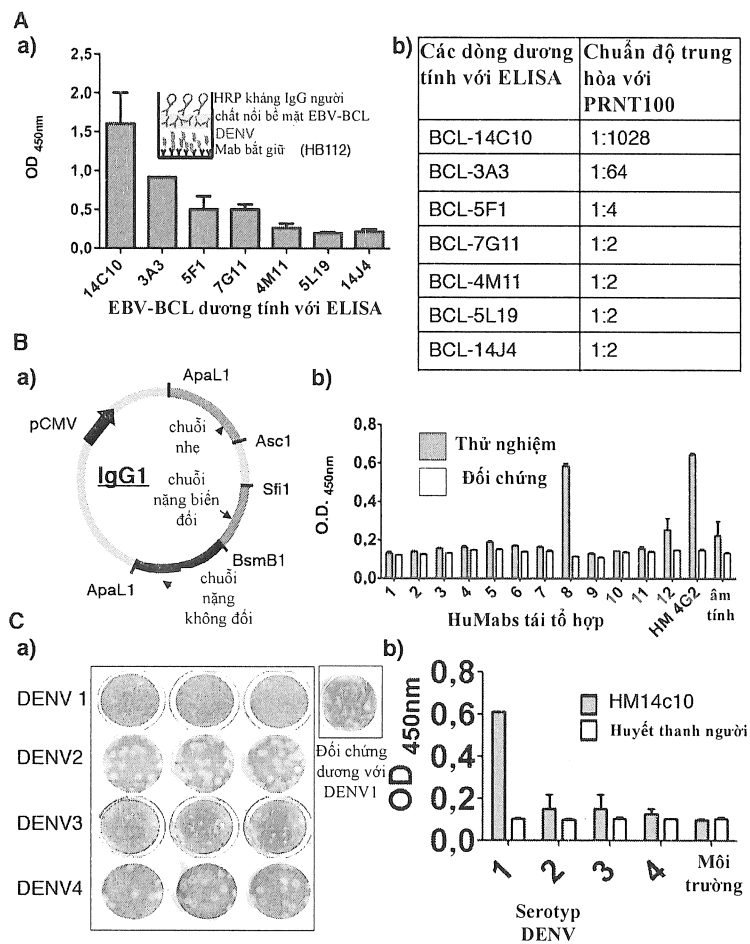


Fig.10:
Nhận biết và biểu hiện sự tái tổ hợp của kháng thể hoàn toàn của người có hoạt tính trung hòa với virus Dengue

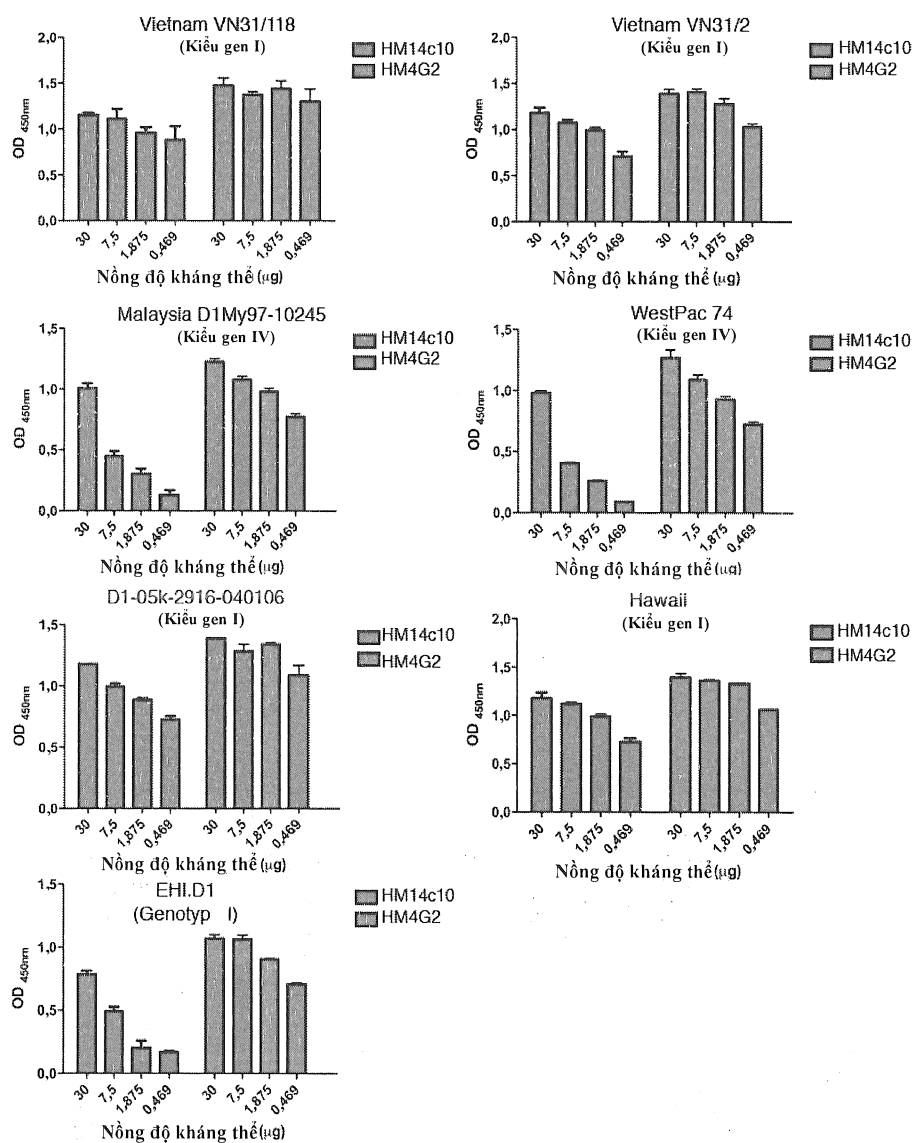


Fig.15:
HM14c10 biểu hiện hoạt tính gắn kết với nhiều thể phân lập lâm sàng DENV1

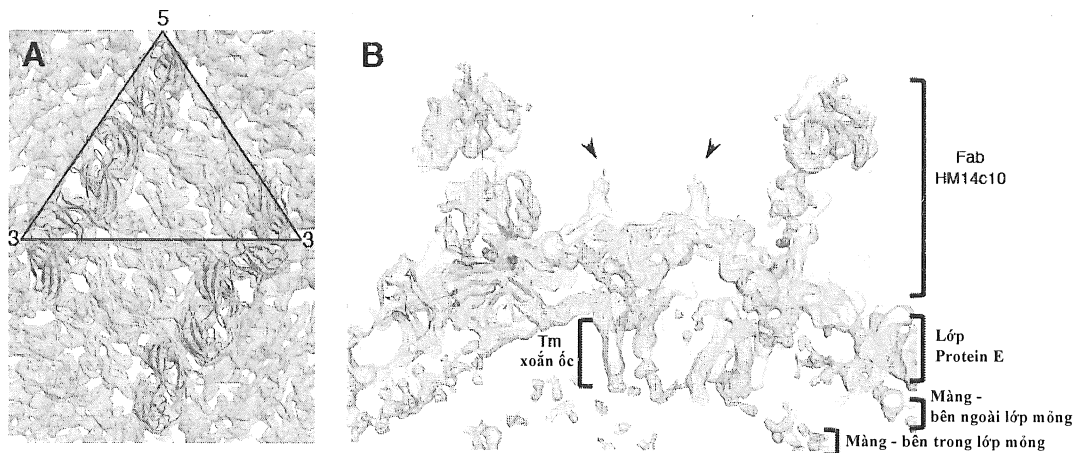


Fig.16:
Cấu trúc tinh thể sau dung hợp của protein E DENV1 trong bản đồ cryoEM của Fab HM14c10 được tạo phức với virus Dengue 1



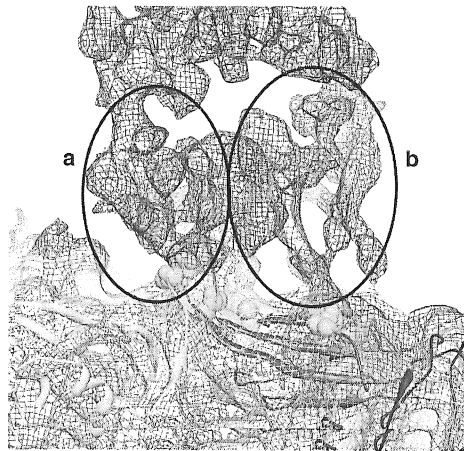
Fig.17:
Sơ đồ hình ảnh nổi của bề mặt chung gắn kết Fab HM14c10 và protein E



Fig.18:

Sự chồng chất của các vùng biến đổi của mô hình cùng loại của HM14C10 9 (màu xanh lá) với kháng thể đơn dòng người tham chiếu (PDB mã 2GHW) (màu nước biển).

Hình vẽ thể hiện mặt bên (A) và mặt bên (B) của các vùng biến đổi của kháng thể

A**B**

Vị trí Fab	^a Mật độ Fab	^b Chuỗi kháng thể	Số lượng nguyên tử được làm phù hợp/số nguyên tử bên ngoài đường đồng mức sau khi khớp	Giá trị bán độ trung bình ở vị trí nguyên tử sau khi khớp
I	a	nhẹ	834 / 584	2,077
	b	nặng	936 / 663	2,074
I	a	nặng	936 / 666	1,791
	b	nhẹ	834 / 580	2,117
II	a	nhẹ	834 / 533	2,286
	b	nặng	936 / 676	1,936
II	a	nặng	936 / 640	2,022
	b	nhẹ	834 / 629	1,909

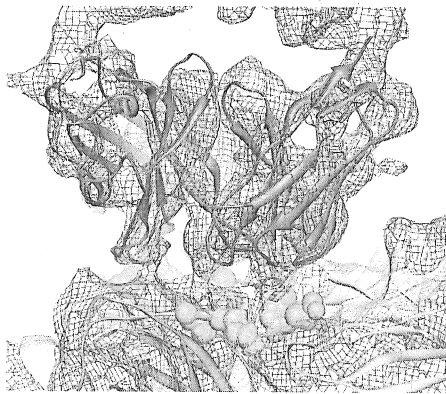
C

Fig.19:

Sự khớp của mô hình tương đồng của vùng biến đổi HM14c10 trong bản đồ mật độ cryoEM HM14c10:DENV1

22/24

A

```

DENV1 PVP159      MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHSGCVTTMAKDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRLKLCIEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG 100
DENV1 Hawaii     MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHSGCVTTMAKDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRLKLCIEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG
DENV1 D1My97-10245 MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHSGCVTTMAKDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRLKLCIEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG
DENV1 WestPac 74  MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHSGCVTTMAKDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRLKLCIEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG
DENV1 Ehi D1      MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHSGCVTTMAKDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRLKLCIEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG
DENV1 D1-05k-2916-040106 MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHSGCVTTMAKDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRLKLCIEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG

DENV1 PVP159      WNGGCGLPGKGSLITCAKFKCVTKLEGIVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNSTTEHGTIATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT 200
DENV1 Hawaii     WNGGCGLPGKGSLITCAKFKCVTKLEGIVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNSTTEHGTIATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT
DENV1 D1My97-10245 WNGGCGLPGKGSLITCAKFKCVTKLEGIVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNSTTEHGTIATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT
DENV1 WestPac 74  WNGGCGLPGKGSLITCAKFKCVTKLEGIVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNSTTEHGTIATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT
DENV1 Ehi D1      WNGGCGLPGKGSLITCAKFKCVTKLEGIVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNSTTEHGTIATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT
DENV1 D1-05k-2916-040106 WNGGCGLPGKGSLITCAKFKCVTKLEGIVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNSTTEHGTIATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT

DENV1 PVP159      NKEKSMVLHKQWFLDLPLPWTSGASTPQETWNRDILLVTFKTAHAKKQEVAVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTIFAGHLKCRLLKMDKLTLGKMSV 300
DENV1 Hawaii     NKEKSMVLHKQWFLDLPLPWTSGASTPQETWNRDILLVTFKTAHAKKQEVAVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTIFAGHLKCRLLKMDKLTLGKMSV
DENV1 D1My97-10245 NKEKSMVLHKQWFLDLPLPWTSGASTPQETWNRDILLVTFKTAHAKKQEVAVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTIFAGHLKCRLLKMDKLTLGKMSV
DENV1 WestPac 74  NKEKSMVLHKQWFLDLPLPWTSGASTPQETWNRDILLVTFKTAHAKKQEVAVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTIFAGHLKCRLLKMDKLTLGKMSV
DENV1 Ehi D1      NKEKSMVLHKQWFLDLPLPWTSGASTPQETWNRDILLVTFKTAHAKKQEVAVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTIFAGHLKCRLLKMDKLTLGKMSV
DENV1 D1-05k-2916-040106 NKEKSMVLHKQWFLDLPLPWTSGASTPQETWNRDILLVTFKTAHAKKQEVAVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTIFAGHLKCRLLKMDKLTLGKMSV

DENV1 PVP159      NCTGSFKLEKEVAETQHTVLVQVYKGSDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLITANPIVTDKPKVNIEAEPFPGESYIVVGAGEHALKLSWFKKGS 396
DENV1 Hawaii     NCTGSFKLEKEVAETQHTVLVQVYKGSDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLITANPIVTDKPKVNIEAEPFPGESYIVVGAGEHALKLSWFKKGS
DENV1 D1My97-10245 NCTGSFKLEKEVAETQHTVLVQVYKGSDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLITANPIVTDKPKVNIEAEPFPGESYIVVGAGEHALKLSWFKKGS
DENV1 WestPac 74  NCTGSFKLEKEVAETQHTVLVQVYKGSDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLITANPIVTDKPKVNIEAEPFPGESYIVVGAGEHALKLSWFKKGS
DENV1 Ehi D1      NCTGSFKLEKEVAETQHTVLVQVYKGSDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLITANPIVTDKPKVNIEAEPFPGESYIVVGAGEHALKLSWFKKGS
DENV1 D1-05k-2916-040106 NCTGSFKLEKEVAETQHTVLVQVYKGSDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLITANPIVTDKPKVNIEAEPFPGESYIVVGAGEHALKLSWFKKGS

```

B

```

DENV1 Hawaii     MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHSGCVTTMAKDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRLKLCIEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG 100
DENV1 H87        MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHSGCVTTMAKDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRLKLCIEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG 100
DENV2 NGC        MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHSGCVTTMAKDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRLKLCIEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG 100
DENV4 H241       MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHSGCVTTMAKDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRLKLCIEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG 100
WNV NY99         FNCLOMSNRDFLEGVSGATWVDVVLEHSGCVTTMSKDKPTLDIELLKTEVTNPAVLRLKLCIEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFVDRG 100

DENV1 Hawaii     WNGGCGLPGKGSLITCAKFKCVTKLEGIVQYENLKYSVIVTVHT--ODQHQVGNSTTEHGTIATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT 195
DENV3 H87        WNGGCGLPGKGSLITCAKFKCVTKLEGIVQYENLKYSVIVTVHT--ODQHQVGNSTTEHGTIATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT 193
DENV2 NGC        WNGGCGLPGKGSLITCAKFKCVTKLEGIVQYENLKYSVIVTVHT--ODQHQVGNSTTEHGTIATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT 195
DENV4 H241       WNGGCGLPGKGSLITCAKFKCVTKLEGIVQYENLKYSVIVTVHT--ODQHQVGNSTTEHGTIATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT 195
WNV NY99         WNGGCGLPGKGSLITCAKFKCVTKLEGIVQYENLKYSVIVTVHT--ODQHQVGNSTTEHGTIATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGLDFNEMVLLT 200

DENV1 Hawaii     MVLLTMKRSKMLVHKQWFLDLPLPWTSGASTPQETWNRDILLVTFKTAHAKKQEVAVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTIFAGHLKCRLLKMDKLTLG 294
DENV3 H87        MVLLTMKRSKMLVHKQWFLDLPLPWTSGASTPQETWNRDILLVTFKTAHAKKQEVAVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTIFAGHLKCRLLKMDKLTLG 292
DENV2 NGC        MVLLTMKRSKMLVHKQWFLDLPLPWTSGASTPQETWNRDILLVTFKTAHAKKQEVAVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTIFAGHLKCRLLKMDKLTLG 294
DENV4 H241       MVLLTMKRSKMLVHKQWFLDLPLPWTSGASTPQETWNRDILLVTFKTAHAKKQEVAVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTIFAGHLKCRLLKMDKLTLG 294
WNV NY99         YVMTVGSTFLVHKQWFLDLPLPWTSGASTPQETWNRDILLVTFKTAHAKKQEVAVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTIFAGHLKCRLLKMDKLTLG 297

DENV1 Hawaii     KMSYVVMCTGSGFKLKEEVAETQHTVLVQVYKGSDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLITANPIVTDKPKVNIEAEPFPGESYIVVGAGEHALKLSWFKKGS 396
DENV3 H87        KMSYVVMCTGSGFKLKEEVAETQHTVLVQVYKGSDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLITANPIVTDKPKVNIEAEPFPGESYIVVGAGEHALKLSWFKKGS 394
DENV2 NGC        KMSYVVMCTGSGFKLKEEVAETQHTVLVQVYKGSDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLITANPIVTDKPKVNIEAEPFPGESYIVVGAGEHALKLSWFKKGS 396
DENV4 H241       KMSYVVMCTGSGFKLKEEVAETQHTVLVQVYKGSDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRLITANPIVTDKPKVNIEAEPFPGESYIVVGAGEHALKLSWFKKGS 396
WNV NY99         KGTTYGVCSKAFKFLGTADTGHGTIVVLELQITGTDGPKCPVISSVASINDLTVVGLRVTVNPFVSVATANAKVLISELTPFGDSYIVVGRGEHALKLSWFKKGS 402

```

Fig.20:

Epitop HM14c10 trên typ huyết thanh 1 của virus Dengue và so sánh epitop với (A) kiểu gen DENV1 khác và typ huyết thanh của (b) Dengue và virus West Nile (WNV)

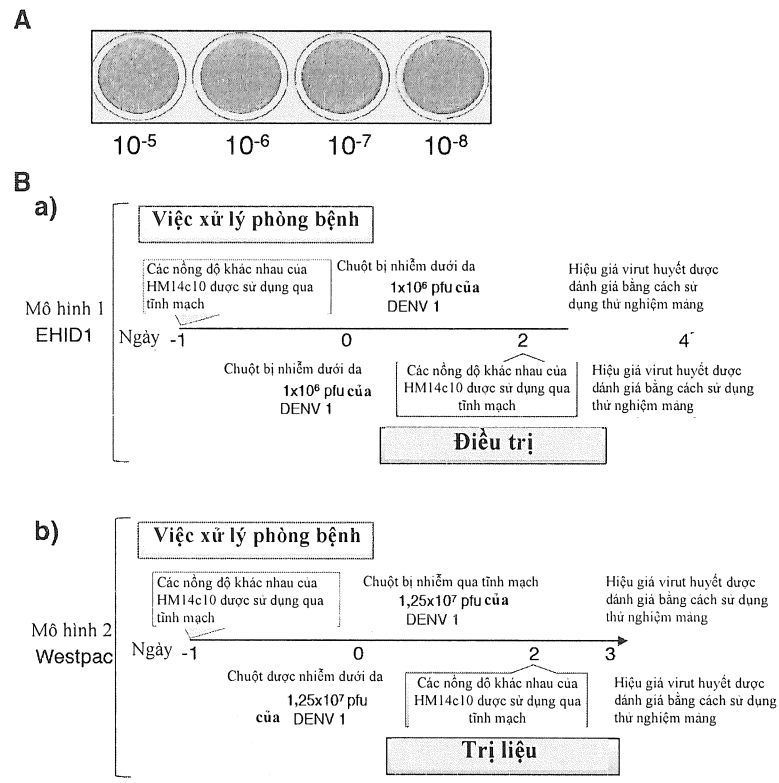


Fig.21:

Khả năng lây nhiễm và hiệu quả *in vivo* của DENV1 được đánh giá

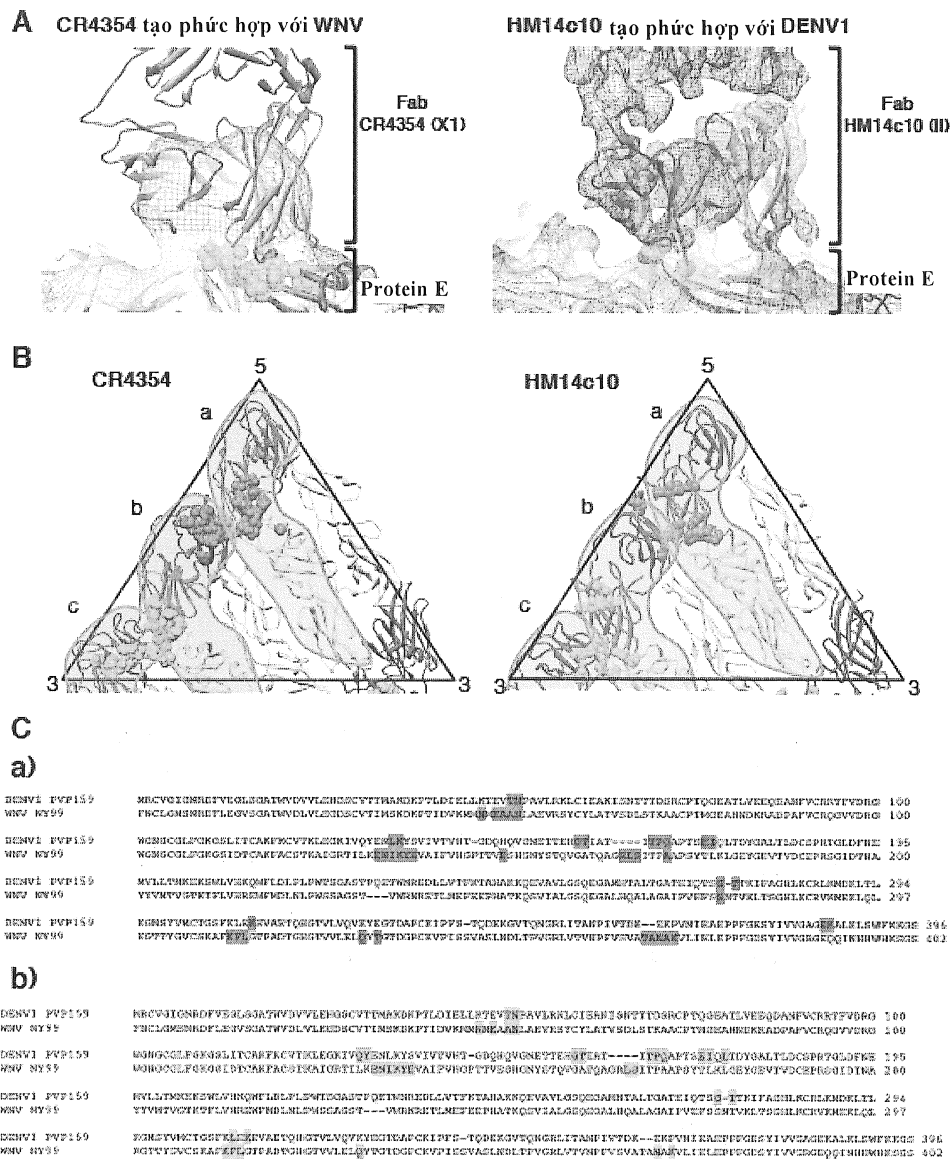


Fig.22:

So sánh epitop được liên kết bằng kháng thể virus West Nile CR4354 và virus Dengue 1 đặc hiệu HM14c10

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE

DSO NATIONAL LABORATORIES

<120> KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU VỚI PROTEIN VỎ TYP HUYẾT THANH 1 CỦA
VIRUT DENUGE VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 26737-19972 PCT

<140> PCT/SG2011/000436

<141> 14-12-2011

<150> 61/423,085

<151> 14-12-2010

<160> 42

<170> Patent trong phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
polypeptit

22562

<400> 1

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asp Gly Arg Thr Ser Leu Asp Trp Phe Leu Leu Arg Pro Gly Gln Phe

35 40 45

Pro Gln Val Lys Ile Ser Glu Leu Ser Arg Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Val Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Gly Glu Ala Glu Asp Val Arg Ala Phe Tyr Cys Ile Tyr Gly

85 90 95

Ile Tyr Val Gly Arg Ser Ala Lys Gly Pro Ser Trp Arg Ser Asn

100 105 110

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp

polypeptit

<400> 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asp Gly Arg Thr Ser Leu Asp Trp Phe Leu Leu Arg Pro Gly Gln Phe

35 40 45

Pro Gln Val Lys Ile Ser Glu Leu Ser Arg Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Val Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Gly Glu Ala Glu Asp Val Arg Ala Phe Tyr Cys Ile Tyr Gly

85 90 95

Ile Tyr Val Gly Arg Ser Ala Lys Gly Pro Ser Trp Arg Ser Asn

100 105 110

<210> 3

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
polypeptit

<400> 3

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

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

Asp Gly Arg Thr Ser Leu Asp Trp Phe Leu Leu Arg Pro Gly Gln Phe
 35 40 45

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

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

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

Ile Tyr Val Gly Arg Ser Ala Lys Gly Pro Ser Trp Arg Ser Asn
 100 105 110

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
polypeptit

<400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr

20 25 30

Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Arg

<210> 5

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
polypeptit

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Thr

20 25 30

Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

Arg

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
polypeptit

<400> 6

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

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

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

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

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

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

Leu	Gln	Thr	Lys	Thr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
				100					105					110	

Arg

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp

polypeptit

<400> 7

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Arg Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Gly Ser Ala Tyr

85 90 95

22562

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
polypeptit

<400> 8

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

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

20

25

30

Leu Gly Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Arg Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

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

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro

65

70

75

80

22562

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Gly Ser Ala Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp

polypeptit

<400> 9

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

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

20

25

30

Leu Gly Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Arg Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

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

50

55

60

22562

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

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

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

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
polypeptit

<400> 10

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

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

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

22562

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

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65

70

75

80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85

90

95

Tyr Tyr Ser Ala Pro His Lys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 11

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp

polypeptit

<400> 11

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

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu His Ser

20

25

30

22562

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35

40

45

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

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65

70

75

80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85

90

95

Tyr Tyr Ser Ala Pro His Lys Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 12

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp

polypeptit

<400> 12

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

1

5

10

15

22562

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 13

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
polypeptit

<400> 13

22562

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

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

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

Ala Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Lys Tyr Ala Gln Met Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asp Leu Thr Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp

polypeptit

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Lys Met Val Asn

65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Gly Val Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Ile Ala Gly Gly Trp Ala Phe Trp Gly Ile Asp Leu Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 15

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
polypeptit

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Lys

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys

85 90 95

22562

Ala Arg Glu Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Ile Asn Trp Phe Asp Pro Trp

100

105

110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 16

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp

polypeptit

<400> 16

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Ala Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Lys Tyr Ala Gln Met Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Glu Leu Phe Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Asp Leu Thr Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100

105

110

Val Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 17

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp

polypeptit

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

22562

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Lys Met Val Asn

65

70

75

80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Gly Val Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Gly Ile Ala Gly Gly Trp Ala Phe Trp Gly Ile Asp Leu Trp

100

105

110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 18

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp

polypeptit

<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Lys

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Glu Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Ile Asn Trp Phe Asp Pro Trp

100

105

110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 19

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp

polypeptit

<400> 19

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Ala Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Lys Tyr Ala Gln Met Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Glu Leu Phe Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Asp Leu Thr Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100

105

110

Val Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 20

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp

polypeptit

<400> 20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Lys Met Val Asn

65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Gly Val Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Ile Ala Gly Gly Trp Ala Phe Trp Gly Ile Asp Leu Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 21

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp

polypeptit

<400> 21

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Lys

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Ile Asn Trp Phe Asp Pro Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 22

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
polypeptit

<400> 22

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

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

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

Ala Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Lys Tyr Ala Gln Met Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ile Ser Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Asp Leu Thr Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

22562

Val Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 23

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp

polypeptit

<400> 23

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Lys Met Val Asn

65

70

75

80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Gly Val Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Gly Ile Ala Gly Gly Trp Ala Phe Trp Gly Ile Asp Leu Trp

100

105

110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 24

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
polypeptit

<400> 24

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Lys

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

22562

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Glu Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Ile Asn Trp Phe Asp Pro Trp

100

105

110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 25

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp

polynucleotit

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(366)

<400> 25

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg

48

22562

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

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc agc ttc agc agt tat
96

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

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gcc cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg
144

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

gca gtg ata tgg tat gat gga agt aaa acg tat tat gga gac tcc gtg
192

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

aag ggc cga ttc acc atc tcc aaa gac aat tcc aag aaa atg gtg aat
240

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Lys Met Val Asn
65 70 75 80

ctc caa atg gac agc ctg gga gtc gag gac acg gct ttt tat tac tgt
288

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

22562

gca aga ggg ata gcc ggt ggc tgg gcg ttt tgg ggg att gac ctc tgg
336

Ala Arg Gly Ile Ala Gly Gly Trp Ala Phe Trp Gly Ile Asp Leu Trp
100 105 110

ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca
366

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

<210> 26

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp
polynucleotit

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 26

gat gtt gtg atg act cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg
48

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agc cag aat gtt tac agc tac
 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 tta ggc tgg tac cag cac aaa cct ggc cgg tct ccc agg ctc ctc atc
 144
 Leu Gly Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Arg Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 ttt ggt gtc acc agc agg gcc act ggc gtc cca gac agg ttc agt ggc
 192
 Phe Gly Val Thr Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag cct
 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gcg gtg tac tac tgt cag cag tac gct ggc tca gcg tac
 288

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Gly Ser Ala Tyr

85

90

95

act ttt ggc cag ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt

324

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Tổng hợp

polypeptit

<400> 27

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

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

20

25

30

Leu Gly Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Arg Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

22562

Phe Gly Val Thr Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 28
<211> 495
<212> PRT
<213> Virut sốt xuất huyết

<400> 28
Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser
1 5 10 15
Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr
20 25 30

Thr Met Ala Lys Asp Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Leu Lys Thr
35 40 45

Glu Val Thr Asn Pro Ala Val Leu Arg Lys Leu Cys Ile Glu Ala Lys
50 55 60

22562

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

Ser Thr Ser Gln Glu Thr Trp Asn Arg Gln Asp Leu Leu Val Thr Phe
 225 230 235 240

Lys Thr Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val Val Val Leu Gly Ser Gln
 245 250 255

Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Thr
 260 265 270

Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys
 275 280 285

Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly
 290 295 300

Pro Phe Lys Leu Glu Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val
 305 310 315 320

Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro
 325 330 335

Phe Ser Ser Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Val
 340 345 350

Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Ile Asn Ile Glu
 355 360 365

Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu
 370 375 380

Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys
 385 390 395 400

Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala Ile Leu Gly
 405 410 415

Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Thr Ser Val
 420 425 430

Gly Lys Leu Val His Gln Ile Phe Gly Thr Ala Tyr Gly Val Leu Phe
 435 440 445

Ser Gly Val Ser Trp Thr Met Lys Ile Gly Ile Gly Ile Leu Leu Thr
 450 455 460

Trp Leu Gly Leu Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser Met Thr Cys Ile
 465 470 475 480

Ala Val Gly Met Val Thr Leu Tyr Leu Gly Val Met Val Gln Ala
 485 490 495

<210> 29
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> Virut sốt xuất huyết

<400> 29

Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr
 20 25 30

Thr Met Ala Lys Asp Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Leu Lys Thr
 35 40 45

Glu Val Thr Asn Pro Ala Val Leu Arg Lys Leu Cys Ile Glu Ala Lys
 50 55 60

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

Thr Leu Val Glu Glu Gln Asp Thr Asn Phe Val Cys Arg Arg Thr Phe
 85 90 95

Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser
 100 105 110

Leu Ile Thr Cys Ala Lys Phe Lys Cys Val Thr Lys Leu Glu Gly Lys
 115 120 125

Ile Val Gln Tyr Glu Asn Leu Lys Tyr Ser Val Ile Val Thr Val His
 130 135 140

22562

Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly Asn Glu Thr Thr Glu His Gly Thr
 145 150 155 160

Thr Ala Thr Ile Thr Pro Gln Ala Pro Thr Ser Glu Ile Gln Leu Thr
 165 170 175

Asp Tyr Gly Ala Leu Thr Leu Asp Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp
 180 185 190

Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Thr Met Glu Lys Lys Ser Trp Leu Val
 195 200 205

His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ser Gly Ala
 210 215 220

Ser Thr Ser Gln Glu Thr Trp Asn Arg Gln Asp Leu Leu Val Thr Phe
 225 230 235 240

Lys Thr Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val Val Val Leu Gly Ser Gln
 245 250 255

Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Thr
 260 265 270

Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys
 275 280 285

Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly
 290 295 300

Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val
 305 310 315 320

Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro
 325 330 335

Phe Ser Ser Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile
 340 345 350

Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu
 355 360 365

Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu
 370 375 380

Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys
 385 390 395 400

Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala Ile Leu Gly
 405 410 415

Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Thr Ser Val
 420 425 430

Gly Lys Leu Ile His Gln Ile Phe Gly Thr Ala Tyr Gly Val Leu Phe
 435 440 445

Ser Gly Val Ser Trp Thr Met Lys Ile Gly Ile Gly Ile Leu Leu Thr
 450 455 460

22562

Trp Leu Gly Leu Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser Met Thr Cys Ile

465 470 475 480

Ala Val Gly Met Val Thr Leu Tyr Leu Gly Val Met Val Gln Ala

485 490 495

<210> 30

<211> 495

<212> PRT

<213> Virut sốt xuất huyết

<400> 30

Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Ser Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser

1 5 10 15

Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr

20 25 30

Thr Met Ala Lys Asp Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Leu Lys Thr

35 40 45

Glu Val Thr Asn Pro Ala Val Leu Arg Lys Leu Cys Ile Glu Ala Lys

50 55 60

Ile Ser Asn Thr Thr Thr Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala

65 70 75 80

Thr Leu Val Glu Glu Gln Asp Ala Asn Phe Val Cys Arg Arg Thr Phe

85 90 95

22562

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

22562

Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Thr
 260 265 270

Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys
 275 280 285

Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly
 290 295 300

Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val
 305 310 315 320

Leu Val Gln Ile Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro
 325 330 335

Phe Leu Thr Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile
 340 345 350

Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu
 355 360 365

Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Ile Gly Ala Gly Glu
 370 375 380

Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys
 385 390 395 400

Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala Ile Leu Gly
 405 410 415

Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Thr Ser Val

420

425

430

Gly Lys Leu Val His Gln Ile Phe Gly Thr Ala Tyr Gly Val Leu Phe

435

440

445

Ser Gly Val Ser Trp Thr Met Lys Ile Gly Ile Gly Val Leu Leu Thr

450

455

460

Trp Leu Gly Leu Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser Met Thr Cys Ile

465

470

475

480

Ala Val Gly Leu Val Thr Leu Tyr Leu Gly Val Met Val Gln Ala

485

490

495

<210> 31

<211> 495

<212> PRT

<213> Virut sốt xuất huyết

<400> 31

Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser

1

5

10

15

Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr

20

25

30

Thr Met Ala Lys Asp Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Leu Lys Thr

35

40

45

22562

Glu Val Thr Asn Pro Ala Val Leu Arg Lys Leu Cys Ile Glu Ala Lys
 50 55 60

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

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

Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser
 100 105 110

Leu Ile Thr Cys Ala Lys Phe Lys Cys Val Thr Lys Leu Glu Gly Lys
 115 120 125

Ile Val Gln Tyr Glu Asn Leu Lys Tyr Ser Val Ile Val Thr Val His
 130 135 140

Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly Asn Glu Thr Thr Glu His Gly Thr
 145 150 155 160

Ile Ala Thr Ile Thr Pro Gln Ala Pro Thr Ser Glu Ile Gln Leu Thr
 165 170 175

Asp Tyr Gly Ala Leu Thr Leu Asp Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp
 180 185 190

Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Thr Met Lys Glu Lys Ser Trp Leu Val
 195 200 205

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

Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu
 370 375 380

Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys
 385 390 395 400

Met Leu Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala Ile Leu Gly
 405 410 415

Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Thr Ser Val
 420 425 430

Gly Lys Leu Val His Gln Ile Phe Gly Thr Ala Tyr Gly Val Leu Phe
 435 440 445

Ser Gly Val Ser Trp Thr Met Lys Ile Gly Ile Gly Ile Leu Leu Thr
 450 455 460

Trp Leu Gly Leu Asn Ser Arg Ser Ala Ser Leu Ser Met Thr Cys Ile
 465 470 475 480

Ala Val Gly Met Val Thr Leu Tyr Leu Gly Val Met Val Gln Ala
 485 490 495

<210> 32

<211> 495

<212> PRT

<213> Virut sốt xuất huyết

22562

<400> 32

Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Ser Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser
1 5 10 15

Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr
20 25 30

Thr Met Ala Lys Asp Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Leu Lys Thr
35 40 45

Glu Val Thr Asn Pro Ala Val Leu Arg Lys Leu Cys Ile Glu Ala Lys
50 55 60

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

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

Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser
100 105 110

Leu Ile Thr Cys Ala Lys Phe Lys Cys Val Thr Lys Leu Glu Gly Lys
115 120 125

Ile Val Gln Tyr Glu Asn Leu Lys Tyr Ser Val Ile Val Thr Val His
130 135 140

22562

Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly Asn Glu Ser Thr Glu His Gly Thr
 145 150 155 160

Thr Ala Thr Ile Thr Pro Gln Ala Pro Thr Thr Glu Ile Gln Leu Thr
 165 170 175

Asp Tyr Gly Ala Leu Thr Leu Asp Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp
 180 185 190

Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Thr Met Lys Glu Lys Ser Trp Leu Val
 195 200 205

His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ser Gly Ala
 210 215 220

Ser Thr Ser Gln Glu Thr Trp Asn Arg Gln Asp Leu Leu Val Thr Phe
 225 230 235 240

Lys Thr Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val Val Val Leu Gly Ser Gln
 245 250 255

Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Thr
 260 265 270

Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys
 275 280 285

Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly
 290 295 300

22562

Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val
305 310 315 320

Leu Val Gln Ile Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro
325 330 335

Phe Ser Thr Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile
340 345 350

Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu
355 360 365

Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Ile Gly Ala Gly Glu
370 375 380

Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys
385 390 395 400

Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala Ile Leu Gly
405 410 415

Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Thr Ser Val
420 425 430

Gly Lys Leu Val His Gln Ile Phe Gly Thr Ala Tyr Gly Val Leu Phe
435 440 445

Ser Gly Val Ser Trp Thr Met Lys Ile Gly Ile Gly Val Leu Leu Thr
450 455 460

22562

Trp Leu Gly Leu Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser Met Thr Cys Ile

465

470

475

480

Ala Val Gly Leu Val Thr Leu Tyr Leu Gly Val Met Val Gln Ala

485

490

495

<210> 33

<211> 396

<212> PRT

<213> Virut sốt xuất huyết

<400> 33

Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser

1

5

10

15

Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr

20

25

30

Thr Met Ala Lys Asp Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Leu Lys Thr

35

40

45

Glu Val Thr Asn Pro Ala Val Leu Arg Lys Leu Cys Ile Glu Ala Lys

50

55

60

Ile Ser Asn Thr Thr Thr Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala

65

70

75

80

Thr Leu Val Glu Glu Gln Asp Ala Asn Phe Val Cys Arg Arg Thr Phe

85

90

95

22562

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

22562

Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Thr			
260	265	270	
Ser Gly Thr Thr Lys Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys			
275	280	285	
Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly			
290	295	300	
Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val			
305	310	315	320
Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro			
325	330	335	
Phe Ser Thr Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile			
340	345	350	
Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu			
355	360	365	
Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu			
370	375	380	
Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser			
385	390	395	
<210> 34			
<211> 396			
<212> PRT			

<213> Virut sốt xuất huyết

<400> 34

Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser

1 5 10 15

Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr

20 25 30

Thr Met Ala Lys Asp Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Leu Lys Thr

35 40 45

Glu Val Thr Asn Pro Ala Val Leu Arg Lys Leu Cys Ile Glu Ala Lys

50 55 60

Ile Ser Asn Thr Thr Thr Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala

65 70 75 80

Thr Leu Val Glu Glu Gln Asp Ala Asn Phe Val Cys Arg Arg Thr Phe

85 90 95

Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser

100 105 110

Leu Ile Thr Cys Ala Lys Phe Lys Cys Val Thr Lys Leu Glu Gly Lys

115 120 125

Ile Val Gln Tyr Glu Asn Leu Lys Tyr Ser Val Ile Val Thr Val His

130 135 140

22562

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

Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val
 305 310 315 320

Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro
 325 330 335

Phe Ser Thr Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile
 340 345 350

Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu
 355 360 365

Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu
 370 375 380

Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser
 385 390 395

<210> 35

<211> 396

<212> PRT

<213> Virut sốt xuất huyết

<400> 35

Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser
 1 5 10 15

22562

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

Asp Tyr Gly Ala Leu Thr Leu Asp Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp
 180 185 190

Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Thr Met Lys Glu Lys Ser Trp Leu Val
 195 200 205

His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ser Gly Ala
 210 215 220

Ser Thr Ser Gln Glu Thr Trp Asn Arg Gln Asp Leu Leu Val Thr Phe
 225 230 235 240

Lys Thr Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val Val Val Leu Gly Ser Gln
 245 250 255

Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Thr
 260 265 270

Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys
 275 280 285

Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly
 290 295 300

Pro Phe Lys Leu Glu Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val
 305 310 315 320

Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro
 325 330 335

22562

Phe Ser Ser Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Val

340

345

350

Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Ile Asn Ile Glu

355

360

365

Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu

370

375

380

Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser

385

390

395

<210> 36

<211> 396

<212> PRT

<213> Virut sốt xuất huyết

<400> 36

Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser

1

5

10

15

Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr

20

25

30

Thr Met Ala Lys Asp Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Leu Lys Thr

35

40

45

Glu Val Thr Asn Pro Ala Val Leu Arg Lys Leu Cys Ile Glu Ala Lys

50

55

60

22562

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

Thr Leu Val Glu Glu Gln Asp Thr Asn Phe Val Cys Arg Arg Thr Phe
 85 90 95

Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser
 100 105 110

Leu Ile Thr Cys Ala Lys Phe Lys Cys Val Thr Lys Leu Glu Gly Lys
 115 120 125

Ile Val Gln Tyr Glu Asn Leu Lys Tyr Ser Val Ile Val Thr Val His
 130 135 140

Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly Asn Glu Thr Thr Glu His Gly Thr
 145 150 155 160

Thr Ala Thr Ile Thr Pro Gln Ala Pro Thr Ser Glu Ile Gln Leu Thr
 165 170 175

Asp Tyr Gly Ala Leu Thr Leu Asp Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp
 180 185 190

Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Thr Met Glu Lys Lys Ser Trp Leu Val
 195 200 205

His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ser Gly Ala
 210 215 220

22562

Ser Thr Ser Gln Glu Thr Trp Asn Arg Gln Asp Leu Leu Val Thr Phe
 225 230 235 240

 Lys Thr Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val Val Val Leu Gly Ser Gln
 245 250 255

 Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Thr
 260 265 270

 Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys
 275 280 285

 Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly
 290 295 300

 Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val
 305 310 315 320

 Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro
 325 330 335

 Phe Ser Ser Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile
 340 345 350

 Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu
 355 360 365

 Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Val Gly Ala Gly Glu
 370 375 380

22562

Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser

385 390 395

<210> 37

<211> 396

<212> PRT

<213> Virut sốt xuất huyết

<400> 37

Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Ser Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser

1 5 10 15

Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr

20 25 30

Thr Met Ala Lys Asp Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Leu Lys Thr

35 40 45

Glu Val Thr Asn Pro Ala Val Leu Arg Lys Leu Cys Ile Glu Ala Lys

50 55 60

Ile Ser Asn Thr Thr Thr Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala

65 70 75 80

Thr Leu Val Glu Glu Gln Asp Ala Asn Phe Val Cys Arg Arg Thr Phe

85 90 95

Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser

100 105 110

22562

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

22562

Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys

275

280

285

Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly

290

295

300

Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val

305

310

315

320

Leu Val Gln Ile Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro

325

330

335

Phe Ser Thr Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile

340

345

350

Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu

355

360

365

Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Ile Gly Ala Gly Glu

370

375

380

Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser

385

390

395

<210> 38

<211> 396

<212> PRT

<213> Virut sốt xuất huyết

<400> 38

22562

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

22562

Thr Ala Thr Ile Thr Pro Gln Ala Pro Thr Thr Glu Ile Gln Leu Thr
 165 170 175

Asp Tyr Gly Ala Leu Thr Leu Asp Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp
 180 185 190

Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Thr Met Lys Glu Lys Ser Trp Leu Val
 195 200 205

His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ser Gly Ala
 210 215 220

Ser Thr Ser Gln Glu Thr Trp Asn Arg Gln Asp Leu Leu Val Thr Phe
 225 230 235 240

Lys Thr Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val Val Val Leu Gly Ser Gln
 245 250 255

Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Thr
 260 265 270

Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys
 275 280 285

Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Met Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly
 290 295 300

Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val
 305 310 315 320

22562

Leu Val Gln Ile Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro

325

330

335

Phe Leu Thr Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile

340

345

350

Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu

355

360

365

Ala Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Ile Gly Ala Gly Glu

370

375

380

Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser

385

390

395

<210> 39

<211> 394

<212> PRT

<213> Virut sốt xuất huyết

<400> 39

Met Arg Cys Val Gly Val Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser

1

5

10

15

Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr

20

25

30

Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Gln Lys Thr

35

40

45

Glu Ala Thr Gln Leu Ala Thr Leu Arg Lys Leu Cys Ile Glu Gly Lys

50

55

60

Ile Thr Asn Ile Thr Thr Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala

65

70

75

80

Ile Leu Pro Glu Glu Gln Asp Gln Asn Tyr Val Cys Lys His Thr Tyr

85

90

95

Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser

100

105

110

Leu Val Thr Cys Ala Lys Phe Gln Cys Leu Glu Ser Ile Glu Gly Lys

115

120

125

Val Val Gln His Glu Asn Leu Lys Tyr Thr Val Ile Ile Thr Val His

130

135

140

Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly Asn Glu Thr Gln Gly Val Thr Ala

145

150

155

160

Glu Ile Thr Ser Gln Ala Ser Thr Ala Glu Ala Ile Leu Pro Glu Tyr

165

170

175

Gly Thr Leu Gly Leu Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn

180

185

190

Glu Met Ile Leu Leu Thr Met Lys Asn Lys Ala Trp Met Val His Arg

195

200

205

22562

Gln Trp Phe Phe Asp Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ser Gly Ala Thr Thr
 210 215 220

Lys Thr Pro Thr Trp Asn Arg Lys Glu Leu Leu Val Thr Phe Lys Asn
 225 230 235 240

Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly
 245 250 255

Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Thr Ser Gly
 260 265 270

Gly Thr Ser Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp
 275 280 285

Lys Leu Lys Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ala Met Cys Leu Asn Thr Phe
 290 295 300

Val Leu Lys Lys Glu Val Ser Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Leu Ile
 305 310 315 320

Lys Val Glu Tyr Lys Gly Glu Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro Phe Ser
 325 330 335

Thr Glu Asp Gly Gln Gly Lys Ala His Asn Gly Arg Leu Ile Thr Ala
 340 345 350

Asn Pro Val Val Thr Lys Lys Glu Glu Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu
 355 360 365

22562

Pro Pro Phe Gly Glu Ser Asn Ile Val Ile Gly Ile Gly Asp Lys Ala
 370 375 380

Leu Lys Ile Asn Trp Tyr Arg Lys Gly Ser
 385 390

<210> 40
 <211> 396
 <212> PRT
 <213> Virut sốt xuất huyết

<400> 40

Met Arg Cys Ile Gly Ile Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr
 20 25 30

Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr
 35 40 45

Glu Ala Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys
 50 55 60

Leu Thr Asn Thr Thr Thr Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro
 65 70 75 80

Ser Leu Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe Val Cys Lys His Ser Met
 85 90 95

22562

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

22562

Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met

260

265

270

Ser Ser Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg

275

280

285

Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly

290

295

300

Lys Phe Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile

305

310

315

320

Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro

325

330

335

Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile

340

345

350

Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu

355

360

365

Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro

370

375

380

Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser

385

390

395

<210> 41

<211> 395

<212> PRT

<213> Virut sốt xuất huyết

<400> 41

Met Arg Cys Val Gly Val Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser

1 5 10 15

Gly Gly Ala Trp Val Asp Leu Val Leu Glu His Gly Gly Cys Val Thr

20 25 30

Thr Met Ala Gln Gly Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr

35 40 45

Thr Ala Lys Glu Val Ala Leu Leu Arg Thr Tyr Cys Ile Glu Ala Ser

50 55 60

Ile Ser Asn Ile Thr Thr Ala Thr Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro

65 70 75 80

Tyr Leu Lys Glu Glu Gln Asp Gln Gln Tyr Ile Cys Arg Arg Asp Val

85 90 95

Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly

100 105 110

Val Val Thr Cys Ala Lys Phe Ser Cys Ser Gly Lys Ile Thr Gly Asn

115 120 125

22562

Leu Val Gln Ile Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Val Val Val Thr Val His
 130 135 140

Asn Gly Asp Thr His Ala Val Gly Asn Asp Ile Pro Asn His Gly Val
 145 150 155 160

Thr Ala Thr Ile Thr Pro Arg Ser Pro Ser Val Glu Val Lys Leu Pro
 165 170 175

Asp Tyr Gly Glu Leu Thr Leu Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Ile Asp
 180 185 190

Phe Asn Glu Met Ile Leu Met Lys Met Lys Lys Lys Thr Trp Leu Val
 195 200 205

His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Ala Ala Gly Ala
 210 215 220

Asp Thr Ser Glu Val His Trp Asn Tyr Lys Glu Arg Met Val Thr Phe
 225 230 235 240

Lys Val Pro His Ala Lys Arg Gln Asp Val Thr Val Leu Gly Ser Gln
 245 250 255

Glu Gly Ala Met His Ser Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Val Asp Ser
 260 265 270

22562

Gly Asp Gly Asn His Met Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Lys Val Arg

275

280

285

Met Glu Lys Leu Arg Ile Lys Gly Met Ser Tyr Thr Met Cys Ser Gly

290

295

300

Lys Phe Ser Ile Asp Lys Glu Met Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Thr

305

310

315

320

Val Val Lys Val Lys Tyr Glu Gly Ala Gly Ala Pro Cys Lys Val Pro

325

330

335

Ile Glu Ile Arg Asp Val Asn Lys Glu Lys Val Gly Arg Ile Ile Ser

340

345

350

Ser Thr Pro Phe Ala Glu Tyr Thr Asn Ser Val Thr Asn Ile Glu Leu

355

360

365

Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Ile Gly Val Gly Asp Ser

370

375

380

Ala Leu Thr Leu His Trp Phe Arg Lys Gly Ser

385

390

395

<210> 42

<211> 402

<212> PRT

<213> Virut West nile

<400> 42

22562

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

22562

Ala	Thr	Gln	Ala	Gly	Arg	Leu	Ser	Ile	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Tyr
				165					170					175	
Thr	Leu	Lys	Leu	Gly	Glu	Tyr	Gly	Glu	Val	Thr	Val	Asp	Cys	Glu	Pro
			180					185					190		
Arg	Ser	Gly	Ile	Asp	Thr	Asn	Ala	Tyr	Tyr	Val	Met	Thr	Val	Gly	Thr
		195					200						205		
Lys	Thr	Phe	Leu	Val	His	Arg	Glu	Trp	Phe	Met	Asp	Leu	Asn	Leu	Pro
	210					215						220			
Trp	Ser	Ser	Ala	Gly	Ser	Thr	Val	Trp	Arg	Asn	Arg	Glu	Thr	Leu	Met
225						230				235				240	
Glu	Phe	Glu	Glu	Pro	His	Ala	Thr	Lys	Gln	Ser	Val	Ile	Ala	Leu	Gly
				245					250					255	
Ser	Gln	Glu	Gly	Ala	Leu	His	Gln	Ala	Leu	Ala	Gly	Ala	Ile	Pro	Val
				260				265					270		
Glu	Phe	Ser	Ser	Asn	Thr	Val	Lys	Leu	Thr	Ser	Gly	His	Leu	Lys	Cys
		275					280					285			
Arg	Val	Lys	Met	Glu	Lys	Leu	Gln	Leu	Lys	Gly	Thr	Thr	Tyr	Gly	Val
	290						295					300			
Cys	Ser	Lys	Ala	Phe	Lys	Phe	Leu	Gly	Thr	Pro	Ala	Asp	Thr	Gly	His
305						310					315			320	

22562

Gly Thr Val Val Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly Pro Cys

325

330

335

Lys Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr Pro Val

340

345

350

Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn

355

360

365

Ala Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile

370

375

380

Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ser

385

390

395

400

Gly Ser