



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

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

(11)



1-0024066

(51)⁷ C07K 16/10; C07H 21/00; A61K 39/42; (13) B
A61P 31/16

(21) 1-2013-00899

(22) 23/08/2010

(86) PCT/SG2010/000306 23/08/2010

(87) WO2012/026878 01/03/2012

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/07/2013 304A

(73) TEMASEK LIFE SCIENCES LABORATORY LIMITED (SG)

1 Research Link, National University of Singapore, Singapore 117604, Singapore

(72) MOOKKAN, Prabakaran (IN); HE, Fang (CN); KWANG, Hwei-Sing Jimmy (US).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG ĐẶC HIỆU VỚI EPITOP CẤU HÌNH CỦA
HEMAGGLUTININ H5, AXIT NUCLEIC, VECTƠ, TẾ BÀO VÀ DƯỢC PHẨM
CHỨA NÓ

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng của chuột 4C2 hoặc kháng thể đơn dòng thể
khảm hoặc được làm tương thích với người đặc hiệu với epitop trung hoà chính của
hemagglutinin cúm H5 và mảnh hoạt tính của nó. Sáng chế còn mô tả phương pháp và
dược phẩm để phòng và điều trị cúm H5N1 bằng cách sử dụng các kháng thể đơn dòng của
chuột hoặc kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người hoặc mảnh
của nó.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng của chuột 4C2 hoặc kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người đặc hiệu với epitop trung hoà chính của hemagglutinin cúm H5 và mảnh hoạt tính của nó. Sáng chế còn mô tả phương pháp và chế phẩm để phòng và điều trị cúm H5N1 bằng cách sử dụng các kháng thể đơn dòng chuột hoặc kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người hoặc mảnh của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các ấn phẩm và các tài liệu khác nêu ra trong bản mô tả này được dùng để làm sáng tỏ tình trạng kỹ thuật của sáng chế hoặc cung cấp các chi tiết liên quan đến việc thực hiện sáng chế, được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn, và để thuận tiện được liệt kê trong phần danh sách tài liệu tham khảo.

Sự xuất hiện chủng H5N1 của virus cúm A gần đây và tỷ lệ tử vong cao do chúng gây ra ở người đã gây ra lo lắng về khả năng bùng phát của đại dịch cúm trong tương lai. Đã có những quan tâm và nỗ lực đáng kể ở quy mô toàn cầu để tìm kiếm các biện pháp phòng và trị liệu các chủng H5N1 đang lan truyền và để ngăn ngừa sự bùng phát của đại dịch khác. Các phương pháp dùng vacxin hiện nay không phát huy được tác dụng do sự thay đổi kháng nguyên của các chủng virus cúm. Các phương pháp này đòi hỏi phải tổng hợp kháng thể trong cơ thể, do vậy sẽ không có tác dụng bảo vệ nhanh chóng chống sự nhiễm H5N1 trong trường hợp có đại dịch. Các thuốc chống virus được cấp phép lưu hành hiện nay bao gồm các chất ức chế kênh ion do protein M2 tạo ra (rimantidin và amantidin) và các chất ức chế neuraminidaza (oseltamivir và zanamivir). Đã biết rằng virus H5N1 có tính kháng chất ức chế kênh ion do protein M2 tạo ra (Beigel et al., 2005). Các chủng virus H5N1 mới hơn hiện

đang được phân lập cũng có tính kháng các chất ức chế neuraminidaza như oseltamivir và zanamivir (Le et al., 2005, de Jong và Hien, 2006). Các chất ức chế neuraminidaza cần phải được dùng liều cao và thời gian điều trị kéo dài (de Jong và Hien, 2006), dẫn đến làm tăng khả năng xuất hiện các tác dụng phụ ngoài mong muốn. Do đó, cần đến các phương pháp khác để điều trị bệnh cúm.

Phép trị liệu miễn dịch thụ động bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng (mAb: monoclonal antibody) được xem như là một lựa chọn có triển vọng để điều trị nhiều bệnh nhiễm khuẩn. Hiện nay, người ta đang tập trung vào nghiên cứu phương pháp trị liệu bằng cách dùng kháng thể trung hoà tác động đến protein HA1 của virus cúm. Việc hướng đích đến protein này là dễ dàng vì nó nằm trên bề mặt của virus và kháng thể tác động đến protein này có thể trung hoà virus một cách hiệu quả. Do đó, kháng thể đơn dòng tác động đến epitop trung hoà của hemagglutinin (HA) H5 có thể là một biện pháp hấp dẫn thay cho việc chủng ngừa chủ động ở người, đặc biệt là ở những người có nguy cơ nhiễm bệnh cúm cao, ví dụ như người bệnh không phát triển được phản ứng miễn dịch thông thường, trẻ sơ sinh, trẻ nhỏ hoặc người già không có đáp ứng tốt với miễn dịch chủ động. Việc tạo miễn dịch thụ động bằng cách truyền huyết thanh lấy từ người đang phục hồi bệnh đã làm giảm 50% tỷ lệ tử vong trong đại dịch cúm và tỏ ra là có hiệu quả chống nhiễm virus cúm A H5N1 (Kong và Zhou, 2004; Luke et al., 2006). Điều quan trọng là sản phẩm mAb bất kỳ cần phải có tác dụng bảo vệ rộng chống lại các chủng virus cúm H5N1 đang lan truyền và phải ngăn ngừa được sự chọn lọc tạo ra thể đột biến không bị trung hoà *in vivo*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng đặc hiệu với epitop trung hoà chính của hemagglutinin cúm H5 và mảnh hoạt tính của nó. Sáng chế còn mô tả phương pháp và chế phẩm để phòng và điều trị cúm H5N1 bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng như vậy hoặc mảnh của nó.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng đặc hiệu với epitop trung hoà chính của hemagglutinin cúm H5 và mảnh hoạt tính của nó, tức

là mảnh gắn kết với kháng nguyên (trong bản mô tả này còn được gọi là mảnh kháng thể). Theo một phương án, kháng thể đơn dòng này là kháng thể đơn dòng của chuột 4C2. Theo phương án thứ hai, kháng thể đơn dòng này là kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người. Đặc biệt là, kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người gắn kết đặc hiệu với epitop cấu hình của hemagglutinin H5 mà kháng thể đơn dòng của chuột 4C2 gắn kết đặc hiệu. Theo một phương án, kháng thể đơn dòng (hoặc là kháng thể đơn dòng của chuột hoặc kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người) hoặc mảnh của nó gắn kết đặc hiệu với epitop cấu hình của hemagglutinin H5 (HA), trong đó epitop cấu hình này bao gồm axit amin 155 (Ser) và 189 (Arg) của protein HA trưởng thành. Theo một phương án khác, vùng xác định bổ sung (CDR) của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCDR) nằm trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:2 (trong bản mô tả này còn được gọi là HM448828 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của chuột nhắt). Theo một phương án bổ sung, trình tự axit amin cho các CDR biến đổi chuỗi nhẹ là: LCDR1: QDISGH (SEQ ID NO:5); LCDR2: HGT (SEQ ID NO:6); và LCDR3: VQYVQFPWT (SEQ ID NO:7). Theo một phương án, the vùng xác định bổ sung (CDR) của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCDR) nằm trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:4 (trong bản mô tả này còn được gọi là HM448827 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của chuột nhắt). Theo một phương án khác, trình tự axit amin cho các CDR biến đổi chuỗi nặng là: HCDR1: GYTFTTYW (SEQ ID NO:8); HCDR2: IDPYDSET (SEQ ID NO:9); và HCDR3: VRGGSTVAYFGV (SEQ ID NO:10).

Theo một phương án, ADN mã hoá HM448828 chứa trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một phương án khác, ADN mã hoá HM448827 chứa trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:3. Theo một phương án, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:2. Theo một phương án khác, vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:4. Theo một phương án, vùng ổn định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ thu được từ các tế bào tạo kháng thể người theo các kỹ thuật nhân dòng vô tính tiêu chuẩn. Theo một phương án khác vùng ổn định chuỗi nặng của người là vùng ổn định

chuỗi nặng IgG1 của người. Theo một phương án bổ sung, vùng ổn định chuỗi nặng IgG1 của người chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:22 (Số truy cập Ngân hàng gen GenBank AAX09634.1). Theo một phương án khác, trình tự axit nucleic mã hoá trình tự axit amin này được nêu trong SEQ ID NO:21 (số truy cập GenBank số AY885218.1). Theo một phương án, vùng ổn định chuỗi nhẹ của người là vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa của người. Theo một phương án khác, vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa của người này chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:24 (Số truy cập Ngân hàng gen GenBank.AAA58989.1). Theo một phương án khác, axit nucleic mã hoá trình tự này được nêu trong SEQ ID NO:23 (Số truy cập Ngân hàng gen GenBank J00241,1).

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hoá kháng thể đơn dòng của chuột 4C2 hoặc kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người được mô tả trong bản mô tả này hoặc mảnh gắn kết với kháng nguyên của chúng. Ví dụ về trình tự axit nucleic bao gồm các trình tự được mô tả trong bản mô tả này. Theo một phương án bổ sung, sáng chế đề xuất vector chứa axit nucleic. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào chứa và biểu hiện vector.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế mô tả phương pháp và chế phẩm để phòng và điều trị cúm H5N1 bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng của chuột 4C2 như vậy hoặc kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người hoặc mảnh của nó. Theo một phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng của chuột 4C2 hoặc kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người được mô tả trong bản mô tả này và chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng. Theo một phương án khác, dược phẩm này chứa mảnh gắn kết với kháng nguyên của kháng thể đơn dòng này được mô tả trong bản mô tả này và chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng. Theo một phương án bổ sung, dược phẩm này chứa phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể hoặc mảnh kháng thể nêu trên và chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng. Theo một phương án khác, dược phẩm này chứa vector chứa axit nucleic nêu trên và chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng. Theo một phương án khác, dược phẩm này chứa tế bào biểu hiện vector nêu trên và chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp làm giảm nhiễm virus cúm H5N1 ở đối tượng, hoặc làm giảm nguy cơ nhiễm virus cúm H5N1 ở đối tượng, ức chế sự nhiễm một hoặc nhiều chủng virus cúm H5N1 hoặc các thể phân lập của nó ở đối tượng, hoặc phòng ngừa sự nhiễm bệnh cúm hoặc bệnh do một hoặc nhiều chủng virus cúm H5N1 hoặc thể phân lập gây ra. Theo phương án này, phương pháp này bao gồm việc cấp cho đối tượng cần sử dụng, lượng hữu hiệu trị liệu của kháng thể đơn dòng của chuột 4C2 hoặc kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người được mô tả trong bản mô tả này, hoặc mảnh gắn kết với kháng nguyên của chúng, phân tử axit nucleic chứa polynucleotit mã hoá kháng thể hoặc mảnh kháng thể nêu trên; vectơ chứa polynucleotit nêu trên; hoặc tế bào biểu hiện vectơ nêu trên. Theo một phương án, đối tượng này là đối tượng không phát triển được phản ứng miễn dịch thông thường, là trẻ sơ sinh, là trẻ nhỏ hoặc là người già. Theo một phương án khác, việc cấp mang lại hiệu quả trị liệu. Theo một phương án bổ sung, hiệu quả trị liệu bao gồm ức chế sự tăng hiệu giá virus cúm, làm giảm hiệu giá virus cúm, ức chế sự tăng sao chép virus cúm, làm giảm sao chép virus cúm, ức chế sự tăng tăng sinh virus cúm hoặc làm giảm sự tăng sinh virus cúm, hoặc làm giảm sự tiến triển, mức độ nghiêm trọng, tần suất, thời gian mắc hoặc khả năng có thể mắc một hoặc nhiều triệu chứng hoặc biến chứng liên quan đến nhiễm virus cúm ở đối tượng. Theo một phương án, triệu chứng hoặc biến chứng được chọn từ chứng cảm lạnh, sốt, ho, đau họng, chứng xung huyết mũi, xung huyết xoang, viêm nhiễm đường mũi, viêm nhiễm xoang, đau người, đau đầu, mệt mỏi, viêm phổi, bệnh viêm phế quản, viêm nhiễm tai, đau tai và tử vong. Theo một phương án khác, hiệu quả trị liệu này bao gồm đẩy nhanh quá trình phục hồi của đối tượng khỏi nhiễm virus cúm H5N1. Theo một phương án khác, tác nhân này được cấp cho đối tượng được cấp trước, về cơ bản đồng thời với hoặc sau khi nhiễm virus cúm H5N1 của đối tượng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các Fig. 1A và 1B thể hiện hiệu quả phòng bệnh của mAb 4C2 ở chuột nhắt. Mỗi nhóm chuột nhắt được xử lý trước bằng 2,5mg/kg, 5mg/kg hoặc 10mg/kg mAb 4C2, một ngày trước khi tác động bằng 5MLD₅₀ H5N1 Indonesian HPAI đã được làm thích ứng với chuột nhắt từ virus đơn vị huyết thống 1 A/HK/213/2003 (Fig. 1A) hoặc

đơn vị huyết thống 2.1 A/TLL013/06 (Fig. 1B). Chuột nhất được theo dõi về sự sống sót trong suốt thời gian quan sát 14 ngày. Các kết quả được thể hiện là phần trăm sự sống sót.

Các Fig. 2A và 2B thể hiện hiệu quả điều trị của mAb 4C2 ở chuột nhất. Mỗi nhóm chuột nhất được xử bằng 2,5mg/kg, 5mg/kg hoặc 10mg/kg mAb 4C2 một ngày sau khi tác động bằng H5N1 Indonesian HPAI đã được làm thích ứng với chuột nhất từ virus đơn vị huyết thống 1 A/HK/213/2003 (Fig. 2A) và đơn vị huyết thống 2.1 A/TLL013/06 (Fig. 2B). Chuột nhất được theo dõi về sự sống sót trong suốt thời gian quan sát 14 ngày. Các kết quả được thể hiện là phần trăm sự sống sót.

Các Fig. 3A và 3B thể hiện hiệu quả phòng bệnh của 4C2 thể khảm ở chuột nhất. Mỗi nhóm chuột nhất được xử lý trước bằng 2,5mg/kg, 5mg/kg hoặc 10mg/kg ch4C2 một ngày trước khi tác động (kích thích) bằng 5MLD₅₀ H5N1 Indonesian HPAI đã được làm thích ứng với chuột nhất từ virus đơn vị huyết thống 1 A/HK/213/2003 (Fig. 3A) hoặc đơn vị huyết thống 2.1 A/TLL013/06 (Fig. 3B). Chuột nhất được theo dõi về sự sống sót trong suốt thời gian quan sát 14 ngày. Các kết quả được thể hiện là phần trăm sự sống sót.

Các Fig. 4A và 4B thể hiện hiệu quả điều trị của 4C2 thể khảm ở chuột nhất. Mỗi nhóm chuột nhất được xử bằng 2,5mg/kg, 5mg/kg hoặc 10mg/kg of ch4C2 một ngày sau tác động bằng H5N1 Indonesian HPAI đã được làm thích ứng với chuột nhất từ virus đơn vị huyết thống 1 A/HK/213/2003 (Fig. 4A) và đơn vị huyết thống 2.1A/TLL013/06 (Fig. 4B). Chuột nhất được theo dõi về sự sống sót trong suốt thời gian quan sát 14 ngày. Các kết quả được thể hiện là phần trăm sự sống sót.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng của chuột 4C2 hoặc kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người đặc hiệu với epitop trung hoà chính của hemagglutinin cúm H5 và mảnh hoạt tính của nó. Sáng chế còn mô tả phương pháp và chế phẩm để phòng và điều trị cúm H5N1 bằng cách sử dụng kháng thể đơn

dòng chuột như vậy hoặc kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người hoặc mảnh của nó.

Cụm từ "được phân lập" dùng để chỉ phân tử chất liệu sinh học được tách ra khỏi ít nhất một số trong các hợp phần xuất hiện trong tự nhiên cùng với nó.

Các thuật ngữ "kháng thể" hoặc "các kháng thể" như được sử dụng ở bản mô tả này là các thuật ngữ được dùng trong lĩnh vực kỹ thuật này và được hiểu là dùng để chỉ các phân tử hoặc mảnh hoạt tính của các phân tử mà gắn kết với các kháng nguyên đã biết, đặc biệt là các phân tử globulin miễn dịch và các phân tử có hoạt tính miễn dịch của các phân tử globulin miễn dịch, tức là các phân tử có vị trí gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên. Globulin miễn dịch là protein chứa một hoặc nhiều polypeptit về cơ bản được mã hoá bởi gen của vùng ổn định kappa và lambda, alpha, gamma, delta, epsilon và mu của globulin miễn dịch, cũng như gen vùng biến đổi globulin miễn dịch myriad. Các chuỗi nhẹ được phân loại là kappa hoặc lambda. Các chuỗi nặng được phân loại là gamma, mu, alpha, delta, hoặc epsilon, mà các chuỗi nặng này là yếu tố xác định các nhóm globulin miễn dịch lần lượt là IgG, IgM, IgA, IgD và IgE. Ngoài ra, cũng đã biết phân nhóm của chuỗi nặng. Ví dụ, chuỗi nặng IgG ở người có thể là phân nhóm IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4 bất kỳ. Globulin miễn dịch theo sáng chế có thể thuộc nhóm bất kỳ (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA và IgY) hoặc phân nhóm (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2) của phân tử globulin miễn dịch.

Như được sử dụng ở bản mô tả này "gắn kết đặc hiệu" khi nói đến kháng thể có nghĩa là kháng thể gắn kết với kháng nguyên đích của nó với ái lực lớn hơn so với sự gắn kết của nó với các kháng nguyên có cấu trúc khác.

Đơn vị cấu trúc globulin miễn dịch điển hình đã được biết đến là tetrame. Mỗi tetrame được cấu thành từ hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi cặp có một chuỗi "nhẹ" (khoảng 25kD) và một chuỗi "nặng" (khoảng 50-70kD). Đầu tận N của mỗi chuỗi xác định vùng biến đổi vào khoảng 100 đến 110 axit amin hoặc nhiều hơn chủ yếu chịu trách nhiệm cho việc nhận biết kháng nguyên. Các thuật ngữ chuỗi nhẹ biến

đôi (V_L) và chuỗi nặng biến đổi (V_H) lần lượt dùng để chỉ các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng này.

Kháng thể tồn tại ở dạng kháng thể nguyên vẹn có chiều dài đầy đủ hoặc một số mảnh đã được đặc tả được tạo ra bằng cách phân cắt bằng các peptidaza hoặc hoá chất khác nhau. Do vậy, ví dụ, pepsin phân cắt kháng thể ở phía dưới mỗi liên kết disulfua trong vùng bản lề để tạo ra $F(ab')_2$, là đime của Fab mà là chuỗi nhẹ kết nối với V_H-CH_1 bằng liên kết disulfua. $F(ab')_2$ có thể được phân giải ở điều kiện nhẹ nhàng để phá vỡ mỗi liên kết disulfua trong vùng bản lề nhờ đó chuyển hoá đime $F(ab')_2$ thành monome Fab'. Monome Fab' này về cơ bản là mảnh Fab với một phần của vùng bản lề (xem Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993) cho mô tả chi tiết hơn về các mảnh kháng thể khác). Trong khi mà các mảnh kháng thể khác nhau được xác định từ sự phân cắt kháng thể nguyên vẹn, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận biết rằng mỗi mảnh bất kỳ trong số nhiều mảnh kháng thể có thể được tổng hợp de novo hoặc bằng phương pháp hoá học hoặc bằng cách sử dụng phương pháp ADN tái tổ hợp. Do vậy, thuật ngữ kháng thể, như được sử dụng ở bản mô tả này còn bao gồm mảnh kháng thể hoặc tạo ra bằng cách biến đổi phân tử kháng thể nguyên vẹn hoặc được tổng hợp de novo hoặc kháng thể và mảnh thu được bằng phương pháp ADN tái tổ hợp.

"Kháng thể" trong phạm vi của sáng chế được dự định là bao gồm kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người, cũng như mảnh hoạt tính của nó. Ví dụ về mảnh hoạt tính của các phân tử mà gắn kết với các kháng nguyên đã biết bao gồm các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được tách riêng, mảnh Fab, Fab/c, Fv, Fab', và $F(ab')_2$, bao gồm sản phẩm của thư viện biểu hiện globulin miễn dịch Fab và mảnh gắn kết với epitop của kháng thể và mảnh bất kỳ được đề cập trên đây.

Có thể thu được các mảnh hoạt tính này từ kháng thể theo sáng chế bằng cách dùng một số kỹ thuật. Ví dụ, kháng thể đơn dòng có thể bị phân cắt bằng enzym, chẳng hạn như pepsin, và được xử lý bằng bước lọc gel HPLC. Sau đó, các phần thích hợp chứa mảnh Fab có thể được thu gom và cô đặc bằng cách lọc màng và các phương pháp tương tự. Tham khảo mô tả chi tiết hơn các kỹ thuật thông thường để

phân lập mảnh hoạt tính của kháng thể, chẳng hạn trong Khaw et al. (1982); Rousseaux et al. (1986).

Các kháng thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp có thể là kháng thể có chiều dài đầy đủ thông thường, mảnh kháng thể hoạt tính đã biết từ phân cắt protein phân, mảnh kháng thể hoạt tính duy nhất chẳng hạn như Fv hoặc chuỗi đơn Fv (scFv), kháng thể được làm khuyết miễn, và các kháng thể tương tự. Kháng thể Fv có kích cỡ khoảng 50Kd và chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Polypeptit Fv chuỗi đơn ("scFv") là heterodime VH::VL được liên kết đồng hoá trị là có thể được biểu hiện từ axit nucleic bao gồm các trình tự mã hoá VH và VL hoặc được liên kết trực tiếp hoặc được liên kết bằng môi liên kết mã hoá peptit. Xem Huston et al. (1988). Một số cấu trúc có thể chuyển hoá chuỗi polypeptit nhẹ và nặng kết với nhau khi ở trạng thái tự nhiên nhưng được tách ra khỏi nhau bằng phương pháp hoá học ra khỏi vùng V kháng thể thành phân tử scFv phân tử này sẽ cuộn gập thành cấu trúc ba chiều về cơ bản tương tự với cấu trúc của vị trí gắn kết với kháng nguyên. Xem ví dụ patent Mỹ số 5,091,513; 5,132,405 và 4,956,778.

Vị trí kết hợp dùng để chỉ phần phân tử kháng thể mà tham gia vào sự gắn kết với kháng nguyên. Vị trí gắn kết với kháng nguyên được tạo ra bởi các gốc axit amin của vùng biến đổi ("V") đầu tận N của chuỗi nặng ("H") và nhẹ ("L"). Vùng biến đổi của kháng thể chứa ba đoạn đuôi có tính phân hướng cao được gọi là "vùng siêu biến" hoặc "vùng xác định bổ cứu" (CDR) nằm giữa các vùng đoạn đuôi nằm bên sườn có tính bảo toàn hơn được biết đến là "vùng khung" (FR). Trong phân tử kháng thể, ba vùng siêu biến của chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2, và LCDR3) và ba vùng siêu biến của chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) được bố trí tương ứng so với nhau trong không gian ba chiều để tạo ra bề mặt hoặc túi gắn kết với kháng nguyên. Do đó, vị trí kết hợp của kháng thể là các axit amin cấu thành các CDR của kháng thể và các gốc khung bất kỳ mà tạo ra túi vị trí gắn kết.

Có thể xác định việc nhận diện các gốc axit amin ở một kháng thể cụ thể tạo ra vị trí kết hợp bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2010/0080800. Việc nhận diện các

gốc axit amin trong một kháng thể cụ thể mà nằm ngoài các CDR, tuy nhiên vẫn tạo nên một phần của vị trí kết hợp nhờ có mạch bên là một phần của lớp lót của vị trí kết hợp (tức là có thể liên kết thông qua vị trí kết hợp), có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này chẳng hạn như tạo mẫu phân tử và tinh thể học tia X. Xem ví dụ, Riechmann et al. (1988).

Kháng thể thể khảm là các kháng thể trong đó một hoặc nhiều vùng của kháng thể là từ một loài động vật và một hoặc nhiều vùng kháng thể là từ loài động vật khác. Kháng thể thể khảm được ưu tiên là kháng thể bao gồm vùng từ globulin miễn dịch của động vật linh trưởng. Kháng thể thể khảm dùng cho ứng dụng lâm sàng trên người thường được hiểu là có vùng biến đổi từ động vật không phải là người, ví dụ loài gặm nhấm, có vùng ổn định từ người. Ngược lại, kháng thể được làm tương thích với người sử dụng các CDR từ kháng thể không phải là người với phần lớn hoặc tất cả các vùng khung biến đổi từ và tất cả các vùng ổn định từ globulin miễn dịch của người. Kháng thể thể khảm dùng cho người thường được hiểu là có vùng biến đổi từ loài gặm nhấm. Kháng thể thể khảm của người điển hình có vùng ổn định chuỗi nặng từ người và vùng ổn định chuỗi nhẹ từ người với vùng biến đổi của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ từ kháng thể loài gặm nhấm. Kháng thể thể khảm có thể bao gồm một số thay đổi về trình tự axit amin nguyên thể của vùng ổn định người và trình tự vùng biến đổi loài gặm nhấm nguyên thể. Có thể điều chế kháng thể thể khảm và được làm tương thích với người theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm các phương pháp ghép CDR (xem ví dụ, patent Mỹ số 5,843,708; 6,180,370; 5,693,762; 5,585,089; 5,530,101), phương pháp sắp xếp lại trật tự mạch (xem ví dụ, patent Mỹ số 5,565,332; Rader et al. (1998)), phương pháp tạo mẫu phân tử (patent Mỹ số 5,639,641), và các phương pháp tương tự.

"Kháng thể được làm tương thích với người" như được sử dụng ở bản mô tả này trong trường hợp kháng thể gồm hai chuỗi là kháng thể trong đó ít nhất một chuỗi là được làm tương thích với người. Chuỗi kháng thể được làm tương thích với người có vùng biến đổi trong đó một hoặc nhiều vùng khung là người. Kháng thể được làm tương thích với người dạng chuỗi đơn là kháng thể trong đó chuỗi này có vùng biến đổi trong đó một hoặc nhiều vùng khung là từ người. Các phần không phải là từ người

của vùng biến đổi của chuỗi kháng thể được làm tương thích với người hoặc mảnh của nó là thu được từ nguồn không phải là người, đặc biệt là kháng thể không phải của người, thông thường là có nguồn gốc từ loài gặm nhấm. Sự tham gia của các phần không phải là người của kháng thể được làm tương thích với người thường được tạo ra ở dạng ít nhất một vùng CDR nằm rải rác trong vùng khung thu được từ một (hoặc nhiều) globulin miễn dịch người. Ngoài ra, các gốc trợ giúp vùng khung có thể được biến đổi để có được ái lực gắn kết.

Kháng thể được làm tương thích với người có thể chứa vùng ổn định (ví dụ, ít nhất một vùng ổn định hoặc phần của nó, trong trường hợp chuỗi nhẹ, và tốt hơn nếu là ba vùng ổn định trong trường hợp chuỗi nặng). Vùng ổn định của kháng thể được làm tương thích với người nếu có mặt thường là của người. Các phương pháp để thu được "kháng thể được làm tương thích với người" là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, công bố đơn xin cấp patent Mỹ số 2010/0080800.

Thuật ngữ vùng ổn định (CR) như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ gen của vùng ổn định của globulin miễn dịch. Các gen của vùng ổn định mã hoá phần phân tử kháng thể mang lại chức năng hiệu ứng. Đối với kháng thể người thể khảm và kháng thể được làm tương thích với người, thông thường vùng ổn định không phải là của người (ví dụ, của chuột) được thay thế bằng vùng ổn định của người. Vùng ổn định của đối tượng kháng thể thể khảm hoặc được làm tương thích với người thường thu được từ globulin miễn dịch của người. Vùng ổn định chuỗi nặng có thể được chọn từ dạng isotyp bất kỳ trong năm isotyp: alpha, delta, epsilon, gamma hoặc mu. Ngoài ra, các chuỗi nặng của các phân nhóm khác nhau (chẳng hạn như phân nhóm IgG của các chuỗi nặng) chịu trách nhiệm cho các chức năng hiệu ứng khác nhau và do đó, bằng cách lựa chọn vùng ổn định chuỗi nặng mong muốn, có thể tạo ra kháng thể với chức năng hiệu ứng mong muốn. Vùng ổn định mà có thể được sử dụng nằm trong phạm vi của sáng chế là gamma 1 (IgG1), đặc biệt vùng Fc của isotyp gamma 1 (IgG1), gamma 3 (IgG3) và đặc biệt là gamma 4 (IgG4). Vùng ổn định chuỗi nhẹ có thể là dạng kappa hoặc lambda, tốt hơn nếu là dạng kappa. Theo một phương án, vùng

ổn định chuỗi nhẹ là chuỗi ổn định kappa của người (Hieter et al. (1980)) và chuỗi ổn định nặng là chuỗi ổn định IgG4 của người.

Thuật ngữ vùng biến đổi (VR) như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ các miền trong mỗi cặp các chuỗi nhẹ và nặng trong kháng thể tham gia trực tiếp vào việc gắn kết kháng thể với kháng nguyên. Mỗi chuỗi nặng có ở một đầu là miền biến đổi (V_H) tiếp theo là một số miền ổn định. Mỗi chuỗi nhẹ có miền biến đổi (V_L) ở một đầu và miền ổn định ở đầu kia của nó; miền ổn định của chuỗi nhẹ được sắp hàng với miền ổn định thứ nhất của chuỗi nặng, và miền biến đổi của chuỗi nhẹ được sắp hàng với miền biến đổi của chuỗi nặng.

Thuật ngữ vùng khung (FR) như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ một hoặc nhiều vùng khung trong vùng biến đổi của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể (Xem Kabat et al. (1992); Johnson và Wu (2001); <http://colon.backslash.backslash.immuno.dot.bme.dot.nyu.dot.edu>). Các thuật ngữ này bao gồm các vùng trình tự axit amin nằm giữa các CDR trong vùng biến đổi của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể.

Các gốc CDR và FR được xác định theo định nghĩa trình tự tiêu chuẩn (Kabat et al. (1992)), và định nghĩa cấu trúc (ví dụ, như trong Chothia and Lesk (1987)). Khi mà hai phương pháp này dẫn đến sự nhận diện hơi khác nhau về CDR, thì định nghĩa cấu trúc là được ưu tiên, nhưng các gốc được nhận diện bằng cách phương pháp định nghĩa trình tự được xem là các gốc FR quan trọng cho việc quyết định các gốc khung nào sẽ được đưa vào trình tự liên ứng.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" cũng là thuật ngữ được dùng rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này và dùng để chỉ kháng thể là sản phẩm của một tế bào tạo kháng thể được tách dòng. Kháng thể đơn dòng thường được tạo ra bằng cách dung hợp tế bào B tạo kháng thể có thời gian sống ngắn bình thường với tế bào phát triển nhanh, chẳng hạn như tế bào ung thư (đôi khi còn được gọi là tế bào "bất tử"). Tế bào lai thu được, hoặc khối tế bào lai, nhân lên một cách nhanh chóng, tạo ra dòng vô tính sản xuất kháng thể.

Thuật ngữ "mảnh" dùng để chỉ phần hoặc một bộ phận của kháng thể hoặc chuỗi kháng thể chứa ít gốc axit amin hơn kháng thể hoặc chuỗi kháng thể nguyên vẹn hoặc đầy đủ. Có thể thu được mảnh bằng cách xử lý bằng phương pháp hoá học hoặc enzym kháng thể hoặc chuỗi kháng thể nguyên vẹn hoặc đầy đủ. Ngoài ra cũng có thể thu được mảnh bằng phương pháp tái tổ hợp. Các mảnh đưa ra làm ví dụ bao gồm mảnh Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc và/hoặc mảnh Fv. Thuật ngữ "mảnh gắn kết với kháng nguyên" dùng để chỉ mảnh polypeptit của globulin miễn dịch hoặc kháng thể mà gắn kết với kháng nguyên hoặc cạnh tranh với kháng thể nguyên vẹn (tức là với kháng thể nguyên vẹn mà chúng được tạo ra từ đó) cho sự gắn kết với kháng nguyên (tức là gắn kết đặc hiệu). Mảnh gắn kết được tạo ra bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp, hoặc bằng cách phân cắt bằng hoá học hoặc enzym globulin miễn dịch nguyên vẹn. Các mảnh gắn kết bao gồm Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, và kháng thể chuỗi đơn.

Kháng thể được làm tương thích với người có tính sinh miễn dịch giảm đi dùng để chỉ kháng thể được làm tương thích với người có tính sinh miễn dịch giảm đi so với kháng thể gốc, ví dụ, kháng thể chuột.

Kháng thể được làm tương thích với người về cơ bản giữ được các đặc tính gắn kết của kháng thể gốc dùng để chỉ kháng thể được làm tương thích với người duy trì được khả năng gắn kết đặc hiệu kháng nguyên được nhận biết bởi kháng thể gốc được dùng để tạo ra kháng thể được làm tương thích với người này. Tốt hơn nếu kháng thể được làm tương thích với người ái lực gắn kết với kháng nguyên và tính phạm giống như hoặc về cơ bản giống như kháng thể gốc. Lý tưởng là, ái lực của kháng thể sẽ không nhỏ hơn 10% ái lực của kháng thể gốc, tốt hơn nữa nếu không nhỏ hơn khoảng 30%, và tốt nhất nếu ái lực này sẽ không nhỏ hơn 50% ái lực của kháng thể gốc. Các phương pháp đánh giá ái lực gắn kết với kháng nguyên là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm thử nghiệm gắn kết bán tối ưu (half-maximal binding assay), thử nghiệm cạnh tranh, và phân tích Scatchard.

Ngoài ra, thuật ngữ "với một lượng điều trị hữu hiệu" dùng để chỉ lượng kháng thể mà, khi được dùng cho người hoặc động vật, đủ để mang lại tác dụng trị liệu ở người hoặc động vật nêu trên. Lượng hữu hiệu được xác định một cách dễ dàng

bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này theo quy trình thông thường.

Như được sử dụng ở bản mô tả này, các thuật ngữ "điều trị" "phòng ngừa," "phòng" và "ngăn ngừa" dùng để chỉ việc phòng sự xuất hiện hoặc khởi phát của một hoặc nhiều triệu chứng của rối loạn ở đối tượng tạo ra nhờ việc cấp tác nhân phòng bệnh hoặc trị liệu.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng đặc hiệu với epitop trung hoà chính của hemagglutinin cúm H5 và mảnh hoạt tính của nó, tức là mảnh gắn kết với kháng nguyên (trong bản mô tả này còn được gọi là mảnh kháng thể). Theo một phương án, kháng thể đơn dòng này là kháng thể đơn dòng của chuột 4C2. Kháng thể đơn dòng của chuột 4C2 được tạo ra từ khối tế bào lai chuột nhất 4C2. Khối tế bào lai chuột nhất 4C2 được gửi nộp lưu ngày 3/8/2010 theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest với Trung tâm nuôi cấy Mỹ (American Type Culture Collection), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110, USA, và có số truy cập PTA-11241. Sáng chế còn đề cập đến khối tế bào lai tạo kháng thể đơn dòng của chuột 4C2. Theo phương án thứ hai, kháng thể đơn dòng này là kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người. Đặc biệt là, kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người gắn kết đặc hiệu với epitop cấu hình của hemagglutinin H5 mà kháng thể đơn dòng của chuột 4C2 gắn kết đặc hiệu. Theo một phương án, kháng thể đơn dòng (hoặc là kháng thể đơn dòng của chuột hoặc kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người) hoặc mảnh của nó gắn kết đặc hiệu với epitop cấu hình của hemagglutinin H5 (HA), trong đó epitop cấu hình này bao gồm axit amin 155 (Ser) và 189 (Arg) của protein HA trưởng thành. Theo một phương án khác, vùng xác định bổ sung (CDR) của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCDR) nằm trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:2 (trong bản mô tả này còn được gọi là HM448828 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chuột nhất). Theo một phương án bổ sung, trình tự axit amin cho các CDR biến đổi chuỗi nhẹ là: LCDR1: QDISGH (SEQ ID NO:5); LCDR2: HGT (SEQ ID NO:6); và LCDR3: VQYVQFPWT (SEQ ID NO:7). Theo một phương án, vùng xác định bổ sung (CDR) của vùng biến đổi chuỗi nặng này (HCDR) nằm trong trình tự axit amin

được nêu trong SEQ ID NO:4 (trong bản mô tả này còn được gọi là HM448827 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của chuột nhắt). Theo một phương án khác, trình tự axit amin cho các CDR biến đổi chuỗi nặng là: HCDR1: GYTFTTYW (SEQ ID NO:8); HCDR2: IDPYDSET (SEQ ID NO:9); và HCDR3: VRGGSTVAYFGV (SEQ ID NO:10).

Theo một phương án, ADN mã hoá HM448828 chứa trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một phương án khác, ADN mã hoá HM448827 chứa trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO:3. Theo một phương án, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:2. Theo một phương án khác, vùng biến đổi chuỗi nặng này chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:4. Theo một phương án, vùng ổn định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là từ người. Theo một phương án khác, vùng ổn định chuỗi nặng của người là vùng ổn định chuỗi nặng IgG1 của người. Theo một phương án bổ sung, vùng ổn định chuỗi nặng IgG1 của người chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:22 (Số truy cập Ngân hàng gen GenBank AAX09634.1). Theo một phương án khác, trình tự axit nucleic mã hoá trình tự axit amin này được nêu trong SEQ ID NO:21 (Số truy cập GenBank số AY885218.1). Theo một phương án, vùng ổn định chuỗi nhẹ của người là vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa của người. Theo một phương án khác, vùng ổn định chuỗi nhẹ kappa của người này chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:24 (Số truy cập Ngân hàng gen GenBank.AAA58989.1). Theo một phương án khác, axit nucleic mã hoá trình tự này được nêu trong SEQ ID NO:23 (Số truy cập Ngân hàng gen GenBank J00241.1).

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hoá kháng thể đơn dòng của chuột 4C2 hoặc kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người được mô tả trong bản mô tả này hoặc mảnh gắn kết với kháng nguyên của chúng. Ví dụ về trình tự axit nucleic bao gồm các trình tự được mô tả trong bản mô tả này. Theo một phương án bổ sung, sáng chế đề xuất vector chứa axit nucleic này. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào chứa và biểu hiện vector này.

Theo một phương án, kháng thể được làm tương thích với người được điều chế bằng cách kết hợp các vùng ổn định chuỗi nhẹ và chuỗi nặng người với vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng chuột nhất bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này, cũng như các kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Theo một phương án khác, kháng thể được làm tương thích với người được điều chế trong đó các trình tự ADN được tổng hợp mã hoá trình tự V_L và V_H được làm tương thích với người chứa các CDR lần lượt của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng chuột nhất được mô tả trong bản mô tả này.

Các phương pháp tổng hợp ADN mã hoá protein có trình tự đã biết là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Bằng cách sử dụng các phương pháp như vậy, các trình tự ADN mà mã hoá kháng thể được làm tương thích với người là đối tượng của sáng chế được tổng hợp, và sau đó được biểu hiện trong các hệ vector thích hợp để biểu hiện kháng thể tái tổ hợp. Quá trình này có thể được thực hiện trong hệ vector bất kỳ mà tạo ra trình tự kháng thể được làm tương thích với người đối tượng của sáng chế, chẳng hạn như biểu hiện của protein dung hợp chứa trình tự miền ổn định của người và trình tự miền biến đổi của chuột nhất được kết hợp với nhau để tạo ra kháng thể chức năng (gắn kết với kháng nguyên).

Các vector biểu hiện, tế bào vật chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể tái tổ hợp và đặc biệt là kháng thể được làm tương thích với người và các phương pháp thích hợp để biểu hiện các kháng thể này đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 7,074,406.

Tế bào vật chủ đã biết có khả năng biểu hiện globulin miễn dịch chức năng bao gồm, ví dụ, tế bào của động vật có vú chẳng hạn như các tế bào buồng trứng chuột túi má Trung quốc (CHO: Chinese Hamster Ovary), các tế bào COS, các tế bào u tủy, vi khuẩn chẳng hạn như *Escherichia coli*, các tế bào nấm men chẳng hạn như *Saccharomyces cerevisiae*, ngoài ra là các tế bào vật chủ khác. Trong số các loại tế bào này, nhiều nhà nghiên cứu sử dụng tế bào CHO do chúng có khả năng biểu hiện một cách hiệu quả và tiết ra globulin miễn dịch.

Chủ yếu thì biểu hiện tái tổ hợp kháng thể được làm tương thích với người được thực hiện bằng một trong số hai phương pháp chung. Trong phương pháp thứ nhất, các tế bào vật chủ được chuyển nạp bằng một vector tạo ra biểu hiện của cả trình tự biến đổi chuỗi nặng và nhẹ được dung hợp với vùng ổn định được lựa chọn. Trong phương pháp thứ hai, tế bào vật chủ được chuyển nạp bằng hai vector, mà lần lượt tạo ra biểu hiện của một trong số trình tự biến đổi chuỗi nặng hoặc nhẹ được dung hợp với vùng ổn định được chọn lọc.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế mô tả phương pháp và chế phẩm để phòng và điều trị cúm H5N1 bằng cách sử dụng như vậy kháng thể đơn dòng của chuột 4C2 hoặc kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người hoặc mảnh của nó. Theo một phương án, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể đơn dòng của chuột 4C2 hoặc kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người được mô tả trong bản mô tả này và chất pha loãng hoặc chất mang được dung. Theo một phương án khác, được phẩm này chứa mảnh gắn kết với kháng nguyên của kháng thể đơn dòng này được mô tả trong bản mô tả này và chất pha loãng hoặc chất mang được dung. Theo một phương án bổ sung, được phẩm này chứa phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể hoặc mảnh kháng thể nêu trên và chất pha loãng hoặc chất mang được dung. Theo một phương án khác, được phẩm này chứa vector chứa axit nucleic nêu trên và chất pha loãng hoặc chất mang được dung. Theo một phương án khác, được phẩm này chứa tế bào biểu hiện vector nêu trên và chất pha loãng hoặc chất mang được dung.

Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp làm giảm nhiễm virus cúm H5N1 ở đối tượng, hoặc làm giảm nguy cơ nhiễm virus cúm H5N1 ở đối tượng, ức chế sự nhiễm một hoặc nhiều chủng virus cúm H5N1 hoặc các thể phân lập của nó ở đối tượng, hoặc phòng ngừa sự nhiễm bệnh cúm hoặc bệnh do một hoặc nhiều chủng virus cúm H5N1 hoặc thể phân lập gây ra. Theo phương án này, phương pháp này bao gồm việc cấp cho đối tượng cần sử dụng, lượng hữu hiệu trị liệu của kháng thể đơn dòng của chuột 4C2 hoặc kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người được mô tả trong bản mô tả này, hoặc mảnh gắn kết với kháng nguyên của chúng, phân tử axit nucleic chứa polynucleotit mã hoá kháng thể hoặc mảnh kháng thể

nêu trên; vector chứa polynucleotit nêu trên; hoặc tế bào biểu hiện vector nêu trên. Theo một phương án, đối tượng này là đối tượng không phát triển được phản ứng miễn dịch thông thường, là trẻ sơ sinh, là trẻ nhỏ hoặc là người già. Theo một phương án khác, việc cấp mang lại hiệu quả trị liệu. Theo một phương án bổ sung, hiệu quả trị liệu bao gồm việc ức chế sự tăng hiệu giá virus cúm, làm giảm hiệu giá virus cúm, ức chế sự tăng sao chép virus cúm, làm giảm sao chép virus cúm, ức chế sự tăng sinh virus cúm hoặc làm giảm sự tăng sinh virus cúm, hoặc làm giảm sự tiến triển, mức độ nghiêm trọng, tần suất, thời gian mắc hoặc khả năng có thể mắc một hoặc nhiều triệu chứng hoặc biến chứng liên quan đến nhiễm virus cúm ở đối tượng. Theo một phương án, triệu chứng hoặc biến chứng được chọn từ chứng cảm lạnh, sốt, ho, đau họng, chứng xung huyết mũi, xung huyết xoang, viêm nhiễm đường mũi, viêm nhiễm xoang, đau người, đau đầu, mệt mỏi, viêm phổi, bệnh viêm phế quản, viêm nhiễm tai, đau tai và tử vong. Theo một phương án khác, hiệu quả trị liệu này bao gồm đẩy nhanh quá trình phục hồi của đối tượng khỏi nhiễm virus cúm H5N1. Theo một phương án khác, tác nhân này được cấp cho đối tượng được cấp trước khi, về cơ bản đồng thời với hoặc sau khi nhiễm virus cúm H5N1 của đối tượng.

Các kháng thể này theo sáng chế có thể được điều chế thành chế phẩm phù hợp sinh lý và có thể chứa chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá dược được dụng bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế và như mô tả trong bản mô tả này bao gồm kháng thể tương đương về mặt chức năng bất kỳ hoặc phần chức năng của nó được kết hợp với chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá dược được dụng để tạo ra chế phẩm trị liệu. Chất mang, chất pha loãng và/hoặc tá dược được dụng là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, ví dụ như, các dung dịch muối đệm phosphat, nước, các nhũ tương chẳng hạn như nhũ tương dầu trong nước, các dạng khác nhau như tác nhân thẩm ướt, các dung dịch vô trùng, v.v.

Có thể bào chế chế phẩm của dược phẩm theo sáng chế theo các phương pháp tiêu chuẩn đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Ed., Ed. D.B. Troy, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, 2006, tài liệu này được kết hợp với bản mô tả này theo cách viện dẫn.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được cấp cho đối tượng ở dạng rắn, lỏng hoặc dạng sol khí ở liều hữu hiệu trị liệu thích hợp. Ví dụ về các chế phẩm dạng rắn bao gồm viên thuốc tròn, kem, và dạng đơn vị phân liều dùng cấy ghép. Viên thuốc tròn có thể được cấp qua đường miệng. Kem trị liệu có thể được cấp khu trú. Đơn vị phân liều dùng cấy ghép có thể được cấp cục bộ, ví dụ, ở vị trí u, hoặc có thể cấy vào để giải phóng ra toàn thân chế phẩm trị liệu, ví dụ như, ở dưới da. Ví dụ chế phẩm dạng lỏng bao gồm chế phẩm thích hợp để tiêm bắp, dưới da, trong tĩnh mạch, trong động mạch, và chế phẩm dùng khu trú và trong mắt. Ví dụ về chế phẩm dạng sol khí bao gồm chế phẩm dùng để hít để cấp tới phổi.

Chế phẩm có thể được cấp theo đường dùng tiêu chuẩn. Nhìn chung, chế phẩm này có thể được cấp qua đường khu trú, qua đường miệng, đường trực tràng, qua đường mũi, trong da, trong màng bụng, hoặc ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, trong tĩnh mạch, dưới da, hoặc qua cơ). Ngoài ra, chế phẩm này có thể kết hợp vào nền mang giải phóng kéo dài chẳng hạn như polyme có khả năng bị phân huỷ sinh học, polyme này được cấy vào gần nơi muốn chuyển vận thuốc tới, ví dụ như, ở vị trí của khối u. Phương pháp này bao gồm việc cấp đơn liều, việc cấp các liều lặp lại ở khoảng thời gian định trước, và cấp kéo dài trong một khoảng thời gian định trước. Nền mang giải phóng kéo dài, như được sử dụng ở bản mô tả này, là nền mang được tạo ra từ chất liệu, thông thường là polyme mà có thể phân huỷ bằng enzym hoặc thủy phân bằng axit/bazơ hoặc bằng cách hoà tan. Khi được cài vào cơ thể, nền mang này có tác động nhờ enzym và dịch của cơ thể. Thường muốn chọn nền mang giải phóng kéo dài từ các chất liệu tương thích sinh học chẳng hạn như liposom, polylactit (axit polylactit), polyglycolit (polyme của axit glycolic), co-glycolit polylactit (copolyme của axit lactic và axit glycolic), polyanhydrit, poly(ortho)este, polypeptit, axit hyaluronic, collagen, chondroitin sulfat, các axit carboxylic, axit béo, phospholipit, polysacarit, các axit nucleic, polyamino axit, axit amin như phenylalanin, tyrosin, isoleuxin, polynucleotit, polyvinyl propylen, polyvinylpyrrolidon và silicon. Nền mang có khả năng bị phân huỷ sinh học được ưu tiên là nền mang thuộc một trong các dạng polylactit, polyglycolit, hoặc polylactit co-glycolit (co-polyme của axit lactic và axit glycolic).

Chế phẩm này có thể được dùng kết hợp với các chế phẩm khác chứa chất hoặc hợp chất có hoạt tính sinh học, đặc biệt là ít nhất một hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm các hợp chất chống lại stress oxy hóa, các chất chống sự chết của tế bào theo chương trình, tác nhân chelat kim loại, các chất ức chế sự sửa chữa ADN chẳng hạn như pirenzepin và chất chuyển hoá, axit 3-amino-1-propansulfonic (3APS), 1,3-propandisulfonat (1,3PDS), các chất hoạt hoá .alpha.-secretaza, các chất ức chế .beta.- và .gamma.-secretaza, protein tau, chất dẫn truyền thần kinh, các chất phá vỡ tấm beta, các chất hút giúp làm sạch dạng tinh bột beta/làm tiêu các thành phần tế bào, các chất ức chế dạng tinh bột beta bị cắt cụt ở đầu tận N bao gồm dạng tinh bột beta 3-42 được pyroglutamat hóa, các phân tử chống viêm, "các chất chống loạn thần kinh không điển hình" chẳng hạn như, ví dụ như clozapine, ziprasidone, risperidone, aripiprazole hoặc olanzapine hoặc các chất ức chế cholinesteraza (ChEIs) chẳng hạn như tacrine, rivastigmine, donepezil, và/hoặc galantamin, các chất chủ vận M1 và các thuốc khác bao gồm dạng tinh bột bất kỳ hoặc các thuốc biến đổi tau và các chất dinh dưỡng bổ sung chẳng hạn như vitamin B12, xystein, tiền chất của axetylcholin, lexitin, cholin, Ginkgo biloba, axetyl-L-carnitin, idebenon, propentofyllin, hoặc dẫn xuất xantin, cùng với kháng thể theo sáng chế và, tùy ý, chất mang và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược được dụng và quy trình để điều trị các bệnh.

Các chất có hoạt tính được dạng protein có thể có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 1 ng đến 10mg cho mỗi liều. Thông thường, chế độ cấp nên nằm trong khoảng từ 0,1µg đến 10mg kháng thể theo sáng chế, đặc biệt nằm trong khoảng từ 1,0µg đến 1,0mg, và đặc biệt hơn nằm trong khoảng từ 1,0µg đến 100µg, với tất cả các số liệu đơn lẻ nằm trong khoảng trên cũng là một phần của sáng chế. Nếu việc cấp này được thực hiện bằng cách tiêm truyền liên tục, liều lượng thích hợp hơn có thể nằm trong khoảng từ 0,01µg đến 10mg đơn vị cho một kilogam thể trọng trong một giờ với tất cả các số liệu cụ thể nằm trong khoảng trên cũng thuộc vào sáng chế.

Việc cấp sẽ thường được thực hiện ngoài đường tiêu hoá, chẳng hạn tĩnh mạch. Dạng chế phẩm dùng để cấp ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch trong nước hoặc không phải là nước, hỗn dịch và nhũ tương vô trùng. Dung môi không phải

là nước bao gồm mà không chỉ giới hạn ở đó, propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật chẳng hạn như dầu ôliu, và este hữu cơ tiêm được chẳng hạn như etyl oleat. Dung môi dạng nước có thể được chọn từ nhóm bao gồm nước, dung dịch, nhũ tương hoặc hỗn dịch rượu/nước bao gồm nước muối và môi trường đệm. Tá dược lỏng dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch natri clorua, dextroza Ringer, dextroza và natri clorua, Ringer lactat hoá, hoặc dầu không bay hơi. Tá dược lỏng trong tĩnh mạch bao gồm chất độn dạng dịch và chất dinh dưỡng, chất độn chất điện phân (chẳng hạn như các chất trên cơ sở dextroza Ringer) và các chất khác. Các chất bảo quản cũng có thể có mặt chẳng hạn như các chất kháng vi sinh vật, chất chống oxi hoá, các chất chelat hoá, các khí trơ, v.v.

Dược phẩm có thể còn chứa chất mang có dạng protein chẳng hạn như albumin huyết thanh hoặc globulin miễn dịch, đặc biệt loại có nguồn gốc từ người. Các chất có hoạt tính sinh học khác có thể có mặt trong dược phẩm theo sáng chế phụ thuộc vào mục đích sử dụng.

Theo sáng chế, một loạt kháng thể đơn dòng (mAb) chống lại HA2 gp được đặc tả dựa vào epitop tương ứng của chúng bằng cách lập bản đồ epitop. Hiệu quả trị liệu và phòng bệnh của các mAb này được đánh giá ở chuột nhắt được gây tác động kích thích bằng cách chuyển nhiễm virus H5N1 HPAI. Hiệu quả phòng bệnh và điều trị của mỗi trong số các mAb này được đánh giá đối với hai chủng virus H5N1 sinh bệnh cao từ đơn vị huyết thống 1 và 2.1 trong mô hình trên chuột. Hiệu quả được xác định bằng cách theo dõi sự giảm trọng lượng, sự sống sót và động học của sự giảm tải lượng virus ở phổi của chuột nhắt bị nhiễm mAb thể khảm hoặc được làm tương thích với người được điều chế từ mAb này.

Việc thực hiện sáng chế, trừ khi được quy định theo cách khác, các kỹ thuật trong lĩnh vực, sinh học phân tử, vi sinh vật học, ADN tái tổ hợp, di truyền, miễn dịch, công nghệ sinh học tế bào, công nghệ sinh học nuôi cấy tế bào và chuyển gen thông thường, là nằm trong hiểu biết của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Maniatis et al., 1982, *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook et al., 1989, *Molecular*

Cloning, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook and Russell, 2001, *Molecular Cloning*, 3rd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Ausubel et al., 1992), *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, including periodic updates); Glover, 1985, *DNA Cloning* (IRL Press, Oxford); Russell, 1984, *Molecular biology of plants: a laboratory course manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); Guthrie and Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, New York, 1991); Harlow and Lane, 1988, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Riott, *Essential Immunology*, 6th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Fire et al., *RNA Interference Technology: From Basic Science to Drug Development*, Cambridge University Press, Cambridge, 2005; Schepers, *RNA Interference in Practice*, Wiley-VCH, 2005; Engelke, *RNA Interference (RNAi): The Nuts & Bolts of siRNA Technology*, DNA Press, 2003; Gott, *RNA Interference, Editing, and Modification: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, Human Press, Totowa, NJ, 2004; Sohail, *Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application*, CRC, 2004.

Sáng chế sẽ được mô tả dựa vào các ví dụ sau đây, các ví dụ này được đưa ra chỉ bằng cách minh họa và không được dự định là nhằm sáng chế theo bất kỳ cách nào. Các kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc các kỹ thuật cụ thể được mô tả sau đây sẽ được áp dụng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Chất liệu và phương pháp

Virut: Thu nhận các virut cúm H5N1 người từ đơn vị huyết thống 2.1 A/Indonesia/CDC669/2006, A/Indonesia/TLL012/2006, A/Indonesia/TLL013/2006, A/Indonesia/TLL014/2006 và A/Indonesia/CDC326/2006 Bộ y tế Ministry of Health (MOH), Indonesia. *** Các virut từ các đơn vị huyết thống khác nhau (đơn vị huyết thống 0-A/Hongkong/156/97, đơn vị huyết thống 1.0-A/Hong Kong/213/2004, đơn vị huyết thống 4.0- A/goose/Guiyang/337/06 và đơn vị huyết thống 8.0-A/gà/Henan/12/04) được giải cứu bằng công nghệ đảo ngược di truyền (RG: Reverse Genetic) (WHO, 2005). Nói ngắn gọn là, các gen HA và NA được tổng hợp được tách dòng vào plasmit có hai gen khởi đầu để cho công nghệ đảo ngược di truyền cúm A. Các plasmit có hai gen khởi đầu thu được từ Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA. Virut được tái cấu trúc này được giải cứu bằng chuyển nạp plasmit chứa HA và NA cùng với plasmit sáu gen còn lại thu được từ A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) vào đồng nuôi cấy của các tế bào 293T và MDCK bằng cách sử dụng Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corp. USA). Khối virut được nhân lên trong khoang túi niệu trứng gà có phôi 11 ngày tuổi ở nhiệt độ 35°C trong thời gian 36 91h. Tất cả thử nghiệm được thực hiện với virut có khả năng sinh bệnh cao được thực hiện thiết bị ngăn chặn BSL 3+ theo tiêu chuẩn đề xuất của CDC/NIH và WHO và được Trung tâm Agri-Food and Veterinary Agency and MOH, Singapore phê chuẩn.

Sản xuất MAb: Chuột nhắt BALB/c được gây miễn dịch dưới da hai lần cách khoảng thời gian đều đặn là 2 tuần bằng virut nguyên thể bất hoạt từ A/Indonesia/TLL014/2006 trong 0,1ml muối đệm phosphat (PBS), chất này được nhũ hoá bằng thể tích tương đương chất bổ trợ Montanide ISA563 (SEPPIC, France). Chuột nhắt được tăng cường miễn dịch bằng cùng kháng nguyên virut, 3 ngày trước khi dung hợp tế bào lách với tế bào SP2/0. Các tế bào đã được dung hợp này được đưa vào đĩa 96 lỗ và phần dịch nổi của nó được sàng lọc bằng thử nghiệm miễn dịch

huỳnh quang như mô tả sau đây. Khối tế bào lai tạo ra mAb được tách dòng bằng cách pha loãng giới hạn ít nhất ba lần. Các mAb dương tính được thử nghiệm về hoạt tính ức chế sự ngưng kết hồng cầu như được mô tả sau đây. Globulin miễn dịch từ mAb dương tính chọn được phân loại isotyp bằng cách sử dụng kit phân loại isotyp thương mại (Amersham Bioscience, England) như mô tả trong phương pháp của nhà sản xuất. Các mAb này được tinh chế bằng cách sử dụng hạt Protein A sepharosa (Millipore). Độ tinh khiết của các kháng thể này được khẳng định bằng phân tích SDS-PAGE. Sau đó các mAb này được thử nghiệm về hoạt tính trung hoà bằng thử nghiệm ức chế sự ngưng kết hồng cầu tiêu chuẩn như được mô tả sau đây.

Thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (IFA): Các tế bào MDCK được nuôi cấy trong đĩa 96 lỗ được gây nhiễm bằng chủng H5N1 AIV. Vào thời điểm 24–48 h sau khi gây nhiễm, các tế bào này được cố định bằng 4% paraformaldehyt trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ trong phòng và rửa ba lần bằng muối đệm phosphat (PBS), độ pH 7,4. Các tế bào đã được cố định được ủ với dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy khối tế bào lai ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 1h, rửa bằng muối đệm phosphat (PBS) và sau đó được ủ với pha loãng theo tỷ lệ 1:40 isothiocyanat fluorescein (FITC)-globulin miễn dịch thỏ kháng chuột nhất liên hợp (Dako, Denmark). Các tế bào này được rửa tiếp trong PBS và việc gắn kết kháng thể được đánh giá bằng kính hiển vi epi-huỳnh quang trường rộng (Olympus IX71).

Thử nghiệm ức chế sự ngưng kết hồng cầu: Thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (HI) được thực hiện như mô tả trước đây (Webster et al., 1991). Nói ngắn gọn là, mAb được pha loãng liên tiếp (2 lần) trong đĩa 96 lỗ đáy hình chữ V và được trộn với 4 đơn vị HA của virus H5N1. Các đĩa được ủ trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, và cho 1% RBC gà vào mỗi lỗ. Điểm cuối ức chế ngưng kết hồng cầu là pha loãng mAb cao nhất mà không nhận thấy sự kết dính.

Phân lập và phân tích các đột biến thoát khỏi tác dụng của kháng thể: Epitop được nhận biết bởi mAb 4C2 được lập bản đồ bằng cách đặc tả các đột biến thoát khỏi tác dụng của kháng thể như mô tả trước đây (Kaverin et al., 2007). Nói ngắn gọn là, virus H5N1 được ủ với một lượng dư mAb trong thời gian 1 h và sau đó được cấy vào

trứng gà có phôi 11 ngày tuổi. Để phân lập các đột biến thoát khỏi tác dụng của kháng thể *in vivo*, các mẫu phôi từ chuột nhất được xử lý được cấy trực tiếp vào trứng có phôi. Trứng này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 48h. Virus được thu hoạch và được sử dụng cho nhân dòng vô tính trong pha loãng giới hạn trong trứng gà có phôi và các đột biến thoát khỏi tác dụng của kháng thể được tinh chế bằng màng. ARN được chiết từ dịch túi niệu. Gen hemagglutinin được khuếch đại PCR bằng enzym phiên mã ngược (RT) và được tách dòng vào vector tách dòng TA (Promega) và một số dòng vô tính được xác định trình tự. Trình tự của từng dòng vô tính được phân tích bằng cách so sánh trình tự của virus gốc.

Nhân dòng vô tính plasmit biểu hiện IgG1 thể khảm: Việc thiết kế vector biểu hiện được thực hiện như mô tả (Jostock et al., 2004). Nói ngắn gọn là, vùng ổn định kháng thể người mã hoá chuỗi nhẹ kappa và chuỗi nặng IgG1 được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn môi sau đây: chuỗi nặng ổn định IgG1 của người: đoạn môi xuôi dòng 5'-CTCGAGCGACCTCCACCAAGG-3' (SEQ ID NO:11) và đoạn môi ngược dòng 5'-TCTAGACTCGGAGAGGGACAGAG-3' (SEQ ID NO:12); chuỗi nhẹ kappa ổn định của người: đoạn môi xuôi dòng 5'-CTGCAGATCACGCGAACTGTGGCT GC-3' (SEQ ID NO:13) và đoạn môi ngược dòng 5'-GGCGCGCCCGAAGTTGTCCCCTCTCACAA TCATC ATC-3' (SEQ ID NO:14). Vùng ổn định được khuếch đại của chuỗi nhẹ kappa và chuỗi nặng IgG1 được tách dòng vào plasmit pCMV/myc/ER cải biến có vị trí đầu vào ribosom nội tại (IRES) của virus bệnh viêm não cơ tim được cài xen giữa chúng. Các vị trí giới hạn duy nhất được đưa vào để cho phép cài xen vùng biến đổi của các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ nằm trong khung cùng với vùng ổn định. ARN thông tin được điều chế từ các tế bào lai mAb 4C2 và được sử dụng trong tổng hợp sợi ADN bổ sung thứ nhất bằng các hexame ngẫu nhiên. ADN bổ sung tổng được sử dụng làm khuôn mẫu để khuếch đại cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ biến đổi bằng cách sử dụng đoạn môi và các phương pháp của thể thực khuẩn kháng thể tái tổ hợp scFv chuột nhất (Amersham Biosciences). Các sản phẩm thu được được tách dòng vào pCR-Script (Stratagene, USA) để tạo trình tự. Sau đó, các đoạn môi đặc hiệu trình tự được thiết kế như sau: chuỗi nhẹ biến đổi đặc hiệu 4C2: đoạn môi xuôi dòng 5'-GG

TAAGGGGTAAACAGTAGCAGG-3' (SEQ ID NO:15) và đoạn mỗi ngược dòng 5'-CTTTGGCCTC TCTGGGATAGAAG-3' (SEQ ID NO:16); chuỗi nặng biến đổi đặc hiệu 4C2: đoạn mỗi xuôi dòng 5'-CACGATGATAATATGGCCACAACC-3' (SEQ ID NO:17) và đoạn mỗi ngược dòng 5'-CACCG GTTGGGGGAAGTAGTACT-3' (SEQ ID NO:18). Các đoạn mỗi này được dùng để khuếch đại vùng biến đổi, sau đó vùng này được tách dòng vào vectơ biểu hiện. Trình tự mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi đặc hiệu 4C2 được nêu trong SEQ ID NO:3 và trình tự mã hoá chuỗi nặng biến đổi đặc hiệu 4C2 được nêu trong SEQ ID NO:1. Biểu hiện của cấu trúc này dẫn đến việc tạo ra kháng thể thể khảm chứa 33% trình tự là vùng biến đổi chuột nhất từ chuột và 67% trình tự là vùng ổn định người cho IgG1.

Biểu hiện không ổn định của kháng thể thể khảm và tinh chế: Kháng thể thể khảm được biểu hiện bằng cách sử dụng hệ thống biểu hiện Freestyle 293 (Invitrogen, USA) để thu được kháng thể được tạo ra trong môi trường không chứa huyết thanh xác định. Cấu trúc được đề cập trên đây được chuyển nạp vào tế bào 293-F bằng cách sử dụng 293fectin (Invitrogen, USA) và gom phần dịch nổi vào 120h sau khi chuyển nạp. Kháng thể 4C2 thể khảm (ch-mAb 4C2 hoặc ch4C2) được tinh chế bằng cách sử dụng hạt Protein A sepharosa (Millipore). Độ tinh khiết của kháng thể thể khảm được khẳng định bằng SDS-PAGE và áp dụng phân tích thẩm tách miễn dịch sử dụng Ig kháng người được đánh dấu HRP (DAKO) được dùng để khẳng định rằng đã đưa vào vùng ổn định của người.

Thử nghiệm trung hòa vi lượng: Phân tích hoạt tính trung hoà của kháng thể đơn dòng này chống lại chủng H5N1 bằng thử nghiệm trung hòa vi lượng như được mô tả trước đây (Prabakaran et al., 2008). Nói ngắn gọn là, mAb đã pha loãng 10 lần được pha loãng liên tiếp nữa (hai lần) và được ủ với 100 50% liều gây nhiễm mô nuôi cấy (TCID₅₀) của các đơn vị huyết thống khác nhau của chủng H5N1 trong thời gian 1h ở nhiệt độ trong phòng và được cho lên đĩa lặp lại hai lần vào tế bào MDCK được cho phát triển trong đĩa 96 lỗ. TCID₅₀ của mỗi trong số chủng H5N1 của dịch nuôi cấy tế bào MDCK được xác định bằng phương pháp Reed and Muench. Hiệu giá trung hoà được đánh giá là pha loãng mAb cao nhất trong đó không phát hiện được tác động gây bệnh tế bào bằng cách soi kính hiển vi thường.

Nghiên cứu kích thích: Chuột nhắt thể nội phối SPF BALB/c 4-6 tuần tuổi được sử dụng cho các nghiên cứu kích thích. Chuột nhắt (n=10 cho mỗi nhóm) được gây nhiễm trong mũi 5MLD50 (liều gây chết chuột nhắt 50%) thuộc hai chủng H5N1 khác nhau (RG-A/Hongkong/213/2003 từ đơn vị huyết thống 1 và A/Indonesia/TLL013/06 từ đơn vị huyết thống 2.1). Tất cả thử nghiệm trên động vật được thực hiện theo hướng dẫn cho thử nghiệm trên động vật được thực hiện ở NIID và các phương pháp thử nghiệm.

Hiệu quả phòng bệnh: Để xác định hiệu quả phòng bệnh, chuột nhắt được xử lý trước trong màng bụng bằng 2,5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg hoặc 0mg/kg (PBS) kháng thể đơn dòng (4C2 hoặc ch4C2), trước khi gây tác động kích thích bằng virus. Sau 24h, chuột nhắt được gây tác động kích thích bằng 5MLD50 của hai chủng H5N1 khác nhau. Chuột nhắt được theo dõi hàng ngày về thể trọng và tỷ lệ tử vong cho đến khi tất cả động vật bị chết hoặc cho đến ngày 14 sau tác động kích thích.

Hiệu quả điều trị: Để xác định hiệu quả điều trị của mAb thể khảm nhóm chuột nhắt được gây tác động kích thích bằng 5MLD50 hai chủng H5N1 khác nhau. 24h sau khi gây tác động kích thích bằng virus, chuột nhắt được xử lý bằng đường trong màng bụng 2,5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg hoặc 0mg/kg (PBS) kháng thể đơn dòng (4C2 hoặc ch4C2). Chuột nhắt được theo dõi hàng ngày về thể trọng và tỷ lệ tử vong cho đến khi tất cả động vật bị chết hoặc cho đến ngày 14 sau tác động kích thích.

Ví dụ 2

Xác định đặc điểm và tạo thể ghép mAb 4C2 chuột

Một loạt mAb đối với hemagglutinin (HA) cúm được sàng lọc cho tác dụng trung hoà hiệu quả các chủng virus H5N1 khác nhau. Các axit amin tham gia vào việc tạo thành epitop của mAb 4C2 được phân tích bằng cách chọn lọc các đột biến thoát khỏi tác dụng trung hoà của kháng thể. Trình tự axit amin của protein HA bao gồm protein tín hiệu được nêu trong SEQ ID NO:19, và trình tự axit amin của protein HA trưởng thành được nêu trong SEQ ID NO:20. Việc xác định trình tự của gen HA đầy đủ được phân lập từ các biến thể thoát khỏi tác dụng của mAb 4C2 thực hiện các đột

biến một điểm ở vị trí axit amin 155 (Ser thành Ile) và 189 (Arg thành Lys) (đối với protein HA trưởng thành được nêu trong SEQ ID NO:20). mAb 4C2 được lựa chọn cho các nghiên cứu trị liệu ở mô hình chuột nhắt dựa trên tính phản ứng với virus H5N1 và hoạt tính HI cao (Bảng 1) và hiệu giá trung hoà (Bảng 2).

Bảng 1

Hiệu giá ức chế ngưng kết hồng cầu của 4C2 mAb đối với đơn vị huyết thống khác nhau của chủng H5N1

Chủng virus	Đơn vị huyết thống virus H5N1	Hiệu giá HI
A/Indonesia/TLL014	đơn vị huyết thống 2.1	512
A/Indonesia/TLL013	đơn vị huyết thống 2.1	512
A/Indonesia/CDC669/06	đơn vị huyết thống 2.1	512
A/Hongkong/156/97	đơn vị huyết thống 0	256
A/goose/Guiyang/337/06	đơn vị huyết thống 4	256
A/chicken/Henan/12/04	đơn vị huyết thống 8	512
RG-A/Hong Kong/213/2004	đơn vị huyết thống 1	256
A/chicken/Singapore/Sg02 H3N2	-	<4
A/Common iora/Indonesia/F89/H7N1	-	<4

Hiệu giá ức chế ngưng kết hồng cầu của mAb 4C2 của chuột (1mg/ml) được đo với các virus khác nhau.

Bảng 2

Hiệu giá trung hòa vi lượng của mAb 4C2 với các đơn vị huyết thống khác nhau của chủng H5N1

Chủng virus	Đơn vị huyết thống virus H5N1	Hiệu giá trung hòa vi lượng đối với chủng H5N1#
A/Indonesia/TLL014	đơn vị huyết thống 2.1	320
A/Indonesia/TLL013	đơn vị huyết thống 2.1	640
A/Indonesia/CDC669/06	đơn vị huyết thống 2.1	320
A/Hongkong/156/97	đơn vị huyết thống 0	320
A/goose/Guizhou/337/06	đơn vị huyết thống 4	320
A/chicken/Henan/12/04	đơn vị huyết thống 8	640
RG-A/Hong Kong/213/2004	đơn vị huyết thống 1	320
A/chicken/Singapore/Sg02 H3N2	-	<10
A/Common iora/Indonesia/F89/H7N1	-	<10

Đo trung hòa vi lượng virus của mAb 4C2 (1mg/ml) với đơn vị huyết thống khác nhau của virus H5N1.

* Nồng độ của mỗi n-mAb ở liều 1mg/ml

100TCID50 của mỗi chủng virus được sử dụng cho thử nghiệm trung hòa vi lượng

Ví dụ 3

Tác dụng phòng bệnh bằng mAb 4C2 bảo vệ chuột nhắt khỏi gây tác động kích thích bằng virus gây tử vong

Các tác giả sáng chế kiểm tra hiệu quả phòng bệnh của mAb 4C2 ở chuột nhắt được gây tác động kích thích bằng chủng đơn vị huyết thống 1 hoặc đơn vị huyết thống 2.1 của virus H5N1. Tất cả các con chuột nhắt được xử lý trước bằng đơn liều 5mg/kg hoặc 10mg/kg 4C2 được bảo vệ không bị tử vong sau khi tác động ở mức gây tử vong bằng 5MLD50 của cả hai đơn vị huyết thống của virus H5N1 (tác động bảo vệ 100%) (Fig. 1A, 1B), trong khi tất cả chuột nhắt đối chứng không được xử lý bị chết do nhiễm virus vào ngày 6 sau tác động kích thích. Hơn nữa, chuột nhắt được xử lý trước bằng thậm chí bằng liều thấp nhất 2,5mg/kg 4C2 cho mức bảo vệ 70 và 80% lần lượt khi gây tác động kích thích bằng virus đơn vị huyết thống 1 (Fig. 1A) và đơn vị huyết thống 2.1 (Fig. 1B).

Ví dụ 4

Tác dụng trị liệu bằng 4C2 bảo vệ chuột nhắt khi gây tác động kích thích bằng virus tử vong

Để xác định hiệu quả điều trị của mAb 4C2 đối với tác động kích thích gây tử vong bằng H5N1, chuột nhắt được gây tác động kích thích bằng 5MLD50 các chủng virus đơn vị huyết thống 1 hoặc đơn vị huyết thống 2.1. Hai mươi bốn giờ sau khi gây tác động kích thích bằng virus, chuột nhắt này được xử lý bằng 2,5mg, 5mg/kg hoặc 10mg/kg of 4C2. MAbs 4C2 có khả năng bảo vệ 100% chuột nhắt từ cả hai đơn vị huyết thống của virus ở nồng độ 5mg/kg và 10mg/kg (Fig. 2A và 2B). Thậm chí ở 2,5mg/kg nó có thể bảo vệ 80% chuột nhắt với tác động gây tử vong của virus đơn vị huyết thống 1 và đơn vị huyết thống 2.1.

Ví dụ 5

Tạo thể ghép mAb 4C2 chuột

Kháng thể đơn dòng thể khảm (ch-mAb) được tạo ra từ mAb sao cho vùng ổn định được thay bằng vùng ổn định có nguồn gốc từ người nhưng vùng biến đổi vẫn là có nguồn gốc từ chuột. mAb thể khảm được tạo ra bằng cách này là 66,6% được làm tương thích với người. Các kháng thể thể khảm này vẫn giữ được đặc tính ban đầu của mAb chuột (các kết quả không được thể hiện). Theo cách này, điều chế được mAb thể khảm hoặc được làm tương thích với người.

Ví dụ 6

Tác dụng phòng bệnh bằng ch4C2 bảo vệ chuột nhất khỏi tác động kích thích bằng virus tử vong

Các tác giả sáng chế kiểm tra hiệu quả bảo vệ của ch4C2 ở chuột nhất được gây tác động kích thích bằng chủng virus H5N1 đơn vị huyết thống 1 hoặc đơn vị huyết thống 2.1. Tất cả chuột nhất được xử lý trước bằng đơn liều 5mg/kg hoặc 10mg/kg ch4C2 được bảo vệ không bị tử vong sau khi tác động gây tử vong bằng 5MLD50 cả hai đơn vị huyết thống của virus H5N1 (bảo vệ 100%) (Fig. 3A, 3B), trong khi đó tất cả chuột nhất đối chứng không được xử lý chết do nhiễm virus đến ngày 6 sau tác động kích thích. Hơn nữa, chuột nhất được xử lý trước bằng thậm chí bằng liều thấp nhất 2,5kg/mg ch4C2 cho thấy tác dụng bảo vệ 80 và 90% đối với đơn vị huyết thống 1 (Fig. 3A) và đơn vị huyết thống 2.1 (Fig. 3B) sau khi gây tác động kích thích lần lượt bằng virus này.

Ví dụ 7

Tác dụng trị liệu của ch4C2 bảo vệ chuột nhất khỏi tác động kích thích bằng virus tử vong

Để xác định hiệu quả điều trị của ch4C2 đối với tác động kích thích gây tử vong của H5N1, chuột nhất được gây tác động kích thích bằng 5MLD50 chủng virus

đơn vị huyết thống 1 hoặc đơn vị huyết thống 2.1. Hai mươi bốn giờ sau khi gây tác động kích thích bằng virus, chuột nhất được xử lý bằng 2,5mg, 5mg/kg hoặc 10mg/kg ch4C2. Ch4C2 có khả năng bảo vệ 100% chuột nhất khỏi cả hai đơn vị huyết thống virus ở nồng độ 5mg/kg và 10mg/kg (Fig. 4A và 4B). Thậm chí ở nồng độ 2,5mg/kg nó có thể bảo vệ 70% chuột nhất khỏi tác động gây tử vong bằng virus đơn vị huyết thống 1 và đơn vị huyết thống 2.1.

Việc lập bản đồ epitop bằng cách sử dụng phân tích đột biến không bị trung hoà cho thấy là Ser155 và Arg189 là các yếu tố quyết định chính của epitop của mAb 4C2. Ngoài ra, sự có mặt axit amin của epitop ở vòng thứ 150 có tính kháng nguyên cao và 189 vị trí axit amin giải thích khả năng trung hoà cao của nó. Do đó, trong nghiên cứu này các tác giả sáng chế đã lựa chọn kháng thể chuột 4C2 trong nghiên cứu phòng bệnh và trị liệu về sự nhiễm H5N1 ở mức gây tử vong. Ngoài ra, các tác giả sáng chế lựa chọn kháng thể này để tạo thể khảm và sau đó sử dụng kháng thể thể khảm này trong nghiên cứu phòng bệnh và trị liệu chống lại sự nhiễm H5N1 ở mức gây tử vong. Hơn nữa, việc chủng ngừa thụ động kháng thể vẫn là một phương pháp có thể khai thác để chống lại đại dịch cúm. Việc cấp phòng bệnh hoặc trị liệu mAb 4C2 hoặc ch4C2 theo đơn liều cho thấy là tác động bảo vệ 100% đối với virus cúm H5N1 gây tử vong trong mô hình chuột nhất. Các tác giả sáng chế nhận thấy tác động bảo vệ 100% đối với virus H5N1 đơn vị huyết thống 1 và 2.1 bằng cách sử dụng 10mg/kg và 5mg/kg 4C2 hoặc ch4C2. Một liều 5mg/kg là đủ mang lại tác dụng bảo vệ và loại trừ virus trong 9 ngày sau khi gây tác động kích thích bằng virus, trong khi đó liều 10mg/kg loại trừ virus chỉ trong 6 ngày sau khi gây tác động kích thích bằng virus. Phép trị liệu bằng 4C2 hoặc ch4C2 có lẽ đã giúp không chế được quá trình nhiễm ban đầu, do đó cho phép động vật có đáp ứng miễn dịch hữu hiệu. Các nghiên cứu của các tác giả đã gợi ý là việc sử dụng phép trị liệu miễn dịch thụ động bằng cách sử dụng mAb 4C2 hoặc mAb ch4C2 thể khảm có thể là công cụ hữu hiệu trong cả việc phòng và điều trị nhiễm H5N1 có khả năng sinh bệnh cao, đồng thời tạo ra tính miễn dịch lập tức cần thiết để đối phó với đại dịch cúm trong tương lai. Kháng thể thể khảm tạo ra trong bản mô tả này có thể được làm tương thích với người tiếp bằng cách ghép vùng xác định bổ cứu bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực

kỹ thuật này. Các kháng thể thể khảm này có thể được đánh giá tiền lâm sàng các loại linh trưởng cận người. Hiệu quả của việc dùng đơn liều trong cả việc phòng và điều trị trong các nghiên cứu ở chuột nhắt ám chỉ rằng hiệu quả của kháng thể có thể vẫn được duy trì ngay cả khi kháng thể thể khảm không thể hiện đáp ứng miễn dịch.

Việc sử dụng các thuật ngữ “a” và “an” và “the” và các tương tự trong bản mô tả tiếng Anh sáng chế (đặc biệt là trong phần Yêu cầu bảo hộ sau đây) được xem như là bao hàm cả nghĩa số ít và số nhiều, trừ khi được quy định khác đi trong bản mô tả này hoặc khi nội dung rõ ràng có nghĩa ngược lại. Các thuật ngữ “chứa” “có” “bao gồm” và “có chứa” được xem như là các thuật ngữ mở (tức là có nghĩa “bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số,”) trừ khi quy định khác. Việc dẫn đến các khoảng giá trị trong bản mô tả này chỉ được dự định như là cách thể hiện ngắn gọn đề cập đến từng giá trị riêng biệt nằm trong khoảng đó, trừ khi được quy định theo cách khác trong bản mô tả này, và mỗi giá trị riêng rẽ được kết hợp vào bản mô tả như là được nêu ra riêng rẽ trong bản mô tả này. Ví dụ, nếu bộc lộ khoảng 10-15, thì cũng bộc lộ 11, 12, 13, và 14. Tất cả các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể được thực hiện theo trật tự thích hợp bất kỳ trừ khi được quy định khác đi trong bản mô tả này hoặc theo cách khác khi nội dung rõ ràng có nghĩa ngược lại. Việc sử dụng bất kỳ và tất cả ví dụ, hoặc ngôn ngữ chỉ từ ví dụ (ví dụ, “chẳng hạn như”) được đưa ra trong bản mô tả này, chỉ được dự định nhằm minh họa rõ hơn sáng chế và không đưa giới hạn nào đến phạm vi của sáng chế trừ khi được yêu cầu bảo hộ khác đi. Không có ngôn ngữ nào trong bản mô tả được hiểu là biểu thị yếu tố không được yêu cầu bảo hộ bất kỳ là thiết yếu cho việc thực hiện sáng chế.

Điều được nhận biết là phương pháp và chế phẩm theo sáng chế có thể kết hợp ở dạng nhiều phương án, chỉ một số các phương án đó được bộc lộ trong bản mô tả này. Các phương án theo sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm các phương án tốt nhất mà các tác giả đã biết để thực hiện sáng chế. Việc biến đổi các phương án này có thể là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này khi đọc phần mô tả nêu trên. Các tác giả sáng chế cho rằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sử dụng các biến đổi như vậy khi thích hợp, và các tác giả sáng chế dự định rằng sáng chế được thực hiện theo cách khác hơn là cách được

mô tả cụ thể trong bản mô tả này. Theo đó, sáng chế bao gồm tất cả các cải biến và biến đổi tương đương của đối tượng của Yêu cầu bảo hộ kèm theo đây ở mức độ được pháp luật cho phép. Hơn nữa, kết hợp bất kỳ của các yếu tố được mô tả trên đây trong tất cả các biến đổi có thể có của chúng được bao hàm trong sáng chế trừ khi được chỉ rõ khác đi trong bản mô tả này hoặc theo cách khác rõ ràng là mâu thuẫn với nội dung.

Tài liệu tham khảo

Chothia C and Lesk AM (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 196:901-917.

de Jong MD, Hien TT (2006). Avian influenza A (H5N1)-Review. *J Clin Virol* 35: 2-13.

Hieter PA, Max EE, Seidman JG, Maizel JV Jr, Leder P (1980). Cloned human and mouse kappa immunoglobulin constant and J region genes conserve homology in functional segments. *Cell* 22:197-207.

Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotný J, Margolies MN, Ridge RJ, Bruccoleri RE, Haber E, Crea R, et al. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli. *Proc Nat Acad Sci USA* 85:5879-5883.

Johnson, G and Wu, TT (2001). Kabat Database and its applications: future directions. *Nucleic Acids Research* 29:205-206.

Jostock T, Vanhove M, Brepoels E, van Gool R, Daukandt M, et al. (2004) Rapid generation of functional human IgG antibodies derived from Fab-onphage display libraries. *J Immunol Methods* 289: 65-80.

Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C (1992). *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services.

Kaverin NV, Rudneva IA, Ilyushina NA, Varich NL, Lipatov AS, et al. (2007). Structure of antigenic sites on the hemagglutinin molecule of H5 influenza virus and phenotypic variation of escape mutants. *J Gen Virol* 83: 2497–2505.

Khaw BA, Strauss HW, Carvalho A, Locke E, Gold HK, Haber E (1982). Technetium-99m labeling of antibodies to cardiac myosin Fab and to human fibrinogen. *J Nucl Med* 23:1011-1019.

Kong LK, Zhou BP. (2006). Successful treatment of avian influenza with convalescent plasma. *Hong Kong Med J* 357:489.

Le QM, Kiso M, Someya K, Sakai YT, Nguyen TH, et al. (2005). Avian flu: Isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* 437: 1108.

Luke TC, Kilbane EM, Jackson JL, Hoffman SL. (2006). Meta-analysis: Convalescent blood products for Spanish Influenza Pneumonia: A future H5N1 treatment? *Ann Intern Med* 145:599-609.

Prabakaran M, Velumani S, He F, Karuppannan AK, Geng GY, et al. (2008) Protective immunity against influenza H5N1 virus challenge in mice by intranasal co-administration of baculovirus surface-displayed HA and recombinant CTB as an adjuvant. *Virology* 380:412–420.

Rader C, Cheresch DA, Barbas CF 3rd (1998). A phage display approach for rapid antibody humanization: designed combinatorial V gene libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8910-8915.

Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988). Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332:323-327.

Rousseaux J, Rousseaux-Prevost R, Bazin H (1986). Optimal conditions for the preparation of proteolytic fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses. *Methods Enzymology* 121:663-69, Academic Press.

Webster RG, Kawaoka Y, Taylor J, Weinberg R, Paoletti E (1991). Efficacy of nucleoprotein and hemagglutinin antigens expressed in fowlpox virus as vaccine for influenza in chickens. *Vaccine* 9:303–308.

WHO. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:395 1515-1521.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể gắn kết đặc hiệu với epitop cấu hình của hemagglutinin H5, trong đó epitop cấu hình của hemagglutinin H5 là epitop mà kháng thể đơn dòng của chuột 4C2 được tạo ra bởi khối tế bào lai 4C2 đã được nộp lưu ở Trung tâm nuôi cấy Mỹ (American Type Culture Collection: ATCC) với số lưu giữ PTA-11241 gắn kết đặc hiệu, trong đó epitop cấu hình này bao gồm axit amin 155 (Ser) và axit amin 189 (Arg) của hemagglutinin H5 trưởng thành, và trong đó vùng xác định bổ sung của vùng biến đổi chuỗi nhẹ nằm trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng xác định bổ sung của vùng biến đổi chuỗi nặng nằm trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:4.
2. Kháng thể đơn dòng 4C2 như được tạo ra bởi khối tế bào lai 4C2 được nộp lưu ở Trung tâm nuôi cấy Mỹ với số lưu giữ PTA-11241.
3. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể đơn dòng này hoặc mảnh của nó là kháng thể đơn dòng thể khảm hoặc được làm tương thích với người.
4. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1, trong đó hemagglutinin H5 này chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:20.
5. Kháng thể đơn dòng theo điểm 1, trong đó vùng xác định bổ sung là:

LCDR1: QDISGH (SEQ ID NO:5);

LCDR2: HGT (SEQ ID NO:6);

LCDR3: VQYVQFPWT (SEQ ID NO:7);

HCDR1: GYTFTTYW (SEQ ID NO:8);

HCDR2: IDPYDSET (SEQ ID NO:9); và

HCDR3: VRGGSTVAYFGV (SEQ ID NO:10).

6. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:2.
7. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:4.
8. Kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:4.
9. Axit nucleic mã hoá kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể theo điểm 1.
10. Vector chứa axit nucleic theo điểm 9.
11. Tế bào vật chủ được phân lập chứa và biểu hiện vector theo điểm 10.
12. Dược phẩm chứa tác nhân và chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng, trong đó tác nhân này được chọn từ nhóm bao gồm (a) kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 3-8, (b) phân tử axit nucleic chứa axit nucleic mã hoá kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể nêu trên, (c) vector chứa axit nucleic nêu trên, và (d) tế bào biểu hiện vector nêu trên.
13. Dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 hoặc mảnh kháng thể của nó, gắn kết đặc hiệu với cùng epitop và tá dược dược dụng.

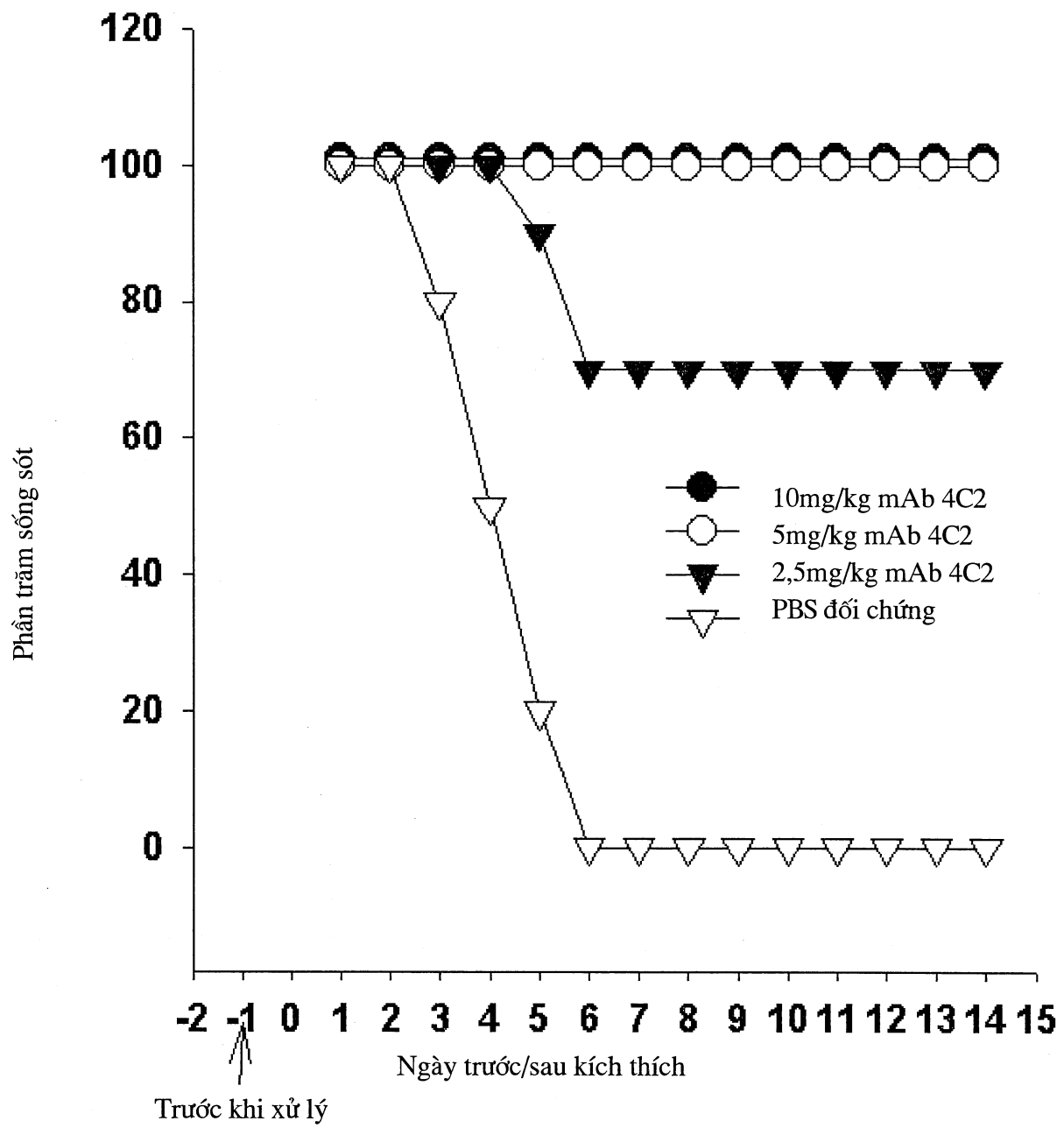


Fig 1A

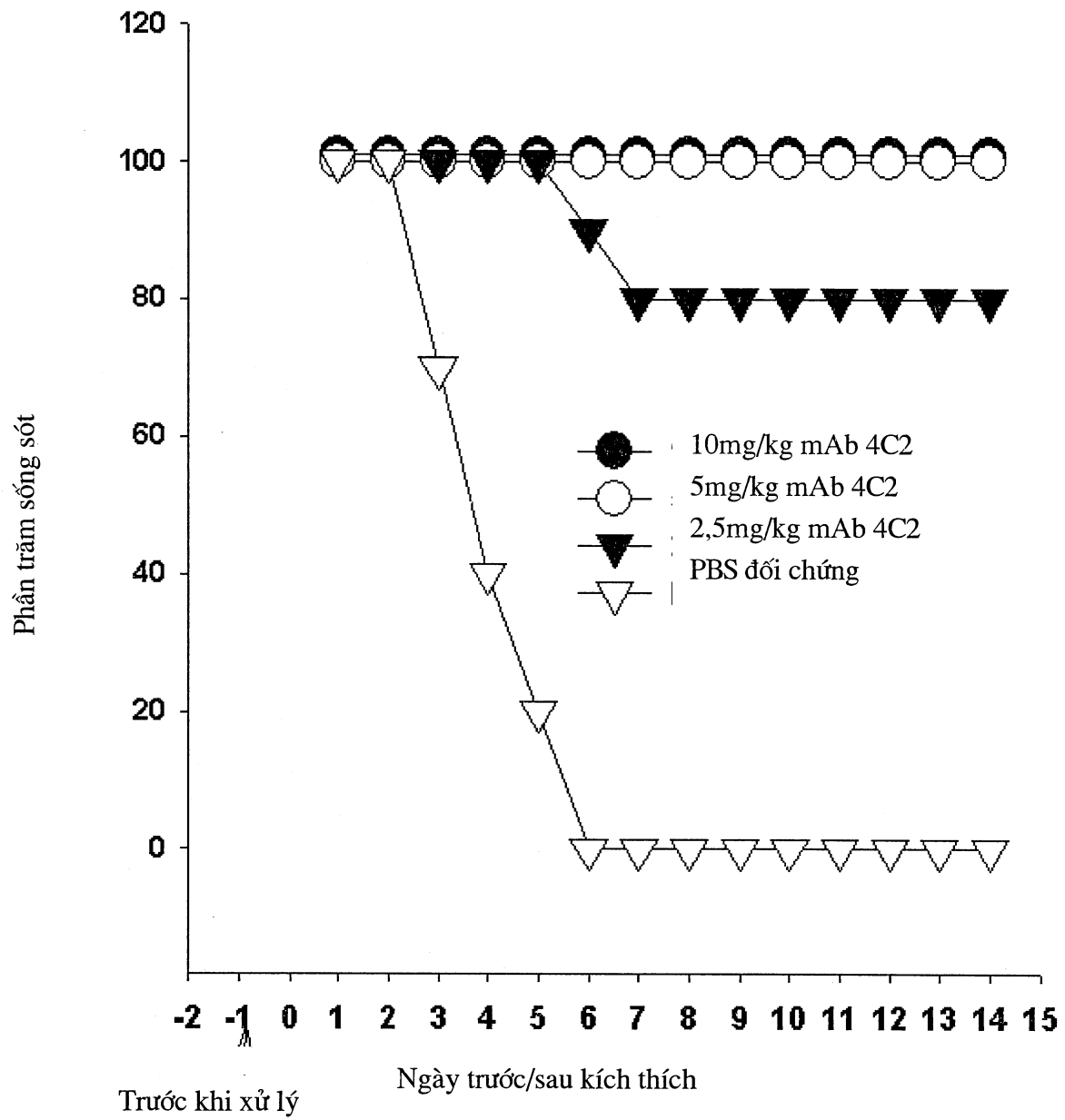


Fig 1B

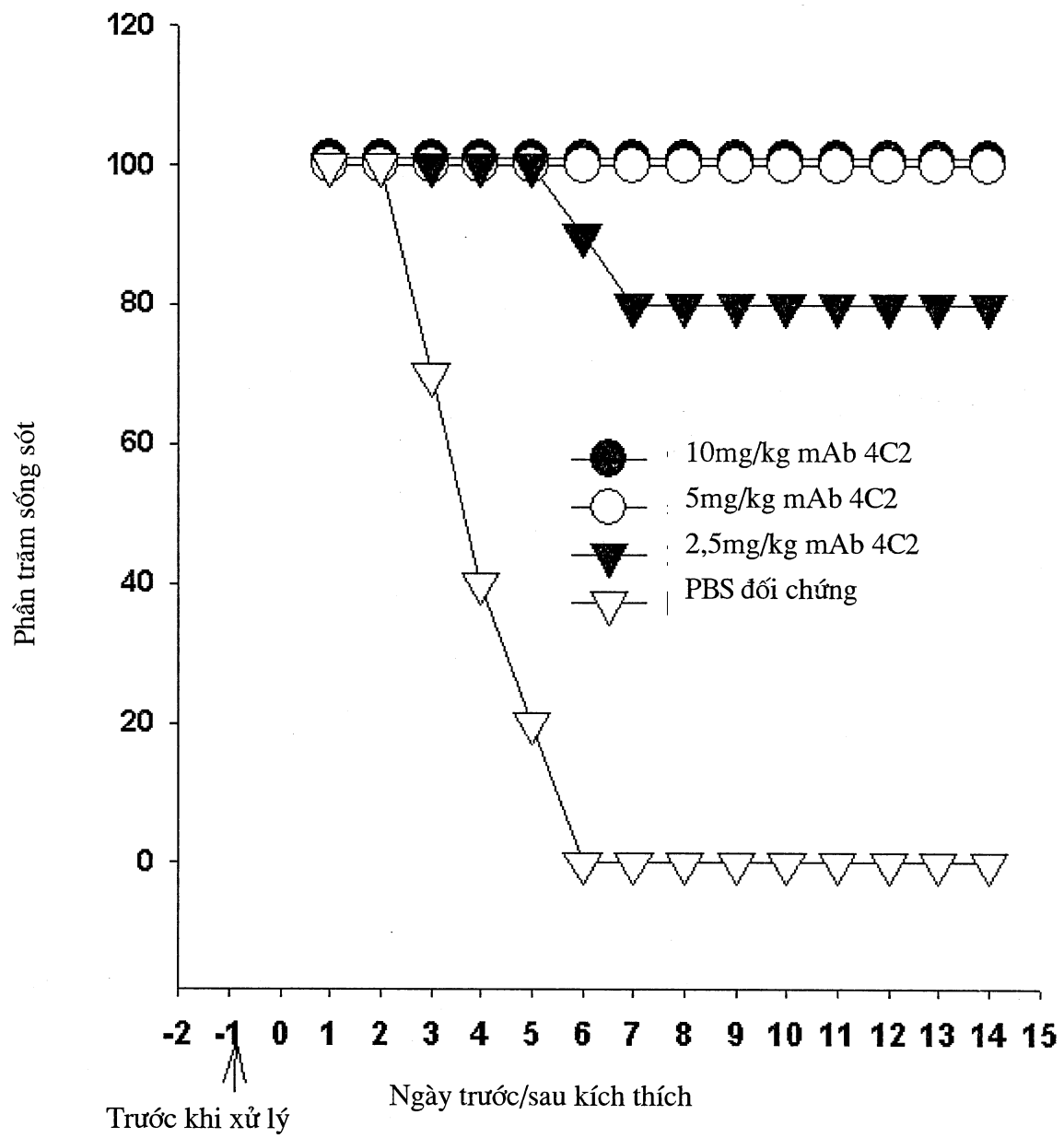


Fig 2A

Phân trăm sống
sốt

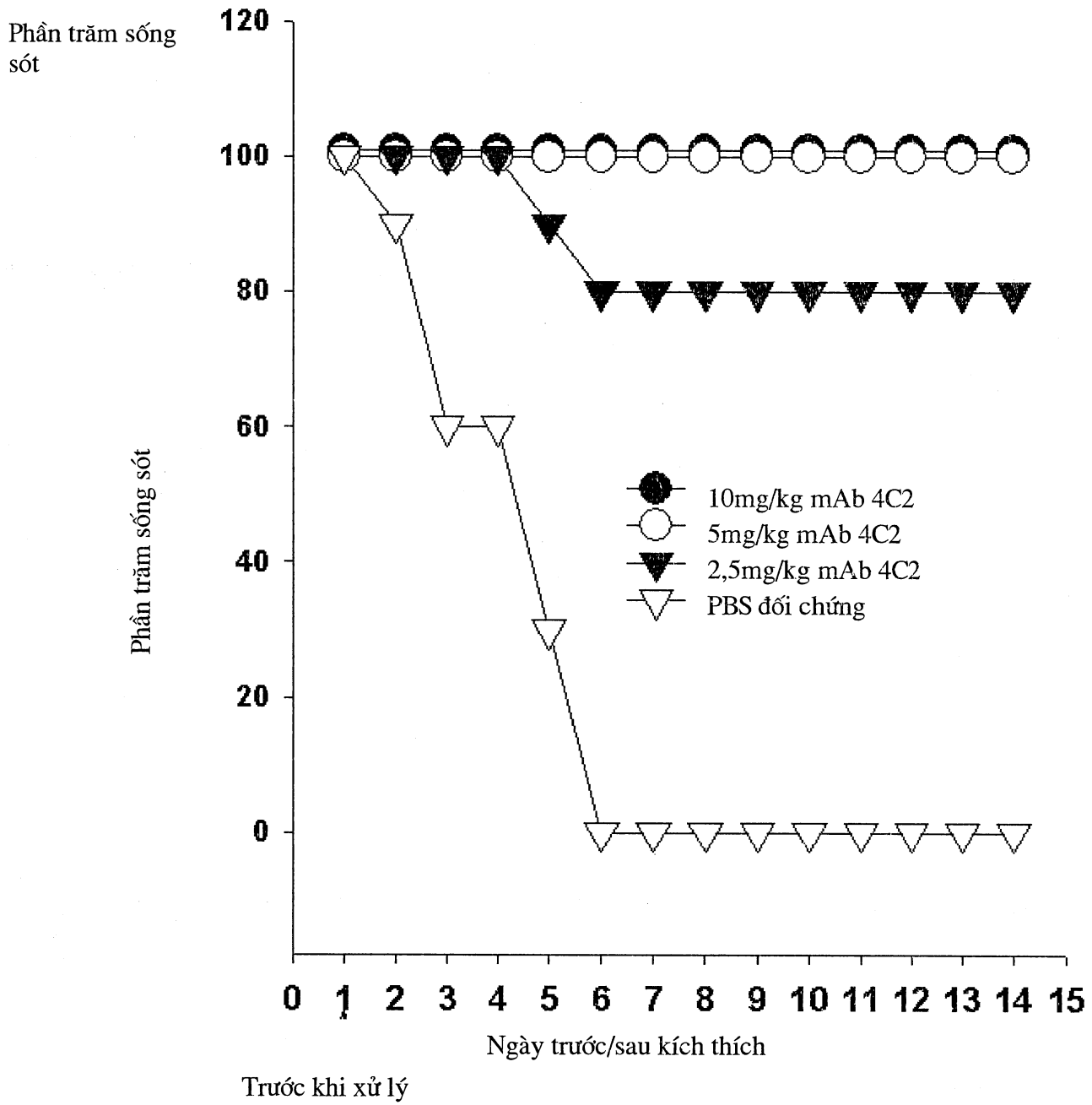


Fig 2B

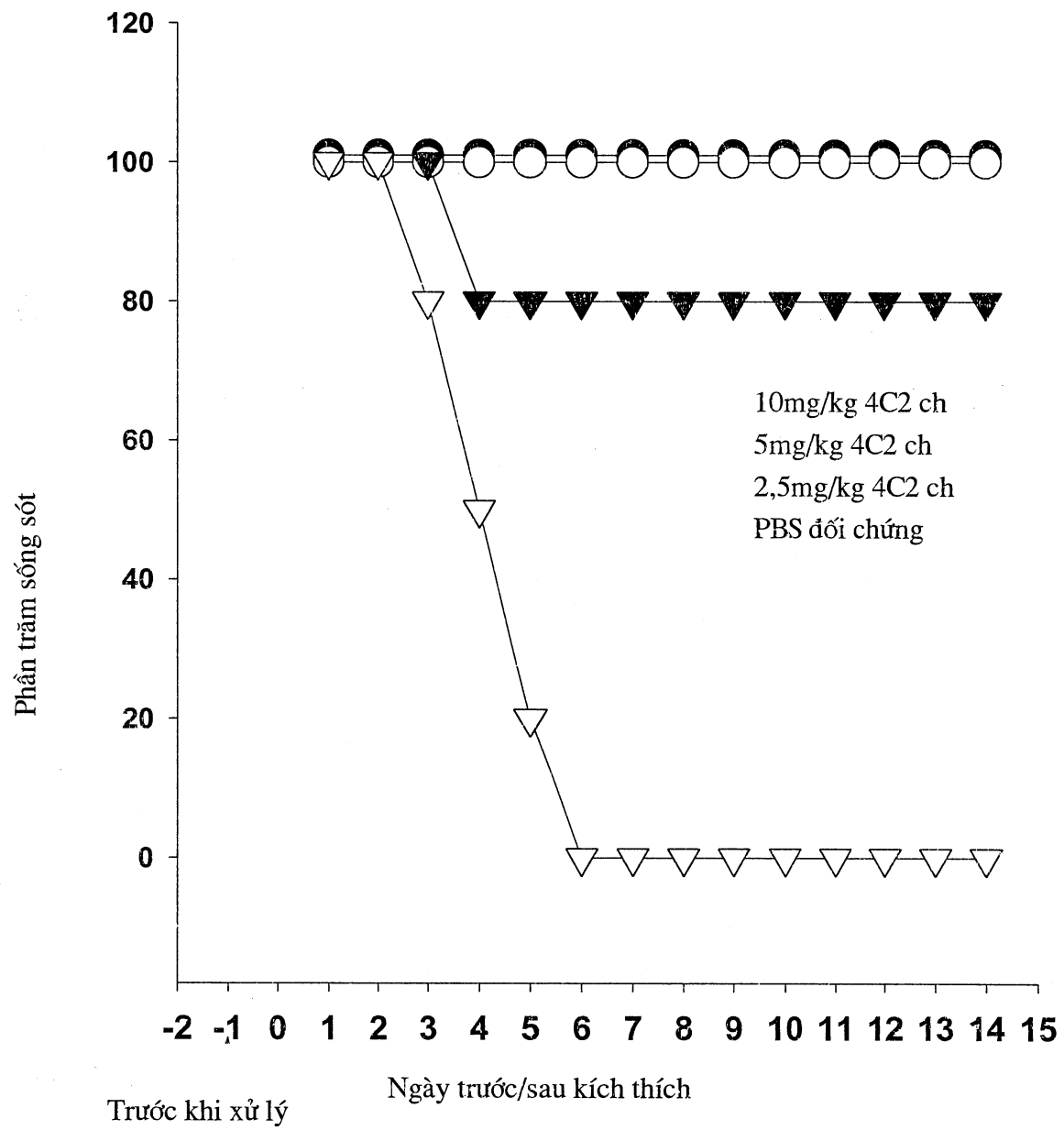


Fig 3A

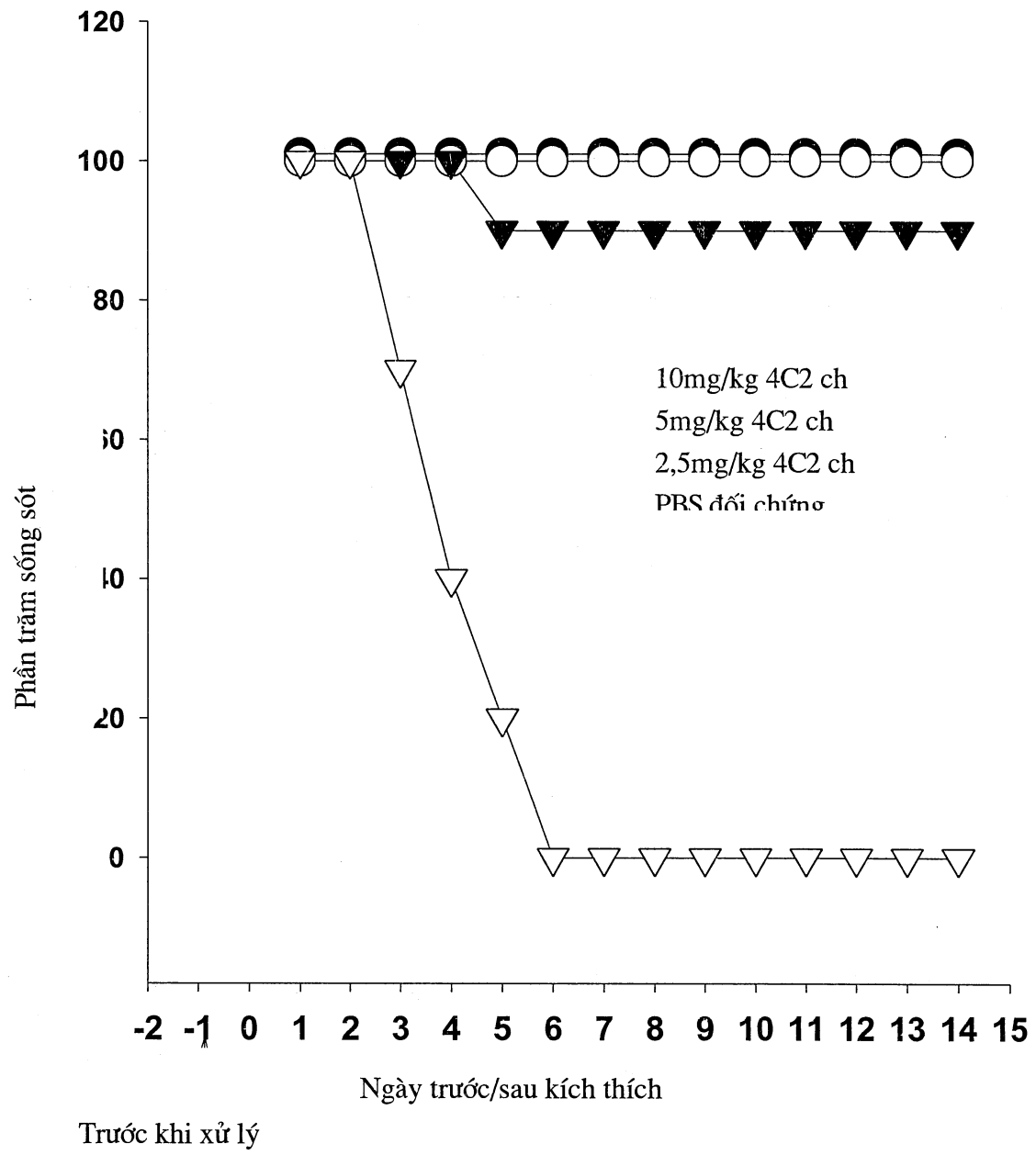


Fig 3B

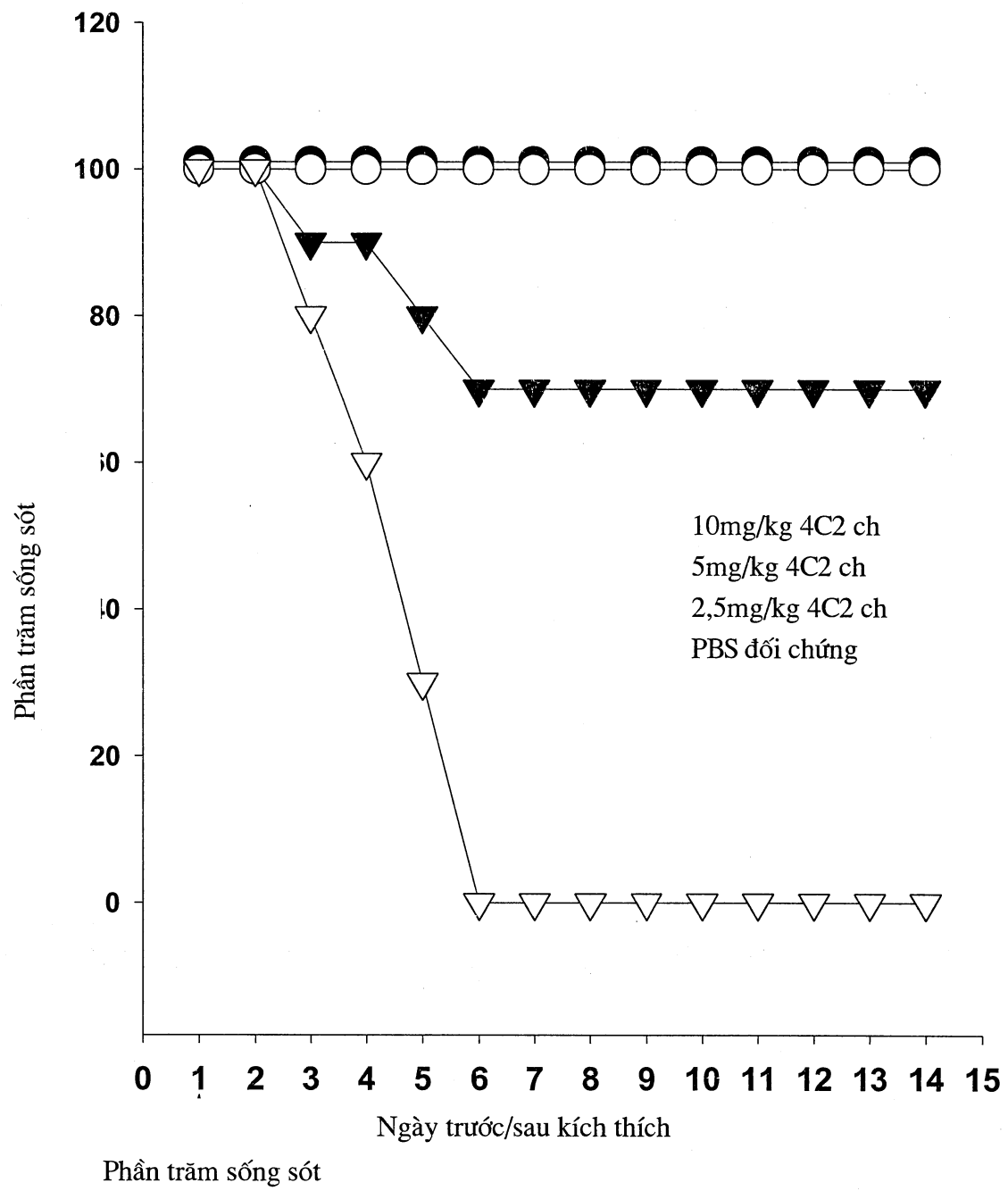


Fig 4A

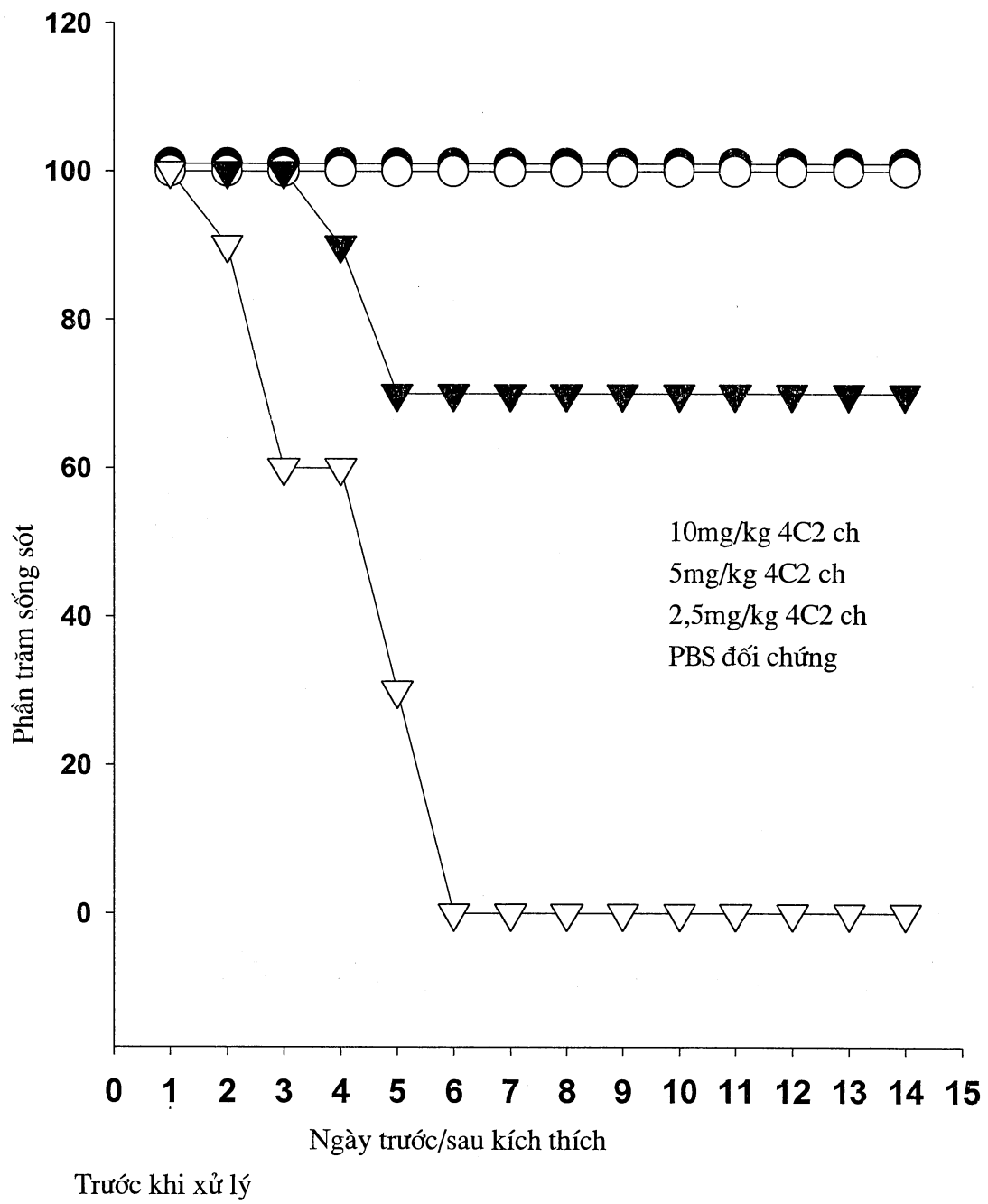


Fig 4B

Danh mục trình tự

<110> Temasek Life Sciences Laboratory Limited
 Mookkan, Prabakaran
 He, Fang
 Kwang, Hwei-Sing Jimmy

<120> Kháng thể đơn dòng đặc hiệu với epitop cấu hình của hemagglutinin H5, axit nucleic, vector tế bào và được phẩm chứa nó

<130> 2577-203

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 300

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(300)

<220>

<221> dấu hiệu misc

<222> (70)..(87)

<223> Chuỗi nhẹ biến đổi CDR1

<220>

<221> dấu hiệu misc

<222> (139)..(147)

<223> Chuỗi nhẹ biến đổi CDR2

<220>

<221> dấu hiệu misc

<222> (256)..(282)

<223> Chuỗi nhẹ biến đổi CDR3

<400> 1

atg acg cag tct cca tcc tcc atg tct gta tct ctg gga gac aca gtc 48
 Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu Gly Asp Thr Val
 1 5 10 15

agc atc act tgc cat gca agt cag gac att agt ggt cat ata ggg tgg 96
 Ser Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asp Ile Ser Gly His Ile Gly Trp
 20 25 30

ttg cag cag aaa cca ggg aaa tca ttt aag ggc ctg atc tat cat gga 144
 Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile Tyr His Gly
 35 40 45

acc aac ttg gaa gat gga gtt cca tca agg ttc agt ggc agt gga tct 192
 Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 50 55 60

gga gca gat ttt tct ctc acc atc agc agc ctg gaa tct gaa gat ttt 240
 Gly Ala Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe

gca gac tat tac tgt gta cag tat gtt cag ttt ccg tgg acg ttc ggt 288
 Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Val Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly
 85 90 95

gga ggc acc aag 300
 Gly Gly Thr Lys
 100

<210> 2
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2

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

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

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

Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Val Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly
 85 90 95

Gly Gly Thr Lys
 100

<210> 3
 <211> 325
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (64)..(87)
 <223> Chuỗi nặng biến đổi CDR1

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (139)..(162)
 <223> Chuỗi nặng biến đổi CDR2

<220>
 <221> dấu hiệu misc
 <222> (277)..(312)
 <223> Chuỗi nặng biến đổi CDR3

<400> 3
 cag gag tct ggg gct gag ctg gtg agg cct ggg gct tca gtg aag ctg 48
 Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu
 1 5 10 15

tcc tgc aag gat tct ggc tac acg ttc acc acc tac tgg atg aac tgg 96
 Ser Cys Lys Asp Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met Asn Trp
 20 25 30

gtt aag cag agg cct gag caa ggc ctt gag tgg att gga agg att gat 144
 Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp
 35 40 45

cct tac gat agt gaa act cac tac aat caa aag ttc aag gac aag gcc 192
 Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala
 50 55 60

ata ttg act gta gac aaa tcc tcc aac aca gcc tac atg caa ctc agc 240
 Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
 65 70 75 80

agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gta agg gga ggg 288
 Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg Gly Gly
 85 90 95

tct acg gtc gcc tac ttc ggt gtc tgg ggc caa ggg a 325
 Ser Thr Val Ala Tyr Phe Gly Val Trp Gly Gln Gly
 100 105

<210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

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

Ser Cys Lys Asp Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met Asn Trp
 20 25 30

Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp
 35 40 45

Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala

50 55 60

Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser
65 70 75 80

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

Ser Thr Val Ala Tyr Phe Gly Val Trp Gly Gln Gly
 100 105

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

Gln Asp Ile Ser Gly His
1 5

<210> 6
<211> 3
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6

His Gly Thr
1

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

Val Gln Tyr Val Gln Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp
1 5

<210> 9

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 9

Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr
 1 5

<210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10

Val Arg Gly Gly Ser Thr Val Ala Tyr Phe Gly Val
 1 5 10

<210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 ctcgagcgcac ctccaccaag g 21

<210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 tctagactcg gagagggaca gag 23

<210> 13
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 ctgcagatca cgccaactgt ggctgc 26

<210> 14
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 ggcgcgcccc aagttgtccc ctctcacaat catcatc 37

<210> 15
 <211> 23
 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 15

ggtaaggggt taacagtagc agg

23

<210> 16

<211> 23

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 16

ctttggcctc tctgggatag aag

23

<210> 17

<211> 24

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 17

cacgatgata atatggccac aacc

24

<210> 18

<211> 23

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 18

caccggttgg gggaagtagt act

23

<210> 19

<211> 566

<212> PRT

<213> Virut cúm A

<400> 19

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser

1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val

20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile

35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe
145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
165 170 175

Lys Lys Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Ala Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
325 330 335

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

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
355 360 365

Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
370 375 380

Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile
385 390 395 400

Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn
405 410 415

Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly
420 425 430

Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu
435 440 445

Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr
450 455 460

Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn
465 470 475 480

Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser
485 490 495

Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu
500 505 510

Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr Tyr
515 520 525

Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala
530 535 540

Ile Met Ile Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 20
<211> 550
<212> PRT
<213> Virut cúm A

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe
130 135 140

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

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

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln
180 185 190

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Ile Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg

195	200	205	
Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly			
210	215	220	
Arg Met Glu Phe Phe Trp Ala Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn			
225	230	235	240
Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile			
245	250	255	
Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly			
260	265	270	
Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser			
275	280	285	
Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys			
290	295	300	
Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser			
305	310	315	320
Pro Gln Arg Glu Ser Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile			
325	330	335	
Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr			
340	345	350	
Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys			
355	360	365	
Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile			
370	375	380	
Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn			
385	390	395	400
Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly			
405	410	415	
Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu			
420	425	430	
Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr			

435 440 445
 Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn
 450 455 460

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

 Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu
 485 490 495

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

 Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala
 515 520 525

 Ile Met Ile Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
 530 535 540

 Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 545 550

 <210> 21
 <211> 341
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> CDS
 <222> (3)..(341)

 <400> 21
 ac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc atc gtc tcc tca gcc tcc acc aag 47
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 1 5 10 15

 ggc cca tgg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg 95
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 20 25 30

 ggc aca ggc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg 143
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 35 40 45

 gtg acg gtg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc 191
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 50 55 60

 ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg 239
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val

<220>

<221> CDS

<222> (336)..(656)

<400> 23

ttctaaactc tgaggggggc ggaatgacgtg gccattcttt gcctaaagca ttgagtttac 60

tgcaaggctca gaaaagcatg caaagccctc agaatggctg caaagagctc caacaaaaca 120

atttagaact ttattaagga atagggggaa gctaggaaga aactcaaac atcaagattt 180

taaatacgct tcttggtctc ctgctataa ttatctggga taagcatgct gttttctgtc 240

tgtccctaac atgccctgtg attatccgca aacaacacac ccaagggcag aactttgtta 300

cttaaacacc atcctgtttg cttcttctct cagga act gtg gct gca cca tct 353

Thr Val Ala Ala Pro Ser

1 5

gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc 401

Val Phe Ile Phe Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala

10 15 20

tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta 449

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val

25 30 35

cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tgg ggt aac tcc cag gag agt 497

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser

40 45 50

gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc 545

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr

55 60 65 70

ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc 593

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys

75 80 85

gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tgg ccc gtc aca aag agc ttc aac 641

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn

90 95 100

agg gga gag tgt tag agggagaagt gccccacct gctcctcagt tccagcctga 696

Arg Gly Glu Cys

105

ccccctcca tctttggcc tctgacctt ttccacagg ggacctaccc ctattgcggt 756

cctccagctc atctttacc tcacccccct cctcctcctt ggctttaatt atgctaagt 816

tggaggagaa tgaataaata aagtgaatct ttgcacctgt ggtttctctc ttcttcaat 876

ttaataatta ttatctgttg ttaccaact actcaatttc tcttataagg gactaaatat 936

gtagtcatcc taaggcgcat aaccatttat aaaaatcatc cttcattcta tttacccta 996

tcctcctctg caagacagtc ctccctcaaa ccacaagcc ttctgtctc acagtccct 1056

gggcccgtgtg aggagagact tgcttcttg tttcccctc ctcagcaagc cctcatagtc 1116

cttttaagg gtgacaggtc ttacggtcac atatcctttg attcaattcc ctgggaatca 1176

accaaggcaa attttcaaaa agaagaaacc tgc 1209

<210> 24

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

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

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105