



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

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

(11)



1-0029307

(51)⁷ C07K 16/28; A61K 39/00

(13) B

(21) 1-2016-05015

(22) 10/06/2015

(86) PCT/EP2015/062993 10/06/2015

(87) WO2015/189302 17/12/2015

(30) 62/010,117 10/06/2014 US; 15305078.6 23/01/2015 EP

(45) 25/08/2021 401

(43) 26/06/2017 351A

(73) OSE IMMUNOTHERAPEUTICS (FR)

22 Boulevard Benoni Goullin 44200 Nantes, France

(72) POIRIER, Nicolas (FR); MARY, Caroline (FR); VANHOVE, Bernard (BE).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ PHÂN LẬP GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI CD127, PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC TÁI TỔ HỢP VÀ ĐƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể được định hướng kháng lại CD127, chuỗi alpha của thụ thể interleukin 7 (IL-7) (IL-7R), và các kháng thể này có các tính chất đối kháng đối với tương tác IL-7-IL-7R, có thể thể hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với các tế bào dương tính với CD127 nhưng không làm gia tăng sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai (dendritic cell: DC) được cảm ứng bởi TSLP, một xytokin cũng sử dụng CD127 như là một phần của thụ thể của nó. Ngoài ra, các kháng thể này không gây cảm ứng sự nội nhập của CD127 và/hoặc ức chế sự nội nhập được cảm ứng bởi IL7 của CD127. Theo khía cạnh khác của sáng chế, các kháng thể được đề xuất mà nhận biết epitop CD127 người chứa các trình tự từ vị trí 2b của CD127, cụ thể là epitop chứa các trình tự CD127 người của miền D1 và của vị trí 2b của CD127, cụ thể là epitop chứa ít nhất một trình tự từ D1 chứa SEQ ID No: 115 (cụ thể là chứa SEQID No: 110) và/hoặc SEQ ID No: 111 và/hoặc trình tự từ vị trí 2b chứa trình tự của SEQ ID No: 116 và tùy ý còn chứa SEQ ID No: 117 (cụ thể là chứa SEQ ID No: 111). Các kháng thể của sáng chế là thích hợp để sử dụng để chữa trị tình trạng bệnh lý được chẩn đoán ở bệnh nhân mà do yếu tố sinh bệnh học liên quan đến sự tạo lympho bào, khi các con đường truyền tín hiệu IL-7 góp phần vào yếu tố sinh bệnh học này, đặc biệt là khi sự gia tăng sự trưởng thành, chính xác hơn là sự điều hòa tăng của các phân tử đồng kích thích, của các tế bào đuôi gai là không mong muốn.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể được định hướng kháng lại phân đơn vị alpha của thụ thể của interleukin 7 (IL-7), được gọi là CD127 hoặc p90 IL-7R hoặc IL-7Ralpha hoặc IL-7R – đôi khi còn được gọi là IL-7Ra –, đặc biệt là kháng lại chuỗi alpha của thụ thể của IL-7 người được biểu thị trên các tế bào người. Các kháng thể này có các tính chất đối kháng đối với tương tác IL-7-IL-7R, có thể biểu hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với các tế bào dương tính với CD127 nhưng không làm gia tăng sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai (dendritic cell: DC) được cảm ứng bởi TSLP, một xytokin cũng sử dụng CD127 như là một phần của thụ thể của nó. Cách khác, hoặc ngoài ra, các kháng thể này không gây cảm ứng sự nội nhập của CD127 và/hoặc ức chế sự nội nhập được cảm ứng bởi IL7 của CD127. Theo khía cạnh khác của sáng chế, các kháng thể được đề xuất là các kháng thể nhận biết epitop CD127 người chứa các trình tự từ vị trí 2b của CD127, cụ thể là epitop chứa các trình tự CD127 người của miền D1 và của vị trí 2b của CD127, cụ thể là epitop chứa ít nhất một trình tự từ D1 chứa SEQ ID No: 115 (cụ thể là chứa SEQ ID No: 110) và trình tự từ vị trí 2b chứa trình tự SEQ ID No: 116 và tùy ý còn chứa SEQ ID No: 117 (cụ thể là chứa SEQ ID No: 111).

Do đó, các kháng thể của sáng chế là thích hợp để sử dụng để chữa trị tình trạng bệnh lý được chẩn đoán ở bệnh nhân mà do yếu tố sinh bệnh học liên quan đến sự tạo lympho bào, khi các con đường truyền tín hiệu IL-7 góp phần vào yếu tố sinh bệnh học này, đặc biệt là khi sự gia tăng sự trưởng thành, chính xác hơn là sự điều hòa tăng của các phân tử đồng kích thích, của các tế bào đuôi gai là không mong muốn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sinh hóa

CD127 là phổ biến đối với thụ thể IL-7 (IL-7R) và đối với thụ thể TSLP (TSLPR). IL-7R được cấu thành từ heterodime của CD127 và chuỗi gama thông thường (c) của các thụ thể interleukin. Chuỗi gama thông thường yc đôi khi được đề cập ở đây và trong tài liệu chuyên ngành là CD132. IL-7R được liên kết bởi Interleukin 7. Thụ thể TSLP là heterodime của CD127 và yếu tố giống thụ thể xytokin 2 (cytokine receptor-like

factor 2: CRLF2). Thụ thể TSLP được liên kết bằng TSLP. Trong tài liệu chuyên ngành, TSLPR đôi khi được sử dụng để chỉ cả chuỗi CRLF2 của thụ thể này, và phức hợp CD127/CRLF2. Để tránh nhầm lẫn, trong sáng chế này TSLPR thường chỉ phức hợp.

CD127 (số truy cập Swiss Prot là P16871) có thể tồn tại dưới bốn đồng phân. Đồng phân hợp chuẩn, còn gọi là H20 (Swiss Prot P16871.1) là protein xuyên màng đơn và có 459 axit amin gồm, từ đầu N đến đầu C, peptit tín hiệu 20 axit amin, miền ngoại bào 219 axit amin, miền xuyên màng 25 axit amin và miền nội bào 195 axit amin. Các đồng phân khác có trình tự giống như trình tự của toàn bộ (hoặc hầu hết) miền ngoại bào của H20 và thể hiện các trình tự đầu C thay đổi. Các đồng phân 2 và 4 được tiết (Swiss Prot P16871-4 và P16871-3), trong khi đồng phân 3 (Swiss Prot P16871-2) cũng là protein xuyên màng. Trình tự của CD127, không có peptit tín hiệu, được cung cấp ở đây dưới dạng SEQ ID No: 57. Khi đề cập đến các axit amin được đánh số của CD127 trong đơn sáng chế, trình tự này sẽ có vai trò làm tham chiếu cho việc đánh số. CD127 được báo cáo là có trình tự SEQ ID No:113, và miền ngoại bào của nó, khi peptit tín hiệu được loại bỏ, có trình tự là SEQ ID No:114. Trừ khi có quy định khác, việc đánh số được dùng ở đây đối với các axit amin của CD127 là việc đánh số từ SEQ ID No:114.

CD127 là thụ thể tương đồng thụ thể xytokin nhóm I (Cytokine Receptor Homology class I: CRH I). Như được biết rõ trong lĩnh vực này, miền ngoại bào của các thụ thể này bao gồm hai miền fibronectin 3, được gọi là D1 và D2. Cấu trúc tinh thể học chính xác của CD127 đã được công bố và mô tả trong, ví dụ, McElroy et al., 2009; McElroy et al., 2012 và Walsh, 2012 và cụ thể là đã được bộc lộ dưới dạng dữ liệu cấu trúc protein trong cơ sở dữ liệu Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB), với số truy cập là 3UP1. D1 thường được xem như là có liên quan trong việc liên kết với IL-7, trong khi D2 là có liên quan trong việc liên kết với chuỗi γ (và cả với IL-7). Quan trọng là, vị trí 2b của miền D2, chủ yếu bao gồm các axit amin 109 đến 127 của SEQ ID No:114 (xem Walsh, 2012) là có tính quyết định đối với tương tác CD127-c, cụ thể là nó cho phép hoặc gia tăng liên kết của CD127 với γ với sự có mặt của IL-7. cụ thể là, các đột biến ở P112 và L115, mà đã được nhận diện ở các bệnh nhân bị chứng suy giảm miễn dịch kết hợp nặng (Severe combined immunodeficiency: SCID), được cho là làm mất ổn định nhân

ky nước của miền D2 mà có thể dẫn đến dấu hiệu sinh bệnh của chúng. Như nêu trên, vị trí 2b bao gồm chủ yếu là các axit amin 109 đến 127; người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng các đầu mút của miền này có thể không nhất thiết phải được quy định một cách rõ ràng với sự chính xác từng bazơ và hiểu rõ ràng vị trí 2b có thể được hiểu là chứa, ở một hoặc cả hai đầu của trình tự nêu trên, nhiều hơn hoặc ít hơn 1, 2, hoặc 3 axit amin. Do đó, trong bản mô tả này, khi đề cập đến vị trí 2b của CD127, thì sẽ được hiểu là đề cập đến trình tự của CD127 bắt đầu ở điểm 106, 107, 108, 109, 110, 111 hoặc 112 và kết thúc ở điểm 124, 125, 126 hoặc 127; cụ thể là đến trình tự mà được cho là hoặc được thể hiện là cấu thành vị trí liên kết thiết yếu với chuỗi yc của IL7-R, cụ thể là với sự có mặt của IL-7.

Truyền tín hiệu IL-7R. Sự liên kết của IL-7 với IL-7R kích hoạt sự hoạt hóa của một số con đường truyền tín hiệu, bao gồm các Janus kinaza (JAK) -1 và -3, chất truyền tín hiệu và hoạt hóa phiên mã 5 (signal transducer and activator of transcription 5: STAT5) và phosphatidylinositol 3-kinaza (PI3-k). Các con đường STAT1 và STAT3 được báo cáo là được hoạt hóa, mặc dù chúng dường như không phải là các con đường chủ yếu. Sự hoạt hóa con đường STAT5 được yêu cầu để cảm ứng protein Bcl-2 chống sự chết tế bào theo chương trình và ngăn ngừa sự thâm nhiễm của protein Bax tiền chết tế bào theo chương trình vào trong ty thể và do đó để làm sống sót các tiền chất tế bào T phát triển tuyến ức. Sự hoạt hóa con đường PI3-k dẫn đến sự phosphoryl hóa và sự giữ lại tế bào chất của protein Bad tiền chết tế bào theo chương trình.

Sự truyền tín hiệu TSLPR. Lymphopoietin nền tuyến ức, (Thymic Stromal Lymphopoietin: TSLP) là xytokin tế bào biểu mô mà có hoạt tính trong việc tạo lympho bào và cụ thể là có liên quan đến sự điều hòa sự phát triển của các tế bào của hệ miễn dịch, sự điều hòa này tác động đặc biệt đến sự trưởng thành của các tế bào này. TSLP người (số truy cập Genbank: AF338732) là yếu tố mà gây ra sự phân cực của các tế bào đuôi gai và thúc đẩy sự tăng sinh và sự biệt hóa tế bào T và B. TSLP còn ngăn chặn sự sản sinh các tế bào Treg (Lei et al., 2011) .

Các con đường truyền tín hiệu được cảm ứng bởi TSLP đã được chứng minh là khác, ở mức phân tử, với các con đường được cảm ứng bởi IL-7. Cụ thể là, mặc dù TSLP liên kết với thụ thể của nó còn hoạt hóa Jak-1, nhưng nó không hoạt hóa Jak-3 nhưng lại hoạt hóa Jak-2. Các khác biệt này là phù hợp với sự quan sát thấy rằng Jak-1 kết hợp với CD127, chung nhau bởi cả hai thụ thể trong khi Jak-2 kết hợp với CRLF2

và Jak-3 với γc (Rochman et al., 2010). Sự hoạt hóa con đường STAT5 cũng được báo cáo đối với sự truyền tín hiệu được cảm ứng bởi TSLP (Zhong et al., 2014). Một tác dụng chính của TSLP là để dẫn đến sự hoạt hóa các tế bào đuôi gai, làm cảm ứng sự biểu hiện quá mức các phân tử đồng kích thích như CD80, nhờ đó thúc đẩy các đáp ứng viêm qua trung gian TH-2 (Reche et al., 2001).

Sinh học tế bào.

“Các tế bào dương tính với CD127” là các tế bào biểu hiện CD127 trên bề mặt tế bào của chúng. Trong hầu hết các trường hợp, các tế bào dương tính với CD127 biểu hiện CD127 dưới dạng phức hợp tạo thành IL-7R (các tế bào dương tính với IL-7R) và/hoặc dưới dạng phức hợp tạo thành TSLPR (các tế bào dương tính với TSLPR). CD127 được biểu hiện bởi các tế bào khác nhau, bao gồm cả tế bào T ghi nhớ và tế bào T chuyên cần. CD127 được biểu hiện cụ thể bởi các tế bào T thực hiện (effector T cell: Teff), bao gồm các tế bào T tĩnh và các tế bào T ghi nhớ, và bởi các tế bào B chưa trưởng thành, nhưng đặc biệt là không được biểu hiện bởi các tế bào T điều hòa tĩnh tự nhiên (Treg tự nhiên). IL-7R là cần thiết để thúc đẩy sự biệt hóa tế bào tuyến ức và mở rộng dòng tế bào lympho.

Sự quan trọng của con đường IL7-CD127 đối với sự nội cân bằng tế bào T chuyên cần được nhấn mạnh bằng một số nghiên cứu gần đây thể hiện rằng các mức biểu hiện của IL-7R α liên kết màng trên các tế bào T CD4⁺ thông thường là tương quan với tần suất của các tế bào T (RTE)-CD4⁺ di cư tuyến ức vừa qua trên các đối tượng khỏe mạnh và các bệnh nhân bị nhiễm HIV cũng như các bệnh nhân bị MS (Albuquerque et al., 2007) (Broux et al., 2010). IL-7R α cũng là thành phần của thụ thể thụ thể TSLP. Sự tiết TSLP bởi các tiểu thể Hassall, các cấu trúc bao gồm các tế bào biểu mô trên tuyến ức, đã được chứng minh là tạo điều kiện cho các tế bào đuôi gai thuộc tủy CD11c⁺ (MDC) gây cảm ứng sự biệt hóa các tế bào tuyến ức thành Treg (Watanabe et al., 2005a). Do đó, các tín hiệu từ thụ thể IL-7 là cần thiết để phát triển Treg như được thể hiện trên chuột nhất bất hoạt IL-7R α (Mazzucchelli et al., 2008). Trong (Haas et al., 2011), các tác giả đã chứng minh sự biểu hiện IL-7R α giảm trên các tế bào T thông thường và các mức huyết tương IL-7 được điều hòa tăng cùng với sự giảm tần suất Treg di cư tuyến ức vừa qua và chức năng Treg trên MS, mà không có ảnh hưởng di truyền rõ ràng (Haas et al., 2011). Việc mở xẻ cách IL-7 điều hòa sự vận chuyển màng thụ thể cùng nguồn gốc của nó là yếu tố quyết định để hiểu biết sâu sắc về vai trò của

IL-7/IL-7R trong chức năng lympho bào. Các nghiên cứu trước đây đã gợi ý rằng sự kích thích IL-7 của các tế bào T dẫn đến sự điều biến giảm trên bề mặt của CD127 trong vòng 30 phút, có thể là do sự nội nhập thụ thể. Tại các thời điểm muộn hơn (2-6 giờ), IL-7 được thể hiện là gây cảm ứng sự điều hòa phiên mã giảm của CD127. Tuy nhiên, động lực thực tế của sự nội nhập CD127 và sự điều hòa các cơ chế vận chuyển bởi IL-7 vẫn cần được làm sáng tỏ (Henriques et al., 2010). Cũng đã có gợi ý rằng sự truyền tín hiệu được cảm ứng bởi IL-7 là phụ thuộc vào sự nội nhập CD127 và sự thoái hóa thụ thể tiếp đó là dựa vào hoạt tính JAK3 và được qua trung gian là cả proteasom và lysosom.

Sinh lý bệnh học

Các tế bào đuôi gai biểu hiện các mức phân tử đồng kích thích cao sau khi trưởng thành, như CD80, làm thúc đẩy các đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T. Chúng cũng sản sinh xytokin TARC (CCL17), làm cảm ứng sự hóa hướng động ở các tế bào T. Như vậy, các tế bào đuôi gai trưởng thành góp phần vào sinh lý bệnh học của một số bệnh qua trung gian miễn dịch trong đó các đáp ứng tế bào T đóng vai trò, ví dụ như ở bệnh hen, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm ruột kết, bệnh đa xơ cứng và bệnh viêm màng mạch nhỏ. Các tế bào đuôi gai trưởng thành cũng đóng vai trò chính trong quy trình thải ghép các tế bào, các mô hoặc cơ quan được ghép. Do đó, nhiều chiến lược trị liệu đã nhắm vào việc ngăn chặn sự trưởng thành các tế bào đuôi gai.

Sự có mặt hay không có mặt của các phân tử đồng kích thích trên các tế bào trình diện kháng nguyên (kháng nguyên-presenting cells: APCs), như các tế bào đuôi gai có ảnh hưởng đáng kể đến bản chất chất lượng và số lượng của đáp ứng miễn dịch. Sự biểu hiện quá mức của CD80 bởi các tế bào đuôi gai gây ra sự trưởng thành DC và làm gia tăng sự hoạt hóa tế bào T ghi nhớ (Bour-Jordan et al., 2011). Về mặt cơ chế, sự tương tác của CD28 với CD80 chiếm giữ đám trung tâm của liên hợp thần kinh miễn dịch học và được đồng khu trú với TCR tiếp hợp, nhờ đó ổn định hóa liên hợp thần kinh miễn dịch (Dustin and Shaw, 1999) (Grakoui et al., 1999). Tương tác giữa CD28 và CD80 thực tế tạo ra khoảng cách thích hợp cho TCR để tương tác một cách hiệu quả với các phân tử HLA (Shaw and Dustin, 1997).

Bệnh đa xơ cứng (Multiple sclerosis: MS) là bệnh hủy myelin viêm của hệ thần kinh trung ương (central nervous system: CNS). Sự xuất hiện của các vết hủy myelin

ở CNS của các bệnh nhân bị MS được kết hợp với sự thâm nhiễm viêm chủ yếu bao gồm các đại thực bào và các tế bào lympho T. Về mặt cơ chế, MS được xem như là bệnh tự miễn. Điển hình là, MS được xem như là bệnh chủ yếu qua trung gian các tế bào T CD4⁺. Các phân nhóm cụ thể của CD4⁺: Th1 và gần đây hơn là Th17, là có liên quan trong sinh lý bệnh học của bệnh này. Hiện tại, vẫn khó có thể quy các vai trò cụ thể cho mỗi quần thể phụ Th1 và Th17. Hơn nữa, sự ức chế vận chuyển bạch cầu bằng sự đối kháng của integrin $\alpha 4$ ($\alpha 4$) hiện được phê duyệt như là phương pháp trị liệu để điều trị các bệnh viêm như MS và các bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease: IBD) và cũng như để điều trị chứng xơ vữa động mạch (Zhi et al., 2014). $\alpha 4\beta 7$ được biểu hiện trên nhiều nhóm bạch cầu giới hạn bao gồm các đại thực bào được hoạt hóa, các phân nhóm lympho bào, các tế bào NK, các dưỡng bào và các bạch cầu ưa eosin.

IL-7 người cảm ứng sự biểu hiện mạnh mẽ của các integrin $\alpha 4$ và $\beta 7$ *in vitro* trên các tế bào lympho T của người và làm tăng một cách đột ngột tần suất của các tế bào lympho T của người biểu hiện các integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và $\alpha 4/\beta 7$ (0), đây là các chất cần thiết đối với sự trở về và lưu lại ở các mô không phải dạng lympho như ruột, não và da (Denucci et al., 2009; Gorfu et al., 2009).

Các tế bào T chuyên cần một phần chịu trách nhiệm cho sự thải cấp các cơ quan và các mô được ghép. Các tế bào này có thể được kiểm soát bằng các thuốc ức chế miễn dịch hiện có (các chất ức chế calcineurin) và bằng các kháng thể đơn dòng mà phong bế sự đồng kích thích (chống dính bám, các chất ức chế CD80/86). Các tế bào T ghi nhớ cũng chịu trách nhiệm cho sự thải ghép. Các tế bào T ghi nhớ tích tụ ở người do lịch sử miễn dịch đạt được, chủ yếu là các phản ứng kháng lại các virus trước đây. Các tế bào T ghi nhớ đã được thể hiện rằng có thể được tái hoạt hóa bằng các kháng nguyên cùng loài như là kết quả của “tính miễn dịch khác loại”, là phản ứng chéo của sự phòng vệ chống virus của chúng ta đối với các kháng nguyên cùng loài (Adams et al., 2003). Tính miễn dịch khác loại thể hiện khả năng ngăn chặn có hiệu lực đối với sự cảm ứng dung nạp vì các tế bào T ghi nhớ, ngược lại với các tế bào T chuyên cần, được lập trình để hoạt hóa nhanh chóng, với yêu cầu giảm đối với các tín hiệu đồng kích thích. Các tế bào T ghi nhớ cũng có thể có liên quan đến sự thải ghép mạn tính. Bên cạnh vai trò của chúng trong việc ghép cơ quan và mô, các tế bào T chuyên cần và các tế bào T ghi nhớ còn đồng chịu trách nhiệm cho nhiều bệnh tự miễn. Đây là trường

hợp đối với bệnh viêm ruột kết mạn loét (Shinohara et al., 2011), bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến hoặc bệnh mảnh ghép kháng lại ký chủ.

Hơn nữa, một số tế bào ác tính đã được thể hiện là biểu thị IL-7R. Đây là trường hợp đối với bệnh u lympho da Sezary (60% trong số chúng), hoặc bệnh bạch cầu lympho bào cấp ở trẻ em trong đó khoảng 15% số trường hợp phát triển sự đột biến tăng chức năng ở CD127, làm cho các khối u này một phần phụ thuộc vào IL-7 (Shochat et al., 2011).

Việc làm nghèo các lympho bào T đã là phương pháp ức chế miễn dịch hiển nhiên để kháng lại sự thải ghép khác loài hoặc kháng lại sự tự miễn. Tuy nhiên, việc làm nghèo toàn bộ tế bào T có thể là không thuận lợi cho sự cảm ứng dung nạp miễn dịch. Các quần thể phụ tế bào T hướng đích hoặc các tế bào T được hoạt hóa một cách chọn lọc, không có các tế bào Treg cải biến, có thể tạo nên phương pháp tiên dung nạp miễn dịch (Haudebourg et al., 2009). Do đó, CD127 có thể được xem như là đích trị liệu có hấp dẫn tiềm năng đối với các kháng thể đơn dòng (các kháng thể đơn dòng: Mabs) hướng đến sự điều biến các đáp ứng miễn dịch vì các kháng thể đơn dòng này có thể có tiềm năng làm nghèo các lympho bào thực hiện mà không làm nghèo các lympho bào điều hòa. Do đó, đã giả định rằng chúng có thể thể hiện hiệu lực trong việc ghép, tự miễn (Michel et al., 2008) và tính ác bằng cách đối kháng sự truy cập của IL-7 vào IL-7-R và nhờ đó hạn chế chức năng và sự phát triển của tế bào T và B.

Liệu pháp với kháng thể đơn dòng kháng các tế bào CD127⁺ mà can thiệp vào con đường IL-7 có thể hoàn thành mục đích này bằng cách loại trừ/trung hòa các tế bào T chuyên cần và các tế bào T ghi nhớ và/hoặc làm giảm số lượng của chúng trong khi vẫn bảo tồn các tế bào Treg hoặc bằng cách loại trừ hoặc làm giảm số lượng các tế bào ác tính dương tính với CD127. Tuy nhiên, liệu pháp với kháng thể đơn dòng kháng các tế bào CD127⁺ có thể tác động như là con dao hai lưỡi nếu nó dẫn đến sự hoạt hóa các tế bào đuôi gai. Thực vậy, CD127 còn được biểu hiện bởi các tế bào đuôi gai kết hợp với CRLF2, tạo thành thụ thể TSLP. Với sự có mặt của TSLP, các tế bào đuôi gai nhận các đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T và thúc đẩy các đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào T. Một số kháng thể đơn dòng kháng CD127, có lẽ bằng cách cải biến cách TSLP tương tác với thụ thể TSLP, có tính chất làm gia tăng sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai được cảm ứng bởi TSLP (như được thể hiện với điều kiện môi trường0). Kết quả là, liệu pháp với kháng thể đơn dòng kháng CD127 mà sẽ không thể

làm gia tăng sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai được cảm ứng bởi TSLP, sẽ thể hiện ưu điểm trong trị liệu. Nó sẽ có thể thể hiện lợi ích của sự phong bế IL7R mà không có hạn chế của sự hoạt hóa các tế bào đuôi gai trong môi trường viêm chứa TSLP.

Trong công bố, các tác giả đã phân tích lợi ích của thụ thể (Racapé et al., 2009) IL-7 alpha (IL7R dưới dạng đích trị liệu tiềm năng trong sự ghép. Xem xét sự biểu hiện của IL-7R trên các tế bào T khác nhau và các tế bào đáp ứng IL-7, các tác giả đã xác định liệu việc hướng đích các tế bào T ghi nhớ biểu hiện IL-7R có thể kéo dài khả năng sống sót của mảnh ghép khác loại ở chuột nhắt hay không và kết luận rằng việc hướng đích IL-7 hoặc IL-7R sẽ miễn trừ một cách thuận lợi các tế bào Treg. Giữa các góc nhìn này, các tác giả đã chỉ ra rằng việc hướng đích IL-7 hoặc IL-7R trong việc điều trị trị liệu có thể có các hệ quả khác nhau đối với sự sống sót của các tế bào biểu hiện CD127 và có thể gợi ra các typ giảm lympho bào khác nhau. Câu hỏi về các tác dụng của các kháng thể mà sẽ được định hướng kháng IL-7R tùy thuộc vào liệu chúng sẽ là kháng thể phong bế hoặc kháng thể trung hòa hay kháng thể gây độc tế bào cũng được đặt ra từ quan điểm nhìn nhận. Tuy nhiên, các tác giả không thể hiện là đã đạt được và thử nghiệm các kháng thể này và thay vào đó các tác giả đã thể hiện nhu cầu nghiên cứu thêm để đánh giá sự liên quan của giả thuyết này.

Xem xét các hạn chế về các phương pháp trị liệu đang có đối với các bệnh liên quan đến miễn dịch và các bệnh khác liên quan đến IL-7/IL-7R như các loại bệnh ung thư khác nhau, bao gồm một số bệnh ung thư vú, thấy rằng vẫn cần các loại thuốc khác, đặc biệt là các loại thuốc hoạt tính đối với các đích chọn lọc hơn nhằm kiểm soát, ví dụ, điều biến sự hoạt hóa miễn dịch ở người bệnh.

Trong trường hợp này, các kháng thể đơn dòng kháng IL-7R có các tính chất đối kháng đối với IL-7R đã được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO2010/017468 và các phiên bản được làm giống như của người của chúng trong công bố đơn quốc tế số WO2011/094259 nhằm để điều trị các bệnh tự miễn như bệnh đa xơ cứng. Các kháng thể được mô tả này được nêu là chất đối kháng đối với sự liên kết của IL-7 với thụ thể của nó, và có hoạt tính kháng sự khuếch đại và sự sống sót của các tế bào TH17 và TH1 mà được nêu là cần sự tương tác IL-7 với thụ thể CD127 của chúng. Tác dụng của các kháng thể này đối với sự trưởng thành của các tế bào miễn dịch, và đặc biệt là của các tế bào đuôi gai, đã không được xem xét. Ngoài ra, các kháng thể này được nêu là không

ức chế sự sản sinh TARC cảm ứng bởi TSLP (trang 107 của WO2011/094259). Tương tự, các kháng thể kháng CD127 được báo cáo trong công bố đơn quốc tế số WO2011/104687 hoặc trong công bố đơn quốc tế số WO2013/056984, mà được dự tính là để sử dụng trong việc điều trị bệnh tiểu đường, bệnh lupus, bệnh viêm khớp dạng thấp và các bệnh tự miễn khác, đã không được bàn luận về tác dụng khả dĩ của chúng đối với sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai và sự tương tác của chúng với sự truyền tín hiệu cảm ứng bởi TSLP đã không được báo cáo. Ngoài ra, như được công bố bởi Kern et al (Kern et al., 2013; Kern et al., 2015) và như được thể hiện ở đây, các kháng thể kháng CD127 trong lĩnh vực kỹ thuật này gây cảm ứng sự nội nhập của thụ thể. Vì các kháng thể kháng CD127 đối kháng mà còn gây cảm ứng sự nội nhập của CD127 thất bại trong việc kiểm soát sự quá mẫn typ IV trên da (0), trong đó các kháng thể kháng CD127 đối kháng mà không gây cảm ứng sự nội nhập lại gây cảm ứng, nên có thể là quy trình nội nhập hoạt hóa con đường truyền tín hiệu, làm giảm nhẹ tác dụng đối kháng của các kháng thể này. Cuối cùng là, các kháng thể trong lĩnh vực kỹ thuật này nhận biết epitop mà không chứa trình tự bất kỳ từ vị trí 2b của CD127 (tức là đặc biệt từ các axit amin 109-127 của SEQ ID No:114); và không được thể hiện là làm phá vỡ liên kết của CD127 với chuỗi yc của IL7-R.

Mặc dù có sự quan tâm gần đây trong việc phát các kháng thể CD127 nhưng các nỗ lực chỉ tập trung vào ức chế sự truyền tín hiệu IL-7R được cảm ứng bởi IL7. Tuy nhiên, TSLP và TSLPR đã có liên quan đến một số bệnh lý học. TSLP đã được chứng minh là đóng vai trò trong các bệnh da và phổi (He and Geha, 2010) và kết hợp với các bệnh lý khác nhau bao gồm bệnh viêm khí đạo và bệnh viêm da cơ địa dị ứng ở người và chuột nhắt (Ying et al., 2008) (Jariwala et al., 2011). Ngoài ra, TSLP đã được chứng minh là kết hợp với sự điều hòa sự miễn dịch và viêm ở ruột (Taylor et al., 2009). Các bệnh lý khác liên quan đến TSLP và TSLPR bao gồm bệnh bạch cầu tế bào B nhi khoa (van Bodegom et al., 2012), các rối loạn dị ứng đặc hiệu ở phổi và da, các bệnh liên quan đến tính tự miễn (Roan et al., 2012) và bệnh ung thư, bao gồm bệnh ung thư vú (Olkhanud et al., 2011).

Do đó, mặc dù đã được công nhận phần lớn trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng các kháng thể kháng CD127 là các ứng viên đầy hứa hẹn để điều trị các bệnh liên quan đến tính miễn dịch thông qua sự đối kháng của các cơ chế được cảm ứng bởi IL-7 và/hoặc qua trung gian IL-7-R, và rằng các kháng thể này cũng sẽ liên kết CD127 trong trường

hợp của thụ thể TSLP và can thiệp vào các cơ chế được cảm ứng bởi TSLP và/hoặc qua trung gian thụ thể TSLP, nhưng sự liên quan khả dĩ của chúng trong việc trưởng thành của các tế bào đuôi gai không được đặt câu hỏi và sự cải thiện bao gồm thu được các kháng thể mà không thể hiện tác dụng làm tăng sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai và/hoặc không gây cảm ứng sự nội nhập của CD127 và/hoặc ức chế sự nội nhập được cảm ứng bởi IL7, chưa từng được gợi ý trong lĩnh vực này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo phát hiện bất ngờ của họ về sự gia tăng không mong muốn, được cảm ứng bởi sự tồn tại của các kháng thể kháng CD127, sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai được cảm ứng bởi TSLP (mặc dù các kháng thể này ức chế sự sản sinh TARC cảm ứng bởi TSLP), các tác giả sáng chế đã phát triển các kháng thể mà không thể hiện sự gia tăng này và do đó là thích hợp hơn để điều trị các bệnh, cụ thể là các bệnh tự miễn. Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng các kháng thể mà không gây cảm ứng sự nội nhập và/hoặc ức chế sự nội nhập cảm ứng bởi IL7 của CD127 là có hiệu quả cao, đặc biệt là *in vivo* so với các kháng thể có trong lĩnh vực kỹ thuật này như MD707-13.

Sáng chế đề xuất biện pháp thích hợp trong trường hợp này, liên quan đến các kháng thể đơn dòng kháng IL-7R mà chỉ can thiệp tiêu cực vào con đường TSLP. Theo đó các kháng thể đơn dòng (Mab) của sáng chế không làm gia tăng sự trưởng thành của tế bào đuôi gai cảm ứng bởi TSLP, ngược lại với những gì mà các tác giả sáng chế quan sát được trên các kháng thể kháng CD127 thông thường. Ngoài ra hoặc cách khác, các kháng thể của sáng chế không gây cảm ứng sự nội nhập của CD127 và/hoặc ức chế sự nội nhập cảm ứng bởi IL7 của CD127. Theo một phương án cụ thể, các kháng thể được đề xuất trong sáng chế kết hợp các tính chất liên quan đến sự nội nhập và/hoặc sự trưởng thành DC với hoạt tính đối kháng đối với sự truyền tín hiệu IL-7/IL-7-R. Theo các phương án cụ thể, các kháng thể của sáng chế ức chế sự biểu hiện được cảm ứng bởi IL7 của các integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và $\alpha 4/\beta 7$ trên các tế bào T, cụ thể là *in vivo*. Do đó, các Mab này với các cơ chế tác dụng mới tạo ra các sản phẩm mới để đánh giá các lợi ích trị liệu của việc hướng đích CD127.

Hơn nữa, các tác giả sáng chế còn bộc lộ epitop được nhận biết bởi kháng thể được ưu tiên của sáng chế, nhờ đó cho phép phát triển trực tiếp các kháng thể khác

và/hoặc các mảnh hoặc các miền liên kết kháng nguyên của chúng hoặc các miền liên kết kháng nguyên có liên quan về mặt cấu trúc từ các loại polypeptit khác, mà liên kết epitop liên quan và bảo tồn các đặc tính mong muốn.

Các epitop từ CD127 được nhận biết bởi N13B2 được nhận diện bằng kỹ thuật quét oligo-peptit trên cơ sở mảng (đôi khi được gọi là quét peptit chồng chập hoặc phân tích pepscan) và chứa các trình tự axit amin của CD127 người gồm các trình tự ep1 (SEQ ID No: 110), ep2 (SEQ ID No: 111) và ep3 (SEQ ID No:86). Kỹ thuật này sử dụng thư viện các trình tự oligo-peptit từ các đoạn chồng chập và không chồng chập của protein đích và kiểm tra khả năng của chúng trong việc liên kết với kháng thể cần quan tâm. Bằng cách kết hợp các trình tự peptit không liên kế từ các phần khác nhau của protein đích và ép buộc tính cứng nhắc về cấu dạng đối với peptit kết hợp này (như bằng cách sử dụng các khung CLIPS) (Timmerman et al., 2007), các epitop không liên tục có thể được lập bản đồ với độ tin cậy và chính xác rất cao (Cragg, 2011) (Gaseitsiwe et al., 2010). Để xác định thêm về epitop, sử dụng các thủ tục bảo vệ sự phân giải protein, cho phép xác định rằng epitop cấu dạng chứa các trình tự axit amin của CD127 người có trình tự SEQ ID No: 115, SEQ ID No: 116 và SEQ ID No: 117. Do đó, epitop này chứa các trình tự từ vị trí 2b của CD127. Hơn nữa, epitop này còn chứa các trình tự ở cả miền D1 và miền D2 của CD127 và đặc biệt hơn là gồm các trình tự từ miền D1 cùng với các trình tự từ vị trí 2b. Các epitop của sáng chế được mô tả chi tiết hơn dưới đây. Cụ thể là, các epitop này bao gồm SEQ ID No:115 (hoặc SEQ ID No:110), SEQ ID No:116 (hoặc SEQ ID No:86) và SEQ ID No:117 (hoặc SEQ ID No:111) trong cách sắp xếp cấu dạng của chúng trong CD127 tự nhiên.

Theo phương án cụ thể, các kháng thể đơn dòng còn gây ra tác động gây độc tế bào đối với các tế bào CD127+ đích mà còn làm giảm về mặt vật lý số lượng của chúng (sự co lại của quần thể phụ).

Do đó, sáng chế liên quan đến đại phân tử, như kháng thể, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể hoặc phân tử khả chứa kháng thể và mảnh của nó, mà (i) liên kết một cách đặc hiệu chuỗi alpha của thụ thể với IL-7 (được gọi là CD127) qua tương tác kháng thể-kháng nguyên, đặc biệt là của chuỗi alpha của thụ thể IL-7 được biểu thị bằng các tế bào dương tính với CD127 người, và (ii) không làm gia tăng sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai được cảm ứng bởi TSLP (được đặc trưng, ví dụ, bằng sự biểu hiện gia tăng của các kháng nguyên bề mặt tế bào CD80 và/hoặc CD40) và/hoặc

(iii) không gây cảm ứng sự nội nhập của CD127 và/hoặc ức chế sự nội nhập được cảm ứng bởi IL7 của CD127.

Theo một phương án cụ thể của sáng chế, đại phân tử này chứa chuỗi VH chứa ít nhất một trong số các trình tự axit amin dưới đây:

- VHCDR1 SEQ ID No:10;
- VHCDR2 SEQ ID No:12;
- VHCDR3 SEQ ID No:14 hoặc SEQ ID No: 48;
- VH SEQ ID No:22

và/hoặc chuỗi VL chứa ít nhất một trong số các trình tự axit amin:

- VLCDR1 SEQ ID No:16 hoặc SEQ ID No: 50;
- VLCDR2 SEQ ID No:18 hoặc SEQ ID No: 52;
- VLCDR3 SEQ ID No:20;
- VL SEQ ID No:24.

Theo các phương án cụ thể, đại phân tử thể hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với các tế bào T của người biểu hiện CD127 (các tế bào CD127+). Theo các phương án khác, đại phân tử không thể hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với các tế bào T người biểu thị CD127 (các tế bào CD127+).

Sáng chế còn liên quan đến các chế phẩm chứa đại phân tử này, các phương pháp thu được các đại phân tử này và việc sử dụng các đại phân tử và các chế phẩm này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sự ức chế của IL-7 được cảm ứng bởi lympho bào T pSTAT5+ theo cách đáp ứng liều đối với các kháng thể đơn dòng kháng IL-7R người.

Fig.2 thể hiện sự ức chế việc truyền tín hiệu IL-7R bởi mAb N13B2.

Fig.3 thể hiện các thử nghiệm liên kết trên kháng thể N13B2 của chuột cống kháng CD127.

Fig.4 thể hiện hoạt tính kháng CD127 của kháng thể N13B2 mới được đo bằng thử nghiệm ELISA sử dụng kháng nguyên hCD127 tái tổ hợp.

Fig.5 thể hiện sự sản sinh TARC (Thymus and Activation-Regulated Chemokine, CCL17) được cảm ứng bởi TSLP và sự biểu hiện của của dấu chuẩn bề mặt tế bào CD80 bởi các tế bào đuôi gai thuộc tủy.

Fig.6 thể hiện sự ức chế sự sản sinh TARC được cảm ứng bởi TSLP bằng các kháng thể kháng CD127 người.

Fig.7 thể hiện tác dụng của các kháng thể kháng CD127 đối với sự biểu hiện CD80 và CD40 được cảm ứng bởi TSLP, dấu chuẩn của sự trưởng thành các tế bào đuôi gai.

Fig.8 thể hiện mức gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (Antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC) của kháng thể N13B2 khảm (IgG1 hoặc IgG4) kháng CD127 người.

Fig.9 thể hiện hiệu lực của các mAb N13B2 chuột cống kháng CD127 trong việc cải thiện bệnh viêm ruột kết được cảm ứng bằng cách hóa học trên chuột nhắt suy giảm miễn dịch được làm giống như của người.

Fig.10 thể hiện trình tự nucleotit và axit amin của các chuỗi VH và VL của thể khảm N13B2_G1M.

Fig.11 thể hiện trình tự nucleotit và axit amin của thể khảm N13B2_G4M.

Fig.12 thể hiện trình tự axit amin của ba chuỗi Fc khác của người (IgG1, IgG2 và IgG4) và của chuỗi Fc của kháng thể N13B2 chuột cống (IgG1).

Fig.13 thể hiện thử nghiệm liên kết kháng CD127 ELISA: phủ CD127Fc người và được phát hiện bằng kháng thể kháng kappa người.

Fig.14 thể hiện sự ức chế P-STAT5 bằng kháng thể kháng CD127.

Fig.15 thể hiện thử nghiệm độ ổn định của kháng thể kháng CD127 được làm giống như của người so với kháng thể của chuột cống kháng CD127.

Fig.16 thể hiện các thử nghiệm cạnh tranh và nội nhập bằng sự đếm tế bào.

Fig.17 (A) thể hiện nghiên cứu dược động học và dược lực học của việc dùng mAb N13B2 và MD707-13 trên các loài linh trưởng không phải người. (B) song song, thể hiện sự biểu hiện của CD127 trên bề mặt của các lympho bào T huyết được giám

sát bằng cách đếm tế bào theo dòng và được chuẩn hóa đến mức đo được trước khi tiêm mAb (được biểu thị bằng đường nét đứt).

Fig.18 thể hiện các con khi đầu chó (papio anubis) được điều trị trong tĩnh mạch bằng N13B2-IgG1 (n=3, hình vuông đen), N13B2-IgG4 (n=3, hình tròn đen) hoặc MD707-13-IgG4 (n=3, hình tròn trắng).

Fig.19 thể hiện sự ức chế in vitro sự biểu hiện integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và $\alpha 4/\beta 7$.

Fig.20 thể hiện sự ức chế in vivo sự biểu hiện integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và $\alpha 4/\beta 7$.

Fig.21 thể hiện tác dụng của kháng thể N13B2 trên mô hình DTH, là mô hình bệnh vẩy nến in vivo.

Fig.22 thể hiện các con khi đầu chó (papio anubis) được điều trị trong tĩnh mạch bằng N13B2-IgG1 (n=3, hình vuông đen), N13B2-IgG4 (n=3, hình tròn đen) hoặc MD707-13-IgG4 (n=3, hình tròn trắng) hoặc dung dịch đệm đối chứng (n=3, đường nét đứt).

Fig.23 thể hiện trình tự protein của N13B2 VH IgG4 S228P_h3 được làm giống như của người.

Fig.24 thể hiện trình tự protein của N13B2 VL Ckappa_h3 được làm giống như của người.

Fig.25 thể hiện N13B2 bảo vệ chống chết trên mô hình chuột nhắt bị bệnh viêm: bệnh mảnh ghép kháng lại ký chủ được cảm ứng trên chuột nhắt được làm giống như của người.

Fig.26 thể hiện N13B2 đặc biệt ngăn chặn sự viêm ruột kết trên mô hình chuột nhắt bị bệnh viêm.

Fig.27 thể hiện các miền epitop trên protein CD127 (Uniprot P16871) mà được nhận biết bởi kháng thể N13B2.

Fig.28 thể hiện thử nghiệm đồng kết tủa miễn dịch của phức hợp CD127/IL7/CD132 với các kháng thể kháng hCD127.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo sáng chế, đại phân tử biểu thị phân tử bất kỳ, đặc biệt là phân tử có nguồn gốc sinh học hoặc phân tử chứa các mảnh có nguồn gốc sinh học, có trọng lượng phân

từ trên 500Da. Các đại phân tử bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các polypeptit và các polypeptit được cải biến như các polypeptit được glycosyl hóa và các thể liên hợp của nó. Như được sử dụng ở đây, đại phân tử mà “liên kết một cách đặc hiệu CD127 qua các tương tác kháng thể-kháng nguyên” có nghĩa là các tương tác giữa đại phân tử này và CD127 chủ yếu ở chỗ các tương tác giống như các tương tác giữa kháng thể đặc hiệu với CD127 và CD127. Cụ thể là, đại phân tử này có thể chứa các gốc của kháng thể mà có liên quan, trong tương tác này, về cấu hình không gian cho phép tạo thành các biên hóa học giống nhau với protein CD127. Theo phương án cụ thể, đại phân tử chứa ít nhất một trình tự CDR của chuỗi VH và/hoặc chuỗi VL của kháng thể. Theo phương án được ưu tiên, đại phân tử chứa tất cả các trình tự CDR của chuỗi VH và/hoặc của chuỗi VL của kháng thể. Theo phương án được ưu tiên, đại phân tử chứa toàn bộ chuỗi VH và/hoặc toàn bộ chuỗi VL của kháng thể.

Theo các phương án cụ thể, đại phân tử được sản xuất, được thiết kế hoặc được chọn lọc để nhận biết epitop được quy định như sau (được quy định bằng ít nhất một trong các dấu hiệu sau):

(a) epitop chứa các trình tự, cụ thể là ít nhất 3, 4, 5, 6 hoặc 7 axit amin liên tiếp, lấy từ vị trí 2b của CD127, cụ thể là từ các axit amin 109-127 của SEQ ID No:114, đặc biệt hơn là từ các axit amin 110-125, 110-120, 112-120 của SEQ ID No:114, đặc biệt hơn là từ các axit amin 114-119 của SEQ ID No:114 (tương ứng với SEQ ID No:116); cụ thể là, epitop chứa SEQ ID No:116, cụ thể là chứa SEQ ID No:86; cụ thể là, epitop chứa P112 hoặc L115 của CD127;

(b) ngoài các dấu hiệu trong mục (a) nêu trên, epitop chứa các trình tự, cụ thể là ít nhất 3, 4, 5, 6 hoặc 7 các axit amin liên tiếp, lấy từ miền D1 của CD127, cụ thể là từ các axit amin 1-98 của SEQ ID No:114; cụ thể là, epitop chứa các trình tự axit amin của SEQ ID No:115 (cụ thể là chứa trình tự axit amin của ep1 (SEQ ID No:110)

(c) ngoài các dấu hiệu trong mục (a), và tùy ý trong mục (b) nêu trên, epitop chứa các trình tự, cụ thể là 3, 4, 5, 6 hoặc 7 axit amin liên tiếp, lấy từ các axit amin 180-220 của SEQ ID No:114, cụ thể là từ các axit amin 1190 đến 200; cụ thể là, epitop chứa trình tự axit amin của SEQ ID No:117; cụ thể là chứa trình tự axit amin của ep2 (SEQ ID No:111);

(d) epitop chứa các trình tự của SEQ ID No:115 và các trình tự của SEQ ID No:116, hoặc epitop chứa trình tự của SEQ ID No:117 và các trình tự của SEQ ID No:116; cụ thể là epitop chứa các trình tự của SEQ ID No:115, SEQ ID No:116 và SEQ ID No:117;

(e) epitop chứa các trình tự của CD127 như được quy định trong mục (a), (b), (c) và/hoặc (d) trên đây, và không có các trình tự axit amin khác (có nhiều hơn 3, 4, hoặc 5 axit amin liên tiếp) của CD127 ngoài các trình tự axit amin được nêu rõ ràng, tức là cụ thể là, epitop chỉ chứa các trình tự dưới đây từ CD127:

- một trình tự lấy từ vị trí 2b, cụ thể là gồm các axit amin 109-127 của SEQ ID No:114, hoặc các axit amin 110-125, 110-120, hoặc 112-120 của SEQ ID No:114, hoặc các axit amin 114-119 của SEQ ID No:114 (tương ứng với SEQ ID No:116), hoặc trình tự tương ứng với SEQ ID No:86, và/hoặc gồm trình tự 3 axit amin hoặc trên 3, 4, 5, 6, 7 axit amin và 19 axit amin hoặc dưới 19, 18, 15, 11 axit amin lấy từ vị trí 2b, cụ thể là trình tự này chứa P112 hoặc L115 của CD127;

- tùy ý, ngoài trình tự của vị trí 2b, một trình tự lấy từ miền D1 của CD127, cụ thể là từ các axit amin 98 của SEQ ID No:114, cụ thể là một trình tự gồm SEQ ID No:110 hoặc SEQ ID No:115, và/hoặc gồm trình tự 3 axit amin hoặc trên 3, 4, 5, 6, 7 axit amin và 20 axit amin hoặc dưới 20, 18, 16, 11 axit amin chứa SEQ ID No:115 hoặc nằm trong trình tự của SEQ ID No:115;

- tùy ý, ngoài trình tự của vị trí 2b và trình tự tùy ý từ miền D1 nêu có, một trình tự lấy từ các axit amin 180 đến 220 của SEQ ID No:114, cụ thể là một trình tự gồm SEQ ID No:111 hoặc SEQ ID No:117, và/hoặc gồm trình tự 3 axit amin hoặc trên 3, 4, 5, 6, 7 axit amin và 20 axit amin hoặc dưới 20, 18, 16, 11 axit amin chứa SEQ ID No:117 hoặc nằm trong trình tự SEQ ID No:117;

epitop này có thể chứa các axit amin bổ sung, với điều kiện là các axit amin bổ sung này không được lấy từ trình tự của CD127 (tức là với điều kiện là epitop không chứa trên 3, 4 hoặc 5 axit amin liên tiếp từ trình tự của CD127 ngoài trình tự từ vị trí 2b và có thể là các trình tự tùy ý từ miền D1 và từ các axit amin 180-220 của SEQ ID No:114 nêu trên);

(f) epitop, ngoài dấu hiệu nêu trong mục (a), (b), (c) hoặc (d) trên đây, không chứa nhiều hơn 3, 4 hoặc 5 axit amin liên tiếp lấy từ vùng 99-108 của SEQ ID No:114,

không chứa nhiều hơn 3, 4 hoặc 5 axit amin liên tiếp lấy từ vùng 128-179 của SEQ ID No:114 và/hoặc không chứa nhiều hơn 3, 4 hoặc 5 axit amin liên tiếp từ vùng 220-239 của SEQ ID No:114, cụ thể là không chứa nhiều hơn 3, 4 hoặc 5 axit amin liên tiếp từ vùng 99-108, 128-179 và 220-239 của SEQ ID No:114;

(g) epitop gồm tổ hợp của các trình tự của CD127 như được quy định trong mục (a), (b), (c), (d), (e) và/hoặc (f) nêu trên, trong đó một số axit amin đã được đột biến, cụ thể là được xóa bỏ và/hoặc thay thế, cụ thể là được thay thế bằng axit amin có các tính chất tương tự (các thay thế bảo tồn); cụ thể là, epitop gồm hoặc chứa các trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, 85%, 90%, hoặc 95% với các trình tự của CD127 như được quy định trong mục (a), (b), (c), (d), (e) và/hoặc (f) nêu trên, dưới dạng tổ hợp như được quy định trong mục (b), (c) hoặc (d) nếu liên quan;

(h) epitop là epitop cấu dạng có các dấu hiệu được quy định trong mục (a), (b), (c), (d), (e), (f) và/hoặc (g) nêu trên, tức là gồm hoặc chứa các trình tự như được quy định trong mục (a), (b), (c), (d), (e), (f) và/hoặc (g) nêu trên dưới cấu dạng mà bất chước cấu dạng của các trình tự đã nêu trong CD127 tự nhiên (dưới dạng monome hoặc dưới dạng dime với yc và/hoặc kết hợp với IL-7);

(i) epitop gồm mảnh của CD127 (tức là sự kéo dài các axit amin liên tiếp) với các dấu hiệu nêu trong mục (a), (b), (c), (d), (g) và/hoặc (h) trên đây;

(j) epitop có các dấu hiệu được quy định trong mục (g) trên đây và thu được bằng công nghệ như công nghệ CLIPS mà cho phép tổng hợp các tổ hợp peptit với cấu trúc có thể dự báo.

Theo các phương án cụ thể về các epitop với các dấu hiệu nêu trong mục (b) và (c), epitop gồm trình tự axit amin của CD127 mà được xen giữa hai trình tự ep1 và ep2, và tùy ý không kéo dài để chứa bất kỳ, hoặc không kéo dài để chứa nhiều hơn một axit amin của trình tự của CD127 người trình tự ngược chiều (tức là đầu N của trình tự của ep1) và/hoặc xuôi chiều (tức là đầu C của trình tự của ep2) trong số các trình tự này. Theo các phương án cụ thể khác, epitop là epitop sao cho không trình tự nào trong số các trình tự ep1 hoặc ep2 được kéo dài để chứa axit amin bất kỳ trong số các axit amin liền kề của chúng trong trình tự CD127 người, hoặc để chứa nhiều hơn 7, 5 hoặc 1 axit amin liên tiếp từ các axit amin liền kề trong trình tự của CD127 người mà được xen giữa ep1 và ep2; sự kéo dài của các trình tự ep1 và ep2 có thể, trong trường hợp này,

còn bị giới hạn ngược chiều (của ep1) hoặc xuôi chiều (của ep2) như trên. Theo các phương án cụ thể, các trình tự của CD127 mà gồm các trình tự epitop nêu trên không được kéo dài để chứa các axit amin liền kề của chúng từ trình tự CD127 người trên 1 axit amin đầu N hoặc trên 7 axit amin đầu C liền kề với ep1, hoặc trên 30 axit amin đầu N hoặc 30 axit amin đầu C liền kề với ep2.

Theo các phương án trong đó đại phân tử được sản xuất, thiết kế hoặc chọn lọc để nhận biết epitop chứa một số trình tự axit amin không liền kề của CD127 (tức là các trình tự mà không liền kề trong trình tự chủ yếu của CD127), có thể sản xuất hoặc chọn lọc các kháng thể mà nhận biết epitop gồm một trong số các trình tự CD127 đã nêu, và sau đó chọn lọc trong số các kháng thể này các kháng thể mà nhận biết (các) trình tự CD127 khác (sự chọn lọc này có thể còn được thực hiện bằng các bước chọn lọc liên tiếp nếu trên hai trình tự CD127 không liền kề là cần được nhận biết).

Sáng chế còn gồm epitop cấu dạng được nhận biết bởi các kháng thể đối kháng của sáng chế. Sáng chế còn bao gồm các kháng thể mà liên kết epitop cấu dạng này. Các phương án này bao gồm epitop cấu dạng CD127 gồm (i) miền có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90%, hoặc 95% với SEQ ID NO. 115 và/hoặc miền có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90%, hoặc 95% với SEQ ID NO. 117 và (ii) miền có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90%, hoặc 95% với SEQ ID NO. 116. Đặc biệt hơn là, epitop cấu dạng CD127 gồm các gốc axit amin 73-79 và/hoặc 114-119 và các gốc axit amin 193-196 của SEQ ID No:114. Sáng chế bao gồm các kháng thể mà liên kết epitop cấu dạng này. Theo các phương án cụ thể, đại phân tử được sản xuất, thiết kế, hoặc chọn lọc để nhận biết epitop cấu dạng gồm các trình tự axit amin của CD127 người có các trình tự SEQ ID No: 115, SEQ ID No: 116 và SEQ ID No: 117.

Cụ thể là, theo các phương án nêu trên, kháng thể được nêu kháng lại chất sinh miễn dịch mà gồm hoặc chứa epitop như được mô tả, tức là ban đầu được sản xuất bằng cách gây miễn dịch trên động vật mà không phải là người, cụ thể là động vật có vú, bằng kháng nguyên chứa hoặc gồm epitop đã nêu. Do đó, sáng chế còn đề cập đến kháng nguyên mà epitop của nó là như được mô tả trên đây, cụ thể là đề cập đến việc sử dụng nó làm chất sinh miễn dịch trong việc sản xuất các kháng thể và/hoặc đề cập đến việc sử dụng nó trong việc chọn lọc và/hoặc trong các phương pháp kiểm tra để sản xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc đại phân tử khác. Sáng chế

còn đề cập đến các phương pháp đã nêu sử dụng kháng nguyên đã nêu. Vì các kháng nguyên có thể gồm các thành phần không phải peptit ngoài các thành phần peptit và/hoặc có thể gồm các thành phần peptit mà không tạo thành một phần của epitop, nên cần hiểu ở đây rằng, trừ khi có quy định khác hoặc rõ ràng từ văn cảnh cụ thể, khi đề cập đến trình tự của của kháng nguyên và/hoặc đến các dấu hiệu của trình tự này thì trình tự hoặc các dấu hiệu này nên được hiểu là biểu thị trình tự (hoặc các dấu hiệu của nó) của phần epitop của kháng nguyên. Nếu kháng nguyên gồm các axit amin mà không tạo thành một phần của epitop, thì các axit amin này tốt hơn là không gồm trên 3, 4 hoặc 5 axit amin liên tiếp của CD127.

Do đó và trừ khi thể hiện là không liên quan về mặt kỹ thuật, các quy định và các dấu hiệu được bộc lộ ở đây liên quan đến các kháng thể hoặc các mảnh của chúng sẽ áp dụng một cách tương tự cho đại phân tử bất kỳ của sáng chế.

Liên kết của CD127

Theo sáng chế, “liên kết” với protein IL-7R chỉ sự tương tác kiểu kháng nguyên-kháng thể và bao gồm các tính chất “liên kết đặc hiệu” của các kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng trong đó liên kết đặc hiệu có nghĩa là các kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên liên kết với protein IL-7R trong khi chúng không liên kết hoặc liên kết với ái lực yếu hơn một cách đáng kể với các protein khác (ví dụ, chuỗi γ của thụ thể xytokin thường). Tốt hơn là liên kết đặc hiệu được quy định và/hoặc được xác định trong các điều kiện sinh lý, đặc biệt là về độ pH và hàm lượng muối của dung dịch thử nghiệm. Liên kết và độ đặc hiệu liên kết có thể được thử nghiệm theo các phương pháp thử nghiệm được bộc lộ trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế và cụ thể là có thể được thử nghiệm bằng phương pháp phân tích Biacore, ELISA, hoặc thẩm tách Western.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, các kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó hướng đích và liên kết chuỗi IL-7-R alpha khi nó được tạo phức hợp trong thụ thể TSLP với CCRF2; số truy cập Genbank: AF338733; Reche et al., 2001).

Theo phương án cụ thể, các kháng thể hoặc các mảnh của chúng hoặc các phân tử khảm của sáng chế liên kết với CD127 dưới dạng protein riêng biệt với hằng số phân

ly (Kd) nhỏ hơn $5E-10$ M. Theo phương án được ưu tiên, hằng số phân ly (Kd) nhỏ hơn $1E-10$ M hoặc nhỏ hơn $9E-11$ M, hoặc nhỏ hơn $5E-11$ M.

Theo các phương án cụ thể, các kháng thể hoặc các mảnh của chúng hoặc phân tử khảm hoặc đại phân tử khác của sáng chế liên kết với kháng nguyên của CD127 người gồm các trình tự của ep1 (SEQ ID No: 110) và/hoặc ep2 (SEQ ID No: 111). Theo các phương án cụ thể, kháng nguyên gồm mảnh của CD127 người gồm cả ep1 và ep2 (tức là kháng nguyên gồm các trình tự của ep1 và ep2 và các trình tự xen giữa của CD127 người). Theo các phương án khác, kháng nguyên chỉ gồm các trình tự ep1 và ep2 từ CD127 người, có thể ngoài các trình tự khác từ nguồn gốc khác, mà khác biệt với các trình tự CD127 người. Theo các phương án khác nữa, các trình tự ep1 và/hoặc ep2 được mở rộng để chứa một vài axit amin bổ sung từ CD127 người, cụ thể là tối đa một axit amin đầu N đối với ep1, tối đa 7 axit amin đầu C đối với ep1, tối đa 1, 10, 20 hoặc 30 axit amin đầu N đối với ep2, tối đa 7; 10, 20 hoặc 30 axit amin đầu C đối với ep2. Các kháng nguyên cụ thể gồm: kháng nguyên như trên, tốt hơn là chứa cả ep1 và ep2, trong đó trình tự của CD127 chứa ep1 không kéo dài để chứa các axit amin liền kề với trình tự đã nêu trong trình tự của CD127 người, hoặc không kéo dài để chứa trên 1 axit amin đầu N hoặc trên 7 axit amin đầu C của ep1 trong trình tự của CD127 người; và kháng nguyên như trên trong đó trình tự của CD127 chứa ep2 không kéo dài để chứa các axit amin liền kề với trình tự nêu trên trong trình tự của CD127 người, hoặc không kéo dài để chứa trên 30 axit amin đầu N hoặc trên 30 axit amin đầu C của ep2 trong trình tự của CD127 người; và các kháng nguyên có cả hai dấu hiệu này. Theo các phương án cụ thể, các kháng thể hoặc các mảnh của chúng hoặc phân tử khảm hoặc đại phân tử khác của sáng chế liên kết với kháng nguyên của CD127 người gồm các trình tự của SEQ ID No: 115, SEQ ID No: 116 và SEQ ID No: 117.

Theo một số phương án, kháng nguyên không chồng chập với hoặc không chứa epitop của IL-7R mà được nhận biết bởi kháng thể đơn dòng được chọn từ nhóm gồm C1GM, C2M3, P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a và HAL403b (được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 2011/04687 A1). Theo một số phương án, kháng thể được nêu kháng lại kháng nguyên hoặc liên kết với epitop mà không chứa bất kỳ, hoặc không chứa một số trong số các gốc I82, K84, K100, T105, và Y192 của thụ thể interleukin-7 alpha, cụ thể là không chứa K100 và/hoặc không chứa T105. Theo một số phương án, kháng nguyên hoặc epitop không chứa K194, hoặc không chứa bất kỳ hoặc không

chứa tất cả các gốc được chọn từ nhóm gồm các gốc D190, H191, và K194 của IL-7R người. Theo các phương án cụ thể, kháng nguyên hoặc epitop không chứa I82 hoặc K84, hoặc không chứa K100 hoặc T105, hoặc không chứa Y192, hoặc không chứa D190, H191, Y192 hoặc K194.

Mặc dù CD127 là thông thường đối với cả IL-7R và TSLPR, nhưng phải lưu ý rằng kháng thể kháng CD127 sẽ không nhất thiết nhận biết (tức là liên kết trong các điều kiện thích hợp) CD127 trong cả hai trường hợp này. Hơn nữa, thậm chí nếu kháng thể liên kết với CD127 cả trong trường hợp của IL-7R và trong trường hợp của TSLPR, thì nó cũng sẽ không nhất thiết phải có tác dụng như nhau đối với tương tác IL-7-IL-7R và tương tác TSLP-TSLPR. Ví dụ, nó có thể ngăn chặn sự liên kết của IL-7 với IL-7R và không ngăn chặn liên kết của TSLP với TSLPR. Hơn nữa, liên kết của kháng thể với thụ thể có thể có các tác dụng khác nhau, dựa trên các tác dụng khác nhau đối với tương tác phối tử-thụ thể. Thực vậy, liên kết của kháng thể có thể cải biến cấu dạng của thụ thể, độc lập với phối tử hoặc kết hợp với phối tử, và do đó hoạt hóa hoặc làm vô hoạt thụ thể. Tác dụng này có thể khác nhau đối với mỗi thụ thể và thực tế nó có thể được đảo ngược: kháng thể mà làm vô hoạt IL-7R có thể hoạt hóa TSLPR, và ngược lại.

Như được sử dụng ở đây, việc hoạt hóa thụ thể có nghĩa là kích hoạt ít nhất một số trong số các thay đổi sinh hóa mà diễn ra khi liên kết phối tử với thụ thể của nó. Các thay đổi này có thể bao gồm sự cải biến cấu trúc thụ thể (ví dụ dime hóa); phosphoryl hóa thụ thể và tuyển thêm và/hoặc phosphoryl hóa các protein liên kết thụ thể (như các Janus kinaza, các yếu tố phiên mã STAT v.v.) và/hoặc các thay đổi đối với sự định vị tế bào của thụ thể (ví dụ sự nội nhập thụ thể). Như được sử dụng ở đây, việc khử hoạt hóa thụ thể có nghĩa là ngăn chặn, hoặc phục hồi, ít nhất một số trong số các cải biến sinh hóa kết hợp với sự liên kết của phối tử của nó với thụ thể. Ví dụ, thụ thể có thể được hoạt hóa về mặt cấu tạo (tức là được hoạt hóa ngay cả trong trường hợp vắng mặt phối tử) và được khử hoạt hóa với sự có mặt của kháng thể như kháng thể của sáng chế. Cách khác, hoặc ngoài ra, sự hoạt hóa được cảm ứng bởi phối tử có thể hoàn toàn, hoặc một phần, được ức chế bằng sự khử hoạt hóa thụ thể. Do đó, sự khử hoạt hóa có thể diễn ra, trong số các cơ chế khác, qua việc ngăn chặn sự liên kết của phối tử (và các sự kiện "hoạt hóa" tiếp theo), và/hoặc ngăn chặn sự thay đổi cấu trúc kết hợp với sự liên kết của phối tử (ví dụ dime hóa) và/hoặc cải biến vị trí trên tế bào của thụ thể (ví

dự tác nhân khử hoạt hóa có thể kích hoạt sự nội nhập và/hoặc sự thoái hóa thụ thể và do đó ngăn chặn sự hoạt hóa bởi thụ thể).

Vẫn mặt sự trưởng thành tế bào đuôi gai cảm ứng bởi TSLP được gia tăng

Các kháng thể của sáng chế có thể liên kết CD127 trong thụ thể TSLP (tức là có thể liên kết CD127 khi nó nằm trong phức hợp với CRLF2, tạo thành thụ thể TSLP). Do đó, các kháng thể của sáng chế có thể can thiệp vào việc truyền tín hiệu được cảm ứng bởi TSLP và/hoặc qua trung gian thụ thể TSLP.

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện ra rằng tồn tại các kháng thể được định hướng kháng (hoặc nhận biết) CD127 trong thụ thể TSLP và các kháng thể này thể hiện sự đối kháng nhất định đối với tương tác TSLP-TSLPR tuy nhiên lại làm tăng sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai cảm ứng bởi TSLP: sự trưởng thành này là cao hơn ở các tế bào được xử lý bằng TSLP và các kháng thể so với các tế bào được xử lý chỉ bằng TSLP. Các kháng thể thông thường này làm tăng sự trưởng thành tế bào đuôi gai phụ thuộc TSLP. Theo các phương án được ưu tiên, các kháng thể hoặc các mảnh của sáng chế không tác dụng hiệp đồng với TSLP đối với sự trưởng thành của các tế bào miễn dịch, cụ thể là các tế bào đuôi gai. Nói cách khác, các kháng thể của sáng chế không làm gia tăng sự trưởng thành của các tế bào miễn dịch cảm ứng bởi TSLP. Tác dụng này là đặc biệt mong muốn đối với sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai.

Cần nhấn mạnh rằng khả năng khả năng của các kháng thể kháng CD127 trong việc ức chế sự sản sinh TARC được cảm ứng bởi TSLP không thể được xem như là yếu tố dự báo chắc chắn tác dụng tiêu cực (hoặc ít nhất là không tích cực) của các kháng thể đối với sự truyền tín hiệu được cảm ứng bởi TSLP và hệ quả xuôi chiều của nó (cụ thể là sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai). Thực vậy, như các tác giả sáng chế đã phát hiện, ngay cả các kháng thể mà ức chế một cách hữu hiệu sự sản sinh TARC cảm ứng bởi TSLP vẫn có thể làm gia tăng sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai phụ thuộc TSLP như được đo bằng sự biểu hiện của CD40 hoặc CD80 với TSLPR.

Sự trưởng thành tế bào đuôi gai cảm ứng bởi TSLP có thể được đo bằng sự biểu hiện của dấu chuẩn tế bào CD40 và/hoặc CD80 (Inaba et al., 1995; Watanabe et al., 2005b) dưới dạng dấu chuẩn mà là yếu tố quyết định của sự trưởng thành của một số tế bào miễn dịch, đặc biệt là cái gọi là sự biệt hóa TH-2 quan sát được ở một số bệnh

tự miễn, bệnh hen và ghép tạng. Theo các phương án đặc biệt, sự gia tăng sự trưởng thành tế bào đuôi gai cảm ứng bởi TSLP được đánh giá bằng cách xác định sự biểu hiện gia tăng của (các) dấu chuẩn bề mặt tế bào CD40 và/hoặc CD80 trên các tế bào dương tính với TSLPR được xử lý bằng TSLP và bằng đại phân tử của sáng chế so với các tế bào dương tính với TSLPR chỉ được xử lý bằng TSLP.

Theo phương án cụ thể, các đại phân tử, cụ thể là các kháng thể hoặc mảnh của nó, mà không làm gia tăng sự trưởng thành tế bào đuôi gai cảm ứng bởi TSLP sẽ không làm gia tăng sự biểu hiện của CD80 khoảng trên 25% khi so với sự kích thích chỉ bằng TSLP (không có đại phân tử). Tốt hơn là, sự biểu hiện của CD80 không được gia tăng trên 20%, tốt hơn là không trên 10% và thậm chí tốt hơn nữa là không trên 5%. Theo phương án được ưu tiên cụ thể, sự biểu hiện của CD80 không được gia tăng hoặc được giảm trên các tế bào được kích thích bằng TSLP và bằng đại phân tử khi so với các tế bào chỉ được kích thích bằng TSLP.

Theo phương án cụ thể, các đại phân tử mà không làm gia tăng sự trưởng thành tế bào đuôi gai cảm ứng bởi TSLP sẽ không làm gia tăng sự biểu hiện của CD40 khoảng trên 50% khi so với sự kích thích chỉ bằng TSLP (không có đại phân tử). Tốt hơn là, sự biểu hiện của CD40 không được gia tăng trên 25%, tốt hơn là không trên 10% và thậm chí tốt hơn nữa là không trên 5%. Theo phương án được ưu tiên cụ thể, sự biểu hiện của CD40 không được gia tăng hoặc được giảm trên các tế bào được kích thích bằng TSLP và bằng đại phân tử khi so với các tế bào chỉ được kích thích bằng TSLP.

Việc đo sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai cũng được minh họa trong các ví dụ (xem cụ thể là 0) và có thể được thực hiện theo phương pháp chuẩn bất kỳ đã biết từ người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, cụ thể là phương pháp bất kỳ thích hợp để xác định sự biểu hiện CD80 và/hoặc CD40 trên các tế bào đuôi gai, dưới dạng dấu chuẩn của sự trưởng thành tế bào đuôi gai.

Để thử nghiệm các tính chất của các kháng thể kháng CD127 về sự vắng mặt của sự tăng tiềm lực không mong muốn của việc truyền tín hiệu TSLP, các tế bào biểu hiện TSLPR, như các tế bào pro B của động vật có vú (như các tế bào BA/F3 được minh họa ở đây), có thể được sử dụng.

Ức chế sự biểu hiện được cảm ứng bởi IL7 của các integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và $\alpha 4/\beta 7$

Theo các phương án cụ thể, các kháng thể (hoặc các đại phân tử) của sáng chế ức chế sự biểu hiện được cảm ứng bởi IL7 của các integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và $\alpha 4/\beta 7$ *in vitro*. Sự biểu hiện được cảm ứng bởi IL7 của các integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và $\alpha 4/\beta 7$, như được sử dụng ở đây, thể hiện một trong hai hoặc cả hai yếu tố là sự gia tăng về mức biểu hiện của các integrin $\alpha 4$ và $\beta 7$ và sự gia tăng về số lượng hoặc tỷ lệ của các lympho bào T biểu hiện các integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và/hoặc $\alpha 4/\beta 7$. Sự ức chế có thể là ức chế một phần, tức là mức biểu hiện của các integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và $\alpha 4/\beta 7$ với sự có mặt của IL7 được tăng lên trên mức cơ sở (tức là mức mà không có kháng thể và cũng không có IL7) với sự có mặt của các kháng thể, nhưng nhỏ hơn khi vắng mặt các kháng thể; hoặc sự ức chế có thể là ức chế hoàn toàn, tức là mức biểu hiện của các integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và $\alpha 4/\beta 7$ với sự có mặt của IL7 và của kháng thể là không cao hơn mức cơ sở.

Theo các phương án cụ thể, các kháng thể của sáng chế ức chế sự biểu hiện của các integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và/hoặc $\alpha 4/\beta 7$ *in vitro*, tức là mức biểu hiện của các integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và/hoặc $\alpha 4/\beta 7$ là thấp hơn trên các tế bào được xử lý bằng các kháng thể (và cùng và/hoặc không cùng với IL7) so với các tế bào không được xử lý (tức là không được xử lý bằng kháng thể hoặc IL7). Mức độ ức chế có thể phụ thuộc vào liều. Khả năng ức chế sự biểu hiện có thể được đo như được nêu trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, trong đó người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể sửa lại cách đo này, ví dụ, cho phù hợp với các kháng thể cụ thể, các mảnh kháng thể hoặc các miền liên kết kháng nguyên hoặc các đại phân tử khác được bộc lộ ở đây và/hoặc cho hợp với các mô hình bệnh cụ thể nếu cần.

Theo các phương án được ưu tiên, các kháng thể (hoặc các đại phân tử) của sáng chế ức chế sự biểu hiện của các integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và $\alpha 4/\beta 7$ *in vivo*. Như được sử dụng ở đây, biểu hiện này có nghĩa là (i) sự biểu hiện của các integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và/hoặc $\alpha 4/\beta 7$, (ii) số lượng và/hoặc tỷ lệ của các lympho bào T dương tính với $\alpha 4$, $\beta 7$ và/hoặc $\alpha 4/\beta 7$ và/hoặc (iii) thể cấy ghép của các lympho bào T dương tính với $\alpha 4$, $\beta 7$ và/hoặc $\alpha 4/\beta 7$ được giảm đi trên các mẫu thu được từ động vật được xử lý bằng các kháng thể so với động vật không được xử lý. Như được sử dụng ở đây, thể cấy ghép biểu thị sự kết hợp mô được ghép hoặc tế bào vào cơ thể vật chủ, quy trình mà thường diễn ra trong một khoảng thời gian từ vài giờ đến vài ngày. Theo các phương án cụ thể, động vật là động vật có vú, cụ thể là động vật có vú không phải người, đặc biệt là chuột nhắt. Theo các

phương án cụ thể, động vật là người. Theo các phương án cụ thể, tác dụng này được quan sát trên các lympho bào của người được tiêm vào động vật nhận, tốt hơn là chuột nhắt suy giảm miễn dịch. Theo các phương án cụ thể, hai tuần sau khi tiêm PBMC người vào chuột nhắt suy giảm miễn dịch, mức phần trăm trung bình của các tế bào T dương tính với integrin $\beta 7$ được giảm xuống khoảng ít nhất là 25%, tốt hơn là khoảng ít nhất là 50%, trên các con chuột nhắt được xử lý bằng kháng thể so với các con chuột nhắt không được xử lý. Theo các phương án cụ thể, hai tuần sau khi tiêm PBMC người vào chuột nhắt suy giảm miễn dịch, mức phần trăm trung bình của các tế bào T được cấy ghép dương tính với integrin $\beta 7$ được giảm xuống khoảng ít nhất là 25%, tốt hơn là khoảng ít nhất là 50%, và thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất là 70% trên các con chuột nhắt được xử lý bằng kháng thể so với các con chuột nhắt không được xử lý. Tác dụng của kháng thể hoặc đại phân tử của sáng chế có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được nêu trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, cụ thể là 0 đối với sự biểu hiện của các integrin $\alpha 4/\beta 7$ và thể cấy ghép, trong đó người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể sửa lại nếu cần, ví dụ, cho phù hợp với kháng thể cụ thể, mảnh hoặc miền liên kết kháng nguyên của nó hoặc đại phân tử khác và/hoặc cho phù hợp với mô hình bệnh cụ thể.

Các chất ức chế sự nội nhập CD127

Sự nội nhập là quy trình tế bào mà thông qua đó thụ thể bề mặt tế bào như CD127 được vận chuyển vào trong không gian tế bào chất (có thể ở trong/tại bề mặt của các khoang nội bào hoặc các màng) và do đó không còn có thể truy cập được từ không gian ngoại bào, tức là thụ thể được nội nhập có thể không tiếp xúc trực tiếp được bằng phối tử trong không gian ngoại bào. Phối tử, dù là phối tử tự nhiên của thụ thể hay phối tử nhân tạo hay phân tử khác liên kết với thụ thể, có thể được nội nhập cùng với thụ thể. Hầu hết các thụ thể đều trải qua sự nội nhập hằng định và sự biểu hiện bề mặt tế bào của chúng được duy trì không đổi hoặc thông qua sự thay thế của các thụ thể được nội nhập và bị thoái hóa bằng các thụ thể được tổng hợp/trưởng thành mới, hoặc thông qua sự phục hồi trực tiếp, tức là sự vận chuyển thụ thể được nội nhập ngược trở lại bề mặt tế bào.

Một số tác nhân kích thích có thể dẫn đến tốc độ nội nhập tăng và/hoặc tốc độ thay thế/phục hồi giảm, do đó dẫn đến sự thực giảm sự biểu hiện trên bề mặt tế bào của thụ thể. Như được sử dụng ở đây, sự nội nhập được cảm ứng bởi IL7 của CD127 có

nghĩa là sự giảm sự biểu hiện trên bề mặt tế bào của CD127 cảm ứng bởi sự có mặt của IL7 (hoặc quan sát được với sự có mặt của IL-7) trong môi trường ngoại bào, như được quan sát *in vitro* sau thời gian ủ hạn chế để loại trừ các tác động trong thời gian dài hơn như sự điều hòa xuôi chiều phiên mã. Thời gian hạn chế này thường theo thứ tự hàng chục phút, tốt hơn là dưới 2 giờ, tốt hơn nữa là dưới 1 giờ và thậm chí tốt hơn nữa là 45 phút hoặc ít hơn, 30 phút hoặc ít hơn hoặc 15 phút hoặc ít hơn.

Theo phương án được ưu tiên, kháng thể của sáng chế ức chế sự nội nhập được cảm ứng bởi IL7 của CD127. Do đó, khi ủ với kháng thể của sáng chế, sự có mặt của IL7 gây cảm ứng không giảm sự biểu hiện trên bề mặt tế bào của CD127, hoặc gây cảm ứng giảm sự biểu hiện trên bề mặt tế bào của CD127 ít mạnh hơn so với các tế bào được ủ không có các kháng thể. Theo các phương án cụ thể, khi được ủ với các kháng thể của sáng chế, mức biểu hiện trên bề mặt tế bào của CD127 khi các tế bào được ủ ở 37°C trong 15 phút với 5ng/mL IL7 là ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 90% mức biểu hiện trên bề mặt tế bào ở các tế bào được ủ không có IL7. *In vitro*, sự biểu hiện trên bề mặt tế bào tốt hơn là được đo sau thời gian hạn chế như đã chỉ ra trên đây. Bên cạnh đó, vì hầu hết các quy trình nội nhập tế bào bị hạn chế ở nhiệt độ thấp nên tác dụng thường được quan sát tốt nhất ở nhiệt độ sinh lý, cụ thể là 37°C. Tuy nhiên, cũng dự tính là ủ các tế bào ở nhiệt độ thấp, cụ thể là 4°C.

Đã biết rằng các kháng thể đối với thụ thể có thể gây cảm ứng sự nội nhập của thụ thể, điều này có nghĩa là sự biểu hiện trên bề mặt tế bào của thụ thể được giảm đi khi có mặt kháng thể. Cụ thể là điều này có thể nảy sinh bằng cách gây cảm ứng sự thay đổi về cấu dạng của thụ thể mà bất chước sao cho được cảm ứng bởi phối tử gây cảm ứng nội nhập, tự nhiên, và tác dụng này có thể tùy thuộc vào epitop được nhận biết bởi các kháng thể. Như được sử dụng ở đây, “kháng thể gây cảm ứng sự nội nhập của CD127” có nghĩa là các tế bào được ủ với sự có mặt của kháng thể thể hiện sự biểu hiện trên bề mặt tế bào của CD127 giảm so với các tế bào được ủ với sự vắng mặt của kháng thể. Sự biểu hiện trên bề mặt tế bào tốt hơn là được đo *in vitro* sau thời gian ủ hạn chế và trong các điều kiện nhiệt độ như nêu trên đây. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể của sáng chế không gây cảm ứng sự nội nhập của CD127. Do đó, sự biểu hiện trên bề mặt tế bào của CD127 ở các tế bào được ủ với sự có mặt của kháng thể không bị giảm, hoặc không bị giảm đáng kể, so với sự biểu hiện trên bề mặt tế bào ở các tế bào được ủ trong các điều kiện tương tự khác, nhưng không có kháng thể. Theo

các phương án cụ thể, khi được ủ ở 37°C trong thời gian 30 đến 45 phút với sự có mặt của 50ng/mL kháng thể, mức biểu hiện trên bề mặt tế bào của CD127 là ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 90% mức biểu hiện trên bề mặt tế bào của CD127 ở các tế bào được ủ với sự vắng mặt của kháng thể. Tác dụng này có thể được quan sát với sự vắng mặt của IL7 (ở cả các tế bào được xử lý và không được xử lý bằng kháng thể), với sự có mặt của IL7, và/hoặc cả hai.

Một trong hai dấu hiệu liên quan đến sự nội nhập CD127 nêu trên (tức là sự ức chế sự nội nhập được cảm ứng bởi IL7 hoặc sự không gây cảm ứng sự nội nhập) có thể góp phần làm tăng hiệu quả của các kháng thể, trong khi kết hợp cả hai dấu hiệu này có thể còn hiệu quả hơn nữa. Sáng chế bộc lộ kháng thể thể hiện phương án được ưu tiên, trong đó với sự có mặt của cả IL7 và kháng thể này, sự biểu hiện trên bề mặt tế bào của CD127 không bị giảm đi một cách đáng kể. Theo các phương án được ưu tiên này, sau quá trình ủ 45 phút với sự có mặt của 50ng/mL kháng thể, gồm 15 phút với sự có mặt của 5ng/mL IL7, ở 37°C, mức biểu hiện trên bề mặt tế bào của CD127 là ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 90% mức biểu hiện trên bề mặt tế bào của CD127 ở các tế bào đối chứng, được ủ trong môi trường không chứa kháng thể hoặc IL7.

Sự phá vỡ tương tác chuỗi CD127 - γ c

Theo phương án cụ thể, đại phân tử, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, của sáng chế có thể phá vỡ sự liên kết của CD127 với chuỗi γ c của IL7-R. Điều này có nghĩa là, trong các điều kiện (cụ thể là các điều kiện hóa học và vật lý) trong đó CD127 và chuỗi γ c được liên kết với nhau với sự vắng mặt của kháng thể, và cụ thể là với sự có mặt của IL-7, sự có mặt của kháng thể làm giảm đáng kể liên kết này. Theo các phương án cụ thể, với sự có mặt của kháng thể và của IL-7, CD127 không liên kết với γ c. Cụ thể là, với sự có mặt của kháng thể và của IL-7, lượng chuỗi γ c được phát hiện kết hợp với (hoặc liên kết với) CD127 là dưới 80%, tốt hơn là dưới 50%, thậm chí tốt hơn nữa là dưới 25% hoặc 10% của lượng được liên kết với sự vắng mặt của kháng thể (hoặc với sự có mặt của kháng thể kháng CD-127 khác như MD707-13) trong các điều kiện tương tự khác, cụ thể là với sự có mặt của IL-7. Dấu hiệu này của kháng thể có thể được đánh giá cụ thể bằng các phương pháp đồng kết tủa miễn dịch, đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ để kiểm tra sự tương tác của các protein và được minh họa ở đây trong 0. Cụ thể là, các tế bào có thể được ủ với sự có mặt hoặc vắng mặt của kháng thể được thử nghiệm, sau đó được hòa

tan trong các điều kiện cho phép bảo quản các phức hợp protein, và sản phẩm dung giải thu được có thể được đem kết tủa miễn dịch kháng CD127 và sự có mặt của γ c trong phức hợp được kết tủa miễn dịch chứa CD127 được đánh giá bằng phương pháp thẩm Western sử dụng các kháng thể kháng γ c (ngược lại, sự kết tủa miễn dịch có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kháng thể kháng γ c và sự có mặt của CD127 được đánh giá bằng cách sử dụng các kháng thể kháng CD127).

Một phương pháp để thu được các kháng thể này là làm cho các kháng thể đã nêu kháng lại epitop chứa các trình tự từ vị trí 2b của CD127, hoặc là chọn lọc các kháng thể mà nhận biết epitop này. Thực vậy, sự liên kết của kháng thể với vị trí này, là điều cốt yếu đối với tương tác với c, có thể làm phá vỡ, ví dụ bằng cách cạnh tranh hoặc cản trở về không gian, sự tương tác của γ c với CD127.

Cụ thể là, cũng có thể chọn lọc các kháng thể có dấu hiệu mong muốn này, từ các kháng thể kháng CD127, ví dụ từ thư viện kháng thể (bao gồm nếu thư viện này không thu được bằng cách sử dụng chất sinh miễn dịch chứa các trình tự của vị trí 2b), thông qua các thủ tục sàng lọc thông thường đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ và dễ dàng làm cho phù hợp với mục đích này. Cụ thể là, ví dụ, CD127 (hoặc một mảnh miễn ngoại bào của nó) có thể được liên kết với các đĩa 96 lỗ hoặc các chất nền tương tự thường được sử dụng nhằm mục đích sàng lọc này. Các kháng thể cấu thành thư viện có thể được bổ sung một cách riêng rẽ, mỗi kháng thể vào một lỗ, và chuỗi γ c được bổ sung vào mỗi lỗ. Sau khi rửa các đĩa, sự có mặt của γ c trong mỗi lỗ có thể được kiểm tra, ví dụ bằng các phương pháp dựa trên sự phát huỳnh quang. Trong các lỗ chứa kháng thể với dấu hiệu mong muốn, sẽ không phát hiện thấy γ c (hoặc lượng nhỏ của chúng). Rõ ràng là có thể cải biến thủ tục này, ví dụ chấm các kháng thể lên chất nền rắn thành các vết riêng rẽ; cho phép CD127 liên kết với các kháng thể được chấm, và cho phép chuỗi γ c liên kết với các chuỗi CD127 được cố định này.

Tính đối kháng đối với tương tác IL-7-IL-7R

Theo phương án cụ thể, đại phân tử, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, của sáng chế còn có các tính chất đối kháng đối với interleukin 7 (IL-7) nhờ đó gây đối kháng sự truy cập, tức là liên kết của IL-7 với CD127 trên các tế bào dương tính với CD127.

“Các tính chất đối kháng đối với tương tác IL-7-IL-7R” có nghĩa là các kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, mà hướng đích IL-7R α , có tác dụng ngăn chặn khả năng truy cập của thụ thể IL-7 được biểu hiện trên các tế bào CD127, đặc biệt là các tế bào T thực hiện của người, cụ thể là các tế bào T ghi nhớ của người, liên kết với đối tác IL-7 của nó, đặc biệt là IL-7 của người. Kết quả của sự gây đối kháng liên kết của IL-7 là, các kháng thể của sáng chế hoặc các mảnh chức năng của chúng dẫn đến chứng giảm lympho bào bằng cách ngăn chặn sự sản sinh các tế bào T tuyến ức phụ thuộc IL-7.

Các tính chất đối kháng có thể cụ thể là đối kháng đối với sự truyền tín hiệu IL-7R cảm ứng bởi IL-7. Chất đối kháng sự truyền tín hiệu IL-7R cảm ứng bởi IL-7 có thể được nhận diện bằng cách đo khả năng ức chế sự phosphoryl hóa STAT5 như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Sự phosphoryl hóa STAT5 cảm ứng bởi IL7 là dấu chuẩn của sự hoạt hóa IL7R và kháng thể mà đối kháng tương tác IL7-IL7R được cho là làm giảm sự phosphoryl hóa STAT5 cảm ứng bởi IL7.

Theo các phương án cụ thể, đại phân tử của sáng chế là chất đối kháng sự truyền tín hiệu IL-7R cảm ứng bởi IL-7. Theo phương án cụ thể, đại phân tử của sáng chế ức chế sự phosphoryl hóa STAT5 cảm ứng bởi IL7. Theo các phương án được ưu tiên, mức độ ức chế sự phosphoryl hóa STAT5 là lớn hơn 50% ở các nồng độ kháng thể thấp như 50ng/ml và/hoặc mức độ ức chế sự phosphoryl hóa STAT5 là lớn hơn 80% ở các nồng độ kháng thể thấp như 100ng/ml. Mức độ ức chế sự phosphoryl hóa STAT5 có thể được đánh giá bằng các phương pháp đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết đến và cụ thể là bằng phương pháp được nêu trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế (cụ thể là 0).

“Chất đối kháng sự liên kết của TSLP”

Vì các kháng thể của sáng chế liên kết CD127 trong IL-7R nên chúng có thể cũng liên kết CD127 trong TSLPR và, cụ thể là bằng cách gây cản trở về không gian và/hoặc bằng cách cạnh tranh trên các vị trí liên kết chung, chúng có thể ức chế sự liên kết của TSLP với TSLPR. Nói cách khác, các kháng thể của sáng chế có thể thể hiện hoạt tính đối kháng đối với sự liên kết của TSLP.

“Chất ức chế sự sản sinh TARC được cảm ứng bởi TSLP”

Theo một phương án cụ thể, các kháng thể của sáng chế có thể ức chế sự sản sinh TARC cảm ứng bởi TSLP của các tế bào dương tính với CD127. Như nêu trên, các tế bào đuôi gai được kích thích bởi TSLP sản sinh các mức TARC gia tăng. Điều này có thể là do sự liên kết của chúng với TSLPR và tác động tiềm năng của chúng như là các chất đối kháng của liên kết TSLP.

Theo phương án cụ thể, các kháng thể của sáng chế, và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng đã được chọn lọc theo khả năng của chúng để không làm gia tăng sự trưởng thành của chúng (sự trưởng thành được, ví dụ, xác định như là sự biểu hiện gia tăng của dấu chuẩn bề mặt tế bào CD40 và/hoặc CD80).

Mức sản sinh TARC được cảm ứng bởi TSLP có thể thấp hơn ở các tế bào được xử lý bằng TSLP cùng với các kháng thể kháng CD127 hoặc các mảnh của chúng hoặc phân tử khảm như được mô tả ở đây, so với các tế bào chỉ được xử lý bằng TSLP. Nói cách khác, các đại phân tử của sáng chế có thể là các chất ức chế sự sản sinh TARC được cảm ứng bởi TSLP. Theo một phương án của sáng chế, kháng thể hoặc mảnh của nó hoặc phân tử khảm như được mô tả ở đây làm giảm các mức sản sinh TARC. Theo phương án cụ thể của sáng chế, mức sản sinh TARC ở các tế bào được xử lý bằng TSLP và kháng thể, mảnh hoặc phân tử khảm được giảm xuống khoảng trên 10%, tốt hơn là trên 20%, so với mức sản sinh ở các tế bào chỉ được xử lý bằng TSLP, ở các nồng độ kháng thể thấp như 1 µg/ml. Việc đo mức sản sinh TARC được minh họa trong các ví dụ (cụ thể là 0) và có thể được thực hiện trên các tế bào miễn dịch dương tính với CD127, cụ thể là các tế bào đuôi gai, từ mẫu máu sử dụng phương pháp chuẩn bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết.

“Hoạt tính gây độc tế bào”

Theo phương án cụ thể của sáng chế, các kháng thể của sáng chế hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, được định hướng kháng phân tử CD127 có trong thụ thể IL-7, còn có tính chất gây độc tế bào đối với các tế bào của người, đặc biệt là các tế bào T của người mà biểu hiện thụ thể đã nêu. Các tế bào người mà biểu hiện CD127 dưới dạng chuỗi của thụ thể IL-7, mà là đích của các kháng thể của sáng chế và các mảnh của chúng, chủ yếu là các lympho bào T và chính xác hơn là các quần thể phụ của các lympho bào T thực hiện gồm các tế bào T chuyên cần và các tế bào T ghi nhớ

nhưng không phải là các tế bào T điều hòa (regulatory T cells: Treg), đặc biệt là không Treg tĩnh tự nhiên. Các tế bào T ghi nhớ được sinh ra như là kết quả của việc môi kháng nguyên và chủ yếu được quy định bằng các đặc tính chức năng của chúng, gồm khả năng trải qua sự tăng sinh gọi lại khi tái hoạt hóa và biệt hóa thành các tế bào thực hiện và các tế bào ghi nhớ thứ cấp. Tương tự, thụ thể TSLP hướng đích (dưới dạng phức hợp gồm chuỗi IL-7-R alpha) điều hòa sự biệt hóa lympho bào T hỗ trợ, tế bào B, và tế bào đuôi gai.

Theo một phương án của sáng chế, các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, có “hoạt tính gây độc tế bào đối với các tế bào T” hoặc các tính chất gây độc tế bào (các kháng thể gây độc tế bào) làm tăng khả năng làm nghèo quần thể tế bào T thực hiện bằng cách tiêu diệt các tế bào này và do đó làm giảm số lượng các tế bào này khi được dùng. Ngược lại, các kháng thể này không làm thay đổi quần thể phụ của các tế bào T điều hòa hoặc không làm thay đổi nó đến mức độ đáng kể, cho phép các tế bào Treg thực hiện chức năng của chúng. Trong trường hợp này, theo một phương án cụ thể, tỷ lệ giữa tế bào T điều hòa (Treg) và tế bào T thực hiện (effector T: Teff) đã được quan sát thấy rằng tăng lên sau khi dùng các kháng thể của sáng chế. Theo phương án cụ thể, các kháng thể của sáng chế cho phép tăng tỷ lệ này lên khoảng 10% hoặc nhiều hơn thế. Theo phương án cụ thể, sự tăng tỷ lệ giữa Treg và Teff là khoảng 20%.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, các kháng thể gây độc tế bào thể hiện mức độ gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity: ADCC). Theo phương án khác, các kháng thể của sáng chế không có các tính chất ADCC. Khả năng ADCC của kháng thể được xem như là tích cực khi mức độ gây độc tế bào đặc hiệu là lớn hơn 10%. Tính chất ADCC có thể được đánh giá trong thử nghiệm ADCC như thử nghiệm được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế (cụ thể là 0). Nếu kháng thể là kháng thể chuột cống thì các tế bào thực hiện được sử dụng trong thử nghiệm ADCC là các tế bào LAK (tế bào tiêu diệt được hoạt hóa bởi lymphokin: Lymphokine-activated killer) của chuột cống. Nếu các kháng thể được làm giống như của người thì thử nghiệm ADCC có thể được thực hiện trên các tế bào NK người.

Các kháng thể của sáng chế mà có cả tính chất gây độc tế bào và tính chất đối kháng đối với các tế bào dương tính với CD127 sẽ cho phép tích tụ các tác dụng của các tính chất này đối với việc làm nghèo các tế bào T thực hiện, đặc biệt là các tế bào

T ghi nhớ, nhờ đó cho phép làm nghèo mạnh mẽ hơn (làm suy kiệt nhóm các tế bào CD127+) và làm giảm tương ứng số lượng các tế bào T đích.

Các đoạn nêu trên cũng như các ví dụ dưới đây mô tả cách kiểm tra các đặc tính chức năng này. Các phần dưới đây sẽ mô tả chi tiết các đặc tính cấu trúc khác nhau và các cải biến khả dĩ của các kháng thể hoặc các mảnh hoặc các phân tử khảm. Theo các hướng dẫn này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể thu được các kháng thể hoặc các mảnh có các đặc tính cấu trúc dưới đây cùng với các đặc tính chức năng mong muốn, cụ thể là bắt đầu từ kháng thể mà có các đặc tính chức năng mong muốn, như N13B2, vì trong một số trường hợp có thể dự đoán rằng việc làm theo một số trong số các dấu hiệu cấu trúc này sẽ không cải biến các dấu hiệu chức năng và/hoặc bằng cách kiểm tra sự mất các đặc tính chức năng sau khi đưa vào đặc tính cấu trúc mới. Hơn nữa, với sự bộc lộ ở đây về epitop được nhận biết bởi kháng thể, sự phát triển của các kháng thể khác có các dấu hiệu chức năng tương tự là quy trình thông thường, vì các kháng thể được nêu kháng lại epitop giống hoặc tương tự có thể được chọn theo khả năng của chúng trong việc tạo ra các tác dụng tương tự khi liên kết với CD127. Ngoài các quy trình kiểm tra trực tiếp được nêu ở đây, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể sử dụng các phương pháp kiểm tra này để chọn lọc các kháng thể thích hợp.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, đại phân tử là N13B2 hoặc kháng thể có ít nhất một trong số các CDR của N13B2, hoặc các mảnh là các mảnh của N13B2. Do đó, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc mảnh của nó trong đó VH chứa ít nhất một trong số các trình tự axit amin dưới đây, hoặc một trong số biến thể được làm giống như của người ưu tiên của chúng được mô tả dưới đây:

- VHCDR1 SEQ ID No:10;
- VHCDR2 SEQ ID No:12;
- VHCDR3 SEQ ID No:14;

và/hoặc trong đó VL chứa ít nhất một trong số các trình tự axit amin dưới đây, hoặc một trong số biến thể được làm giống như của người ưu tiên của chúng được mô tả dưới đây:

- VLCDR1 SEQ ID No:16;
- VLCDR2 SEQ ID No:18;

- VLCDR3 SEQ ID No:20.

Theo phương án cụ thể, đại phân tử này chứa ít nhất 2, 3, 4 hoặc 5 trong số các trình tự CDR của N13B2 tức là VHCDR1 SEQ ID No:10, VHCDR2 SEQ ID No:12, VHCDR3 SEQ ID No:14, VLCDR1 SEQ ID No:16, VLCDR2 SEQ ID No:18 và VLCDR3 SEQ ID No:20, số lượng bất kỳ trong số này có thể được thay thế bằng một trong số các biến thể được làm giống như của người ưu tiên của chúng được mô tả dưới đây. Theo phương án cụ thể, đại phân tử này chứa tất cả sáu trình tự CDR của N13B2, số lượng bất kỳ trong số này có thể được thay thế bằng một trong số các biến thể được làm giống như của người ưu tiên của chúng được mô tả dưới đây. Theo các phương án cụ thể, đại phân tử này chứa chuỗi VH có trình tự axit amin của SEQ ID No:22 và/hoặc chuỗi VL có trình tự axit amin của SEQ ID No:24. Theo các phương án cụ thể, đại phân tử này chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin của SEQ ID No:2 và/hoặc của SEQ ID No:6 và/hoặc chuỗi nhẹ có trình tự axit amin của SEQ ID No:4. Các phương án cụ thể khác đối với các chuỗi VH và VL là các biến thể được làm giống như của người được bộc lộ dưới đây. Theo phương án cụ thể, chuỗi ổn định có trình tự của chuỗi Fc IgG1 của chuột cống như nêu trên Fig.12 (Uniprot P20759) và/hoặc trình tự của SEQ ID No:34.

Các mảnh

“Mảnh liên kết kháng nguyên” của kháng thể của sáng chế là một phần của kháng thể này, tức là phân tử tương ứng với một phần của cấu trúc của kháng thể của sáng chế mà thể hiện khả năng liên kết kháng nguyên đối với chuỗi alpha của thụ thể IL-7 đối với IL-7 người, có thể dưới dạng tự nhiên của nó; mảnh này đặc biệt thể hiện tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên đối với kháng nguyên này là giống hoặc hầu như giống với tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên của kháng thể bốn chuỗi tương ứng. Thuận lợi là, các mảnh liên kết kháng nguyên này có ái lực liên kết tương tự như các kháng thể 4 chuỗi tương ứng. Tuy nhiên, mảnh liên kết kháng nguyên mà có ái lực liên kết kháng nguyên giảm so với các kháng thể 4 chuỗi tương ứng cũng được dự tính nằm trong sáng chế. Khả năng liên kết kháng nguyên có thể được xác định bằng cách đo ái lực của kháng thể và của mảnh được xem xét. Các mảnh liên kết kháng nguyên này cũng có thể được gọi là các mảnh chức năng của các kháng thể.

Các mảnh liên kết kháng nguyên của các kháng thể là các mảnh mà chứa các miền siêu biến được gọi là các CDR (vùng quyết định bổ cứu: Complementary Determining Region) hoặc (các) phần của chúng bao gồm vị trí nhận biết đối với kháng nguyên, tức là, IL-7Ra của IL-7 người, nhờ đó quy định tính đặc hiệu nhận biết kháng nguyên. Mỗi chuỗi nhẹ và nặng (tương ứng là VL và VH) của globulin miễn dịch bốn chuỗi có ba CDR, lần lượt được gọi là VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3 và VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3. Do đó, sáng chế đặc biệt đề cập đến các mảnh của các kháng thể của sáng chế, mà chứa hoặc gồm gồm tất cả hoặc phần chọn lọc các CDR trong số VL-CDR1 (SEQ ID No:16), VL-CDR2 (SEQ ID No:18), VL-CDR3 (SEQ ID No:20) và VH-CDR1 (SEQ ID No:10), VH-CDR2 (SEQ ID No:12) và VH-CDR3 (SEQ ID No:14), các biến thể được làm giống như của người của chúng được bộc lộ dưới đây, hoặc các phần chức năng của chúng, tức là các phần mà thể hiện tính đặc hiệu liên kết mong muốn tốt hơn là với ái lực cao đối với IL-7Ra của IL-7 người.

Các mảnh liên kết kháng nguyên cụ thể của sáng chế là các mảnh của chuỗi VH của kháng thể của sáng chế mà tổ hợp các miền CDR1, CDR2 và CDR3 của nó, cụ thể là các mảnh có trình tự axit amin được bộc lộ ở đây, gồm các biến thể được làm giống như của người được bộc lộ dưới đây. Các mảnh khác của sáng chế là các mảnh của chuỗi VL của kháng thể của sáng chế mà tổ hợp các miền CDR1, CDR2 và CDR3 của nó, cụ thể là các mảnh có trình tự axit amin được bộc lộ ở đây, gồm các biến thể được làm giống như của người được bộc lộ dưới đây. Các mảnh mà chứa hoặc gồm VH-CDR3 và/hoặc VL-CDR3, cụ thể là các mảnh có trình tự axit amin được bộc lộ ở đây, gồm các biến thể được làm giống như của người được bộc lộ dưới đây, hoặc các phần chức năng của chúng là đặc biệt được ưu tiên khi các vùng CDR3 thể hiện là yếu tố quyết định trong tính đặc hiệu nhận biết kháng nguyên.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể xác định vị trí của các vùng/miền khác nhau của các kháng thể bằng cách tham chiếu đến các quy định chuẩn trong lĩnh vực này đã nêu, bao gồm hệ thống đánh số tham chiếu (Martin, 2001) hoặc bằng cách tham chiếu đến hệ thống đánh số của Kabat (Kabat et al., 1992) hoặc bằng cách áp dụng thuật toán IMGT “collier de perle” (<http://www.imgt.org/IMGTindex/Colliers.html>, Lefranc et al., 1999). Về lĩnh vực này, để quy định các trình tự của sáng chế, lưu ý rằng việc định ranh giới của các vùng/các miền có thể thay đổi theo mỗi hệ thống tham chiếu. Do đó, các vùng/các miền như

được quy định trong sáng chế sẽ bao gồm các trình tự thể hiện các thay đổi về độ dài hoặc sự định vị của các trình tự liên quan trong trình tự có chiều dài đầy đủ của các miền biến đổi của các kháng thể, khoảng $\pm 10\%$.

Ngoài ra, các gốc khử miễn dịch có thể có mặt trong các miền CDR biến đổi của các kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng. Theo phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh của nó được khử miễn dịch.

Dựa vào cấu trúc của các globulin miễn dịch bốn chuỗi, các mảnh liên kết kháng nguyên có thể được quy định bằng cách so sánh với các trình tự của các kháng thể trong các cơ sở dữ liệu có sẵn và trong lĩnh vực kỹ thuật này (Martin, 2001), và đặc biệt là bằng cách so sánh vị trí của các miền chức năng trong các trình tự này, lưu ý là các vị trí của miền khung và miền ổn định là đã được quy định rõ ràng đối với các nhóm các kháng thể khác nhau, đặc biệt là đối với các IgG, cụ thể là đối với các IgG động vật có vú. Việc so sánh này còn bao gồm dữ liệu liên quan đến các cấu trúc 3 chiều của các kháng thể.

Nhằm mục đích minh họa các phương án cụ thể của sáng chế, các mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể mà chứa các miền biến đổi chứa các CDR của kháng thể này bao gồm Fv, dsFv, scFv, Fab, Fab', F (ab')₂ đã được quy định rõ bằng việc tham chiếu đến (Kabat et al., 1992), (Martin, 2001) và cả các mảnh Fv (Delves et al., 2011) gồm các miền VL và VH của kháng thể được kết hợp với nhau bằng các tương tác kỵ nước; trong các mảnh dsFv, heterodime VH:VL được làm ổn định bằng liên kết disulfua; trong các mảnh scFv, các miền VL và VH được kết nối với nhau thông qua nhóm liên kết peptit linh hoạt do đó tạo ra protein đơn chuỗi. Các mảnh Fab là các mảnh monome có thể thu được bằng sự thủy phân bằng papain đối với kháng thể; chúng chứa toàn bộ chuỗi L, và mảnh VH-CH1 của chuỗi H, được liên kết với nhau thông qua liên kết disulfua. Mảnh F (ab')₂ có thể được sản xuất bằng cách thủy phân bằng pepsin đối với kháng thể phía dưới dưới liên kết disulfua bản lẻ; nó chứa hai mảnh Fab', và ngoài ra là một phần của vùng bản lẻ của phân tử globulin miễn dịch. Các mảnh Fab' có thể thu được từ các mảnh F (ab')₂ bằng cách cắt liên kết disulfua trong vùng bản lẻ. Các mảnh F (ab')₂ có hóa trị hai, tức là chúng chứa hai vị trí liên kết kháng nguyên, giống như phân tử globulin miễn dịch tự nhiên; mặt khác, các mảnh Fv (dime VH-VL cấu thành phần biến đổi của Fab), dsFv, scFv, Fab, và Fab' có hóa trị một, tức là chúng chứa một vị trí liên kết kháng nguyên duy nhất.

Các kháng thể khảm

Theo phương án khác của sáng chế, các kháng thể được cải biến và, kết quả là, là các kháng thể khảm, chứa các miền hoặc (các) sợi gồm các gốc axit amin của các kháng thể khác nhau, cụ thể là các kháng thể thu được từ các loài động vật khác nhau, được tổ hợp với nhau trong kháng thể chức năng. Theo phương án cụ thể, đại phân tử của sáng chế là kháng thể khảm gồm hệ các mảnh kháng thể lắp ráp với nhau từ ít nhất hai loài khác nhau. Theo phương án cụ thể, kháng thể khảm chứa vùng ổn định của kháng thể người. Các vùng ổn định này được minh họa trong các ví dụ bằng các mảnh Fc G1 (SEQ ID No:26) hoặc các mảnh Fc G4 (SEQ ID No:28) hoặc mảnh CL kappa (SEQ ID No:30). Cách khác, các mảnh Fc người được minh họa trên Fig.12 (Uniprot P01857, Uniprot P01859, Uniprot P01861) và/hoặc với các trình tự của SEQ ID No:31, SEQ ID No:32, SEQ ID No:33 hoặc SEQ ID No:112 có thể được sử dụng. Theo phương án cụ thể, kháng thể khảm chứa vùng biến đổi của kháng thể loài gặm nhấm và vùng ổn định của kháng thể người. Theo phương án cụ thể, kháng thể khảm chứa chuỗi VH với trình tự của SEQ ID No:2 (N13B2-G1m-VH-FcG1m (E333A)) hoặc trình tự của SEQ ID No:6 (N13B2-G4m-VH-FcG4m (S228P)) và chuỗi VL với trình tự của SEQ ID No:4 (N13B2-G1m-VL-CLkappa).

Các affitin, anticalin và các giả kháng thể khác

Các đại phân tử của sáng chế còn chứa các protein nhân tạo có khả năng liên kết với các kháng nguyên bất chước khả năng đó của các kháng thể, còn gọi ở đây là giả kháng thể liên kết kháng nguyên. Các protein này bao gồm các affitin và các anticalin. Các affitin là các protein nhân tạo có khả năng liên kết chọn lọc các kháng nguyên. Chúng được dẫn xuất về mặt cấu trúc từ protein liên kết ADN Sac7d, được phát hiện trong *Sulfolobus acidocaldarius*, là vi sinh vật thuộc lĩnh giới cổ khuẩn. Bằng cách ngẫu nhiên hóa các axit amin trên bề mặt liên kết của Sac7d, ví dụ bằng cách tạo ra các biến thể tương ứng với các phép thay thế ngẫu nhiên của gốc 11 của mặt phân giới liên kết của Sac7d, thư viện affitin có thể được tạo ra và đưa thư viện protein thu được vào các bước của kỹ thuật biểu lộ trên ribosom, ái lực có thể được định hướng đến các đích khác nhau, như các peptit, các protein, các virus và các vi khuẩn. Các affitin là các giả kháng thể và đang được phát triển làm các công cụ trong công nghệ sinh học. Chúng cũng được sử dụng làm các chất ức chế đặc hiệu đối với các enzym khác nhau (Kreienbrink et al., 2008). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ

dàng phát triển các affitin với các tính chất liên kết cần thiết bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, cụ thể là như được bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO2008068637 và công bố nêu trên, cụ thể là phương pháp tạo ra các thư viện biểu lộ trên thể thực khuẩn và/hoặc biểu lộ trên ribosom và phương pháp sàng lọc chúng sử dụng kháng nguyên như được bộc lộ ở đây. Các anticalin là các protein nhân tạo mà có thể liên kết với các kháng nguyên, hoặc với các protein hoặc với các phân tử nhỏ. Chúng là các giả kháng thể được dẫn xuất từ các lipocalin người, các lipocalin này là họ các protein liên kết tự nhiên. Các anticalin nhỏ hơn khoảng tám lần với kích cỡ khoảng 180 axit amin và trọng lượng khoảng 20kDa (Skerra, 2008). Các thư viện biểu lộ trên thể thực khuẩn anticalin đã được tạo ra mà đặc biệt cho phép sàng lọc hoặc chọn lọc các anticalin có các tính chất liên kết đặc hiệu. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng phát triển các affitin với các tính chất liên kết cần thiết bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, cụ thể là như được bộc lộ trong patent châu Âu số EP1270725 B1, patent Mỹ số US8536307 B2, (Schlehuber and Skerra, 2002) và công bố nêu trên, cụ thể là phương pháp tạo ra các thư viện biểu lộ trên thể thực khuẩn và/hoặc biểu lộ trên ribosom và phương pháp sàng lọc chúng sử dụng kháng nguyên như được bộc lộ ở đây. Các anticalin và các affitin có thể đều được sản xuất trong một số hệ biểu hiện bao gồm các hệ biểu hiện vi khuẩn. Do đó, sáng chế đề xuất các affitin, các anticalin và các giả kháng thể tương tự khác với các dấu hiệu của các kháng thể được mô tả ở đây, cụ thể là liên quan đến sự liên kết với CD127, sự không cảm ứng và/hoặc sự ức chế sự nội nhập CD127, sự trưởng thành của các DC, tất cả các dạng này đều được dự tính là các đại phân tử của sáng chế.

Sự làm giống như của người.

Theo phương án cụ thể, các đại phân tử của sáng chế là các kháng thể được làm giống như của người hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng. Vì vậy đã thu được đầu tiên ở động vật, đặc biệt ở các loài gặm nhấm và cụ thể là ở chuột cống, sau khi gây miễn dịch động vật và sản sinh các kháng thể đơn dòng từ khối tế bào lai, các kháng thể của sáng chế được cải biến trên các trình tự VH và/hoặc VL của chúng bằng cách thay thế các gốc axit amin, trên khung và ngoài ra, tùy ý, trên các trình tự CDR. Sự làm giống như của người có thể được thực hiện bằng cách tái tạo bề mặt hoặc bằng cách ghép CDR theo các kỹ thuật đã biết. Sự tái tạo bề mặt đặc biệt đạt được bằng cách

thay thế các gốc của loài gặm nhấm bằng các gốc axit amin của người. Sự thay thế này được thực hiện theo cách sao cho vẫn duy trì cấu trúc khung của kháng thể gốc và cả sự biểu hiện các CDR, nhờ đó cho phép các tương tác của các khung và của các CDR trên kháng thể được tái tạo bề mặt bảo tồn được cấu dạng tự nhiên của bề mặt tiếp xúc với kháng nguyên nhờ đó nó vẫn giữ ái lực liên kết kháng nguyên.

Các phương án được ưu tiên của kháng thể của sáng chế được biểu thị bằng các phiên bản được làm giống như của người của kháng thể N13B2 (chuột cống) chứa các chuỗi nhẹ và nặng dưới đây:

Chuỗi nặng của N13B2-h1, có trình tự của SEQ ID No: 36, trong đó các trình tự CDR của N13B2 chuột cống đã được bảo tồn, cũng như một vài axit amin khác bên ngoài các trình tự CDR, và trong đó tất cả các axit amin khác khớp với trình tự của kháng thể người. Chuỗi nặng này có độ tương đồng 87,8% với chuỗi nặng của kháng thể người. Các gốc sau đây ngoài các trình tự CDR đã được bảo tồn: V ở vị trí Kabat H24 (vị trí 24 trên Fig.23; A trong trình tự của người), V ở vị trí Kabat H37 (vị trí 37 trên Fig.23; I trong trình tự của người), A ở vị trí Kabat H49 (vị trí 49 trên Fig.23; S trong trình tự của người) và D ở vị trí Kabat H73 (vị trí 74 trên Fig.23; N trong trình tự của người);

Chuỗi nặng của N13B2-h2, có trình tự của SEQ ID No: 38, trong đó, so với chuỗi nặng của N13B2-h1, các axit amin ở các vị trí Kabat H37, H49 và H73, bên ngoài các trình tự CDR, đã được cải biến để khớp với trình tự của chuỗi nặng của kháng thể người;

Chuỗi nặng của N13B2-h3, có trình tự của SEQ ID No: 40, trong đó, so với chuỗi nặng của N13B2-h2, M ở vị trí Kabat H96 (vị trí 100 trên Fig.23), trong trình tự CDR3, đã được đột biến thành L để khớp với trình tự của chuỗi nặng của kháng thể người và/hoặc để tránh sự cải biến sau dịch mã. Các gốc khả dĩ khác đối với vị trí này bao gồm cụ thể là A, F và I và tốt hơn nữa là F hoặc I. Do đó, biến thể được làm giống như của người khả dĩ đối với trình tự CDR3 của VH N13B2 có trình tự của SEQ ID No: 48.

Chuỗi nhẹ của N13B2-h1, có trình tự của SEQ ID No: 42, trong đó các trình tự CDR của N13B2 chuột cống đã được bảo tồn, cũng như một vài axit amin khác bên ngoài các trình tự CDR, và trong đó tất cả các axit amin khác khớp với trình tự của

kháng thể người. Chuỗi nhẹ này có độ tương đồng 80% với chuỗi nhẹ của kháng thể người. Các gốc sau đây ngoài các trình tự CDR đã được bảo tồn: V ở vị trí Kabat L48 (vị trí 48 trong Fig.24; I trong trình tự người), Y ở vị trí Kabat L71 (vị trí 71 trong Fig.24; F trong trình tự người) và F ở vị trí Kabat L87 (vị trí 87 trong Fig.24; Y trong trình tự người);

Chuỗi nhẹ của N13B2-h2, có trình tự của SEQ ID No: 44, trong đó, so với chuỗi nhẹ của N13B2-h1, ba axit amin ở các vị trí Kabat L48, L71 và L87, bên ngoài các trình tự CDR, đã được cải biến để khớp với trình tự của chuỗi nhẹ của kháng thể người;

Chuỗi nhẹ của N13B2-h3, có trình tự của SEQ ID No: 46, trong đó, so với chuỗi nhẹ của N13B2-h2, các axit amin ở các vị trí Kabat L31 (vị trí 31 trên Fig.24) và/hoặc L52 (vị trí 53 trên Fig.24), lần lượt các trình tự trong CDR1 và CDR2, đã được đột biến từ lần lượt từ N thành Q và từ S thành T, để khớp với trình tự của chuỗi nhẹ của kháng thể người và/hoặc để tránh sự cải biến sau dịch mã. Các axit amin khả dĩ khác đối với vị trí L31 gồm H và R. Các đột biến khả dĩ khác đối với trình tự CDR3 bao gồm sự bảo tồn S ở vị trí L52 và đột biến N ở vị trí L51 (vị trí 52 trên Fig.24) thành Q, H, K hoặc R. Do đó, biến thể được làm giống như của người khả dĩ đối với trình tự CDR1 của VL N13B2 có trình tự của SEQ ID No: 50, và biến thể được làm giống như của người khả dĩ đối với trình tự CDR2 của VL N13B2 có trình tự của SEQ ID No: 52.

Các kháng thể đa chức năng hoặc các mảnh

Các mảnh liên kết kháng nguyên cơ sở này của sáng chế có thể được tổ hợp với nhau để thu được các mảnh liên kết kháng nguyên đa hóa trị, như các diabody, các tribody hoặc các tetrabody. Các mảnh liên kết kháng nguyên đa hóa trị này cũng là một phần của sáng chế.

Các cải biến nêu trên có thể được kết hợp nếu liên quan. Theo các phương án cụ thể, đại phân tử là kháng thể, kháng thể này là kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm giống như của người và/hoặc kháng thể được khử miễn dịch.

Các phương pháp để thu các kháng thể của sáng chế

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó của sáng chế cụ thể là được tạo ra một cách có lợi kháng lại phân tử mà là CD127 được biểu hiện bằng các tế bào

T của người, có thể được tạo ra từ việc gây miễn dịch dưới dạng polypeptit tự nhiên hoặc phân tử tái tổ hợp.

Sự gây miễn dịch có thể được thực hiện theo phương thức được bộc lộ trong các ví dụ dưới đây: Thể khảm Fc CD127 tái tổ hợp (10975-H03H Sino Biological, Bắc Kinh, Trung Quốc) được sử dụng để gây miễn dịch chuột cống như chuột cống thuộc chủng LOU/C Igk1a có sẵn ở Đại học Louvain, Bỉ). Cách khác, kháng nguyên chứa các trình tự axit amin của SEQ ID No:115 (cụ thể là chứa SEQ ID No: 110) và/hoặc của SEQ ID No:117 (cụ thể là chứa SEQ ID No: 111) và/hoặc của SEQ ID No:116, kháng nguyên này còn chứa thêm các trình tự khác, cụ thể là các trình tự khác của CD127 người, hoặc không, như được bộc lộ trên đây, có thể được sử dụng làm chất sinh miễn dịch. Khối tế bào lai được thu lấy bằng cách dung hợp các tế bào lách đơn nhân với tế bào u tế bào miễn dịch của chuột cống LOU: IR983F, là dòng tế bào kháng azaguanin và không tiết, theo quy trình đã được mô tả (Chassoux et al., 1988). Đầu tiên, khối tế bào lai được sàng lọc theo khả năng của các kháng thể đơn dòng được tiết trong việc liên kết với phân tử CD127 tái tổ hợp (thể khảm Fc CD127; 10975-H03H, Sino Biological, Bắc Kinh, Trung Quốc). Sau đó, khối tế bào lai được sàng lọc theo khả năng của các kháng thể đơn dòng của chúng trong việc liên kết với CD127 được biểu hiện bằng các tế bào T của người và theo khả năng trong việc ức chế sự cảm ứng của sự phosphoryl hóa STAT-5 được cảm ứng bởi IL-7 trên các bạch cầu của người, như được minh họa trên Fig.1, và theo khả năng của chúng trong việc không làm gia tăng sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai cảm ứng bởi TSLP.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, kháng thể được làm giống như của người của sáng chế được dẫn xuất từ kháng thể được gọi là N13B2 bằng cách đột biến một hoặc nhiều vùng CDR của chuỗi nặng biến đổi (Variable Heavy: VH) của nó và/hoặc chuỗi nhẹ biến đổi (Variable Light: VL) của nó, cụ thể là kháng thể giữ ít nhất một hoặc hai vùng CDR gốc trong số các vùng CDR3, CDR2 và CDR1 ở VH và/hoặc VL, kháng thể được cải biến này có dưới 10% gốc axit amin đột biến, tốt hơn là có một hoặc không có gốc axit amin đột biến, trong các vùng CDR được xem xét riêng rẽ so với vùng CDR1, CDR2 hoặc CDR3 gốc, trong đó các vùng CDR gốc này là

- i. VHCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID No 10 ;
- ii. VHCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID No 12 ;
- iii. VHCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID No 14 ;

- iv. VLCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID No:16 ;
- v. VLCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID No:18 ;
- vi. VLCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID No:20.

Do đó, VHCDR3 có thể có trình tự axit amin của SEQ ID No: 48; VLCDR1 có thể có trình tự axit amin của SEQ ID No: 50; VLCDR2 có thể có trình tự axit amin của SEQ ID No: 52.

Theo phương án cụ thể, mảnh liên kết kháng nguyên của sáng chế là mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể N13B2 mà được cải biến như được mô tả trong các đoạn nêu trên, mảnh liên kết kháng nguyên được cải biến này có dưới 10% gốc axit amin đột biến so với mảnh liên kết kháng nguyên gốc.

Xem xét hướng dẫn được cung cấp bởi sáng chế, để biểu hiện các kháng thể của sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể điều chế khối tế bào lai hoặc sử dụng các công nghệ khác như các thư viện biểu hiện và các hệ thống biểu hiện, sau đó chọn lọc các kháng thể có cấu trúc của các kháng thể được tiết bởi khối tế bào lai và có các tính chất của nó, cụ thể là các tính chất liên kết và trung hòa của nó. Các thư viện cADN có thể được điều chế một cách tương xứng từ ARN được biểu hiện trong khối tế bào lai của sáng chế và các trình tự thích hợp được chọn lọc và được biểu hiện. Cách khác, cADN mã hóa các kháng thể của sáng chế hoặc các mảnh của chúng được điều chế bằng cách tổng hợp.

“Các tế bào lai” theo sáng chế là các tế bào được tạo ra từ sự dung hợp các tế bào sản sinh kháng thể (các lympho bào B) từ động vật mà đã được gây miễn dịch bằng chất sinh miễn dịch chọn lọc và đối tác dung hợp là các tế bào u tủy cho phép cung cấp tính bất diệt cho tế bào dung hợp thu được. Các tế bào u tủy và các tế bào sản sinh kháng thể (các tế bào B như các tế bào lách) có thể là có nguồn gốc giống nhau, và là các tế bào nhân điển hình cụ thể là các tế bào động vật có vú của cùng động vật. Cách khác, chúng có thể có nguồn gốc khác nhau, do đó tạo ra khối tế bào lai dị biệt. Các tế bào u tủy như tế bào u tế bào miễn dịch của chuột cống LOU: IR983F, dòng tế bào kháng azaguanin và không tiết, được chọn trong số các tế bào mà thất bại trong việc sản sinh các globulin miễn dịch để cho phép khối tế bào lai điều chế được chỉ tiết các kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu mong muốn. Các tế bào khác thích hợp để thúc đẩy ADCC như các tế bào được mô tả trong các trang dưới đây để điều chế các kháng

thể thông qua việc biểu hiện trên các tế bào tái tổ hợp có thể được sử dụng thay cho các tế bào u tế bào miễn dịch của chuột cống. Các tế bào này thuận lợi là các tế bào có khả năng fucosyl hóa thấp hoặc không có khả năng fucosyl hóa.

Việc điều chế khối tế bào lai thích hợp để thực hiện sáng chế được thực hiện theo các kỹ thuật thông thường. Các phương án được mô tả chi tiết trong các ví dụ thực hiện sáng chế, trong đó các dấu hiệu được bộc lộ cụ thể có thể được sửa lại cho phù hợp với các tế bào khác được sử dụng làm đối tác dung hợp.

Các mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể thu được bắt đầu từ kháng thể, đặc biệt là bằng cách sử dụng sự thủy phân bằng enzym theo các kỹ thuật đã được biết rõ gồm thủy phân bằng papain hoặc bằng pepsin, hoặc sử dụng kỹ thuật phân cắt thích hợp bất kỳ. Cách khác, chúng có thể được biểu hiện trên các tế bào chủ được cải biến bằng cách tái tổ hợp với các trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của các mảnh đã nêu, hoặc có thể được tổng hợp, đặc biệt là được tổng hợp bằng cách hóa học. Do đó, các kháng thể của sáng chế, gồm các kháng thể được cải biến và các mảnh liên kết kháng nguyên của các kháng thể này cũng có thể được điều chế bằng các kỹ thuật công nghệ di truyền cổ điển, như các kỹ thuật được mô tả bởi Sambrook et al. (Deininger, 1990) và các phiên bản cập nhật). Do đó, sáng chế đề cập đến các phiên bản của các polypeptit VH và VL mà chứa peptit tín hiệu hoặc không. Peptit tín hiệu có thể là cần thiết trong quá trình điều chế các polypeptit trong các tế bào.

Liên quan đến việc sử dụng kháng thể của sáng chế hoặc các mảnh chức năng của chúng để dùng cho bệnh nhân, có thể có lợi khi thu được các kháng thể đơn dòng được làm giống như của người hoặc các kháng thể đơn dòng khảm và/hoặc các kháng thể được khử miễn dịch từ các kháng thể của sáng chế mà là các kháng thể không thuộc loài sinh trưởng như các kháng thể được minh họa trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, đặc biệt là có thể có lợi khi làm giảm phản ứng miễn dịch đối với các kháng thể đã nêu của vật chủ hoặc bệnh nhân nhận. Các mảnh chức năng của các kháng thể biến thể này cũng có thể thu được dưới dạng các biến thể được làm giống như của người, khảm hoặc khử miễn dịch.

Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà là kháng thể được làm giống như của người, cũng có thể thu được bằng cách thay thế (các) gốc axit amin có mặt trong (các) vùng ổn định của các chuỗi biến đổi (VH và/hoặc VL) của kháng thể

không phải của người của sáng chế, bằng (các) gốc axit amin của người có vị trí tương ứng trong các kháng thể người theo quy định và cách đánh số chuẩn, trong đó mức độ thay thế này là từ 1% đến 20%, cụ thể là từ 1% đến 18% các gốc trong các vùng khung đã nêu. Các vùng ổn định đã nêu gồm các vùng thuộc các vùng khung (framework region: FwR) được quy định trong các kháng thể bốn chuỗi được nhận diện cụ thể là bằng cách tham chiếu đến cách đánh số Kabat.

Các ví dụ cụ thể về các kháng thể được cải biến theo sáng chế bao gồm các kháng thể khảm, các kháng thể được làm giống như của người và/hoặc các kháng thể được khử miễn dịch.

Kháng thể được cải biến cụ thể có các gốc axit amin được cải biến trong các vùng CDR, việc cải biến này dẫn đến sự khử miễn dịch bằng sự mất đi các epitop tế bào T trong miền biến đổi của kháng thể không phải của người. Việc khử miễn dịch có thể được thực hiện sau khi xác định các epitop tế bào T trong miền biến đổi của kháng thể, đặc biệt là bằng các dự báo in silico (sàng lọc ảo), sau đó là sự đột biến điểm trong trình tự của các chuỗi biến đổi của kháng thể mà loại bỏ các epitop tế bào T chức năng. Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, sự cải biến của các vùng CDR, đặc biệt là của các vùng CDR3 được hạn chế đến mức độ cần thiết để khử miễn dịch khi dùng cho cơ thể người, ví dụ để làm giảm ái lực liên kết của các thụ thể tế bào T đối với các phức hợp HLA-nhóm II/peptit. Theo phương án cụ thể, (các) vùng CDR3 của VH và/hoặc của VL không được cải biến. Theo phương án khác, các vùng FR và/hoặc các vùng CH cũng được cải biến, đặc biệt là được làm giống như của người.

Do đó, các kháng thể trong khung của sáng chế bao gồm kháng thể dựa trên các dấu hiệu được quy định trên đây, kháng thể này là kháng thể được làm giống như của người, đặc biệt là kháng thể thu được bằng cách thay thế (các) gốc axit amin có trong (các) vùng khung của kháng thể của sáng chế bằng (các) gốc axit amin của người có vị trí tương ứng trong các kháng thể người theo quy định và cách đánh số chuẩn. Mức độ thay thế các gốc axit amin trong các vùng khung và/hoặc trong các CDR để làm giống như của người, bao gồm sự khử miễn dịch, là từ 1% đến 20% cụ thể là từ 1% đến 18% các gốc trong các vùng khung và/hoặc các vùng CDR đã nêu. Như nêu trên, sự làm giống như của người chủ yếu hướng đích các vùng khung của các kháng thể gốc. Trong một số trường hợp, sự làm giống như của người có thể cách khác là hoặc còn liên quan đến (các) vùng CDR, cụ thể là (các) vùng CDR1 và/hoặc CDR2 và đặc biệt hơn là được

gọi là sự khử miễn dịch. Theo các phương án cụ thể, không nhiều hơn một axit amin được cải biến ở mỗi vùng CDR. Các ví dụ về các kháng thể được làm giống như của người và/hoặc được khử miễn dịch thu được từ kháng thể N13B2 của chuột cống được bộc lộ ở đây.

Do đó, sự làm giống như của người có thể đạt được xem xét đến các khung chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của tế bào dòng mầm của người mà thể hiện độ tương đồng về trình tự cao nhất với trình tự của kháng thể hoặc mảnh không phải của người, và chọn lọc các gốc axit amin, đặc biệt là các gốc được biểu lộ ở bề mặt trên kháng thể, cần được thay thế trên kháng thể không phải của người hoặc mảnh của nó đã nêu, để thích hợp với (các) gốc tương ứng của người. Theo phương án cụ thể, một số hoặc tất cả các vùng FRL và/hoặc một số hoặc tất cả các vùng FRH là hoàn toàn của người, tức là, có các đặc tính của các trình tự khung của người. Theo phương án khác, các gốc được chọn trong một số hoặc tất cả các vùng FR được thay thế.

Các phương pháp để làm giống như của người đối với các kháng thể cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực này và được mô tả, ví dụ, bởi Routledge et al. (Edward G. Routledge, 1993). Các phương pháp này cũng có thể áp dụng cho các mảnh liên kết kháng nguyên, như scFvs. Bằng cách ví dụ, phương pháp được biết như là "tái tạo bề mặt" gồm thay thế tập hợp các gốc bề mặt trong các khung của vùng biến đổi của kháng thể không của người bằng tập hợp các gốc bề mặt của người, trong khi đó phương pháp được biết như là ghép CDR bao gồm chuyển các CDR từ kháng thể không phải người vào các vùng khung của kháng thể người. Việc ghép CDR thường được hoàn thiện bằng việc tối ưu hóa khung, bao gồm thay thế một số gốc của khung của người, để tối ưu hóa ái lực liên kết. Bước tối ưu hóa khung gần đây đã được đơn giản hóa bằng việc sử dụng các thư viện tổ hợp (Rosok et al., 1996) (Baca et al., 1997).

Sáng chế đặc biệt đề cập đến các kháng thể được làm giống như của người thu được bằng cách ghép CDR từ kháng thể N13B2 của chuột cống. Các trình tự VH và VL của người mà có các trình tự với độ đồng nhất mạnh lần lượt với các trình tự VH và VL của N13B2 chuột cống, được chọn lọc trong cơ sở dữ liệu. Các trình tự CDR của N13B2 được ghép vào trên các trình tự này của người. Một số gốc bên ngoài các trình tự CDR có thể có tác động đáng kể đối với sự nhận biết hoặc ái lực với kháng nguyên, cụ thể là các gốc ở sát gần với các CDR và các gốc được biết như là các gốc Vernier. Như được mô tả chi tiết trên đây, và trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, cụ

thể là trong 0, một số phiên bản của các kháng thể được làm giống như của người được thử nghiệm: bảo tồn nhất trong đó tất cả các trình tự của chuỗi công được bảo tồn đối với CDR và các gốc quan trọng về mặt cấu trúc nêu trên, phiên bản trong đó các trình tự của người được chọn theo các gốc quan trọng về mặt cấu trúc và phiên bản gần nhất đối với các trình tự của người, trong đó, ngoài các gốc quan trọng về mặt cấu trúc bên ngoài CDR, một vài gốc bên trong CDR được cải biến từ trình tự ban đầu của chuỗi công để đặc biệt ngăn chặn các cải biến sau dịch mã như sự oxy hóa hoặc sự khử amit hóa.

Chiến lược khác gần đây có sẵn cho việc làm giống như của người đối với kháng thể chỉ bảo tồn các trình tự CDR3 gốc không phải của người của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng trong khi trình tự còn lại được chọn từ các thư viện di truyền V sơ khai của người (Rader et al., 1998).

Các kháng thể khảm, kháng thể được làm giống như của người và/hoặc kháng thể khử miễn dịch của sáng chế có thể thuộc nhóm các globulin miễn dịch bất kỳ, như các kháng thể không được cải biến. Tốt hơn là, chúng thuộc phân nhóm của nhóm IgG như IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4.

Các phương pháp điều chế các mảnh liên kết kháng nguyên tái tổ hợp, hoặc các kháng thể khảm bằng cách kết hợp các vùng biến đổi của kháng thể với các nhóm liên kết thích hợp, hoặc với các vùng ổn định của kháng thể khác, đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Các kháng thể của sáng chế được mô tả là các kháng thể đơn dòng, nghĩa là chế phẩm chứa các kháng thể này là đồng nhất, đặc biệt là tương đồng về mặt độ đặc hiệu liên kết kháng nguyên và do đó về mặt chế phẩm vùng biến đổi. Do đó, các kháng thể này có thể đủ tư cách như là đơn dòng ngay cả khi chúng thu được bằng các kỹ thuật khác với kỹ thuật tế bào lai.

Theo phương án khác, sáng chế còn đề cập đến phân tử khảm mà chứa kháng thể theo quy định bất kỳ trong số các quy định được cung cấp ở đây hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó kháng thể này hoặc mảnh chức năng của nó được kết hợp với phân tử khác về mặt chức năng. Phân tử khảm của sáng chế có thể là protein khảm dung hợp hoặc thể liên hợp thu được từ dạng gắn kết thích hợp bất kỳ bao gồm gắn kết cộng hóa trị, ghép, liên kết hóa học với nhóm hóa học hoặc sinh học hoặc với

phân tử, như polyme PEG hoặc nhóm bảo vệ khác hoặc phân tử thích hợp để bảo vệ kháng lại sự phân cắt bằng các proteaza *in vivo*, để cải thiện độ ổn định và/hoặc thời gian bán hủy của kháng thể hoặc mảnh chức năng này. Với các kỹ thuật tương tự, đặc biệt là bằng cách liên kết hóa học hoặc ghép, phân tử kháng có thể được điều chế bằng phân tử hoạt tính về mặt sinh học, phân tử hoạt tính này được, ví dụ, chọn trong số các độc tố, cụ thể là ngoại độc tố *Pseudomonas A* (Risberg et al., 2011), chuỗi A của độc tố thực vật ricin (van Oosterhout et al., 2001) hoặc saporintoxin (Flavell et al., 2006), đặc biệt là thành phần có hoạt tính trị liệu, vector (đặc biệt gồm vector protein) thích hợp để hướng đích kháng thể hoặc mảnh chức năng đến các tế bào hoặc các mô cụ thể của cơ thể, hoặc nó có thể được kết hợp với nhãn hoặc với nhóm liên kết, đặc biệt là khi các mảnh của kháng thể được sử dụng.

Sự PEG hóa của kháng thể hoặc các mảnh chức năng của chúng là phương án đặc biệt hấp dẫn vì nó cải thiện các điều kiện phân phát của chất nền hoạt tính đến vật chủ, đặc biệt là dùng cho ứng dụng điều trị. PEG hóa có thể là đặc hiệu về vị trí để ngăn chặn sự can thiệp vào các vị trí nhận biết của các kháng thể hoặc các mảnh chức năng, và có thể được thực hiện với PEG trọng lượng phân tử cao. PEG hóa có thể đạt được thông qua các gốc xystein tự do có trong trình tự của kháng thể hoặc mảnh chức năng hoặc thông qua các gốc xystein tự do bổ sung trong trình tự amin của kháng thể hoặc mảnh chức năng.

Sáng chế cũng liên quan đến chế phẩm chứa các kháng thể hoặc các mảnh chức năng của chúng như được quy định ở đây, trong đó các kháng thể hoặc các mảnh chức năng của chúng là quần thể đồng nhất của các kháng thể hoặc các mảnh chức năng của chúng hoặc là các kháng thể đơn dòng hoặc các mảnh chức năng của chúng.

Trong một số trường hợp, có thể sử dụng chế phẩm chứa các sản phẩm để thu được tác dụng mong muốn, trong đó mỗi sản phẩm trong chế phẩm này tạo ra ít nhất một tác dụng mong muốn. Trong trường hợp này, ví dụ, có thể kết hợp các phân tử có tác dụng ức chế đối với tương tác IL-7-IL-7R và các phân tử có tác dụng gây độc tế bào đối với các tế bào dương tính với CD127. Các kết hợp này được nằm trong phạm vi của sáng chế. Quan trọng là, theo sáng chế, chế phẩm chứa các sản phẩm này không nên tác dụng hiệp đồng với TSLP đối với sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai. Thông thường, chế phẩm này bao gồm kết hợp các sản phẩm mà trong đó từng sản

phẩm này không tác dụng hiệp đồng với TSLP đối với sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai.

Theo phương án cụ thể, sáng chế liên quan đến chế phẩm hoặc hệ tập hợp các hợp chất chứa các kháng thể, các mảnh hoặc các phân tử khảm như được mô tả ở đây, trong đó chế phẩm này chứa (i) quần thể các kháng thể hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng hoặc các phân tử khảm có hoạt tính gây độc tế bào đối với các tế bào dương tính với CD127, đặc biệt là các tế bào T CD127+ và (ii) quần thể các kháng thể hoặc các mảnh chức năng của chúng hoặc các phân tử khảm có các tính chất đối kháng đối với IL-7 người, các quần thể các kháng thể này được kết hợp trong hỗn hợp hoặc được phân tách và, theo sự lựa chọn phân tách này, được phối chế để dùng kết hợp hoặc theo tuần tự. Các kháng thể và/hoặc các mảnh chức năng và/hoặc các phân tử khảm không tác dụng hiệp đồng với TSLP đối với sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai.

Các quy định được cung cấp ở đây đặc biệt bằng cách tham chiếu đến các kháng thể của sáng chế, sẽ tương tự áp dụng cho các mảnh liên kết kháng nguyên của nó trừ trường hợp nó rõ ràng không liên quan về mặt kỹ thuật. Các quy định này cũng áp dụng cho các đại phân tử (cụ thể là các kháng thể khảm hoặc các phân tử khảm) hoặc các chế phẩm chứa các kháng thể này hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên chúng hoặc được dẫn xuất từ các kháng thể này, như được bộc lộ trong sáng chế. Cũng chỉ rõ thêm rằng các mảnh liên kết kháng nguyên của các kháng thể của sáng chế được dẫn xuất từ các kháng thể trên quan điểm về mặt khái niệm hoặc về mặt dự kiến, nhưng chúng cũng có thể được điều chế thông qua các kỹ thuật khác nhau, không nhất thiết phải có sự cầu viện vào các kháng thể dưới dạng các sản phẩm.

Sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa đại phân tử theo quy định bất kỳ được cung cấp ở đây. Theo các phương án cụ thể, axit nucleic của sáng chế mã hóa axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No:2; SEQ ID No:4; SEQ ID No:6; SEQ ID No:8; SEQ ID No:10; SEQ ID No:12; SEQ ID No:14; SEQ ID No:16; SEQ ID No:18; SEQ ID No:20; SEQ ID No:22, SEQ ID No:24, SEQ ID No:36, SEQ ID No:38, SEQ ID No:40, SEQ ID No:42, SEQ ID No:44, SEQ ID No:46, SEQ ID No:48, SEQ ID No:50, SEQ ID No:52, SEQ ID No:54, SEQ ID No:56, SEQ ID No:110, SEQ ID No:111, SEQ ID No:86, SEQ ID No:115, SEQ ID No:116 và SEQ ID No:117. Theo các phương án cụ thể, axit nucleic của sáng chế chứa hoặc gồm trình tự của SEQ ID

No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 hoặc 55.

Axit nucleic mà thích hợp để điều chế các đại phân tử của sáng chế đặc biệt được chọn từ nhóm gồm:

- i. polynucleotit mã hóa vùng VH và có trình tự của SEQ ID No 1 hoặc SEQ ID No: 5 hoặc SEQ ID No:54 hoặc vùng biến đổi của vùng VH và có trình tự của SEQ ID No:21 hoặc SEQ ID No: 35 hoặc SEQ ID No:37 hoặc SEQ ID No:39;
- ii. polynucleotit mã hóa vùng VL có trình tự của SEQ ID No 3 hoặc SEQ ID No: 7 hoặc SEQ ID No:56 hoặc vùng biến đổi của vùng VL và có trình tự của SEQ ID No:23, hoặc SEQ ID No: 41 hoặc SEQ ID No:43 hoặc SEQ ID No:45;
- iii. polynucleotit mã hóa vùng VHCDR1 có trình tự của SEQ ID No:9,
- iv. polynucleotit mã hóa vùng VHCDR2 có trình tự của SEQ ID No:11,
- v. polynucleotit mã hóa vùng VHCDR3 có trình tự của SEQ ID No:13 hoặc của SEQ ID No:47,
- vi. polynucleotit mã hóa vùng VLCDR1 có trình tự của SEQ ID No 15 hoặc của SEQ ID No:49,
- vii. polynucleotit mã hóa vùng VLCDR2 có trình tự của SEQ ID No 17 hoặc của SEQ ID No:51,
- viii. polynucleotit mã hóa vùng VLCDR3 có trình tự của SEQ ID No 19.

Sáng chế còn đề cập đến polynucleotit có các nucleotit được cải biến về trình tự của SEQ ID No 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 hoặc 55, và nó:

- (a) mã hóa polypeptit có trình tự axit amin lần lượt là SEQ ID No 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 hoặc 56 và/hoặc
- (b) có độ tương đồng ít nhất 85%, tốt hơn là ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95%, và tốt nhất là ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% trên toàn bộ chiều dài của nó với một trong số các polynucleotit lần lượt có trình tự SEQ ID No 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 hoặc 55 và/hoặc,

(c) là mảnh của polynucleotit có trình tự của trình tự SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 21, 23, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 53 hoặc 55, và mã hóa polypeptit chứa hoặc gồm mảnh liên kết kháng nguyên.

Các polynucleotit của sáng chế cũng có thể là các trình tự được tối ưu hóa, đặc biệt là để biểu hiện trên các tế bào vật chủ. Các kỹ thuật tối ưu hóa trong lĩnh vực này là các kỹ thuật thông thường.

Các mảnh polynucleotit của sáng chế thuận lợi là có trình tự của ít nhất 9 nucleotit, đặc biệt là ít nhất 18 nucleotit và là ngắn hơn trình tự gốc của chúng, đặc biệt là lần lượt ngắn hơn các trình tự VH hoặc VL được minh họa có độ dài đầy đủ.

Theo phương án cụ thể, các polynucleotit của sáng chế có thể thuận lợi là chứa, ngoài trình tự mã hóa đại phân tử của sáng chế, ngược chiều từ trình tự mã hóa các chuỗi kháng thể, trình tự mã hóa peptit tín hiệu cho phép tiết protein đã nêu khi được biểu hiện trong tế bào sản sinh. Chúng cũng có thể chứa một hoặc nhiều trình tự mã hóa một hoặc nhiều peptit dấu chuẩn để phát hiện, và/hoặc tạo điều kiện thuận lợi cho việc tinh chế protein đã nêu.

Sáng chế còn liên quan đến vector để tách dòng vật truyền để biểu hiện polynucleotit được bộc lộ ở đây. Theo phương án cụ thể, vector của sáng chế là plasmid thích hợp để tách dòng và/hoặc biểu hiện trên các tế bào động vật có vú, mà chứa các trình tự điều hòa để phiên mã và biểu hiện.

Sáng chế còn đề cập đến các tế bào hoặc các dòng tế bào được tái tổ hợp với polynucleotit của sáng chế, đặc biệt là tế bào hoặc dòng tế bào của động vật có vú hoặc của chim. Ví dụ, các tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary Cells), được cải biến di truyền để giảm sự fucosyl hóa toàn bộ. Thực vậy, các kháng thể thiếu sự fucosyl hóa nhân thể hiện mức độ gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể gia tăng đáng kể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) (von Horsten et al., 2010). Ví dụ khác là dòng tế bào EB66 mà vốn có các tính chất fucosyl hóa thấp (Olivier et al., 2010).

Do đó, sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều chế kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) thu khối tế bào lai sau khi gây miễn dịch động vật, đặc biệt là động vật có vú bằng chuỗi alpha của thụ thể IL-7 của người, tốt hơn là bằng kháng nguyên của nó chứa các trình tự của CD127 người với các trình tự của SEQ ID No:115 (và/hoặc SEQ ID No: 110) và/hoặc SEQ ID No:117 (và/hoặc SEQ ID No: 111) và/hoặc SEQ ID No:116 (và/hoặc SEQ ID No:86), kháng nguyên này chứa các trình tự khác của CD127 người hoặc không chứa, như đã nêu trên đây, và, nếu cần, tăng cường tạo miễn dịch cho động vật này bằng cùng một chất sinh miễn dịch, thu hồi các tế bào lách hoặc các tế bào hạch bạch huyết từ động vật đáp ứng với việc gây miễn dịch và dung hợp các tế bào này bằng các tế bào u tủy để phân lập các kháng thể đơn dòng và/hoặc
- (b) biểu hiện các polynucleotit mã hóa cho các kháng thể này như các polynucleotit được bộc lộ ở đây với trình tự nucleotit của chúng dưới dạng tái tổ hợp trong các tế bào dưới các điều kiện cho phép thu hồi các kháng thể, và
- (c) thu hồi các kháng thể nhận biết epitop như được quy định ở đây, cụ thể là các kháng thể chứa các trình tự từ vị trí 2b của CD127 và cụ thể là chứa các trình tự này và ngoài ra là các trình tự từ miền D1 của CD127, cụ thể là các kháng thể có ái lực liên kết mong muốn đối với chuỗi alpha của thụ thể IL-7 của người.

Theo phương án cụ thể của sáng chế, các kháng thể hoặc mảnh của chúng được điều chế trên các tế bào mà thể hiện tính chất fucosyl hóa thấp, như các tế bào EB66 của chim.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp chọn lọc các kháng thể gồm các bước thu, có thể thông qua một trong số các phương pháp được mô tả ở đây, các kháng thể hoặc các mảnh của chúng mà liên kết đặc hiệu CD127, cụ thể là kháng nguyên của chúng như được bộc lộ ở đây, và chọn lọc trong số các kháng thể này các kháng thể mà không làm gia tăng sự trưởng thành được cảm ứng bởi TSLP của các tế bào miễn dịch, cụ thể là các tế bào đuôi gai, không gây cảm ứng sự nội nhập của CD127 và/hoặc ức chế sự nội nhập được cảm ứng bởi IL7 của CD127 và/hoặc ức chế *in vitro* và/hoặc *in vivo* sự biểu hiện của các integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và/hoặc $\alpha 4/\beta 7$. Việc chọn lọc này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng quy trình bất kỳ được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế để kiểm tra sự tăng hoặc giảm sự biểu hiện được cảm ứng bởi TSLP của các dấu chuẩn bề mặt tế bào CD40 và/hoặc CD80 hoặc để kiểm tra các tác dụng đối với sự nội nhập của CD127 hoặc để kiểm tra các tác dụng đối với sự biểu hiện của các integrin

$\alpha 4$, $\beta 7$ và $\alpha 4/\beta 7$. Các thử nghiệm này có thể được thực hiện một cách thuận tiện ví dụ trên các đĩa 96 lỗ để cho phép sàng lọc nhanh và hiệu quả một số lượng lớn các kháng thể ứng viên và việc đọc ra có thể được thực hiện bằng cách nhuộm miễn dịch cổ điển và phân tích đếm tế bào theo dòng. Do đó, sáng chế đề cập đến phương pháp chọn lọc các kháng thể, các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng hoặc đại phân tử khác, phương pháp này chứa hoặc gồm ít nhất một trong số các bước sau:

- a. Kiểm tra (ví dụ như được mô tả trong 0, 0, 0 và/hoặc 0) đối với đại phân tử về khả năng liên kết của đại phân tử này với CD127, cụ thể là với kháng nguyên của nó như được bộc lộ ở đây;
 - b. Kiểm tra (ví dụ như được mô tả trong 0 và/hoặc 0) sự nội nhập của CD127 được cảm ứng bởi sự có mặt của đại phân tử trong tế bào biểu hiện CD127;
 - c. Kiểm tra (ví dụ như được mô tả trong 0 và/hoặc 0) sự ức chế bởi đại phân tử sự nội nhập của CD127 được cảm ứng bởi IL7 trong các tế bào biểu hiện CD127;
 - d. Kiểm tra (ví dụ như trong 0, 0 và/hoặc 0) sự gia tăng sự trưởng thành của các DC cảm ứng bởi TSLP với sự có mặt của đại phân tử;
- và tùy ý bao gồm ít nhất một trong số các bước sau:
- e. Kiểm tra (ví dụ như trong 0, 0 và/hoặc 0) sự ức chế bởi đại phân tử đối với sự truyền tín hiệu cảm ứng bởi IL-7, cụ thể là sự phosphoryl hóa STAT5;
 - f. Kiểm tra (ví dụ như trong 0, 0 và/hoặc 0) sự ức chế bởi đại phân tử đối với sự sản sinh TARC được cảm ứng bởi TSLP;
 - g. Kiểm tra (ví dụ như trong 0, 0 và/hoặc 0) sự ức chế bởi đại phân tử đối với sự biểu hiện của integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và/hoặc $\alpha 4/\beta 7$, cụ thể là sự biểu hiện trên bề mặt tế bào ở các lympho bào T;
 - h. Kiểm tra (ví dụ như trong 0, 0) sự phá vỡ bởi kháng thể đối với liên kết của CD127 với chuỗi γc , cụ thể là với sự có mặt của IL-7.

Mỗi bước trong số các bước kiểm tra này được theo sau bằng việc chọn lọc một hoặc nhiều đại phân tử có các dấu hiệu chức năng mong muốn, như được bộc lộ ở đây.

Như nêu trên, nếu mong muốn là kháng thể nhận biết epitop chứa các trình tự mà không liên kết trong trình tự của CD127, thì có thể kiểm tra liên tục sự nhận biết của (hoặc sự liên kết với) các mảnh của epitop chứa (hoặc chủ yếu chứa) trình tự liên kết đơn của CD127. Ví dụ, nếu mong muốn thu được kháng thể nhận biết epitop chứa các trình tự SEQ ID No:115, SEQ ID No:116 và SEQ ID No:117, thì có thể thứ nhất là

chọn lọc các kháng thể nhận biết epitop chủ yếu chứa SEQ ID No:116, và sau đó thứ hai là chọn lọc, trong số các kháng thể được chọn lần thứ nhất này, các kháng thể nhận biết epitop chủ yếu chứa SEQ ID No:115, và sau đó chọn lọc, trong số các kháng thể được chọn lần thứ hai này, các kháng thể nhận biết epitop chủ yếu chứa SEQ ID No:117. Rõ ràng là, thứ tự chọn lọc có thể được cải biến so với thứ tự này, thứ tư này được cung cấp ở đây chỉ là một ví dụ.

Mục đích khác của sáng chế là được phẩm chứa đại phân tử của sáng chế, với tá được, trong đó được phẩm này tùy ý còn chứa thành phần hoạt tính khác.

Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chứa thành phần hoạt tính là đại phân tử của sáng chế hoặc được phẩm như được quy định trên đây, dưới dạng phối chế thích hợp để kiểm soát sự sống sót hoặc sự mở rộng của các tế bào dương tính với CD127 người, cụ thể là các tế bào thực hiện dương tính với CD127 của người, đặc biệt là sự sống sót hoặc sự mở rộng của các tế bào T ghi nhớ CD127+, đặc biệt là các tế bào T ghi nhớ mà dương tính cả với CD127 và CD8, hoặc dương tính cả với CD127 và CD4, khi được dùng cho người bệnh. Theo phương án cụ thể, chế phẩm chứa đại phân tử của sáng chế làm thành phần hoạt tính là dưới dạng phối chế thích hợp để kiểm soát sự biệt hóa và/hoặc sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai khi được dùng cho bệnh nhân.

Chế phẩm của sáng chế có thể còn chứa hợp chất bổ sung có tác dụng điều biến miễn dịch trị liệu, cụ thể là trên các tế bào liên quan đến sự dị ứng hoặc sự tự miễn. Nhằm mục đích minh họa, các chất điều biến miễn dịch ví dụ được quan tâm là là các kháng thể đơn dòng khác hướng đích các tế bào T, như các kháng thể kháng CD3, kháng ICOS hoặc kháng CD28 hoặc các protein tái tổ hợp hoặc các kháng thể hướng đích các tế bào phụ như các kháng thể kháng CD40 hoặc CTLA4Ig.

Sáng chế cũng liên quan đến kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc phân tử khảm như được quy định hoặc minh họa ở đây, để sử dụng làm thành phần hoạt tính trong chế phẩm phối hợp hoặc chế độ trị liệu bổ sung cho bệnh nhân cần điều trị. Sáng chế cũng dự tính việc sử dụng đại phân tử, axit nucleic, tế bào hoặc dòng tế bào của sáng chế làm thành phần có hoạt tính trị liệu trong chế phẩm phối hợp hoặc trong chế độ trị liệu bổ sung cho bệnh nhân cần điều trị.

Đại phân tử theo sáng chế, axit nucleic, vector, tế bào, dòng tế bào, được phẩm hoặc chế phẩm như được quy định ở đây là cụ thể được đề xuất để sử dụng cho người

bệnh để điều trị các tình trạng bệnh lý bị ảnh hưởng bởi các đáp ứng miễn dịch, đặc biệt là bởi các đáp ứng của các tế bào T ghi nhớ. Do đó, các tác giả sáng chế đã đề xuất rằng kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, phân tử khảm theo sáng chế, được phẩm hoặc chế phẩm như được quy định ở đây được sử dụng để điều trị các bệnh tự miễn hoặc dị ứng cụ thể là các rối loạn da dị ứng, các rối loạn ruột hoặc sự thải ghép hoặc để điều trị bệnh bạch cầu như bệnh bạch cầu lympho bào cấp (ví dụ T-ALL) hoặc u lympho như u lympho Hodgkin, hoặc điều trị bệnh ung thư như bệnh ung thư vú kết hợp với các tế bào CD127+, bệnh ung thư thận, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư phổi, bệnh ung thư tuyến tụy, hoặc để điều trị bệnh u lympho tế bào T ở da, như u lympho Sezary, hoặc để điều trị bệnh bạch cầu dạng lympho bào cấp với sự đột biến tăng chức năng của con đường IL-7-R/TSLP.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng các đại phân tử như được quy định ở đây để làm nghèo các tế bào dương tính với CD127 trong khi bảo tồn được các tế bào âm tính với CD127.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng các đại phân tử như được quy định ở đây để ngăn chặn sự biệt hóa và/hoặc sự mở rộng và/hoặc sự trưởng thành của các tế bào dương tính với CD127, cụ thể là sự biệt hóa, sự mở rộng, hoặc sự trưởng thành cảm ứng bởi IL-7 và/hoặc TSLP, trong khi có ít hoặc không có tác dụng trực tiếp đối với các tế bào âm tính với CD127.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến việc sử dụng các đại phân tử được quy định ở đây để loại trừ/trung hòa các tế bào T chuyên cần và các tế bào T ghi nhớ bằng cách can thiệp vào sự truyền tín hiệu được cảm ứng bởi IL-7, trong khi vẫn bảo tồn các tế bào Treg.

Theo phương án cụ thể, sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng các đại phân tử được quy định ở đây để làm nghèo các quần thể phụ của các lympho bào, hoặc các quần thể tế bào khác biểu hiện CD127 (gồm các lympho bào T và B bình thường hoặc bệnh lý, các tế bào NK, các tế bào đuôi gai và các loại tế bào khác gồm các tế bào biểu mô) nhờ tác động gây độc tế bào của các kháng thể, có thể nhưng không chỉ là thông qua ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity: tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể) và tùy ý thông qua CDC (Complement-Dependent Cytotoxicity: tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể).

Theo các phương án trên, sáng chế cũng dự tính việc sử dụng có thể áp dụng đối với các axit nucleic, các vector, các tế bào, các dòng tế bào và các chế phẩm của sáng chế.

Thuật ngữ “điều trị” hoặc “điều trị trị liệu”, có nghĩa là các bước dùng được thực hiện dẫn đến việc cải thiện tình trạng lâm sàng của động vật hoặc bệnh nhân cần điều trị, đối tượng mà bị (các) rối loạn kết hợp với con đường IL-7, tức là liên quan đến hoạt hoặc tăng sinh của các tế bào dương tính với CD127. Việc điều trị này nhằm cải thiện tình trạng lâm sàng của động vật hoặc bệnh nhân, bằng cách loại bỏ hoặc làm thuyên giảm các triệu chứng kết hợp với (các) rối loạn liên quan đến con đường IL-7, tức là liên quan đến sự hoạt hóa hoặc tăng sinh của các tế bào dương tính với CD127. Theo phương án được ưu tiên, việc điều trị theo sáng chế giúp hồi phục sức khỏe. Theo phương án được ưu tiên, việc điều trị này không có tác dụng tiêu cực không mong muốn do sự trưởng thành của các tế bào miễn dịch gia tăng, cụ thể là sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai.

Sáng chế gồm việc sử dụng các đại phân tử trong việc điều trị các tình trạng bệnh lý liên quan đến sự thay đổi đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân dẫn đến tình trạng dung nạp miễn dịch trội hoặc, ngược lại, thiếu sự dung nạp khi đó việc kiểm soát mức đáp ứng miễn dịch sẽ là cần thiết cũng như sự phá hủy các tế bào dương tính với CD127 ác tính.

Sáng chế đề xuất các biện pháp thích hợp để sử dụng trong các tình trạng bệnh lý như các tình trạng bệnh lý cảm ứng bởi sự thải ghép, các bệnh tự miễn, các bệnh dị ứng, các bệnh đường hô hấp, các bệnh nhiễm virus mạn tính, bệnh u lympho, bệnh bạch cầu hoặc các bệnh ung thư khác gồm các tình trạng bệnh lý do các khối u rắn (ví dụ bệnh ung thư vú) trong đó các tình trạng bệnh lý này là kết hợp với các tế bào dương tính với CD127 cũng như con đường truyền tín hiệu IL-7 và trong đó sự gia tăng sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai phải được tránh.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến việc sử dụng đại phân tử, axit nucleic, tế bào, dòng tế bào hoặc chế phẩm của sáng chế cho bệnh nhân để điều trị bệnh tự miễn hoặc bệnh dị ứng hoặc để điều trị bệnh bạch cầu như bệnh bạch cầu lympho bào cấp hoặc để điều trị u lympho, hoặc để điều trị bệnh ung thư, hoặc để điều trị bệnh nhiễm

virut mạn tính, hoặc để điều trị bệnh các bệnh viêm, hoặc để điều trị bệnh các bệnh đường hô hấp, hoặc để điều trị các triệu chứng liên quan đến sự ghép tạng.

Theo phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bao gồm việc dùng đại phân tử, axit nucleic, tế bào, dòng tế bào hoặc chế phẩm của sáng chế cho bệnh nhân để điều trị bệnh tự miễn hoặc bệnh dị ứng hoặc để điều trị bệnh bạch cầu như bệnh bạch cầu lympho bào cấp hoặc để điều trị u lympho, hoặc để điều trị bệnh ung thư, hoặc để điều trị bệnh nhiễm virut mạn tính, hoặc để điều trị bệnh các bệnh viêm, hoặc để điều trị bệnh các bệnh đường hô hấp, hoặc để điều trị các triệu chứng liên quan đến sự ghép tạng.

Các dấu hiệu và các tính chất bổ sung của sáng chế sẽ là rõ ràng từ phần Ví dụ thực hiện sáng chế và Mô tả văn tắt các hình vẽ dưới đây.

Mô tả văn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sự ức chế truyền tín hiệu IL-7R. Sự ức chế của IL-7 được cảm ứng bởi lympho bào T pSTAT5+ theo cách đáp ứng liều đối với các kháng thể đơn dòng kháng IL-7R α người. N13B2 (hình vuông), N13E5 (hình tròn) và N13K12 (hình tam giác). pSTAT5 (%) : tỷ lệ (%) của các tế bào dương tính với phospho-STAT5, như được đo bằng FACS. Sự ức chế phụ thuộc liều đối với sự phosphoryl hóa STAT5 là tương tự nhau đối với ba dòng, tất cả ba dòng này đều ức chế sự phosphoryl hóa một cách hiệu quả ở nồng độ 50ng/ml (mức ức chế khoảng 50%) và một cách hoàn toàn ở nồng độ 100 đến 500ng/ml (mức ức chế > 95%).

Fig.2 thể hiện sự ức chế sự truyền tín hiệu IL-7R bởi mAb N13B2. Hệ trục như trên Fig.1. (A) Sự ức chế của IL-7 cảm ứng bởi lympho bào T pSTAT5+ theo cách đáp ứng liều đối với mAb N13B2 (hình vuông) so với mAb MD707-3 (hình tròn), cả hai đều trên mô hình loài gặm nhấm. (B) Thử nghiệm giống như ở (A) với các dạng khâm IgG1 người (hình vuông) và IgG4 người (hình tròn) của N13B2 với sự có mặt của IL-7 tái tổ hợp của người với nồng độ 0,1ng/ml (ký hiệu trắng) hoặc 5ng/ml (ký hiệu đen). N13B2 có hiệu quả hơn trong việc ức chế STAT 5 so với MD707-13 (mức ức chế ~50% ở nồng độ N13B2 100ng/ml, so với MD707-13 1000ng/mL), trong khi các kiểu phụ IgG khác nhau của N13B2 thể hiện hiệu lực ức chế khả sánh.

Fig.3 thể hiện: (A) các thử nghiệm liên kết trên kháng thể N13B2 kháng CD127 của chuột cống. Kháng thể N13B2 hoặc MD707-1 được tiêm lên kháng nguyên cố định

bởi CD127 ở nồng độ khác nhau. Resp. diff: Chênh lệch đáp ứng (Response difference). Thời gian: giây (tổng thời gian: 20 phút). Blk: trống (blank: không có kháng thể). Các đường cong kết hợp và phân ly được phân tích với mô hình "chất phân tích hóa trị hai" trên phần mềm BIAeval 4. Kết quả được biểu thị trong bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Kết quả của các thử nghiệm liên kết

	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)
MD707-1	2,66E+05	1,21E-04	2,19E+09	4,56E-10
N13B2	2,01E+05	1,60E-05	1,26E+10	7,96E-11

Bảng 2: Kd của N13B2 và các thể khảm của nó được mô tả trong (A) trong thử nghiệm riêng

Kháng thể	Ka1 (1/Ms)	Kd1 (1/s)	Rmax (RU)	KA (1/M)	KD (M)
N13B2 chuột cống	9,63E+04	4,75E-06	115	2,03E+10	4,93E-11
N13B2-G1	1,49E+05	5,62E-05	109	2,65E+09	3,77E-10
N13B2-G4	2,01E+04	3,41E-06	94,9	5,89E+09	1,70E-10

Fig.4 thể hiện hoạt tính kháng CD127 của kháng thể N13B2 mới được đo bằng thử nghiệm ELISA sử dụng kháng nguyên hCD127 tái tổ hợp. OD 450nm: mật độ quang (optical density: OD) ở 450nm. A. Hoạt tính liên kết CD127 của N13B2 (hình tròn đen) được so với kháng thể được sản sinh trước đó (MD707-1 (hình thoi trắng), 3 (hình tam giác trắng) và 6 (hình vuông đen)). N13B2 thể hiện là chất gắn kết hiệu quả nhất trong thử nghiệm này. B. Hoạt tính đối với CD127 giữa các dạng N13B2 khác nhau (chuột cống, IgG1 (hình tròn) hoặc IgG4 (hình vuông)) được so sánh. Không thấy có khác biệt đáng kể về hoạt tính liên kết.

Bảng 3: ED50 của các kháng thể được chọn

	ED 50 (ng/ml)
N13B2	65,64
MD707-1	122,93
MD707-3	293,32
MD707-6	2789,41

St cMD707-3-G1	16,1
cN13B2-G1	12
cN13B2-G4	12,6

Fig.5 thể hiện sự sản sinh TARC (Thymus and Activation-Regulated Chemokine, CCL17) được cảm ứng bởi TSLP và sự biểu hiện của của dấu chuẩn bề mặt tế bào CD80 bởi các tế bào đuôi gai thuộc tủy. Không: không kích thích. LPS: kích thích bằng lipopolysaccharit. TSLP: kích thích bằng TSLP. A) Định lượng sự sản sinh TARC trên dịch nổi bằng ELISA; và B) sự biểu hiện CD80 trên bề mặt tế bào bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng đối với các tế bào đuôi gai CD1C+ trong máu người được nuôi cấy trong 24 giờ bằng một mình môi trường, 1µg/ml LPS hoặc 15ng/ml TSLP. Số liệu là trị số trung bình $\pm$ sai số chuẩn hoặc nồng độ trung bình (SEM) từ 3 thử nghiệm độc lập.

Fig.6 thể hiện sự ức chế sự sản sinh TARC được cảm ứng bởi TSLP bằng các kháng thể kháng CD127 người. Sự định lượng mức sản sinh TARC bằng phương pháp ELISA trên dịch nổi của các tế bào đuôi gai CD1C+ trong máu người được nuôi cấy trong 24 giờ với 15ng/ml TSLP và nồng độ khác nhau của các kháng thể kháng CD127 người: Kháng thể N13B2 (hình tròn), MD707-6 (hình tam giác) và kháng TSLP làm đối chứng (X). Số liệu là đại diện của ba thử nghiệm độc lập từ ba người cho máu khác nhau. N13B2 chỉ ức chế rất nhẹ sự cảm ứng tiết TARC (mức ức chế ~20% ở nồng độ 6µg/mL), trong khi MD707-13 và kháng TSLPR là các chất ức chế hiệu quả hơn (mức ức chế lần lượt là ~50% và ~70%).

Fig.7 thể hiện tác dụng của các kháng thể kháng CD127 đối với sự biểu hiện CD80 và CD40 được cảm ứng bởi TSLP, dấu chuẩn của sự trưởng thành các tế bào đuôi gai. Các tế bào được hoạt hóa bằng TSLP ở nồng độ 15ng/ml trong 24 giờ. Các kháng thể kháng CD127: N13B2, MD707-3 và MD707-6 được bổ sung vào dịch nổi ở nồng độ 6µg/ml. Sự biểu hiện CD80 (A) và CD40 (B) ở bề mặt tế bào được phân tích bằng FACS. Dữ liệu là đại diện của 3 thử nghiệm độc lập và được biểu thị dưới dạng % so với biểu hiện ở các tế bào đối chứng (môi trường = không kháng thể, với TSLP). Chỉ có N13B2, trong số các kháng thể được kiểm tra, không làm tăng sự biểu hiện trên bề mặt tế bào của CD40 và CD80 ở các tế bào được xử lý bằng TSLP.

Fig.8 thể hiện mức gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (Antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC) của kháng thể N13B2 khảm (IgG1 hoặc IgG4) kháng CD127 người. Các tế bào NK người được sử dụng làm các tế bào thực hiện (effector: E) được ủ trong 4 giờ với dòng tế bào BAF/3 được chuyển nhiễm bằng CD127 người làm các tế bào đích (tỷ lệ 10 tế bào thực hiện trên 1 tế bào đích) và với nồng độ khác nhau của IgG1 N13B2 khảm (hình vuông đen), IgG4 N13B2 (hình vuông trắng) hoặc MD707-3 khảm (X). Phần trăm mức gây độc tế bào đặc hiệu được xác định bằng sự giải phóng ^{51}Cr .

Fig.9 thể hiện hiệu lực của các mAb N13B2 chuột cống kháng CD127 trong việc cải thiện bệnh viêm ruột kết được cảm ứng bằng cách hóa học trên chuột nhắt suy giảm miễn dịch được làm giống như của người. Sự sống sót (A) và sự thay đổi về trọng lượng (B) được giám sát hàng ngày từ ngày 0, bắt đầu điều trị hóa học bằng axit 2,4,6-trinitrobenzensulfonic (TNBS), mà gây ra sự viêm ruột kết nặng khi được dùng trong trực tràng, sau khi tiêm PBS (đường liền / hình tam giác đen) hoặc kháng thể N13B2 kháng IL7R α (đường nét đứt, hình tam giác trắng). Trên (B), mỗi điểm thể hiện số liệu trọng lượng trung bình ($\pm$ SEM); $n = 6$ đối với nhóm Hu-TNBS + PBS và $n = 6$ đối với nhóm TNBS + kháng IL-7R α . Sự sống sót được gia tăng và sự giảm trọng lượng được giảm đi ở nhóm được xử lý.

Fig.10 thể hiện trình tự nucleotit và axit amin của các chuỗi VH và VL của thể khảm N13B2_G1M. Các chuỗi Fc được in dưới dạng chữ thường, ba CDR trong mỗi trình tự là được gạch chân. Dấu hoa thị (*) biểu thị codon kết thúc trong trình tự axit amin.

Fig.11 thể hiện trình tự nucleotit và axit amin của thể khảm N13B2_G4M. Các chuỗi Fc được in dưới dạng chữ thường, ba CDR trong mỗi trình tự là được gạch chân. Dấu hoa thị (*) biểu thị vị trí của codon kết thúc trong trình tự axit amin.

Fig.12 thể hiện trình tự axit amin của ba chuỗi Fc khác của người (IgG1, IgG2 và IgG4) và của chuỗi Fc của kháng thể N13B2 chuột cống (IgG1).

Fig.13 thể hiện thử nghiệm liên kết kháng CD127 ELISA: phủ CD127Fc người và được phát hiện bằng kháng thể kháng kappa người. Hoạt tính kháng CD127 của kháng thể N13B2 mới được đo bằng thử nghiệm ELISA sử dụng kháng nguyên hCD127 tái tổ hợp. Hoạt tính CD127 giữa các dạng kháng thể N13B2 khác nhau (wt

(X), các kháng thể IgG4 được làm giống như của người h1 (hình vuông đen), h2 (hình tròn trắng) hoặc h3 (hình tam giác đen)) được so sánh. OD: mật độ quang.

Bảng 4: ED 50 của các kháng thể được chọn

	ED 50 (ng/ml)
N13B2 wt	3
N13B2-h1	2,4
N13B2-h2	0,6
N13B2-h3	0,6

Fig.14 thể hiện sự ức chế P-STAT5 bằng kháng thể kháng CD127 A. Sự ức chế P-STAT5 được cảm ứng bởi IL7 bằng các mAb N13B2 được làm giống như của người trên lympho bào T (N13B2 h1 (hình vuông đen), h2 (hình tròn trắng) và h3 (hình tam giác đen) theo cách thức phụ thuộc liều và được so sánh với kháng thể N13B2 wt chuột cống (X) với sự có mặt của IL-7 tái tổ hợp của người 0,1ng/ml. B. Các kháng thể kháng CD127 khác nhau từ các quá trình sản sinh kháng thể trước đó được so sánh về khả năng ức chế P-STAT5 phụ thuộc IL7 của chúng: MD707 3 (hình tròn), MD707 4 (hình tam giác) và MD707 13 (hình vuông).

Bảng 5: IC 50 của các kháng thể được chọn

	IC 50 (ng/ml)
N13B2 wt	50,2
N13B2-h1	63,8
N13B2-h2	18,7
N13B2-h3	21,2

Fig.15 thể hiện thử nghiệm độ ổn định của kháng thể kháng CD127 được làm giống như của người so với kháng thể của chuột cống kháng CD127. Các nồng độ kháng thể được đo bằng ELISA sau 7 ngày ở 37°C (N13B2wt chuột cống (+) hoặc N13B2 h3 được làm giống như của người (hình vuông)) và ở -80°C (N13B2wt chuột cống (X) hoặc N13B2 h3 được làm giống như của người (hình tam giác)) và sau bốn sự kiện đóng băng/làm tan băng (hình thoi).

Bảng 6: Hoạt tính liên kết của các kháng thể sau 7 ngày ở 37°C hoặc ở -80°C và sau 4 sự kiện đông/tan băng

	ED 50 (ng/ml)
N13B2 wt_bảo quản ở -80°C	3,6
N13B2 wt_bảo quản 7 ngày ở 37°C	3,5
N13B2-h3_bảo quản ở -80°C	1,3
N13B2-h3_bảo quản 7 ngày ở 37°C	1,1
N13B2-h3_4x đông băng và làm tan băng	1,7

Bảng 7: Thử nghiệm độ ổn định của kháng thể kháng CD127 người được làm giống như của người so với kháng thể kháng CD127 người của chuột cống. Phân tích bằng cách lọc gel đối với sự tạo thành kết tụ sau khi ủ trong 7 ngày ở 37°C hoặc ở -80°C.

	N13B2-wt		N13B2-h''	
	D7 ở -80°C	D7 ở 37°C	D7 ở -80°C	D7 ở 37°C
% kết tụ	3	4	2,8	3,2
% monome	97	96	97,2	96,8

Fig.16 thể hiện các thử nghiệm cạnh tranh và nội nhập bằng sự đếm tế bào. Các tế bào đơn nhân máu ngoại biên của người được ủ với một số mAb kháng CD127, trong 30 phút ở 4°C (cột gạch bóng) hoặc ở 37°C (cột màu đen) hoặc ở 37°C trong 30 phút mà không có IL-7 và sau đó trong 15 phút với 5ng/ml IL-7 tái tổ hợp của người (cột màu xám): (A) 10µg các dòng MD707-5, MD707-12 hoặc MD707-13 hoặc N13B2-G4 khám; (B) 50ng N13B2, H3L4 dòng HAL hoặc 1A11 hoặc môi trường làm đối chứng. Sau đó các tế bào được nhuộm ở 4°C bằng các mAb kháng CD127 người có bán trên thị trường để đánh giá sự biểu hiện chuỗi alpha của thụ thể IL-7 tại mức màng tế bào.

Các kháng thể MD707-5, MD707-12 và MD707-13 gây cảm ứng sự nội nhập của thụ thể ở 37°C cùng hoặc không cùng với IL-7, trong khi N13B2-G4 khám không gây cảm ứng. Kháng thể HAL gây cảm ứng giảm sự biểu hiện trên bề mặt tế bào của CD127 trong điều kiện bất kỳ. Kết quả ở 4°C chỉ ra rằng kháng thể 1A11 cạnh tranh nhẹ với kháng thể được sử dụng để đánh dấu, trong khi HAL thể hiện sự cạnh tranh mạnh mẽ và N13B2 không cạnh tranh. Ở 37°C, không thấy có vết nhuộm trên bề mặt tế bào với sự có mặt của HAL, trong khi 1A11 một mình gây cảm ứng giảm mạnh sự biểu hiện

trên bề mặt tế bào của CD127 và khi kết hợp với IL-7, sự biểu hiện trên bề mặt tế bào được giảm khoảng 90%. Ngược lại, N13B2 không làm giảm sự biểu hiện trên bề mặt tế bào của CD127 ở 4°C, và cũng không gây cảm ứng giảm sự biểu hiện trên bề mặt tế bào của CD127 khi sử dụng một mình, và nó ức chế sự giảm quan sát được khi có mặt của IL-7.

Fig.17 thể hiện: (A) nghiên cứu được động học và dược lực học của việc dùng mAb N13B2 và MD707-13 trên các loài linh trưởng không phải người. Các con khỉ đầu chó (*papio anubis*) được điều trị trong tĩnh mạch bằng N13B2-IgG1 10mg/kg (n=3, hình vuông đen), N13B2-IgG4 (n=3, hình tròn đen) hoặc MD707-13-IgG4 (n=3, hình tròn trắng). Nồng độ của mAb kháng CD127 trong huyết thanh được giám sát bằng ELISA. (B) song song, thể hiện sự biểu hiện của CD127 trên bề mặt của các lympho bào T huyết được giám sát bằng cách đếm tế bào theo dòng và được chuẩn hóa đến mức đo được trước khi tiêm mAb (được biểu thị bằng đường nét đứt). * $p < 0,05$. Tổng mức huyết tương là có thể so sánh được theo thời gian đối với tất cả ba kháng thể. Sự biểu hiện trên bề mặt tế bào của CD127 bị giảm xuống sau khoảng 8 ngày điều trị bằng MD707-13, trong khi không thấy có sự giảm khi điều trị bằng dòng bất kỳ trong số các dòng N13B2 được kiểm tra.

Fig.18 thể hiện các con khỉ đầu chó (*papio anubis*) được điều trị trong tĩnh mạch bằng N13B2-IgG1 10mg/kg (n=3, hình vuông đen), N13B2-IgG4 (n=3, hình tròn đen) hoặc MD707-13-IgG4 (n=3, hình tròn trắng). Tần suất các lympho bào T điều hòa ($CD3^+ CD4^+ CD25^{high} Foxp3^+$) trong máu và các hạch bạch huyết (được biểu thị dưới dạng % của các tế bào T dương tính với CD4) cũng như số lượng tuyệt đối của các lympho bào T điều hòa (được biểu thị dưới dạng tế bào/mL) được giám sát ở ngày 0 và 2 tuần sau khi dùng các mAb. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Tất cả ba kháng thể đều gia tăng tổng số lượng các tế bào T điều hòa trong máu và gia tăng tỷ lệ các tế bào T điều hòa trong cả máu và các hạch bạch huyết.

Fig.19 thể hiện sự ức chế *in vitro* sự biểu hiện integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và $\alpha 4/\beta 7$. A. thể hiện phần trăm của lympho bào T người dương tính với $\alpha 4$ và dương tính với $\alpha 4/\beta 7$, sau 9 ngày nuôi cấy cùng hoặc không cùng với 5ng/ml của IL-7 người, thử nghiệm bằng FACS. B. giống như trên, với nồng độ mAb N13B2 thể hiện được bổ sung vào môi trường ở ngày 0. Các đường nét đứt thể hiện mức cơ sở trong điều kiện đối chứng (không có IL-7 và mAb N13B2). Mức tăng biểu hiện các integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và $\alpha 4/\beta 7$ được

cảm ứng bởi IL-7 được ngăn chặn bằng mAb N13B2 được làm giống như của người *in-vitro* (nó được ngăn chặn hoàn toàn ở nồng độ kháng thể khoảng $\sim 2\mu\text{g/mL}$).

Fig.20 thể hiện sự ức chế *in vivo* sự biểu hiện integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và $\alpha 4/\beta 7$. 40×10^6 tế bào đơn nhân máu ngoại biên của người được tiêm vào trong phúc mạc của chuột nhắt suy giảm miễn dịch được chiếu xạ (chuột nhắt được làm bất hoạt chuỗi gama của thụ thể IL-2/NOD/SCID). Phần trăm của các lympho bào T dương tính với $\beta 7$ huyết (trái) và thể cấy ghép các lympho bào T người dương tính với $\beta 7$ (phải) sau hai tuần điều trị bằng dung dịch đệm đối chứng ($n=5$) hoặc mAb N13B2 (5mg/kg, $n=5$), được đánh giá bằng FACS. ** $p < 0,01$. N13B2 làm giảm đáng kể tỷ lệ của các tế bào T dương tính với $\beta 7$, và thể cấy ghép của các tế bào T dương tính với $\beta 7$.

Fig.21 thể hiện tác dụng của kháng thể N13B2 trên mô hình DTH (Delayed-Type Hypersensitivity: quá mẫn muộn), mô hình bệnh vảy nến *in vivo*. Các con khỉ đầu chó (papio anubis) được chủng ngừa BCG (Bacillus Calmette-Guerin) được thử thách bằng sự tiêm trong chân bì 2000 (A) hoặc 1000 (B) đơn vị tuberculin tinh khiết để gây cảm ứng đáp ứng quá mẫn muộn và đường kính của ban đỏ được ghi lại mỗi ngày (dấu hoa thị; đường nét đứt). Một tháng sau, các con vật này được điều trị trong tĩnh mạch bằng 10mg/kg N13B2-IgG1 ($n=3$, hình vuông đen), N13B2-IgG4 ($n=3$, hình tròn đen) hoặc MD707-13-IgG4 ($n=3$, hình tròn trắng). Bốn giờ sau khi dùng các mAb, các con vật này được thử thách lần nữa bằng sự tiêm trong chân bì 2000 (A) hoặc 1000 (B) đơn vị tuberculin tinh khiết để gây cảm ứng đáp ứng quá mẫn muộn và đường kính của ban đỏ được ghi lại mỗi ngày (đường nét liền). Kháng thể N13B2 mà không phải MD707-13, ức chế đáp ứng của các lympho bào ghi nhớ, như được đo bằng đường kính của ban đỏ sau lần thử thách thứ hai.

Fig.22 thể hiện các con khỉ đầu chó (papio anubis) được điều trị trong tĩnh mạch bằng 10mg/kg của N13B2-IgG1 ($n=3$, hình vuông đen), N13B2-IgG4 ($n=3$, hình tròn đen) hoặc MD707-13-IgG4 ($n=3$, hình tròn trắng) hoặc dung dịch đệm đối chứng ($n=3$, đường nét đứt). Bốn giờ sau, các con vật này được nhận liều tiêm trong tĩnh mạch 1,5ml các tế bào hồng cầu của cừu (sheep red blood cells: SRBC) ở nồng độ 10%. Độ chuẩn IgG đặc hiệu kháng SRBC được giám sát 1 tuần và 2 tuần sau khi tiêm SRBC và được chuẩn hóa đến các độ chuẩn của chúng ở ngày 0. * $p < 0,05$. N13B2, mà không phải MD707-13, ức chế đáp ứng miễn dịch thể dịch, như được đo bằng độ chuẩn IgG đặc hiệu.

Fig.23 thể hiện trình tự protein của S228P_h3 IgG4 VH N13B2 được làm giống như của người: trình tự được bôi màu xám là các CDR, các axit amin được gạch chân và bôi đậm là được đột biến (V42I, A54S, D82N, M108L), trình tự được gạch chân là trình tự IgG4 được đột biến (S228P).

Fig.24 thể hiện trình tự protein của Ckappa_h3 VL N13B2 được làm giống như của người: trình tự được bôi màu xám là các CDR, các axit amin được gạch chân và bôi đậm là được đột biến (V54I, Y77F, F93Y+ N31Q, S59T), trình tự được gạch chân là trình tự IgG4 được đột biến (S228P).

Fig.25 thể hiện N13B2 bảo vệ chống chết trên mô hình chuột nhắt bị bệnh viêm: bệnh mảnh ghép kháng lại ký chủ được cảm ứng trên chuột nhắt được làm giống như của người (xem 0). Phần trăm số chuột nhắt NSG sống sót được tiêm bằng 50 triệu PBMC người vào ngày 0 không được điều trị (hình vuông màu trắng, n=14) hoặc được điều trị ba lần một tuần bằng cách tiêm trong phúc mạc 5mg/kg N13B2 kháng (hình tròn đen, n=19).

Fig.26 thể hiện N13B2 đặc biệt ngăn chặn sự viêm ruột kết trên mô hình chuột nhắt bị bệnh viêm (xem 0). Tại thời điểm làm chết nhẹ nhàng (tức là tại thời điểm giảm 25% trọng lượng hoặc 100 ngày sau khi tiêm), sự thâm nhiễm tế bào viêm vào mỗi mô của chuột nhắt NSG được tiêm 50 triệu PBMC người ở ngày 0 và được điều trị (màu đen) hoặc không được điều trị (màu trắng) ba lần mỗi tuần bằng 5mg/kg N13B2, được phân tích bằng phương pháp mô học trên các lát 10µm được nhuộm bằng hematoxinin và eosin. Kết quả được thể hiện như sau: A. Ruột kết, B. Ruột, C. Gan và D. Phổi. Số liệu là trị số trung bình +/- SEM của ít nhất n=8 con trên một nhóm.

Fig.27 thể hiện các miền epitop trên protein CD127 (Uniprot P16871) mà được nhận biết bởi kháng thể N13B2. Các axit amin dưới phong chữ bôi **đậm** tương ứng với các trình tự tạo thành epitop cấu dạng được nhận biết bởi N13B2; các axit amin được bôi nền màu xám là quan trọng đối với tương tác với IL-7; các axit amin mà được gạch ngang qua cấu thành peptit tín hiệu của CD127.

Fig.28 thể hiện thử nghiệm đồng kết tủa miễn dịch của phức hợp CD127/IL7/CD132 với các kháng thể kháng hCD127 (0). Các làn: 1- PBL một mình, 2- PBL+IL7, 3- PBL+IL7+N13B2, 4- PBL+IL7+MD707-13, 5- CD132-Fc (72Kda) hoặc CD-127-Fc (80KDa). Sự đồng kết tủa miễn dịch của các mẫu trên cột kháng

hCD127 (MD707-9). Các sản phẩm rửa giải được phân tích bằng cách thẩm tách Western với (A) kháng thể chống kháng CD132 người được phát hiện bằng kháng thể dễ kháng thể được đánh dấu bằng peroxidaza hoặc với (B) kháng thể chuột chống kháng CD127 người và được phát hiện bằng kháng thể lừa kháng chuột chống được đánh dấu bằng peroxidaza.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Điều chế và chọn lọc các Mab kháng CD127 người mới

Các con chuột cống được gây miễn dịch bằng hCD127-Ig tái tổ hợp (hCD127 được dung hợp với mảnh ổn định của globulin miễn dịch - Sino Biologicals, Bắc Kinh, Trung Quốc; số tham chiếu 10975-H03H) và các kháng thể đơn dòng được dẫn xuất theo các kỹ thuật thông thường. Phương thức gây miễn dịch được sử dụng là như sau: Thử nghiệm Fc CD127 tái tổ hợp (10975-H03H Sino Biological, Bắc Kinh, Trung Quốc) được sử dụng để gây miễn dịch các con chuột cống thuộc chủng LOU/C Igk1a. Năm mươi microgam protein được tạo huyền phù trong tá dược Freund đầy đủ (Complete Freund Adjuvant) và được dùng dưới da. Sau 20 ngày, thực hiện tiêm gọi lại protein được tạo huyền phù trong tá dược Freund không đầy đủ. Việc tiêm gọi lại tương tự khác được thực hiện vào ngày 60 và việc tiêm tăng cường được thực hiện vào ngày 90 bằng 100 microgam protein, 4 ngày trước khi thu gom các tế bào lách.

Khối tế bào lai được thu lấy bằng cách dung hợp các tế bào lách đơn nhân với tế bào u tế bào miễn dịch của chuột cống LOU: IR983F, là dòng tế bào kháng azaguanin và không tiết, theo quy trình đã được mô tả (Chassoux et al, 1988). Đầu tiên, khối tế bào lai được sàng lọc theo khả năng của các kháng thể đơn dòng được tiết trong việc liên kết với phân tử CD127 tái tổ hợp (thử nghiệm Fc CD127; 10975-H03H, Sino Biological, Bắc Kinh, Trung Quốc).

Sau khi chọn lọc, khối tế bào lai được nuôi cấy trong môi trường DMEM đầy đủ. Dịch nổi được cô bằng cách siêu lọc (Centramate, Pall) và được tinh chế bằng ái lực dựa trên phương pháp sắc ký Protein G (HiTrap, GeHealthcare). Thực hiện rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải glyxin 0,1M độ pH 2,8. Các globulin miễn dịch tinh khiết thu được được đánh giá về hoạt tính kháng CD127 người trong thử nghiệm ELISA.

Trong số các dòng được chọn đầu tiên, được chọn dựa trên sự nhận biết bằng các kháng thể được tiết của CD127 tái tổ hợp, 2 dòng được chọn lọc tiếp bằng cách đếm tế bào theo dòng theo sự nhận biết của CD127 được biểu hiện bởi các tế bào T của người và theo tính chất đối kháng của chúng liên quan đến TSLP.

Các kháng thể được sản sinh và kiểu phụ của chúng cũng như các ái lực của chúng được đặc trưng hóa bằng phép đo cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng công nghệ BIAcore.

Ví dụ 2: Đánh giá khả năng nhận biết rCD127 của các Mab kháng h-CD127 bằng phương pháp ELISA

hCD127 tái tổ hợp (Sino Biologicals, Bắc Kinh, Trung Quốc; số tham chiếu 10975-H08H) được cố định hóa trên nhựa và các liều Mab gia tăng được bổ sung vào để đo khả năng liên kết. Sau khi ủ và rửa, kháng thể chuột nhất kháng chuỗi kappa chuột cống được đánh dấu bằng peroxidaza (AbdSerotec) được bổ sung vào đó và được phát hiện bằng các phương pháp thông thường. Khả năng liên kết được xác nhận đối với mỗi kháng thể.

Ví dụ 3: Ức chế sự truyền tín hiệu IL7 (pSTAT5)

Các tế bào bạch cầu đơn nhân to máu ngoại biên của người (Human peripheral blood monocyctic cell: PBMC) được thu hoạch bằng gradien Ficoll từ những người tình nguyện viên khỏe mạnh được ủ trong môi trường không huyết thanh với nồng độ khác nhau của các kháng thể cần quan tâm trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng, trước khi ủ bằng 0,1 hoặc 5ng/ml của IL-7 tái tổ hợp của người (rhIL-7; AbD Serotec, số tham chiếu PHP046) trong 15 phút ở 37°C. PBMC không được xử lý bằng rhIL-7 được phân tích làm tín hiệu nền, trong khi các tế bào được xử lý bằng IL-7 không có kháng thể được dùng làm đối chứng âm. Sau đó PBMC nhanh chóng được làm đông lạnh và rửa bằng dung dịch đệm FACS để chấm dứt phản ứng. Sau đó các tế bào được ủ trong 15 phút bằng dung dịch Cytofix/Cytoperm lạnh (BD Bioscience, số tham chiếu 554722), rửa hai lần bằng dung dịch đệm Perm/Wash (Bd Bioscience) và nhuộm bằng kháng thể kháng CD3 FITC người (Bd Bioscience số tham chiếu 557694) trong 30 phút trên đá. Sau đó PBMC được rửa hai lần bằng dung dịch đệm Perm/Wash và được tạo tính thấm trong dung dịch đệm BD Perm III (Bd Bioscience, số tham chiếu 558050) trong 30 phút. Sau đó các tế bào được rửa hai lần trong dung dịch đệm FACS (và/hoặc PBS với

1% BSA và 0,1% azit) và được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng với kháng thể kháng pSTAT5 người Alexa 647 (BD Bioscience, số tham chiếu 612599). Các mẫu được phân tích trên thiết bị FACS BD CANTO II. Như được thể hiện trên 0 và 0, N13B2 và các kháng thể khảm thu được từ đó (N13B2-G1 và N13B2-G4) là các chất ức chế mạnh sự phosphoryl hóa STAT5; với mức ức chế trên 50% ở các nồng độ thấp như 50ng/ml và mức ức chế trên 80% (đối với 0,1ng/ml IL-7) hoặc trên 90% (đối với 5ng/ml IL-7) ở các nồng độ kháng thể thấp như 100ng/ml.

Ví dụ 4: Nồng độ bán ức chế (IC₅₀) của các kháng thể kháng IL-7R α người khác nhau được thể hiện trên bảng 1.

Bảng 8: IC₅₀ của các kháng thể kháng CD127 khác nhau đối với P-STAT5 cảm ứng bởi 100 pg/ml rhIL7

IC ₅₀	N13B2	N13E5	N13K12	MD707-3	N13B2-G1	N13B2-G4
pg/ml	43	50	62	1090	28	37

Ví dụ 5: Thử nghiệm nội nhập IL7R bằng cách xác định hàm lượng flo tế bào

Thử nghiệm nội nhập có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kính hiển vi đồng tụ như được mô tả chi tiết trong phần Vật liệu và phương pháp của Henriques et al (2010) và Luo et al. (2011). Để quan sát sự nội nhập của CD127 với sự vắng mặt của IL-7, các kháng thể hN13B2, H3L4 dòng HAL (Patent Mỹ số 8,637,27) hoặc 1A11 (công bố đơn quốc tế số WO2011094259) ở nồng độ cuối cùng là 50ng/ml, (hoặc các kháng thể MD707-5, MD707-12, MD707-13 hoặc N13B2-G4 ở nồng độ cuối cùng là 10 μ g/ml, được ủ với PBMC người (100000 tế bào/lỗ) trong môi trường không chứa huyết thanh (TexMACS, Miltenyi Biotec) trong 30 phút ở 4°C hoặc 37°C. Để quan sát sự nội nhập của CD127 với sự vắng mặt của IL-7, các điều kiện trước khi ủ tương tự được sử dụng ở 37°C cùng với các kháng thể và sau đó các tế bào được kích thích bằng IL7 tái tổ hợp (AbD Serotec, số tham chiếu PHP046) ở nồng độ 0,1ng/ml trong 15 phút ở 37°C. Phản ứng được chấm dứt ở 4°C, và các tế bào được rửa 3 lần bằng PBS-1%BSA-0,1% azit trước khi nhuộm với kháng thể kháng CD127 được đánh dấu bằng PE (dòng hIL7R-M21, BD Bioscience, số tham chiếu 557938) được pha loãng ở mức 1/10 trong PBS-1%BSA-0,1% azit và được ủ 15 phút ở 4°C. Sau khi rửa, các tế bào được phân tích bằng cách xác định hàm lượng flo tế bào bằng tế bào kế CantoII (BD

Biosciences). Các kết quả được thể hiện dưới dạng 0 là đại diện của ba thử nghiệm độc lập.

Phương pháp này là dễ dàng sửa lại cho hợp với các đĩa 96 lỗ để thực hiện sàng lọc và để chọn lọc các kháng thể mà phong bế sự nội nhập CD127 phụ thuộc hoặc không phụ thuộc vào IL7.

Ví dụ 6: Thử nghiệm ái lực kháng thể kháng CD127

Ái lực của kháng thể kháng hCD127 được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt trên Biacore 3000 (GE Healthcare).

Chip CM5 (GE healthcare) được hoạt hóa bằng cách tiêm hỗn hợp NHS / EDC trong 7 phút. CD-127Fc (500µg/mL) được pha loãng trong dung dịch đệm maleat 5mM độ pH bằng 6,2 và gốc este succinimit được tiêm vào đó cho đến khi tín hiệu 300RU mắc vào. Các gốc phản ứng tự do được làm vô hoạt bằng cách tiêm dung dịch etanolamin 1M độ pH bằng 8,5. Các kháng thể được tiêm trên CD 127 được cố định hóa với khoảng nồng độ được quy định trong phần kết quả. Tốc độ tiêm được đặt ở mức 40µL/phút, sự kết hợp được đo trong 3 phút và sự phân ly được đo trong 10 phút. Giữa mỗi chu trình phân tích, chip được phục hồi bằng cách tiêm dung dịch MgCl₂ 5M trong 60 giây.

Các đồ thị đáp ứng theo thời gian thu được được phân tích với mô hình "chất phân tích hóa trị hai" trên phần mềm BIAeval 4.

Như được thể hiện trên 0 và 0 trong đó, N13B2 từ chuột cống và dạng được khám của nó thể hiện ái lực cao đối với CD127, với KD nằm trong khoảng từ 4,9E-11 M đến 8.E-11 M (N13B2 từ chuột cống), 3,77.E-10 (N13B2-G1) và 1,70.E-10 (N13B2-G4). Kháng thể MD707-1 từ chuột cống thể hiện ái lực đối với CD127 thấp hơn so với N13B2 từ chuột cống.

Ví dụ 7: Hoạt tính liên kết kháng thể kháng CD127

Đối với thử nghiệm ELISA loại kẹp, kháng thể lừa kháng IgG người (Fc đặc hiệu) được phủ ở nồng độ 1,2µg/ml lên đĩa P96 và các kháng thể được tinh chế được bổ sung để đo nồng độ theo hàm số của khoảng chuẩn. Sau khi ủ và rửa, kháng thể chuột nhất kháng chuỗi nhẹ của người, kappa đặc hiệu, (Abcam, số tham chiếu ab79115 hoặc Effimune, dòng NaM76-5F3) cộng với kháng thể lừa kháng chuột nhất được đánh dấu

bằng peroxidaza (Jackson ImmunoResearch, số tham chiếu 715-036-151) được bổ sung vào và được phát hiện bằng các phương pháp thông thường.

Hoạt tính liên kết của kháng thể kháng hCD127 được đánh giá bằng thử nghiệm ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay: thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym). Đối với thử nghiệm ELISA, hCD127 tái tổ hợp (Sino Biologicals, Bắc Kinh, Trung Quốc; số tham chiếu 10975-H08H) được cố định hóa trên nhựa ở nồng độ 1µg/ml và kháng thể được tinh chế được bổ sung vào để đo mức liên kết. Sau khi ủ và rửa, kháng thể chuột nhất kháng chuỗi kappa chuột cống được đánh dấu bằng peroxidaza (AbdSerotec) được bổ sung vào đó và được phát hiện bằng các phương pháp thông thường.

Như được thể hiện trên 0 và 0, hoạt tính liên kết của kháng thể N13B2 như được đo bằng phương pháp ELISA là cao, với $ED_{50} = 65,6\text{ng/mL}$ ($ED_{50} < 75\text{ng/ml}$ và $ED_{50} < 100\text{ng/ml}$) đối với kháng thể N13B2 chuột cống kháng hCD127 và ED_{50} là 12,0ng/ml và 12,6ng/ml ($ED_{50} < 15\text{ng/ml}$) đối với hai kháng thể khảm được dẫn xuất từ N13B2 (cN13B2-G1 và cN13B2-G4).

Ví dụ 8: Thử nghiệm độ ổn định

Các kháng thể được làm giống như của người và kháng thể khảm được tinh chế N13B2-G1 được ủ ở 37°C hoặc ở -80°C trong 7 ngày. Hai thử nghiệm được sử dụng để đo độ ổn định của kháng thể: liên kết kháng thể kháng CD127 bằng thử nghiệm ELISA, và sự tạo thành khối kết tụ bằng cách lọc gel. Đối với thử nghiệm ELISA hoạt tính, hCD127 tái tổ hợp (Sino Biologicals, Bắc Kinh, Trung Quốc; số tham chiếu 10975-H08H) được cố định hóa trên nhựa ở nồng độ 1µg/ml và các dịch pha loãng của dịch nổi được bổ sung vào để đo mức liên kết. Sau khi ủ và rửa, kháng thể chuột nhất kháng chuỗi nhẹ của người (kappa đặc hiệu) cộng với kháng thể lừa kháng chuột nhất được đánh dấu bằng peroxidaza được bổ sung và được phát hiện bằng các phương pháp thông thường. Để phân tích sự tạo thành khối kết tụ, mẫu được phân tích trên cột sắc ký lọc gel (Superdex 200, 10/300GL, GeHealthcare) để tách và đánh giá khối kết tụ và monome từ các mẫu.

Ví dụ 9: Sự sản sinh TARC cảm ứng bởi TSLP và sự biểu hiện các dấu chuẩn tế bào đuôi gai trưởng thành CD80 và CD40.

Các tế bào đuôi gai thuộc tủy (DC) được phân lập bằng CD1c (BDCA-1)+ kit phân lập tế bào đuôi gai (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Đức) từ máu của những tình nguyện viên khỏe mạnh (Etablissement Français du Sang, Nantes, Pháp). Các tế bào đuôi gai thuộc tủy được nuôi cấy trong RPMI chứa 10% huyết thanh thai bò, 1% pyruvat, 1% Hepes, 1% L-glutamin và 1% penixilin-streptomycin. Các tế bào được gieo cấy ở mức 5.104 tế bào/lỗ trong các đĩa phẳng 96 lỗ, với sự có mặt của TSLP (15ng/ml), LPS (1µg/ml) hoặc một mình môi trường nuôi cấy, và bổ sung các kháng thể chuột chống kháng CD127 người ở các nồng độ khác nhau. Tại thời điểm 24 giờ nuôi cấy, các tế bào được phân tích bằng cách đếm tế bào theo dòng đối với các dấu chuẩn bề mặt tế bào CD80 của sự trưởng thành (kháng CD80-V450 (BD#560442) và các dịch nổi được thu gom và phân tích khả năng sản sinh TARC bằng thử nghiệm ELISA (các hệ thống R&D, Minneapolis, Mỹ).

Khả năng ức chế sự sản sinh TARC cảm ứng bởi TSLP được đánh giá bằng cách đo mức sản sinh này như nêu trên với sự vắng mặt của kháng thể hoặc với sự có mặt của N13B2 hoặc MD707-6 hoặc kháng thể kháng TSLPR có trên thị trường (R&Dsystems số tham chiếu AF981) ở nồng độ 1µg/ml hoặc 6µg/ml. Như được thể hiện trên 0, N13B2 ức chế sự sản sinh TARC cảm ứng bởi TSLP trên 25% ở các nồng độ thấp như 1µg/mL, tức là hiệu quả như MD707-6 ở nồng độ này.

Khả năng ức chế các dấu chuẩn bề mặt tế bào CD40 và CD80 cảm ứng bởi TSLP được đánh giá bằng cách đo mức biểu hiện này như nêu trên (đối với CD40, kháng thể (kháng CD40-FITC từ Beckton Dickinson số tham chiếu 555588) được sử dụng trong các điều kiện tương tự như các điều kiện nêu trên đối với CD80) với sự vắng mặt của kháng thể (mức biểu hiện được chuẩn hóa ở mức 100% trong điều kiện này) hoặc với sự có mặt của các kháng thể N13B2, MD707-3 hoặc MD707-6 ở nồng độ 6µg/ml. Như được thể hiện trên 0, cả MD707-3 và MD707-6 đều gây cảm ứng sự tăng mức biểu hiện CD40 và CD80, trong khi MD707-3 là chất ức chế tốt đối với sự hoạt hóa STAT5 và chất gắn kết tốt đối với CD127 (0 và 0) và MD707-6 là chất ức chế mạnh đối với sự sản sinh TARC cảm ứng bởi TSLP (0). Mức tăng là ít nhất 20% đối với CD80 và 50% đối với CD40. Ngược lại, kháng thể của sáng chế, N13B2, không làm gia tăng mức biểu hiện của CD40 hoặc CD80 cảm ứng bởi TSLP. Thay vào đó, các mức biểu hiện này là thấp hơn với sự có mặt của TSLP và kháng thể so với trường hợp với sự có mặt của một mình TSLP.

Ví dụ 10: Tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) của các Mab kháng CD127 người

ADCC có nghĩa là vì sự liên kết của kháng thể với epitop được biểu hiện trên các tế bào đích và sự tuyển thêm phụ thuộc vào Fc sau đó các tế bào miễn dịch thực hiện biểu hiện các thụ thể Fc (chủ yếu là các tế bào NK và các lympho bào được hoạt hóa), dẫn đến sự tiêu diệt các tế bào đích chủ yếu bằng các cơ chế dựa trên granzym/perforin.

Các tế bào thực hiện là các tế bào NK người mới sơ cấp được phân tách từ các tế bào đơn nhân máu ngoại vi bằng cách chọn lọc âm tính sử dụng các hạt từ tính (kit phân tách NK, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Đức) và thiết bị phân loại tế bào AutoMACS. Các tế bào NK được ủ qua đêm ở 37°C, 5% CO₂, trong môi trường RPMI 1640 (Life Technologies, Carlsbad, California) được bổ sung 10% FBS (Life Technologies), 100 IU/ml penixilin (Life Technologies), 0,1 mg/ml streptomycin (Life Technologies), 2mM L-glutamin (Life Technologies) và 150 IU/ml IL-2 người (Roche, Basel, Thụy Sĩ). Các tế bào đích (dòng tế bào BAF/3 được chuyển nhiễm bằng CD127 người (Park et al., 2000)) được đánh dấu bằng 100µCi (3,7 MBq) của ⁵¹Cr (PerkinElmer) trong 1 giờ ở 37°C và được rửa năm lần bằng môi trường nuôi cấy. Các tế bào đích được ủ bằng các kháng thể pha loãng hoặc bằng tá được (môi trường nuôi cấy) trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng và 10 000 tế bào được cho vào trong đĩa đáy hình chữ U 96 lỗ. Các tế bào T thực hiện được bổ sung với tỷ lệ tế bào 10:1 (thể tích cuối cùng: 200µl) trong thời gian ủ 4 giờ ở 37°C. Sau đó tổng cộng 25µl dịch nổi được thu hoạch và được đếm bằng bộ đếm gama (Packard Instrument).

Cả Mab MD707-3 có nguồn gốc từ chuột cống và Mab N13B2-G1 khảm (do đó có miền Fc typ IgG1) đều gọi ra ADCC. N13B2-G4 khảm (có miền Fc typ IgG4) không thể hiện hoạt tính ADCC bất kỳ và được sử dụng làm đối chứng âm. Thử nghiệm này, không có mối tương quan trực tiếp giữa ái lực, khả năng liên kết và các tính chất ADCC, điều này chỉ ra rằng các tính chất ADCC không thể dự báo được từ các phân tích khả năng liên kết.

Ví dụ 11: Các nucleotit và các trình tự axit amin của các Mab kháng CD127 người

Các vùng VH và VL của dòng N13B2 được giải trình tự bằng cách sử dụng công nghệ PCR RACE. Ngắn gọn là, toàn bộ ARN được chiết, được phiên mã ngược và cADN thu được được poly-adenyl hóa ở đầu 3' của các phân tử sử dụng dATP và

enzym transferaza điểm cuối. Phản ứng PCR 35 chu trình đầu tiên được thực hiện sử dụng đoạn mỗi neo oligodT và enzym Herculease (Stratagene). PCR 35 chu trình thứ hai được thực hiện sử dụng các đoạn mỗi neo PCR được lồng ghép. Sau đó sản phẩm PCR thu được được tách dòng TA trong *E. Coli* và sau khi chọn lọc trên ampicilin, các khuẩn lạc thu được được sàng lọc bằng sự định hình enzym giới hạn và được xen đoạn cADN đã được giải trình tự.

Ví dụ 12: Sự làm giống như của người

Sự làm giống như của người đối với kháng thể đơn dòng N13B2 của chuột được thực hiện bằng cách sử dụng công nghệ ghép CDR chuẩn. Nguyên tắc của phương pháp này là tái tạo hình kháng thể người sao cho nó chỉ chứa các vùng quyết định bổ cứu (complementarity determining regions: CDRs) từ kháng thể đơn dòng của chuột nhằm không chỉ giảm khả năng sinh miễn dịch của kháng thể ở người mà còn cải thiện các tính chất sinh lý của phân tử được ghép CDR.

Sự làm giống như của người bằng cách ghép CDR yêu cầu là các gốc liên kết kháng nguyên từ kháng thể mẹ của chuột được giữ lại trong phiên bản được làm giống như của người. Các gốc liên kết với các CDR, gọi là các gốc "Vernier", được phát hiện là tác động đến các cấu dạng CDR và tinh chỉnh sự nhận biết kháng nguyên. Chothia and Lesk, (1987) đã phân lập các cấu dạng CDR theo các gốc "hộp chuẩn", một số gốc này được nằm trong bản thân các CDR, và một số gốc khác nằm trong các vùng khung. Do đó, việc nhận diện các gốc "Vernier" và "hộp chuẩn" này là bước quan trọng. Phương thức được sử dụng là dựa trên phương pháp được khai phá bởi Greg Winter và các cộng sự (Paus and Winter, 2006) tại Hội đồng nghiên cứu y khoa, Cambridge, Anh và sử dụng các gốc CDR được quy định bởi Kabat.

Việc chọn các vùng nhận khung của người mà trên đó các vùng CDR N13B2 của chuột cố gắng được ghép được thực hiện bằng cách tra cứu cơ sở dữ liệu các gen V của người và chuột IMGT sử dụng IgBLAST – công cụ được phát triển tại NCBI để tạo điều kiện thuận lợi cho việc phân tích các trình tự vùng biến đổi globulin miễn dịch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast> ; Ye et al., 2013) với các trình tự VH và VL của N13B2 chuột cố gắng làm dữ liệu đầu vào. Ngoài ra, chiến lược được áp dụng ở đây sử dụng các trình tự dòng mầm của người mà là các trình tự tự nhiên của người không chứa các thể siêu đột biến được phát hiện trong trình tự protein và trình tự được dẫn

xuất từ cADN. Các gen dòng mầm tương tự nhất với các trình tự VL và VH của chuột cống thường được chọn. Các vùng khung nhận VH và VL của dòng mầm của người được nhận diện bằng cách sắp xếp thẳng hàng các trình tự VH và VL của kháng thể N13B2 mẹ và dựa trên các tiêu chuẩn sau: 1. Độ tương đồng về trình tự qua khung và các CDR là như được quy định bởi Kabat, 2. Các gốc mặt phân giới nội chuỗi tương đồng và tương thích, 3. Các vòng hỗ trợ với các cấu dạng CDR mẹ hợp chuẩn và các gốc Vernier.

Vài trình tự được làm giống như của người khác nhau được kiểm tra đối với N13B2 để chọn ra trình tự tốt nhất, trình tự này vẫn giữ khả năng liên kết và hoạt tính sinh học. Đối với các biến thể được làm giống như của người của N13B2, trình tự biến đổi của chuỗi nặng được làm giống như của người (VH) của kháng thể N13B2 được tách dòng bằng EcoRV trong plasmit biểu hiện pFuseCHIg-hG1e4 (Invivogen, Toulouse) chứa các miền CH1-CH2-CH3 của hIgG1, được đột biến ở E333A để gia tăng ADCC. Trình tự biến đổi của chuỗi nhẹ được làm giống như của người (VL) của kháng thể N13B2 được tách dòng bằng BsiWI trong plasmit biểu hiện pFuse2CLIg-hk (Invivogen, Toulouse) chứa CLkappa của người.

Trong các tế bào COS, các tác giả sáng chế đã đồng chuyển nhiễm, bằng phương pháp lipofectamin, plasmit chứa VH-hFcG1 bằng plasmit chứa VL-CLk. Sau quá trình ủ 48 đến 72 giờ, dịch nổi được thu hồi và tinh chế bằng ái lực bằng phương pháp sắc ký Protein G (HiTrap, GE Healthcare) với dung dịch đệm rửa giải glyxin 0,1M độ pH bằng 2,8. Kháng thể đã tinh chế được thẩm tách trong PBS và cô. Chúng được định lượng bằng phương pháp ELISA kẹp và được kiểm tra trong thử nghiệm hoạt tính đối với kháng nguyên CD127.

Ví dụ 13: Thử nghiệm các kháng thể kháng IL7R α trên IL-7 trên các mô hình bệnh viêm khác nhau *in vivo*

Nhằm kiểm tra tác dụng của kháng thể đối kháng trong việc gây cảm ứng bệnh viêm ruột kết ở các con chuột nhắt NSG được làm giống như của người, các tác giả sáng chế đã thực hiện một chuỗi các thử nghiệm trên mô hình TNBS, các thử nghiệm này đã thể hiện tác dụng có thể đo được. Việc sử dụng các hapten như TNBS (axit 2,4,6-trinitrobenzen sulfonic) cho phép gây cảm ứng sự bắt chước mô hình miễn dịch học (Nancey et al., 2008). Bệnh viêm ruột kết được gây cảm ứng ở các con chuột nhắt

bằng cách dùng trong trực tràng chất TNBS (Sigma Chemical, L'Isle d'Abeau Chesne, Pháp) đã được hòa tan trong etanol ở ngày 0 trên bốn con chuột được làm giống như của người. Ban đầu, các con chuột nhắt này được gây mê bằng cách hít hỗn hợp khí. Vào ngày 7, các con chuột này được làm chết trong điều kiện gây mê bằng cách ngộ độc CO₂ để dùng cho một vài thử nghiệm (dữ liệu không được thể hiện). Một số con chuột bị chết trước ngày 7 vì điểm lâm sàng của chúng kém.

Do đó, hai nhóm chuột nhắt mới được điều trị bằng PBS hoặc bằng các liều tiêm 210 μ L N13B2 kháng IL7R α ở nồng độ 0,7mg/mL mỗi 2 ngày bắt đầu từ ngày trước khi xử lý TNBS. Các phương pháp phân tích tương tự được thực hiện đối với các kháng thể được tạo ra trong quá trình khai thác mô hình này.

Sau đó các tác giả sáng chế đã kiểm tra hiệu lực kháng thể N13B2 trên mô hình chuột nhắt mắc bệnh mảnh ghép kháng lại ký chủ (GVHD) được làm giống như của người. Mô hình này bắt chước bệnh viêm toàn bộ. Một số con chuột nhắt NOD/scid/IL-2R γ ^{-/-} (NSG) 7 đến 12 tuần tuổi (Charles River, L'arbrèsle, Pháp) được chiếu xạ (3Gy) và được truyền trong phúc mạc (intraperitoneally: i.p.) 50 triệu PBMC người từ các người cho khỏe mạnh như đã được mô tả bởi Poirier et al., 2012. Sau đó, các con chuột này được duy trì trong các điều kiện vô trùng và được giám sát ba lần một tuần về tiến triển trọng lượng và đánh giá lâm sàng. Nhóm đối chứng không được điều trị sau khi truyền các tế bào và nhóm điều trị nhận, từ ngày 0 và ba lần mỗi tuần, các liều tiêm i.p mAb N13B2 khám 5mg/kg. Chẩn đoán GVHD được đưa ra đối với con chuột khi mức giảm trọng lượng là 20%. Các con chuột được phát hiện là giảm trọng lượng trên 25%, và các con chuột sống sót sau 100 ngày từ ngày 0 được làm chết nhẹ nhàng. Sau khi làm chết nhẹ nhàng, các mô ruột kết, ruột, gan và phổi được đóng băng trong nitơ lỏng và Tissu-tek để phân tích mô học. Các phần đóng băng (10 μ m) từ các mô này được làm khô bằng không khí ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trước khi cố định hóa bằng axeton trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó được nhuộm bằng dung dịch hematoxylin và eosin. Kết quả được thể hiện trên 0 và 0.

Ví dụ 14: Phân tích các thông số lâm sàng khác nhau

Khả năng sống sót (0A): các tác giả sáng chế đánh giá tỷ lệ sống sót theo việc xử lý hóa chất và việc sử dụng kháng thể kháng IL7R α . Phần trăm sống sót có xu hướng quan trọng hơn đối với nhóm Hu-TNBS + IL7R α so với nhóm Hu-TNBS + PBS (0A).

Thực vậy, các tác giả sáng chế đã quan sát thấy rằng 100% số chuột nhất thuộc nhóm Hu-TNBS + IL7R α sống sót đến 5 ngày trong khi ở nhóm Hu-TNBS + PBS, ba con chuột đã phải được làm chết nhẹ nhàng trước J5.

Trọng lượng (0B): trong các nhóm được xử lý TNBS từ ngày 0 tiêm trong trực tràng 5% TNBS / etanol 50%, các tác giả sáng chế đã quan sát thấy sự giảm trọng lượng lên tới 20% đối với cả hai nhóm. Tuy nhiên, ở nhóm Hu-TNBS + IL7R α , các con chuột tăng trọng lượng từ J3 trong khi ở nhóm Hu-TNBS + PBS, sự giảm trọng lượng vẫn tiếp tục (0B). Cần lưu ý rằng các con chuột phải bị làm chết để thu thập dữ liệu sinh học và quy trình trong thời hạn dài hơn sẽ xác nhận sự lấy lại trọng lượng.

Khả năng sống sót (0): các tác giả sáng chế đánh giá tỷ lệ sống sót theo việc tiêm PBMC của người (phát triển GvHD) và việc sử dụng kháng thể N13B2 kháng IL7R α . Tỷ lệ các con vật sống sót ở các con chuột được điều trị bằng kháng thể là tốt hơn 30% so với ở các con chuột đối chứng (tỷ lệ chết của các con chuột đối chứng là 100% sau 60 ngày). Kết quả này thể hiện rằng kháng thể N13B2 bảo vệ kháng lại GvHD và sự chết.

Sự thâm nhiễm mô (0): ruột kết, ruột, gan và phổi từ các con chuột bị chết và các con chuột sống sót (nhưng được làm chết nhẹ nhàng) được điều trị hoặc không được điều trị được phân tích mô học về tỷ lệ thâm nhiễm tế bào viêm của chúng (điểm mô học được xác định). Các tác giả sáng chế đã quan sát thấy rằng ruột kết của con chuột được điều trị bằng N13B2 có mức thâm nhiễm tế bào ít hơn so với đối chứng. Không thấy có khác biệt ở ruột, gan và phổi giữa hai điều kiện.

Các con chuột được điều trị bằng N13B2 thể hiện tỷ lệ sống sót 30% so với đối chứng. Mức thâm nhiễm tế bào đặc trưng cho sự viêm là không được cải biến bằng việc điều trị trong các mô ruột, gan và phổi, điều này thể hiện rằng trong mô hình viêm này N13B2 không bảo vệ kháng lại sự viêm ở các mô này. Tuy nhiên, N13B2 đã gây cảm ứng sự giảm 50% mức thâm nhiễm tế bào ở ruột kết. Tác dụng này có thể có tương quan với hoạt tính của kháng thể N13B2 đối với sự biểu hiện integrin $\alpha 4\beta 7$ như được thể hiện trên Fig.19 và Fig.20. Thực vậy, integrin $\alpha 4\beta 7$ được phát hiện là đóng vai trò quan trọng trong việc trở về của các lympho bào được hoạt hóa về ruột. Do đó, sự giảm sự biểu hiện của integrin cảm ứng bởi kháng thể N13B2 có thể chịu trách nhiệm cho sự giảm mức thâm nhiễm tế bào quan sát được ở ruột kết (Fig.26). Nên nhấn mạnh rằng

sự không bảo vệ rõ ràng ở các mô khác có thể là cụ thể đối với mô hình được sử dụng ở đây, và sẽ không dẫn đến kết luận rằng tác dụng bảo vệ của kháng thể chỉ hạn chế ở ruột kết. Cụ thể là, khả năng sống sót cao hơn rất nhiều của các con chuột được điều trị thể hiện rằng tác dụng bảo vệ của kháng thể có tác động tích cực mạnh đối với đến tình trạng chung của các con chuột.

Ví dụ 15: Hiệu lực *in vivo* của kháng thể không được nội nhập

Động vật

Các con khỉ đầu chó (*Papio anubis*, từ CNRS Primatology Center, Rousset, Pháp) là âm tính đối với tất cả các kiểm tra kiểm dịch, gồm kiểm tra tuberculin trên da. Các con khỉ này được nhốt ở khu động vật lớn của phòng thí nghiệm của các tác giả theo các khuyến nghị của Institutional Ethical Guidelines của Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, Pháp. Tất cả các thử nghiệm được thực hiện trong điều kiện gây mê chung bằng Zoletil (Virbac, Carron, Pháp). Các nghiên cứu được động học và được lực học được thực hiện trong suốt các thử nghiệm DTH trên năm con khỉ đầu chó nhận liều bolus trong tĩnh mạch của N13B2-IgG1 hoặc N13B2-IgG4 hoặc MD707-13-IgG4 với lượng 10mg/kg.

Chủng ngừa BCG và thử nghiệm DTH

Theo Poirier et al, (Poirier et al., 2011), các con khỉ đầu chó được gây miễn dịch trong chân bì (intradermally: i.d.) hai lần bằng vắc xin trực khuẩn Calmette–Guérin (BCG) (0.1 ml; 2–8 ¥ 10⁵ UFS; Sanofi Pasteur MSD, Lyon, Pháp) ở vùng phía trên của đùi, 4 và 2 tuần trước khi kiểm tra DTH trên da. Để khảo sát tính miễn dịch tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên trước khi kiểm tra DTH trên da, sự gây miễn dịch thành công được xác nhận bằng thử nghiệm vết miễn dịch được liên kết enzym interferon (IFN)-g (interferon (IFN)-g enzyme-linked immunospot: ELISPOT) (kit ELISPOT IFN-g loài linh trưởng không phải người; R&D Systems, Minneapolis, MN, Mỹ) đối với PBMC mới được phân lập, theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Các phản ứng trong chân bì (Intradermal reaction: IDR) được thực hiện với các lần tiêm trong chân bì cặp đôi với hai liều (1000 UI hoặc 2000 UI) dẫn xuất protein được tinh chế bằng tuberculin (tuberculin-purified protein derivative: PPD; Symbiotics Corporation, San Diego, CA, Mỹ) với lượng 0,1ml trong da trên lưng phải của các con vật. Dung dịch

nước muối (0,1ml) được sử dụng làm đối chứng âm. Các phản ứng của da ở các vị trí tiêm được đo sử dụng thước cặp vuông. Đường kính của mỗi vết ban cứng được đo bởi hai quan sát viên từ các ngày 3 đến 8, và được xem như là dương tính nếu đường kính > 4mm. Trị số trung bình của các số liệu đọc được được ghi lại. Sinh thiết da từ vị trí DTH hoặc đối chứng (nước muối) được thực hiện ở ngày 4 trên một cặp đôi và được đặt trong hộp chất Tissue Tek Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq, Pháp) ở nhiệt độ cắt tối ưu (optimal cutting temperature: OCT) (để phân tích hóa mô miễn dịch. IDR thứ hai được thực hiện sau thời gian thanh lọc 3 tuần và các con vật nhận một liều tiêm trong tĩnh mạch của các kháng thể CD127 khảm (N13B2-IgG1 hoặc N13B2-IgG4 hoặc MD707-13-IgG4) với lượng 10mg/kg 1 ngày trước khi thử thách lần thứ hai bằng PPD. IDR thứ ba được thực hiện sau thời gian thanh lọc 3 đến 6 tuần nữa và các con vật được để không điều trị. Trong một số trường hợp, IDR thứ tư được thực hiện sau thời gian thanh lọc 3 tháng khác và các con vật cũng được để không điều trị.

Ví dụ 16: Biểu hiện $\alpha 4\beta 7$ trên bề mặt tế bào T *in vitro* và *in vivo* trên mô hình chuột nhắt

Để đo mức biểu hiện $\alpha 4\beta 7$ cảm ứng bởi IL7 tại bề mặt tế bào T, lympho bào T của người được kích thích trong 9 ngày ở 37°C, với IL7 (AbD Serotec, số tham chiếu PHP046) ở nồng độ 5ng/ml. Phản ứng được chấm dứt ở 4°C, và được rửa trước khi được nhuộm bằng kháng thể kháng $\alpha 4$ được đánh dấu bằng PerCP/Cy5 (BD Bioscience 563644 dòng 9F10) và kháng thể kháng $\beta 7$ được đánh dấu bằng PE (BD Bioscience, dòng FIB504). Các tế bào dương tính đối với integrin $\alpha 4$ và sau đó là các tế bào dương tính với $\beta 7$ được đo bằng cách đếm tế bào theo dòng. Kháng thể N13B2 được làm giống như của người được bổ sung vào ngày 0 vào môi trường tế bào ở nồng độ khác nhau từ 0,01 đến 20ug/ml.

In-vivo, 40×10^6 tế bào đơn nhân máu ngoại biên của người được tiêm vào trong phúc mạc của chuột suy giảm miễn dịch được chiếu xạ (chuột được làm bất hoạt chuỗi gama của thụ thể IL-2/NOD/SCID). Hai tuần sau khi điều trị bằng dung dịch đệm đối chứng (n=5) hoặc mAb N13B2 (5mg/kg, n=5), phần trăm số lympho bào T dương tính với $\beta 7$ trong máu được đo bằng cách đếm tế bào theo dòng và thể cấy ghép của các lympho bào T dương tính với $\beta 7$ được đo bằng cách đếm tế bào theo dòng. Thể cấy ghép này được đo bằng cách đếm tế bào theo dòng bằng cách phân biệt tế bào dương

tính với CD45 người với các tế bào dương tính với CD45 chuột nhất sử dụng các kháng thể đặc hiệu (PECy7 kháng CD45 người của BD, số tham chiếu 57748, và PerCPCy5.5 kháng CD45 chuột nhất của BD, số tham chiếu 550994) sau đó các tế bào dương tính với $\beta 7$ người được phân tích (BD Bioscience, dòng FIB504).

Ví dụ 17: Định hình kháng thể sử dụng phương pháp vi mảng peptit

Các vi mảng peptit PepStar™ của Technologies chứa các peptit tổng hợp được tinh chế được dẫn xuất từ các kháng nguyên hoặc các nguồn khác mà được cố định hóa một cách chọn lọc hóa học và cộng hóa trị trên bề mặt thủy tinh. Góc liên kết ưa nước được tối ưu hóa được chèn vào giữa bề mặt thủy tinh và trình tự peptit được dẫn xuất từ kháng nguyên để tránh âm tính giả do trở ngại không gian. Đối với các nguyên nhân về mặt kỹ thuật, tất cả các peptit đều chứa glyxin đầu C. Các thử nghiệm định hình đối với các mẫu được thực hiện trên thư viện peptit gồm 52 peptit. Danh sách đầy đủ về các peptit được thể hiện dưới đây:

Bảng 9: Danh sách các peptit được sử dụng trong các thử nghiệm vi mảng peptit

SEQ ID	Trình tự	SEQ ID	Trình tự	SEQ ID	Trình tự
58	ESGYAQNGDLEDAEL	76	FIETKKFLLIGKSNI	94	HDVAYRQEKDENKWT
59	AQNGDLEDAELDDYS	77	KKFLLIGKSNICVKV	95	YRQEKDENK WTHVNL
60	DLEDAELDDYSFSCY	78	LIGKSNICVKVGEKS	96	KDENK WTHVNL SSTK
61	AELDDYSFSCYSQLE	79	SNICVKVGEKSLTCK	97	KWTHVNL SSTKL TLL
62	DYSFSCYSQLEVNGS	80	VKVGEKSLTCKKIDL	98	VNL SSTKL TLL QRKL
63	SCYSQLEVNGSQHSL	81	EKSLTCKKIDLT TIV	99	STKL TLL QRKL QPAA
64	QLEVNGSQHSLTCAF	82	TCKKIDLT TIVKPEA	100	TLL QRKL QPAA MYEI
65	NGSQHSLTCAFEDPD	83	IDLT TIVKPEAPFDL	101	RKLQPAAMY EIKVRS
66	HSLTCAFEDPDVNTT	84	TIVKPEAPFDLSVIY	102	PAAMY EIKVRSIPDH
67	CAFEDPDVNTTNLEF	85	PEAPFDLSVIYREGA	103	YEIKVRSIPDHYFKG
68	DPDVNTTNLEFEICG	86	FDLSVIYREGANDFV	104	VRSIPDHYFKGFWSE
69	NTTNLEFEICGALVE	87	VIYREGANDFVVTFN	105	PDHYFKGFWSEWSPS
70	LEFEICGALVEVKCL	88	EGANDFVVTFNTSHL	106	FKGFWSEWSPSY YFR
71	ICGALVEVKCLNFRK	89	DFVVTFNTSHLQKKY	107	WSEWSPSY YFRTPEI
72	LVEVKCLNFRKLQEI	90	TFNTSHLQKKYVKVL	108	SPSY YFRTPEINN SS
73	KCLNFRKLQEIYFIE	91	SHLQKKYVKVLMHDV	109	YFRTPEINN SS GEMD
74	FRKLQEIYFIETKKF	92	KKYVKVLMHDVAYRQ		
75	QEIYFIETKKFLLIG	93	KVLMHDVAYRQEKDE		

Tổng số 9 mẫu được ủ trên các lát vi mảng sử dụng Multiwell-format. Đối với kháng thể N13B2 và các mẫu khác, 4 nồng độ khác nhau được áp dụng (10, 1, 0,1 và 0,01 $\mu\text{g/ml}$). Một mẫu ủ đối chứng âm (chỉ có kháng thể thứ cấp) được thực hiện song song. Các protein IgG của người và chuột nhất được đồng cố định dọc theo mỗi bộ các peptit để đóng vai trò làm các đối chứng thử nghiệm. Tất cả các công đoạn ủ được thực hiện song song nhau sử dụng hai lát. Hai peptit-mini-array trên mỗi lát được sử dụng như là mẫu ủ đối chứng bằng cách áp dụng kháng thể phát hiện được đánh dấu huỳnh quang một mình để đánh giá sự liên kết dương tính giả đối với các peptit. Sau khi rửa và làm khô các lát, chúng được quét bằng máy quét laze độ phân giải cao ở bước sóng 635nm để thu được các ảnh về cường độ huỳnh quang. Các ảnh này được định lượng để tạo ra trị số pixel trung bình cho mỗi peptit. Kháng thể thứ cấp kháng IgG chuột (JIR 212-175-082) được đánh dấu bằng Cy5 ở nồng độ 1 $\mu\text{g/ml}$. Các dung dịch đệm và các dung dịch Dung dịch đệm được sử dụng là dung dịch đệm TBS gồm 0,05% Tween20 (JPT) và dung dịch đệm thử nghiệm T20 (Pierce, SuperBlock TBS T20, #37536). Bước tiếp nhận và phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng các vi mảng Peptide (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Đức; lô #2668, buồng ủ Multi-Well, Máy quét Axon Genepix 4200AL, phần mềm nhận biết điểm GenePix và Microsoft Excel, R

Ví dụ 18: Lập bản đồ epitop bằng cách phân tích phổ khối

Phương pháp phổ khối được sử dụng để nhận diện epitop cấu dạng. Việc giải trình tự epitop được thực hiện bằng cách sử dụng máy đo phổ khối MALDI. Thiết bị này cho phép trình tự peptit thuộc khoảng giữa 800 và 4000 Da. Việc thủy phân protein cần quan tâm cho phép cắt protein này thành các mảnh nhỏ (các epitop tiềm năng). Lý tưởng là, enzyme thủy phân phải cắt càng gần với các biên của epitop càng tốt. Việc chọn enzyme thủy phân phải được thực hiện theo tần suất cắt của enzyme trong trình tự của protein tái tổ hợp. Bước thủy phân thứ hai được xem như là để giảm kích cỡ của các epitop thu được khi kết thúc bước thủy phân thứ nhất. Tùy thuộc vào enzyme được chọn, các biên dạng sẽ khác nhau đáng kể. Enzyme có sự phân bố tốt nhất về các sản phẩm thủy phân trên trình tự này là chymotrypsin. Enzyme thứ hai với tần suất cắt hợp lý và được phân bố tốt trên trình tự cần quan tâm là Glu C.

Vì epitop là thể cấu dạng nên được ưu tiên là sự thủy phân phức hợp trong quá trình sắc ký ái lực. Sự nhận diện trình tự cần quan tâm được dựa trên việc bảo vệ epitop kháng lại sự thủy phân nhờ enzyme bằng sự tạo thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Sau khi trải qua bước sắc ký ái lực và thủy phân, các mảnh của epitop được rửa giải và được giải trình tự bằng phương pháp phổ khối (MALDI-TOF-TOF Bruker). Cấu trúc 3D của protein cần quan tâm là có sẵn và được so sánh với các kết quả thu được.

Uniprot P16871 [21-239] (Seq ID No:114): tương ứng với miền tô pô của phân đơn vị alpha của thụ thể Interleukin-7 của người hiện đại:

ESGYAQNGDLEDAELDDYSFSCYSQLEVNGSQHSLTCAFEDPDVNTTNLEFEI
CGALVEVKCLNFRKLQEIFYIETKKFLLIGKSNICVKVGEKSLTCKKIDLTITV
KPEAPFDLSVIYREGANDFVVTFTNTSHLQKKYVKVLMHDVAYRQEKDENK
WTHVNLSSTKLTLLQRKLQPAAMYEEKVRSIPDHYFKGFWSSEWSPSYFRTPE
EINNSSGEMD

In silico, các lựa chọn enzyme thủy phân CD127 là (xem các axit amin được gạch chân trên đây trong trình tự tương ứng với Seq ID No:114): Chymotrypsin được chọn làm enzyme thủy phân. Vị trí cắt (các đường nét đậm), số peptit, tần suất cắt là thích hợp. Enzyme Glu-C được chọn làm enzyme thủy phân thứ hai. Số peptit thu được với trọng lượng nằm trong khoảng từ 800 đến 4000Da là thích hợp. Tần suất cắt Glu-C và vị trí các điểm cắt (đường mảnh) là thích hợp. Quy trình được sử dụng là thông thường và đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và được mô tả trong Suckau et al, 1990 và Papac et al, 1994.

Vật liệu và các chất phản ứng: Máy đo phổ khối MALDI-TOF/TOF II de Bruker; các cột Hi-trap NHS (Ref: 17-0716-01 –GE healthcare); Chymotrypsin (Ref:11418467001 –Roche); Glu C (Ref:11420399001 –Roche); Zip/TIP C18 (Ref:ZTC18S096-Millipore); Amoni bicarbonat (Ref: 09830 –Sigma); Glyxin (Ref:G7126 –Sigma); NaCl (Ref : 27800.360 –VWR).

Pha 1: Thủy phân protein và kháng thể tự do trong dung dịch. Thủy phân trong dung dịch kháng nguyên và kháng thể tự do bằng chymotrypsin hoặc Glu C trong 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ và qua đêm ở nhiệt độ trong phòng hoặc 37°C. Phân tích các peptit đã thủy phân được thực hiện bằng phương pháp phổ khối (MS) đối với các

peptit đã thủy phân. Các thử nghiệm này cho phép thiết lập các điều kiện thích hợp về sự thủy phân bằng enzym (thời gian và nhiệt độ). Mục đích là có sự thủy phân đủ đối với kháng nguyên, trong khi tác động đến cấu trúc của kháng thể càng ít càng tốt. Các điều kiện tối ưu được xác định là: Thủy phân bằng chymotrypsin : 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng; thủy phân bằng Glu-C: qua đêm ở 37°C. Mỗi sản phẩm thủy phân của kháng nguyên và kháng thể được phân tích bằng phương pháp phổ khối MALDI-TOF / TOF.

Pha 2: Thủy phân hoàn toàn đối với toàn bộ phức hợp Ac kết nối + toàn bộ kháng nguyên. Việc kết hợp của kháng thể đơn dòng N13B2-G1 kháng CD127 (lô 210415) được thực hiện trên cột Hi-Trap NHS theo thủ tục chuẩn. Việc bắt giữ miễn dịch đối với kháng nguyên trên cột này được thực hiện trong 1 giờ, cho phép tạo ra phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Hiệu suất kết hợp kháng thể N13B2-G1 trên bốn cột Hi-Trap NHS là như sau: 84%, 84%, 83% và 83%. Thu được các hiệu suất kết hợp giống nhau và nhất quán.

Việc thủy phân phức hợp được thực hiện với tỷ lệ 1/50, hoặc 1mg enzym cho 50mg kháng thể, ở nhiệt độ và trong thời gian xác định bằng sự kiểm soát nêu trên. Sau đó cột được rửa bằng dung dịch đệm rửa (amoni bicacbonat 25mM) để loại bỏ và thu hồi các peptit kháng nguyên không liên kết. Bước rửa trong dung dịch nước muối đệm (PBS-2M NaCl) cũng được thực hiện để loại bỏ các peptit không đặc hiệu. Sau khi rửa, việc rửa giải được thực hiện bằng dung môi rửa giải (Glyxin 50mM, pH bằng 2) để chiết một cách đặc hiệu và thu hồi các peptit liên kết một cách đặc hiệu (các peptit này được dự đoán là tương ứng với epitop).

Phân tích MALDI: các phân đoạn rửa và rửa giải được cô bằng phương pháp sắc ký ky nước trên nền C18. Sau đó chúng được phân tích bằng phương pháp phổ khối MALDI-TOF / TOF. Phương pháp phân tích MS có thể đo chính xác khối lượng của các peptit và việc so sánh các khối lượng thực nghiệm với các khối lượng lý thuyết của peptit thu được từ sự thủy phân *in silico* kháng nguyên tự do cho phép nhận diện các peptit; MS/phân tích MS có thể được thực hiện để xác nhận trình tự của peptit nếu cần.

Phổ của sản phẩm rửa giải sau khi thủy phân bằng chymotrypsin phát hiện sự có mặt của các peptit với khối lượng: 912,49; 1086,47; 1843,03; 2104,16; 1944,97;

1564,73; 1835,97; 2022,05; 2424,22 và 2858,42Da, các khối lượng này có thể tương ứng với các peptit kháng nguyên trong 0 dưới đây.

Bảng 10: Các peptit thu được sau khi thủy phân bằng chymotrypsin (các trình tự được bảo vệ khỏi sự phân giải protein)

Khối lượng (Da)	Trình tự	SEQ ID No:
912,49	FIETKKF	115
1843,03	RKLQEIFYFIETKKF	118
2104,16	NFRKLQEIFYFIETKKF	119
1944,97	DLSVIYREGANDFVVTF	120
1564,73	VVTFNTSHLQKKY	121
1835,97	EIKVRSIPDHYFKGF	122
2022,05	EIKVRSIPDHYFKGFW	123
2424,22	EIKVRSIPDHYFKGFWSEW	124
2858,42	EIKVRSIPDHYFKGFWSEWSPSY	125
1086,47	FKGFWSEW	126

Phổ của sản phẩm rửa giải sau khi thủy phân bằng Glu-C phát hiện sự có mặt của các peptit thủy phân của các protein được các tác giả quan tâm với khối lượng là 1200,43; 1309,68; 2108,97; 2191,04; 2699,43; 3170,68 và 3264,70Da có thể tương ứng với các peptit kháng nguyên trong 0 dưới đây.

Bảng 11: Các peptit thu được sau khi thủy phân bằng Glu-C (các trình tự được bảo vệ khỏi sự phân giải protein)

Khối lượng (Da)	Trình tự	SEQ ID No:
2699,43	IYFIETKKFLLIGKSNICVKVGE	127
3264,70	KSLTCKKIDLTIVKPEAPFDLSVIYRE	128
2191,04	LTTIVKPEAPFDLSVIYRE	129
1309,68	APFDLSVIYRE	130
3170,68	NKWITHVNLSTKLTLQKRLQPAAMYE	131
2108,97	IKVRSIPDHYFKGFWSE	132

Hai bước thủy phân cho phép các tác giả nhận diện được ba điểm (0 dưới đây) liên quan đến sự tương tác giữa hN13B2 và kháng nguyên CD127. Các peptit thu được từ dung dịch rửa đệm muối được loại trừ để giới hạn các trình tự cần quan tâm.

Bảng 12: Các trình tự của các peptit CD127 người được bảo vệ bằng N13B2 kháng lại sự phân giải protein

A (SEQ ID No:115)	FIETKKF
B (SEQ ID No:116)	DLSVIY
C (Seq ID No: 117)	FKGF

Việc vẽ bản đồ epitop của kháng thể N13B2 đối với kháng nguyên CD127 thể hiện 3 trình tự khác nhau quan trọng đối với hoạt tính kháng thể đối với con đường IL7/CD127 (Fig.27). Bằng phương pháp phân tích tinh thể học 3D đối với tương tác IL7/CD127 (McElroy et al, Structure 2009, PDB:3DI2), hai trong số các trình tự (Seq ID N°115 và ID N° 117) là gần nhau về mặt cấu trúc và được định vị trong vùng tham gia vào sự liên kết của IL7 với CD127. Trình tự được nhận diện thứ ba (seq ID N°116) được định vị ở điểm 2b của miền D2 của thụ thể, miền được dự đoán là tương tác với CD132, chuỗi gama của thụ thể (Walsh et al, 2012). N13B2 nhận biết epitop cấu dạng trên CD127 được định vị ở 2 phần của protein mà ức chế sự tương tác IL7-CD127 và sự tạo thành heterodime CD127-CD132. Liên kết của N13B2 phải làm mất ổn định sự tạo thành của "phức hợp chuỗi IL7/g/IL7Ra bậc ba" như được dự đoán bởi Walsh ST, điều này phong bế sự nội nhập của phức hợp.

Ví dụ 19: Kết quả

Như đã được mô tả (Henriques et al., 2010), IL-7 một mình gây cảm ứng nội nhập một cách nhanh chóng (30-40%) chuỗi alpha của thụ thể IL-7 (CD127) ở bề mặt của các lympho bào T, sự nội nhập này là cần thiết đối với sự truyền tín hiệu qua trung gian IL-7. Ở đây, các tác giả sáng chế đã mô tả rằng mAb N13B2 ngăn chặn sự nội nhập cảm ứng bởi IL-7 của CD127 và không gây cảm ứng sự nội nhập này bởi chính nó (0). Ngược lại, các tác giả sáng chế mô tả rằng kháng thể kháng CD127 người, dòng 1A11 của GSK (công bố đơn quốc tế số WO2011094259) đã làm giảm một cách đột ngột sự biểu hiện của CD127 ở bề mặt của các lympho bào T khi áp dụng một mình hoặc kết hợp với IL-7 ở 37°C (0). Tác dụng này được quan sát bằng cách sử dụng cách

nhuộm khác bằng một số kháng thể kháng IL7R có trên thị trường (eBioRDR5 và MB15-18C9, dữ liệu không được thể hiện). Sau khi cho các con linh trưởng không phải người dùng trong tĩnh mạch mAb N13B2 khảm (được định dạng với miền Fc của IgG1 hoặc IgG4 người) ở nồng độ 10mg/Kg, các tác giả sáng chế đã không đo được sự giảm mức biểu hiện CD127 ở bề mặt của các lympho bào T trong thời gian 2 tuần theo dõi (0B). Ngược lại, trên các con linh trưởng không phải người khác được điều trị song song bằng cách dùng trong tĩnh mạch 10mg/kg kháng thể kháng CD127 người, dòng MD707-13 (được định dạng với miền Fc của IgG4 người; công bố đơn quốc tế số WO2013/056984), các tác giả sáng chế đã quan sát thấy sự giảm đáng kể (60%) của CD127 ở bề mặt của các lympho bào T (0B). Sự nội nhập này của CD127 sau sự liên kết của mAb kháng CD127 người trên các lympho bào T cũng đã được công bố trước đây bởi nhóm Pfizer, trong đó họ đã mô tả rằng mAb kháng CD127 người của họ (dòng HAL-H3L4, Patent Mỹ số 8,637,273) gây cảm ứng một cách đáng kể sự nội nhập CD127 ex-vivo trên các tế bào máu của người và của con linh trưởng không phải người, cũng như in-vivo sau khi cho các con linh trưởng không phải người dùng trong tĩnh mạch (Kern et al., 2013).

Trong công bố gần đây của Kern et al. (Kern et al., 2015), sự lưu trú của CD127 được nghiên cứu và các thử nghiệm cạnh tranh được thực hiện. Dòng HIL-7R-M21 kháng CD127 của BD Biosciences đã được chứng minh là cạnh tranh với kháng thể HAL/Ab1 (của nhóm Pfizer) trong việc liên kết với CD127. Như được thể hiện trên 0 của sáng chế, kháng thể HAL (dòng H3L4, patent Mỹ số 8637273) được so với N13B2 và 1A11 về sự biểu hiện và nội nhập của CD127. Các kết quả này thể hiện sự cạnh tranh giữa kháng thể HAL và HIL-7R-M21, điều này xác nhận số liệu của Kern et al, 2015. Tuy nhiên, N13B2 không cạnh tranh với HIL-7R-M21. Kern et al. cũng chứng minh rằng HAL/Ab1 bằng bản thân nó, gây cảm ứng *in vivo* sự điều hòa xuôi chiều của sự biểu hiện CD127 ở bề mặt tế bào từ 4 đến 8 ngày sau khi tiêm. Các kết quả đó là có thể so sánh với các kết quả được thể hiện trên 0B của sáng chế với dòng MD707-13. Fig.17B thể hiện sự điều hòa xuôi chiều của sự biểu hiện CD127 ở bề mặt tế bào 4 đến 10 ngày sau khi tiêm kháng thể. Tác dụng *in vivo* này có thể có tương quan với sự nội nhập phụ thuộc MD707-13 *in vitro* của CD127 vào tế bào được quan sát.

Nghiên cứu epitop bằng phương pháp phổ khối và vi mảng peptit đã nhận diện epitop cấu dạng được nhận biết bởi N13B2 trên CD127. Epitop này được định vị trong

các miền D1 và D2, ngược lại với các kháng thể trong lĩnh vực kỹ thuật này mà nhận biết epitop được định vị chỉ ở D1 (0). Hơn nữa, 0 chỉ ra rằng các kháng thể trong lĩnh vực này gây cảm ứng sự nội nhập của CD127, trong khi N13B2 thì không. Do đó, các tác giả sáng chế đã kết luận rằng tính chất không gây cảm ứng sự nội nhập CD127 của N13B2 là có tương quan với tính chất nhận biết epitop được định vị cả ở miền D1 và miền D2 của nó.

Nhìn chung, các kết quả này và các kết quả được báo cáo trước đây thể hiện rằng các mAb kháng CD127 người (dòng 1A11, các dòng HAL/Ab1 và H3L4 và dòng MD707-13) được mô tả là làm phong bế liên kết của IL-7 trên thụ thể IL-7, còn gây cảm ứng sự nội nhập chuỗi alpha của thụ thể IL-7 mà được kết hợp và cần thiết cho việc truyền tín hiệu thụ thể IL-7. Ngược lại và theo cách bất ngờ, mAb N13B2 có tính chất vô song là không gây cảm ứng sự nội nhập CD127 và nó ngăn chặn sự nội nhập cảm ứng bởi IL-7 này. Các kết quả này có tương quan với sự quan sát rằng mAb cảm ứng nội nhập CD127 (ví dụ, dòng MD707-13), mà là hữu hiệu *in vitro* để ngăn chặn sự truyền tín hiệu thụ thể IL-7 (ví dụ, sự phosphoryl hóa STAT5, 0B), là không thể *in vivo* ngăn chặn đáp ứng miễn dịch tế bào ghi nhớ (0) hoặc đáp ứng miễn dịch (0). Ngược lại, các tác giả sáng chế mô tả rằng mAb N13B2, mà phong bế một cách hữu hiệu sự truyền tín hiệu thụ thể IL-7 (sự phosphoryl hóa STAT5) nhưng không gây cảm ứng sự nội nhập CD127 *ex vivo* trên các lympho bào T của người và *in vivo* ở các động vật linh trưởng không phải người, ngăn chặn các đáp ứng tế bào ghi nhớ quá miễn muộn (0) cũng như sự gây miễn dịch kháng lại các tế bào hồng cầu ngoại lai của cừu (0). Mặc dù không thấy có sự khác biệt giữa các kiểu phụ của N13B2 đối với việc kiểm soát đáp ứng ghi nhớ thể dịch, các tác giả sáng chế vẫn lưu ý rằng N13B2 được định hình bằng IgG4 là hiệu quả hơn trong việc ngăn chặn các đáp ứng tế bào ghi nhớ so với IgG1. Không thấy có sự khác biệt về nồng độ huyết thanh và sự phơi nhiễm mAb giữa các con vật được điều trị bằng MD707-13 và được điều trị bằng N13B2. Tương tự, các tác giả sáng chế cũng quan sát thấy sự tăng đáng kể các lympho bào T điều hòa ở các con vật được điều trị bằng mAb N13B2 hoặc mAb MD707-13 (0).

IL-7 người cảm ứng sự biểu hiện mạnh mẽ của các integrin $\alpha 4$ và $\beta 7$ *in vitro* trên các tế bào lympho T của người và làm tăng một cách đột ngột tần suất của các tế bào lympho T của người biểu hiện các integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và $\alpha 4/\beta 7$ (0), các chất cần thiết cho các tế bào lympho T trở về và cần thiết cho sự lưu lại ở các mô không phải dạng lympho

như ruột, não và da (Gorfu et al., 2009, DeNucci et al., 2009). Do đó, các tác giả sáng chế quan sát thấy rằng mAb N13B2 ức chế một cách phụ thuộc liều *in vitro* cả sự biểu hiện của $\alpha 4$ và $\beta 7$ cũng như giảm tần suất của các lympho bào T người dương tính với $\alpha 4$ và các lympho bào T người dương tính với $\alpha 4/\beta 7$ (0B). Tương tự, sau khi được truyền từ các tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người vào chuột nhắt suy giảm miễn dịch, các tác giả đã quan sát thấy rằng kháng thể N13B2 làm giảm một cách đáng kể và nhanh chóng phần trăm số lympho bào T dương tính với $\beta 7$ cũng như số lượng (thể cấy ghép trong chân bì) của các tế bào này sau một (số liệu không được thể hiện) và hai tuần điều trị (0). Các kết quả thu được trên hai mô hình viêm khác nhau thể hiện rằng kháng thể N13B2 kháng IL7R α có thể là tác nhân điều trị hiệu quả đối với các bệnh viêm và cụ thể là bệnh viêm ruột kết.

Ví dụ 20: Sản sinh epitop cấu dạng

Các peptit CLIPS có thể được sử dụng để bắt chước một cách thích hợp cấu trúc bậc hai và bậc ba tự nhiên của kháng nguyên nhằm dịch mã các peptit CLIPS này thành các chất sinh miễn dịch hoạt tính và có hiệu lực mà gây cảm ứng các kháng thể mong muốn (Boshuizen et al, 2014). Công nghệ CLIPS bao gồm sự (đa) vòng hóa các peptit tuyến tính thông qua phản ứng với thực thể cứng nhỏ (khung hóa học) mà mang 2,3 hoặc 4 điểm neo. Các điểm neo này phản ứng riêng với một kiểu nhóm chức của peptit (tức là các thiol) và liên kết với peptit thông qua các liên kết đa cộng hóa trị. Peptit này gấp lại xung quanh khung và nối lỏng độ linh hoạt trong khi từ từ tuân theo cấu trúc ba chiều định rõ, với thực thể khung ở tâm giống như “con nhện trên mạng nhện”.

Công nghệ này sử dụng các khung phù hợp, tổng hợp hoàn toàn. Các khung CLIPS thay đổi chủ yếu ở kích cỡ, tính phân cực, độ cứng, độ hòa tan, nhóm chức năng, và khoảng cách ‘kéo dài-SS’. Các khung này được sử dụng để gắn vào các đầu lỏng lẻo của peptit. Khi được định vị một cách thích hợp trong trình tự peptit, peptit CLIPS thu được có thể giống với cấu trúc 3D của vùng tương ứng trên protein nguyên vẹn hơn rất nhiều so với trình tự tuyến tính. Sự vòng hóa bằng CLIPS có thể được thực hiện trên các gốc L-xystein tự nhiên, và cả trên các D- và L- (homo)xystein được đưa vào bởi con người gần như ở vị trí mong muốn bất kỳ trong trình tự. Do đó, cấu trúc và kích thước của các peptit được thực hiện CLIPS có thể được thay đổi tùy ý. Phản ứng vòng hóa kéo dài không lâu hơn 30 phút, thực hiện ở nhiệt độ trong phòng và

không cần loại xúc tác bất kỳ. Hơn nữa, nó có thể được áp dụng trong điều kiện nước hoàn toàn và độ pH trung tính (7,5-8,0) và do đó có thể tương thích với các hệ sinh học khá nhạy, như các thể thực khuẩn. Cuối cùng là, phản ứng có thể được thực hiện ở các điều kiện pha loãng cao (10-100 μM), mà thúc đẩy sản lượng cao của các sản phẩm vòng và tránh sự trùng hợp. Công nghệ này là khá linh hoạt, và vô song vì tính dễ áp dụng của nó.

Với nỗ lực tái dựng cả epitop tuyến tính và epitop không liên tục cho kháng thể kháng thụ thể, các peptit chồng chập multime được tổng hợp trực tiếp trên các đĩa polypropylen có kích cỡ như thể tín dụng với đầu C được liên kết cộng hóa trị với đáy của mỗi lỗ 3ul (455 lỗ trên một đĩa), và mỗi lỗ chứa peptit khác nhau. Trong mỗi peptit trong số các peptit đơn miền, cầu dixystein vòng hóa được tạo thành để chèn vòng cưỡng ép vào trong các peptit được gắn với đĩa này. Teeling et al, 2006, giải thích cách sản sinh các peptit vòng hóa bằng các peptit cần quan tâm nhằm mục đích tái tạo epitop không liên tục được nhận biết bởi kháng thể cần quan tâm. Ngắn gọn là, dixystein được gắn với đĩa chứa các peptit đầu tiên được tổng hợp bằng các xystein đặt cách quãng từ 4 đến 13 aa dọc theo peptit này, ví dụ, CXXXXC-đĩa, XXXCXXXXCXXXXXXđĩa, hoặc CXXXXC-đĩa, v.v.. Sau đó các peptit này được vòng hóa bằng cách xử lý với a,a-dibromoxylene trong dung dịch nước để tạo ra các vòng xystein chứa số lượng axit amin khác nhau. Quy trình cải biến hóa học này tạo ra nhiều vòng ổn định hơn so với việc tạo các cầu disulfua. (Niederfellner et al, 2011)

Ví dụ 21: Đồng kết tủa miễn dịch CD127 và γC

Để kiểm tra tác dụng của N13B2 và của các kháng thể có trong lĩnh vực này đối với sự liên kết của CD127 với chuỗi γC , thử nghiệm đồng kết tủa miễn dịch được thực hiện trên các tế bào được kích thích bằng IL-7 và được ủ với sự vắng mặt của các kháng thể hoặc với sự có mặt của các kháng thể MD707-13 hoặc các kháng thể N13B2. Với sự vắng mặt của các kháng thể, CD127 và γC được thể hiện là đồng kết tủa miễn dịch. Việc ủ các tế bào với MD707-13 không ngăn chặn sự đồng kết tủa miễn dịch này, trong khi ủ với N13B2 dẫn đến không có sự đồng kết tủa miễn dịch này. Do đó kháng thể của sáng chế là có khả năng phá vỡ liên kết của CD127 với chuỗi γC , trong khi các kháng thể trong lĩnh vực này không có dấu hiệu này.

Để đồng kết tủa miễn dịch phức hợp CD127-CD132-IL7 với sự có mặt của kháng thể kháng CD127, PBL người được ủ với kháng thể kháng hCD127 của chuột cống (N13B2 chuột cống hoặc MD707-13 ở nồng độ 10 μ g/ml) trong 30 phút ở 37°C, trước khi kích thích bằng IL7 (AbD Serotec, số tham chiếu PHP046) ở nồng độ 5ng/ml trong 15 phút ở 37°C. Phản ứng được chấm dứt ở 4°C, và được rửa hai lần bằng PBS lạnh trước khi bổ sung dung dịch đệm phân giải từ kit đồng kết tủa miễn dịch (kit Pierce Direct IP, số tham chiếu 26148).

Cột tinh chế kháng thể kháng CD127 người được chuẩn bị với kit đồng kết tủa miễn dịch (kit Pierce Direct IP, số tham chiếu 26148). Cột này được kết hợp với 75 μ g kháng thể kháng CD127 người không cạnh tranh của chuột (Effimune, MD707-9), theo thủ tục được đề nghị bởi nhà sản xuất. Sản phẩm dung giải được tinh chế sơ bộ trên cột không kết hợp để loại bỏ các chất gắn kết không đặc hiệu. Sau đó, sản phẩm dung giải được bổ sung vào cột kháng CD127 và được ủ trong 2 giờ ở 4°C, trong điều kiện lắc tròn. Cột được rửa hai lần bằng dung dịch đệm rửa, và sau đó được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải. Mẫu thu hồi được phân tích bằng phương pháp thấm tách Western.

Đối với phương pháp thấm tách Western, gel SDS-Page được chuẩn bị (10% để phân giải, 4% để sắp xếp gel, với độ dày 1,5mm) và 50 μ l sản phẩm rửa giải đã biến tính (quá trình biến tính: DTT 0,1M và 10 phút ở 95°C) được bổ sung vào mỗi lỗ. Protein tái tổ hợp CD127Fc (Sino Biologicals, Bắc Kinh, Trung Quốc; số tham chiếu 10975-H08H) và CD132Fc (Sino Biologicals, Bắc Kinh, Trung Quốc; số tham chiếu 10555-H02H) được bổ sung (5 μ g/lỗ) làm đối chứng cho việc phát hiện bằng phương pháp thấm tách Western. Sau khi di cư trong 1 giờ 30 phút ở 200V, và truyền lên màng nitroxenluloza trong 35 phút ở 20V, việc làm bão hòa được thực hiện trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong 5% sữa.

Để khởi động quá trình phát hiện, kháng thể thỏ kháng CD132 người (anticorps-en-ligne, France, số tham chiếu ABIN741840) được bổ sung vào ở tỷ lệ 1/50 qua đêm ở 4°C, sau đó được phát hiện bằng kháng thể dê kháng thỏ được đánh dấu bằng peroxidaza (Jackson Immunoresearch, số tham chiếu 111-035-144) ở tỷ lệ 1/2000 trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi khử lai hóa, màng được ủ bằng kháng thể chuột cống kháng CD127 người (Effimune, MD707-9) ở tỷ lệ 1/200 qua đêm ở 4°C, và được phát hiện bằng kháng thể lừa kháng chuột cống được đánh dấu bằng peroxidaza

(Jackson Immunoresearch, số tham chiếu 712-035-153) ở tỷ lệ 1/1000 trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Đối với mỗi quá trình phát hiện, ECL (Thermo Scientific, số tham chiếu 34080) được sử dụng để phát hiện peroxidaza bằng phản ứng quang hóa, và kết quả được đọc bằng máy ảnh Fuji 4000.

0 thể hiện kết quả của sự đồng kết tủa miễn dịch phức hợp CD127/IL7/CD132. Các tác giả sáng chế đã quan sát thấy rằng chuỗi CD132 (60 KDa) đồng kết tủa với CD127 trong điều kiện bất kỳ trừ trường hợp trong đó các tế bào được ủ bằng kháng thể N13B2 (28A). Tuy nhiên, trong mỗi điều kiện, CD127 (70KDa) được kết tủa miễn dịch tốt bằng kháng thể MD707-9 như được thể hiện trên 0B, điều này chỉ ra rằng N13B2 và MD707-13 không cạnh tranh với MD707-9 trong việc nhận biết CD127. Kháng thể N13B2 ức chế sự tạo thành phức hợp CD127/CD132 với sự có mặt của IL-7. Các kết quả này là nhất quán với sự lập bản đồ epitop của kháng thể N13B2 trên CD127, điều này chỉ ra rằng N13B2 liên kết trình tự axit amin trong vị trí 2b trong miền D2 của chuỗi IL7R alpha (Walsh et al, Immunol rev. 2012).

Nói chung, các kết quả này thể hiện rằng kháng thể N13B2 là chất đối kháng của sự tương tác IL7/CD127 cũng như là chất đối kháng của sự tương tác CD127/CD132 ở vị trí 2b với sự có mặt của IL-7, điều này có thể giải thích hoạt tính ức chế của kháng thể đối với sự nội nhập của CD127 quan sát được với các kháng thể kháng CD127 và/hoặc IL7 từ lĩnh vực này.

Các phương án được đánh số dưới đây cấu thành các phương án được ưu tiên của sáng chế.

1. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó hoặc giả kháng thể liên kết kháng nguyên mà liên kết một cách đặc hiệu với CD127 và không gây cảm ứng sự nội nhập của CD127.

2. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng, cụ thể là theo phương án 1, mà ức chế sự nội nhập cảm ứng bởi IL7 của CD127.

3. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng theo phương án 1 hoặc 0 trong đó mức biểu hiện trên bề mặt tế bào của CD127 trên các tế bào được xử lý bằng IL-7 với sự có mặt của kháng thể hoặc mảnh là ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 90% của mức biểu hiện của nó trên các tế bào được ủ với sự vắng mặt của kháng thể.

4. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết một cách đặc hiệu với CD127 và nhờ đó phá vỡ sự liên kết của CD127 với chuỗi γ c thông thường của các thụ thể xytokin.

5. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo phương án 1 đến 0, mà phá vỡ sự liên kết của CD127 với chuỗi γ c thông thường của các thụ thể xytokin khi được liên kết với CD127.

6. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 hoặc 0, với sự có mặt của nó lượng γ c được liên kết với CD127 là dưới 80%, tốt hơn là dưới 50%, thậm chí tốt hơn nữa là dưới 25% hoặc 10% của lượng đo được khi vắng mặt các kháng thể dưới các điều kiện tương tự khác, cụ thể là trong đó phép đo này được thực hiện trên các sản phẩm dung giải tế bào chứa các phức hợp phân tử chứa CD127 từ các tế bào nguyên vẹn biểu hiện thụ thể IL7 ở bề mặt tế bào, được ủ với sự có mặt của hoặc vắng mặt của các kháng thể này.

7. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên, mà là chất đối kháng của sự truyền tín hiệu IL-7R cảm ứng bởi IL-7.

8. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng, cụ thể là theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, mà liên kết một cách đặc hiệu và/hoặc đã được đề xuất là kháng kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 0 đến 0 hoặc epitop của kháng nguyên này.

9. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng, mà liên kết một cách đặc hiệu với CD127, cụ thể là theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên, mà không làm tăng sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai cảm ứng bởi TSLP.

10. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên mà ức chế sự biểu hiện của các integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và/hoặc $\alpha 4/\beta 7$.

11. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng theo phương án 0 mà ức chế sự biểu hiện của các integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và/hoặc $\alpha 4/\beta 7$ *in vivo*, cụ thể là ở các tế bào T của người được tiêm vào chuột nhắt suy giảm miễn dịch.

12. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng, mà liên kết một cách đặc hiệu với CD127, cụ thể là theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên, chứa chuỗi VH chứa ít nhất một trong số các trình tự axit amin dưới đây:

- VHCDR1 SEQ ID No:10;
- VHCDR2 SEQ ID No:12;
- VHCDR3 SEQ ID No:14 hoặc SEQ ID No:48; hoặc
- VH SEQ ID No:22

và/hoặc chuỗi VL chứa ít nhất một trong số các trình tự axit amin:

- VLCDR1 SEQ ID No:16 hoặc SEQ ID No:50;
- VLCDR2 SEQ ID No:18 hoặc SEQ ID No:52;
- VLCDR3 SEQ ID No:20; hoặc
- VL SEQ ID No:24.

13. Kháng thể hoặc mảnh hoặc giả kháng thể của chúng theo phương án 0 mà chứa ít nhất hai, ba, bốn hoặc năm trình tự CDR được chọn từ nhóm gồm VHCDR1 SEQ ID No:10, VHCDR2 SEQ ID No:12, VHCDR3 SEQ ID No:14 hoặc SEQ ID No:48, VLCDR1 SEQ ID No:16 hoặc SEQ ID No:50, VLCDR2 SEQ ID No:18 hoặc SEQ ID No:52 và VLCDR3 SEQ ID No:20.

14. Kháng thể hoặc mảnh hoặc giả kháng thể của chúng theo phương án 0 mà chứa tất cả sáu trình tự CDR VHCDR1 SEQ ID No:10, VHCDR2 SEQ ID No:12, VHCDR3 SEQ ID No:14 hoặc SEQ ID No:48, VLCDR1 SEQ ID No:16 hoặc SEQ ID No:50, VLCDR2 SEQ ID No:18 hoặc SEQ ID No:52 và VLCDR3 SEQ ID No:20.

15. Kháng thể theo phương án 0 trong đó

- chuỗi VH gồm chuỗi VH với trình tự của SEQ ID No:2 hoặc của SEQ ID No:6 hoặc của SEQ ID No:54 hoặc chứa trình tự của SEQ ID No:22 hoặc của SEQ ID No:36 hoặc của SEQ ID No:38 hoặc của SEQ ID No:40; và

- chuỗi VL gồm chuỗi VL với trình tự của SEQ ID No:4 hoặc của SEQ ID No:56 hoặc chứa trình tự của SEQ ID No:24 hoặc của SEQ ID No:42 hoặc của SEQ ID No:44 hoặc của SEQ ID No:46.

16. Kháng thể theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên mà là kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể được khử miễn dịch.

17. Kháng thể theo phương án 13 mà là kháng thể được làm giống như của người và được khử miễn dịch, trong đó chuỗi nặng có trình tự của SEQ ID No:52 và chuỗi nhẹ có trình tự của SEQ ID No:54.

18. Đại phân tử mà là phân tử khảm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên, trong đó kháng thể này được kết hợp với phân tử khác về mặt chức năng, phân tử khảm này là protein khảm dung hợp hoặc thể liên hợp thu được từ việc liên kết cộng hóa trị nhóm hoặc phân tử hóa học, như polyme PEG hoặc kháng thể được đánh dấu.

19. Đại phân tử theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên, trong đó đại phân tử này là affitin hoặc anticalin.

20. Đại phân tử, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng, theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên mà liên kết với CD127 với Kd nhỏ hơn $5E-10$ M, đặc biệt là nhỏ hơn $1E-10$ M, đặc biệt là nhỏ hơn $5E-11$ M.

21. Đại phân tử, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng, theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên mà thể hiện hoạt tính gây độc tế bào đối với các tế bào dương tính với CD127.

22. Đại phân tử, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng, theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên mà không làm gia tăng sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai cảm ứng bởi TSLP, trong đó sự gia tăng sự trưởng thành tế bào đuôi gai cảm ứng bởi TSLP được đánh giá bằng cách xác định sự biểu hiện tăng của dấu chuẩn bề mặt tế bào CD40 và/hoặc CD80 trên các tế bào dương tính với thụ thể TSLP được xử lý bằng TSLP và bằng đại phân tử này so với các tế bào chỉ được xử lý bằng TSLP.

23. Đại phân tử, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng, theo phương án 0 trong đó sự biểu hiện của CD80 bị gia tăng khoảng không lớn hơn 25%, tốt hơn là không lớn hơn 10%, ở các tế bào dương tính

với thụ thể TSLP được xử lý bằng TSLP và bằng đại phân tử này, so với các tế bào chỉ được xử lý bằng TSLP.

24. Đại phân tử, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng, theo phương án 0 trong đó sự biểu hiện của CD80 là không bị gia tăng hoặc được làm giảm ở các tế bào dương tính với thụ thể TSLP được xử lý bằng TSLP và bằng đại phân tử này, so với các tế bào chỉ được xử lý bằng TSLP.

25. Đại phân tử, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng theo phương án 0 trong đó sự biểu hiện của CD40 bị gia tăng không nhiều hơn 50%, tốt hơn là không nhiều hơn 25%, ở các tế bào dương tính với thụ thể TSLP được xử lý bằng TSLP và bằng đại phân tử này so với các tế bào chỉ được xử lý bằng TSLP.

26. Đại phân tử, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng, theo phương án 0 trong đó sự biểu hiện của CD40 là không bị gia tăng hoặc được làm giảm ở các tế bào dương tính với thụ thể TSLP được xử lý bằng TSLP và bằng đại phân tử này, so với các tế bào chỉ được xử lý bằng TSLP.

27. Phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, hoặc đại phân tử theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên.

28. Phân tử axit nucleic theo phương án 0 trong đó phân tử này mã hóa axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No:2; SEQ ID No:4; SEQ ID No:6; SEQ ID No:8; SEQ ID No:10; SEQ ID No:12; SEQ ID No:14; SEQ ID No:16; SEQ ID No:18; SEQ ID No:20; SEQ ID No:22; SEQ ID No:24; SEQ ID No:36; SEQ ID No:38; SEQ ID No:40; SEQ ID No:42; SEQ ID No:44; SEQ ID No:46; SEQ ID No:48; SEQ ID No:50; SEQ ID No:52; SEQ ID No:54 và SEQ ID No:56.

29. Phân tử axit nucleic theo phương án 0 trong đó phân tử này được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID No:1; SEQ ID No:3; SEQ ID No:5; SEQ ID No:7; SEQ ID No:9; SEQ ID No:11; SEQ ID No:13; SEQ ID No:15; SEQ ID No:17; SEQ ID No:19; SEQ ID No:21; SEQ ID No:23; ; SEQ ID No:35; SEQ ID No:37; SEQ ID No:39; SEQ ID No:41; SEQ ID No:43; SEQ ID No:45; SEQ ID No:47; SEQ ID No:49; SEQ ID No:51; SEQ ID No:53 và SEQ ID No:55.

30. Vectơ để tách dòng và/hoặc để biểu hiện polynucleotit theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0, đặc biệt là plasmit, thích hợp để tách dòng và/hoặc biểu hiện ở các tế bào động vật có vú.

31. Tế bào hoặc dòng tế bào được tái tổ hợp với polynucleotit theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0, đặc biệt là tế bào hoặc dòng tế bào động vật có vú.

32. Dược phẩm chứa đại phân tử, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng, theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 0, với tá dược, trong đó dược phẩm này tùy ý còn chứa thành phần hoạt tính khác.

33. Dược phẩm chứa thành phần có hoạt tính trị liệu là đại phân tử, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng, theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 0 hoặc dược phẩm theo phương án 0 dưới dạng phối chế thích hợp để kiểm soát sự biệt hóa/sự trưởng thành tế bào đuôi gai khi được dùng cho người bệnh.

34. Dược phẩm theo phương án 0 hoặc 0, trong đó dược phẩm này còn chứa hợp chất bổ sung có tác dụng điều biến miễn dịch trị liệu cụ thể là trên các tế bào có liên quan đến bệnh tự miễn hoặc bệnh dị ứng, bệnh bạch cầu như bệnh bạch cầu lympho bào cấp, u lympho, bệnh ung thư, bệnh nhiễm virus mạn tính, các bệnh viêm, sự ghép tạng, bệnh đường hô hấp hoặc chứng tự miễn.

35. Đại phân tử, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 0 hoặc axit nucleic theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0 hoặc tế bào hoặc dòng tế bào theo phương án 0 để sử dụng làm thành phần có hoạt tính trị liệu trong chế phẩm phối hợp hoặc trong chế độ trị liệu bổ sung cho bệnh nhân cần điều trị.

36. Đại phân tử, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 0 hoặc axit nucleic theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0 hoặc tế bào hoặc dòng tế bào theo phương án 0 hoặc dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0 để sử dụng trong việc điều trị bệnh nhân, cụ thể là người bệnh, bị bệnh.

37. Đại phân tử, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 0 hoặc axit

nucleic theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0 hoặc tế bào hoặc dòng tế bào theo phương án 0 hoặc được phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0 để sử dụng trong việc điều trị bệnh nhân, cụ thể là người bệnh, có nguy cơ bị bệnh.

38. Đại phân tử, axit nucleic, tế bào, dòng tế bào hoặc được phẩm để sử dụng theo phương án 0 và/hoặc phương án 0, trong đó bệnh này là bệnh tự miễn, cụ thể là bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh đa xơ cứng, bệnh tiểu đường typ I, bệnh viêm tuyến giáp tự miễn và bệnh luput.

39. Đại phân tử, axit nucleic, tế bào, dòng tế bào hoặc được phẩm để sử dụng theo phương án 0 và/hoặc phương án 0, trong đó bệnh này là bệnh viêm, cụ thể là bệnh IBD và bệnh viêm não tủy.

40. Đại phân tử, axit nucleic, tế bào, dòng tế bào hoặc được phẩm để sử dụng theo phương án 0 và/hoặc phương án 0, trong đó bệnh này là bệnh dị ứng.

41. Đại phân tử, axit nucleic, tế bào, dòng tế bào hoặc được phẩm để sử dụng theo phương án 0 và/hoặc phương án 0, trong đó bệnh này là bệnh ung thư.

42. Đại phân tử, axit nucleic, tế bào, dòng tế bào hoặc được phẩm để sử dụng theo phương án 0 và/hoặc phương án 0, trong đó bệnh này là bệnh đường hô hấp.

43. Đại phân tử, axit nucleic, tế bào, dòng tế bào hoặc được phẩm để sử dụng theo phương án 0 và/hoặc phương án 0, trong đó bệnh này liên quan đến, cụ thể là hậu quả của sự ghép tạng.

44. Phương pháp điều trị bao gồm cho bệnh nhân bị hoặc có nguy cơ bị bệnh dùng đại phân tử, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 0 hoặc axit nucleic theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0 hoặc tế bào hoặc dòng tế bào theo phương án 0 hoặc được phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0.

45. Phương pháp điều trị theo phương án 0, trong đó bệnh này là bệnh tự miễn, cụ thể là bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh đa xơ cứng, bệnh tiểu đường typ I, bệnh viêm tuyến giáp tự miễn và bệnh luput.

46. Phương pháp điều trị theo phương án 0, trong đó bệnh được nêu là bệnh viêm, cụ thể là bệnh IBD và bệnh viêm não tủy.

47. Phương pháp điều trị theo phương án 0, trong đó bệnh được nêu là bệnh dị ứng.

48. Phương pháp điều trị theo phương án 0, trong đó bệnh được nêu là bệnh ung thư.

49. Phương pháp điều trị theo phương án 0, trong đó bệnh được nêu là bệnh đường hô hấp.

50. Phương pháp điều trị theo phương án 0, trong đó bệnh được nêu là có liên quan đến, cụ thể là hậu quả của sự ghép tạng.

51. Đại phân tử, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 0 hoặc axit nucleic theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0 hoặc tế bào hoặc dòng tế bào theo phương án 0 hoặc được phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0 để sử dụng trong việc điều trị bệnh nhân, cụ thể là người bệnh, cần ghép tạng và/hoặc được ghép tạng và/hoặc bệnh nhân đã ghép tạng.

52. Phương pháp điều trị bao gồm cho bệnh nhân cần ghép tạng và/hoặc có thể được ghép tạng và/hoặc bệnh nhân đã ghép tạng dùng đại phân tử, cụ thể là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể của chúng theo phương án bất kỳ trong số các phương án 1 đến 0 hoặc axit nucleic theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0 hoặc tế bào hoặc dòng tế bào theo phương án 0 hoặc được phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0.

53. Kháng nguyên trong đó epitop gồm hoặc chứa các trình tự từ vị trí 2b của CD127, cụ thể là chứa ít nhất 3, 4, 5, 6 hoặc 7 axit amin liên tiếp từ vị trí 2b của CD127.

54. Kháng nguyên theo phương án 0, trong đó epitop gồm hoặc chứa các trình tự từ vị trí gồm các axit amin 109 đến 127 của SEQ ID No:114, cụ thể là từ vị trí gồm các axit amin 110 đến 125, 112 đến 125, 112 đến 120, cụ thể là chứa ít nhất 3, 4, 5, 6 hoặc 7 axit amin liên tiếp từ vị trí đã nêu.

55. Kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 hoặc 0, trong đó epitop chứa ít nhất 3, 4, 5, 6 hoặc 7 axit amin liên tiếp của CD127, các axit amin liên tiếp này chứa P112 và/hoặc L115.

56. Kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0, trong đó epitop gồm hoặc chứa trình tự của SEQ ID No:116, cụ thể là chứa trình tự của SEQ ID No:86.

57. Kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0, trong đó epitop còn chứa các trình tự, cụ thể là ít nhất 3, 4, 5, 6 hoặc 7 axit amin liên tiếp, từ miền D1 của CD127, cụ thể là từ các axit amin 1-98 của SEQ ID No:114.

58. Kháng nguyên theo phương án 0, trong đó epitop chứa trình tự của CD127 người chứa hoặc gồm trình tự của SEQ ID No:115, cụ thể là chứa hoặc gồm SEQ ID No:110

59. Kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0, trong đó epitop còn chứa các trình tự, cụ thể là ít nhất 3, 4, 5, 6 hoặc 7 axit amin liên tiếp, từ các axit amin 180-220 của SEQ ID No:114, cụ thể là trong đó các trình tự đã nêu từ các axit amin 180-220 của SEQ ID No:114 gồm hoặc chứa trình tự của SEQ ID No:117, cụ thể là chứa hoặc gồm SEQ ID No:111.

60. Kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 0 đến 0, trong đó epitop gồm hoặc chứa các trình tự của CD127 người gồm:

- trình tự của SEQ ID No:110 hoặc trình tự của SEQ ID No:115;
- trình tự của SEQ ID No:111 hoặc trình tự của SEQ ID No:117; và
- trình tự của SEQ ID No:86 hoặc trình tự của SEQ ID No:116.

61. Kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0, trong đó epitop không chứa nhiều hơn 3, 4 hoặc 5 axit amin liên tiếp từ trình tự của các axit amin 99-108 của SEQ ID No:114 và/hoặc không chứa nhiều hơn 3, 4 hoặc 5 axit amin liên tiếp từ trình tự của các axit amin 128-179 của SEQ ID No:114, và/hoặc không chứa nhiều hơn 3, 4 hoặc 5 axit amin liên tiếp từ trình tự của các axit amin 220-239 của SEQ ID No:114, cụ thể là không chứa nhiều hơn 3, 4 hoặc 5 axit amin liên tiếp từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin đã nêu của SEQ ID No:114.

62. Kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 hoặc 0, trong đó trình tự epitop của CD127 người chứa SEQ ID No:110 không kéo dài để chứa các axit amin liền kề với trình tự đã nêu trong trình tự của CD127 người khoảng trên 1 axit amin đầu N hoặc trên 7 axit amin đầu C.

63. Kháng nguyên theo phương án 0, trong đó trình tự epitop của CD127 người chứa SEQ ID No:110 không kéo dài để chứa axit amin bất kỳ trong số các axit amin đầu N và/hoặc đầu C liền kề với trình tự đã nêu trong trình tự CD127 người.

64. Kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0, trong đó trình tự epitop của CD127 người chứa SEQ ID No:111 không kéo dài để chứa các axit amin liền kề với trình tự đã nêu trong trình tự của CD127 người khoảng trên 30 axit amin đầu N hoặc trên 30 axit amin đầu C.

65. Kháng nguyên theo phương án 0, trong đó trình tự epitop của CD127 người chứa SEQ ID No:111 không kéo dài để chứa axit amin bất kỳ trong số các axit amin đầu N và/hoặc đầu C liền kề với trình tự đã nêu trong trình tự CD127 người.

66. Kháng nguyên theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0, trong đó epitop là epitop cấu dạng, cụ thể là trong đó các peptit từ CD127 được chứa trong epitop này là dưới cấu dạng mà bất chước cấu dạng của các peptit tương ứng trong CD127 tự nhiên hoặc miễn ngoại bào của nó, cụ thể là trong CD127 dưới dạng monome của nó không có phối tử, dưới dạng được liên kết với γc của nó và/hoặc dưới dạng được liên kết với IL7 của nó.

67. Kháng nguyên theo phương án 0, trong đó epitop là epitop cấu dạng, trong đó các peptit từ CD127 được liên kết với khung phân tử cứng mà giữ cho chúng dưới cấu dạng mong muốn, cụ thể là kháng nguyên này thu được bằng cách sử dụng công nghệ CLIPS.

68. Epitop như được quy định theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0.

69. Axit nucleic mã hóa kháng nguyên như được quy định theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0.

70. Phương pháp sản xuất kháng thể bao gồm bước gây miễn dịch động vật không phải người kháng lại kháng nguyên như được quy định theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 67.

71. Phương pháp chọn lọc kháng thể, mảnh của kháng thể hoặc giả kháng thể, cụ thể là kháng thể thu được theo phương án 0 hoặc mảnh của giả kháng thể của chúng, bao gồm bước thử nghiệm khả năng liên kết của kháng thể này với ít nhất một kháng

nguyên như được quy định theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 67, cụ thể là trong đó phương pháp này gồm một số bước liên tục, mỗi bước thử nghiệm khả năng liên kết với peptit riêng biệt chứa trình tự liên kế đơn của CD127.

72. Phương pháp chọn lọc đại phân tử, cụ thể là kháng thể, cụ thể là kháng thể thu được theo phương án 0, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể này, bao gồm hoặc gồm bước kiểm tra khả năng liên kết của đại phân tử với CD127, cụ thể là với kháng nguyên của nó như được quy định theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 67 và tùy ý chọn lọc các đại phân tử theo phương án 0.

73. Phương pháp chọn lọc đại phân tử theo phương án bất kỳ trong số các phương án 71 hoặc 0, trong đó kháng nguyên chứa một số peptit không liên kế của CD127 và trong đó phương pháp này bao gồm một số bước, mỗi bước này gồm việc kiểm tra khả năng liên kết của đại phân tử với một trong số các peptit đã nêu của CD127.

74. Phương pháp, cụ thể là theo phương án bất kỳ trong số các phương án 71 đến 0, chọn lọc đại phân tử, cụ thể là kháng thể, cụ thể là kháng thể thu được theo phương án 0, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể này, bao gồm hoặc gồm bước kiểm tra sự nội nhập của CD127 trên các tế bào biểu hiện CD127 được cảm ứng bởi sự có mặt của đại phân tử theo phương án .

75. Phương pháp, cụ thể là theo phương án bất kỳ trong số các phương án 71 đến 0, chọn lọc đại phân tử, cụ thể là kháng thể, cụ thể là kháng thể thu được theo phương án 0, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể này, bao gồm hoặc gồm bước kiểm tra sự ức chế bởi đại phân tử đối với sự nội nhập của CD127 được cảm ứng bởi IL7 trên các tế bào biểu hiện CD127 và tùy ý chọn lọc các đại phân tử theo phương án 0.

76. Phương pháp, cụ thể là theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0, chọn lọc đại phân tử, cụ thể là kháng thể, cụ thể là kháng thể thu được theo phương án 0, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể này, bao gồm hoặc gồm bước thử nghiệm khả năng của đại phân tử này trong việc phá vỡ sự liên kết của CD127 với chuỗi ỵc nhờ sự liên kết của nó với CD127.

77. Phương pháp, cụ thể là theo phương án bất kỳ trong số các phương án 71 đến 76, chọn lọc đại phân tử, cụ thể là kháng thể, cụ thể là kháng thể thu được theo phương án 0, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên hoặc giả kháng thể này, bao gồm hoặc gồm

bước kiểm tra sự gia tăng sự trưởng thành của các DC được cảm ứng bởi TSLP với sự có mặt của đại phân tử và tùy ý chọn lọc các đại phân tử theo phương án bất kỳ trong số các phương án 0 đến 0.

78. Phương pháp theo phương án bất kỳ trong số các phương án 71 đến 0, trong đó phương pháp này còn gồm một hoặc nhiều bước dưới đây:

- a. Kiểm tra sự ức chế bởi đại phân tử đối với sự truyền tín hiệu cảm ứng bởi IL-7, cụ thể là sự phosphoryl hóa STAT5;
- b. Kiểm tra sự ức chế bởi đại phân tử đối với sự sản sinh TARC được cảm ứng bởi TSLP;
- c. Kiểm tra sự ức chế bởi đại phân tử đối với sự biểu hiện của integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ và/hoặc $\alpha 4/\beta 7$, cụ thể là sự biểu hiện trên bề mặt tế bào ở các lympho bào T;

Các tài liệu viện dẫn

Adams, A.B., Pearson, T.C., và Larsen, C.P. (2003). Heterologous immunity: an overlooked barrier to tolerance. *Immunol. Rev.* 196, 147–160.

Albuquerque, A.S., Cortesão, C.S., Foxall, R.B., Soares, R.S., Victorino, R.M.M., và Sousa, A.E. (2007). Rate of increase in circulating IL-7 and loss of IL-7R α expression differ in HIV-1 and HIV-2 infections: two lymphopenic diseases with similar hyperimmune activation but distinct outcomes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 3252–3259.

Baca, M., Presta, L.G., O'Connor, S.J., và Wells, J.A. (1997). Antibody humanization using monovalent phage display. *J. Biol. Chem.* 272, 10678–10684.

Van Bodegom, D., Zhong, J., Kopp, N., Dutta, C., Kim, M.-S., Bird, L., Weigert, O., Tyner, J., Pandey, A., Yoda, A., et al. (2012). Differences in signaling through the B-cell leukemia oncoprotein CRLF2 in response to TSLP and through mutant JAK2. *Blood* 120, 2853–2863.

Boshuizen, R.S., Marsden, C., Turkstra, J., Rossant, C.J., Slootstra, J., Copley, C., và Schwamborn, K. (2014). A combination of in vitro techniques for efficient discovery of functional monoclonal antibodies against human CXCR2. *mAbs* 6, 1415–1424.

Bour-Jordan, H., Esensten, J.H., Martinez-Llordella, M., Penaranda, C., Stumpf, M., và Bluestone, J.A. (2011). Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. *Immunol. Rev.* 241, 180–205.

Broux, B., Hellings, N., Venken, K., Rummens, J.-L., Hensen, K., Van Wijmeersch, B., và Stinissen, P. (2010). Haplotype 4 of the multiple sclerosis-associated interleukin-7 receptor alpha gene influences the frequency of recent thymic emigrants. *Genes Immun.* 11, 326–333.

Chassoux, D.M., Linares-Cruz, L.G., Bazin, H., và Stanislawski, M. (1988). K-cell-mediated cytotoxicity induced with rat monoclonal antibodies. I. Antibodies of various isotypes differ in their ability to induce cytotoxicity mediated by rat and human effectors. *Immunology* 65, 623–628.

Chothia, C., và Lesk, A.M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 196, 901–917.

Deininger, P. (1990). *Molecular cloning: A laboratory manual*: 2nd ed. Edited by J. Sambrook, E. F. Fritsch, và T. Maniatis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (in 3 volumes). *Anal. Biochem.* 186, 182–183.

Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R., và Roitt, I.M. (2011). *Roitt's Essential Immunology* (John Wiley & Sons).

Denucci, C.C., Mitchell, J.S., và Shimizu, Y. (2009). Integrin function in T-cell homing to lymphoid and nonlymphoid sites: getting there and staying there. *Crit. Rev. Immunol.* 29, 87–109.

Dustin, M.L., và Shaw, A.S. (1999). Costimulation: building an immunological synapse. *Science* 283, 649–650.

Edward G. Routledge, S.D.G. (1993). Reshaping antibodies for therapy. 13–44.

Flavell, D.J., Warnes, S.L., Bryson, C.J., Field, S.A., Noss, A.L., Packham, G., và Flavell, S.U. (2006). The anti-CD20 antibody rituximab augments the immunospecific therapeutic effectiveness of an anti-CD19 immunotoxin directed against human B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 134, 157–170.

Gaseitsiwe, S., Valentini, D., Mahdaviifar, S., Reilly, M., Ehrnst, A., và Maeurer, M. (2010). Peptide microarray-based identification of *Mycobacterium tuberculosis* epitope binding to HLA-DRB1*0101, DRB1*1501, and DRB1*0401. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 17, 168–175.

Gorfu, G., Rivera-Nieves, J., và Ley, K. (2009). Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr. Mol. Med.* 9, 836–850.

Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., và Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221–227.

Haas, J., Korpöral, M., Schwarz, A., Balint, B., và Wildemann, B. (2011). The interleukin-7 receptor α chain contributes to altered homeostasis of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 41, 845–853.

Haudebourg, T., Poirier, N., và Vanhove, B. (2009). Depleting T-cell subpopulations in organ transplantation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 22, 509–518.

He, R., và Geha, R.S. (2010). Thymic stromal lymphopoietin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1183, 13–24.

Henriques, C.M., Rino, J., Nibbs, R.J., Graham, G.J., và Barata, J.T. (2010). IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7R α in T cells. *Blood* 115, 3269–3277.

Von Horsten, H.H., Ogorek, C., Blanchard, V., Demmler, C., Giese, C., Winkler, K., Kaup, M., Berger, M., Jordan, I., và Sandig, V. (2010). Production of non-fucosylated antibodies by co-expression of heterologous GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase. *Glycobiology* 20, 1607–1618.

Inaba, K., Inaba, M., Witmer-Pack, M., Hatchcock, K., Hodes, R., và Steinman, R.M. (1995). Expression of B7 costimulator molecules on mouse dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 378, 65–70.

Jariwala, S.P., Abrams, E., Benson, A., Fodeman, J., và Zheng, T. (2011). The role of thymic stromal lymphopoietin in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 41, 1515–1520.

Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Miller, M., Perry, H.M. và Gottesman, K.S. (1992) Sequences of Proteins of Immunological Interest (DIANE publishing, 1992).

Kern, B., Kraynov, E., Lee, L.-F., Ray, R. (2013). Receptor occupancy and internalization of an anti-IL-7 receptor antibody. *Cytokine* 63, 276-277.

Kern, B., Li, W., Bono, C., Lee, L.-F., và Kraynov, E. (2015). Receptor occupancy and blocking of STAT5 signaling by an anti-IL-7 receptor α antibody in cynomolgus monkeys. *Cytometry B Clin. Cytom.*

Krehenbrink, M., Chami, M., Guilvout, I., Alzari, P.M., Pécorari F., Pugsley A.P. (2008). Artificial binding proteins (Affitins) as probes for conformational changes in secretin PulD. *J Mol Biol.* 2008 Nov 28.

Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Bodmer, J., Müller, W., Bontrop, R., Lemaitre, M., Malik, A., Barbié, V., và Chaume, D. (1999). IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* 27, 209–212.

Lei, L., Zhang, Y., Yao, W., Kaplan, M.H., và Zhou, B. (2011). Thymic Stromal Lymphopoietin Interferes with Airway Tolerance by Suppressing the Generation of Antigen-Specific Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 186, 2254–2261.

Luo, H., Wu, Z., Qi, S., Jin, W., Han, B., Wu, J. (2011). Ephrinb1 and Ephrinb2 are associated with interleukin-7 receptor α and retard its internalization from the cell surface. *J Biol Chem.* 2011 Dec 30;286 (52):44976-87.

Martin, A.C.R. (2001). Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In *Antibody Engineering*, D.R. Kontermann, và D.S. Dübel, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 422–439.

Mazzucchelli, R., Hixon, J.A., Spolski, R., Chen, X., Li, W.Q., Hall, V.L., Willette-Brown, J., Hurwitz, A.A., Leonard, W.J., và Durum, S.K. (2008). Development of regulatory T cells requires IL-7R α stimulation by IL-7 or TSLP. *Blood* 112, 3283–3292.

McElroy, C.A., Dohm, J.A., và Walsh, S.T.R. (2009). Structural and biophysical studies of the human IL-7/IL-7R α complex. *Struct. Lond. Engl.* 1993 17, 54–65.

McElroy, C.A., Holland, P.J., Zhao, P., Lim, J.-M., Wells, L., Eisenstein, E., và Walsh, S.T.R. (2012). Structural reorganization of the interleukin-7 signaling complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2503–2508

Michel, L., Berthelot, L., Pettré, S., Wiertlewski, S., Lefrère, F., Braudeau, C., Brouard, S., Soullillou, J.-P., và Laplaud, D.-A. (2008). Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor alpha-chain are excluded from the analysis. *J. Clin. Invest.* 118, 3411–3419.

Nancey, S., Hamzaoui, N., Moussata, D., Graber, I., Bienvenu, J., và Flourie, B. (2008). Serum interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and Crohn's disease activity. *Dig. Dis. Sci.* 53, 242–247.

Niederfellner, G., Lammens, A., Mundigl, O., Georges, G.J., Schaefer, W., Schwaiger, M., Franke, A., Wiechmann, K., Jenewein, S., Slootstra, J.W., et al. (2011). Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood* 118, 358–367.

Olivier, S., Jacoby, M., Brillon, C., Bouletreau, S., Mollet, T., Nerrière, O., Angel, A., Danet, S., Souttou, B., Guehenneux, F., et al. (2010). EB66 cell line, a duck embryonic stem cell-derived substrate for the industrial production of therapeutic monoclonal antibodies with enhanced ADCC activity. *mAbs* 2, 405–415.

Olkhanud, P.B., Rochman, Y., Bodogai, M., Malchinkhuu, E., Wejksza, K., Xu, M., Gress, R.E., Hesdorffer, C., Leonard, W.J., và Biragyn, A. (2011). Thymic stromal lymphopoietin is a key mediator of breast cancer progression. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 5656–5662.

Van Oosterhout, Y.V., van Emst, J.L., Bakker, H.H., Preijers, F.W., Schattenberg, A.V., Ruiter, D.J., Evers, S., Koopman, J.P., và de Witte, T. (2001). Production of anti-CD3 and anti-CD7 ricin A-immunotoxins for a clinical pilot study. *Int. J. Pharm.* 221, 175–186.

Papac, D.I., Hoyes, J., và Tomer, K.B. (1994). Epitope mapping of the gastrin-releasing peptide/anti-bombesin monoclonal antibody complex by proteolysis followed by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Protein Sci.* 3, 1485–1492.

Park, L.S., Martin, U., Garka, K., Gliniak, B., Di Santo, J.P., Muller, W., Largaespada, D.A., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Farr, A.G., et al. (2000). Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *J. Exp. Med.* 192, 659–670.

Paus, D., và Winter, G. (2006). Mapping epitopes and antigenicity by site-directed masking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9172–9177.

Poirier, N., Haudebourg, T., Brignone, C., Dilek, N., Hervouet, J., Minault, D., Coulon, F., de Silly, R.V., Triebel, F., Blancho, G., et al. (2011). Antibody-mediated depletion of lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3 (+))-activated T lymphocytes prevents delayed-type hypersensitivity in non-human primates. *Clin. Exp. Immunol.* 164, 265–274.

Racapé, M., Vanhove, B., Soulillou, J.-P., và Brouard, S. (2009). Interleukin 7 receptor alpha as a potential therapeutic target in transplantation. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 57, 253–261.

Rader, C., Cheresch, D.A., và Barbas, C.F. (1998). A phage display approach for rapid antibody humanization: designed combinatorial V gene libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8910–8915.

Reche, P.A., Soumelis, V., Gorman, D.M., Clifford, T., Liu Mr, null, Travis, M., Zurawski, S.M., Johnston, J., Liu, Y.J., Spits, H., et al. (2001). Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 167, 336–343.

Risberg, K., Fodstad, Ø., và Andersson, Y. (2011). Synergistic anticancer effects of the 9.2.27PE immunotoxin and ABT-737 in melanoma. *PloS One* 6, e24012.

Roan, F., Bell, B.D., Stoklasek, T.A., Kitajima, M., Han, H., và Ziegler, S.F. (2012). The multiple facets of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) during allergic inflammation and beyond. *J. Leukoc. Biol.* 91, 877–886.

Rochman, Y., Kashyap, M., Robinson, G.W., Sakamoto, K., Gomez-Rodriguez, J., Wagner, K.-U., và Leonard, W.J. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-mediated

STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19455–19460.

Rosok, M.J., Yelton, D.E., Harris, L.J., Bajorath, J., Hellström, K.E., Hellström, I., Cruz, G.A., Kristensson, K., Lin, H., Huse, W.D., et al. (1996). A combinatorial library strategy for the rapid humanization of anticarcinoma BR96 Fab. *J. Biol. Chem.* 271, 22611–22618.

Schlehuber, S., Skerra, A. (2002). Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant -- a so-called 'anticalin' -- using a molecular random approach. *Biophys Chem.* 2002 May 2;96 (2-3):213-28

Shaw, A.S., và Dustin, M.L. (1997). Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* 6, 361–369.

Shinohara, T., Nemoto, Y., Kanai, T., Kameyama, K., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nakamura, T., Totsuka, T., Ikuta, K., và Watanabe, M. (2011). Upregulated IL-7 receptor α expression on colitogenic memory CD4⁺ T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 2623–2632.

Shochat, C., Tal, N., Bandapalli, O.R., Palmi, C., Ganmore, I., te Kronnie, G., Cario, G., Cazzaniga, G., Kulozik, A.E., Stanulla, M., et al. (2011). Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *J. Exp. Med.* 208, 901–908.

Skerra, A. (2008). Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J.* 2008 Jun;275 (11):2677-83. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06439.x. Epub 2008 Apr 24.

Suckau, D., Köhl, J., Karwath, G., Schneider, K., Casaretto, M., Bitter-Suermann, D., và Przybylski, M. (1990). Molecular epitope identification by limited proteolysis of an immobilized antigen-antibody complex and mass spectrometric peptide mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 9848–9852

Taylor, B.C., Zaph, C., Troy, A.E., Du, Y., Guild, K.J., Comeau, M.R., và Artis, D. (2009). TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J. Exp. Med.* 206, 655–667.

Teeling, J.L., Mackus, W.J.M., Wiegman, L.J.J.M., van den Brakel, J.H.N., Beers, S.A., French, R.R., van Meerten, T., Ebeling, S., Vink, T., Slootstra, J.W., et al. (2006). The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 362–371.

Timmerman, P., Puijk, W.C., và Meloen, R.H. (2007). Functional reconstruction and synthetic mimicry of a conformational epitope using CLIPS technology. *J. Mol. Recognit. JMR* 20, 283–299.

Walsh, S.T.R. (2012). Structural insights into the common γ -chain family of cytokines and receptors from the interleukin-7 pathway. *Immunol. Rev.* 250, 303–316.

Watanabe, N., Wang, Y.-H., Lee, H.K., Ito, T., Wang, Y.-H., Cao, W., và Liu, Y.-J. (2005a). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436, 1181–1185.

Watanabe, N., Hanabuchi, S., Marloie-Provost, M.-A., Antonenko, S., Liu, Y.-J., và Soumelis, V. (2005b). Human TSLP promotes CD40 ligand-induced IL-12 production by myeloid dendritic cells but maintains their Th2 priming potential. *Blood* 105, 4749–4751.

Ye, J., Ma, N., Madden, T.L., và Ostell, J.M. (2013). IgBLAST: an immunoglobulin variable domain sequence analysis tool. *Nucleic Acids Res.* 41, W34–W40.

Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Fang, C., Cousins, D., Zhang, G., Gu, S., Gao, Z., Shamji, B., et al. (2008). Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 2790–2798.

Zhi, K., Li, M., Zhang, X., Gao, Z., Bai, J., Wu, Y., Zhou, S., Li, M., và Qu, L. (2014). $\alpha 4\beta 7$ Integrin (LPAM-1) is upregulated at atherosclerotic lesions and is involved in atherosclerosis progression. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 33, 1876–1887.

Zhong, J., Sharma, J., Raju, R., Palapetta, S.M., Prasad, T.S.K., Huang, T.-C., Yoda, A., Tyner, J.W., van Bodegom, D., Weinstock, D.M., et al. (2014). TSLP signaling pathway map: a platform for analysis of TSLP-mediated signaling. Database J. Biol. Databases Curation 2014, bau007.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà gắn kết đặc hiệu với CD127 của người, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó này chứa chuỗi VH chứa ít nhất một trong số các trình tự axit amin sau:

- (a) VHCDR1 của SEQ ID NO:10;
 - (b) VHCDR2 của SEQ ID NO:12; và
 - (c) VHCDR3 của SEQ ID NO:14 hoặc của SEQ ID NO:48;
- và chuỗi VL chứa ít nhất một trong số các trình tự axit amin dưới đây:
- (d) VLCDR1 của SEQ ID NO:16 hoặc của SEQ ID NO:50;
 - (e) VLCDR2 của SEQ ID NO:18 hoặc của SEQ ID NO:52; và
 - (f) VLCDR3 của SEQ ID NO:20.

2. Kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này là kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể khử miễn dịch.

3. Dược phẩm chứa kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1.

4. Kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó chứa sáu trình tự CDR cấu thành từ VHCDR1 SEQ ID NO:10, VHCDR2 SEQ ID NO:12, VHCDR3 SEQ ID NO:48, VLCDR1 SEQ ID NO:50, VLCDR2 SEQ ID NO:52, và VLCDR3 SEQ ID NO:20.

5. Kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó này là chất đối kháng của sự truyền tín hiệu IL-7R được cảm ứng bởi IL-7.

6. Kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, mà không làm gia tăng sự trưởng thành của các tế bào đuôi gai cảm ứng bởi TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin).

7. Kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, mà không gây cảm ứng sự nội nhập của CD127 ở tế bào được ủ với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó này so với các tế bào được ủ khi không có kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó này.

8. Kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó với sự có mặt của IL7 và kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó sự biểu hiện CD127 trên bề mặt tế bào của chúng không bị giảm đáng kể và/hoặc sự nội nhập của CD127 bị ức chế so với các tế bào được ủ với interleukin 7 (IL-7) và khi không có kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó này.

9. Kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 chứa:

(i) chuỗi nặng có trình tự của SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:38, hoặc SEQ ID NO:40; và

(ii) chuỗi nhẹ có trình tự của SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:44, hoặc SEQ ID NO:46.

10. Kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 chứa:

(i) chuỗi nặng có trình tự của SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, hoặc SEQ ID NO:54; và

(ii) chuỗi nhẹ có trình tự của SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:56.

11. Phân tử axit nucleic tái tổ hợp được phân lập, trong đó phân tử axit nucleic này bao gồm phân tử axit nucleic tái tổ hợp mã hóa chuỗi VH và/hoặc VL của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Effimune
 <120> KHÁNG THỂ PHÂN LẬP GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI CD127, PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC TÁI TỔ HỢP VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY
 <130> B10744B
 <150> US 62/010117
 <151> 2014-06-10
 <150> EP 15305078.6
 <151> 2015-01-23
 <160> 132
 <170> PatentIn phiên bản 3.5
 <210> 1
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự tổng hợp
 <400> 1
 gcggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ctagtgcagc ctggaggggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag tctcaggatt cactctcagt gactattaca tggcctgggt cgcgcaggct 120
 ccaaagaagg gtctggaatg ggtcgcaacc attagtgccg gtgggtctcag aacttactat 180
 ccagactccg tgaagggccg cttcactatc tccagagatg atgcaaaaag gagcctcttc 240
 ctgcaaatga ccagtctgaa gtctgaggac acggccactt attactgtgc aagaccgatg 300
 tctgcacact atggttttaa ctactttgat tactggggcc aaggagtcac ggtcacagtc 360
 tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc 420
 tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccggc tgtcctacag 540
 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 600
 cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt 660
 gagcccaa atctgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg 720
 gggggaccgt cagtcttcct cttccccca aaaccgaagg acaccctcat gatctcccg 780
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagt 840
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 900
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgcgaaaacc 1020
 atctccaaag ccaaagggca gcccagagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg 1080
 gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttctctc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1260
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga 1359

<210> 2
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 2
 Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Leu Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ala Ser Gly Leu Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Arg Ser Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Pro Met Ser Ala His Tyr Gly Phe Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Ala Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 3
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 3

gacatccaga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctctgggaga aactgtcacc 60
 atcgaatgtc gaacaagtga ggacatttac aatgggttag catggtatca gcagaagcca 120
 gggaaatctc ctcagctcct ggtctatagt gcaaatactg tacatattgg ggtcccatca 180
 cggttcagtg gcagtggatc tggtagacag tatttctctca agataaacag cctgcaattt 240
 gaagatgtcg caagttattt ctgtcaacag tattacgatt atccgctcgc gttcgggttct 300
 gggaccaagc tggagatcaa acggacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttggtg gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag 645

<210> 4
 <211> 214
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 4

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1           5           10           15
Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Thr Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Gly
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
          35           40           45
Tyr Ser Ala Asn Ser Leu His Ile Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Phe
65           70           75           80
Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
          85           90           95
Ala Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
          115          120          125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
          130          135          140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
          165          170          175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
          180          185          190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
          195          200          205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210

```

<210> 5

<211> 1350

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 5

```

gcggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctagtgcagc ctggaggggtc cctgaaactc      60
tcctgtgcag tctcaggatt cactctcagt gactattaca tggcctgggt cccgccaggct      120
ccaaagaagg gtctggaatg ggtcgcaacc attagtgcca gtgggctcag aacttactat      180
ccagactccg tgaagggccg cttcactatc tccagagatg atgcaaaaag gagcctcttc      240

```

```

ctgcaaatga ccagtctgaa gtctgaggac acggccactt attactgtgc aagaccgatg      300
tctgcacact atggtttttaa ctactttgat tactggggcc aaggagtcac ggtcacagtc      360
tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc      420
tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg      480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag      540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg      600
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt      660
gagtccaaat atgggtcccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcct gggggggacca      720
tcagtcttcc tgttcccccc aaaaccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag      780
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac      840
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc      900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctgc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag      960
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa    1020
gccaaagggc agccccgaga gccacagtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg    1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc    1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg    1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag    1260
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag    1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaata      1350

```

<210> 6

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 6

```

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

```

```

145                      150                      155                      160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
                      165                      170                      175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
                      180                      185                      190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
                      195                      200                      205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
                      210                      215                      220
Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225                      230                      235                      240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                      245                      250                      255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
                      260                      265                      270
Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
                      275                      280                      285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
                      290                      295                      300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                      310                      315                      320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
                      325                      330                      335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
                      340                      345                      350
Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
                      355                      360                      365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
                      370                      375                      380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                      390                      395                      400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
                      405                      410                      415
Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
                      420                      425                      430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                      435                      440                      445
Lys

```

```

<210> 7
<211> 645
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> Trình tự tổng hợp

```

```

<400> 7

```

```

gacatccaga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctctgggaga aactgtcacc      60
atcgaatgtc gaacaagtga ggacatttac aatgggttag catggtatca gcagaagcca      120
gggaaatctc ctcagctcct ggtctatagt gcaaatagct tacatatagg ggtcccatca      180
cggttcagtg gcagtggatc tggtaacacag tattctctca agataaacag cctgcaattt      240
gaagatgtcg caagttatth ctgtcaacag tattacgatt atccgctcgc gttcgggttct      300
gggaccaagc tggagatcaa acggacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcga      360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag                        645

```

<210> 8

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 8

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1              5              10              15
Glu Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Thr Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Gly
              20              25              30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
              35              40              45
Tyr Ser Ala Asn Ser Leu His Ile Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
              50              55              60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Phe
65              70              75              80
Glu Asp Val Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu
              85              90              95
Ala Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
              100             105             110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
              115             120             125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
              130             135             140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145             150             155             160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
              165             170             175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
              180             185             190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
              195             200             205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys

```

210

<210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 9
 ttccactctca gtgactatta catggcc
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

27

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp
 <400> 10

Phe Thr Leu Ser Asp Tyr Tyr Met Ala
 1 5

<210> 11
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 11
 accattagtg ccagtggggt cagaacttac tatccagact ccgtgaaggg c

51

<210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 12

Thr Ile Ser Ala Ser Gly Leu Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 13
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 13

cggatgtctg cacactatgg ttttaactac ttgattac

39

<210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 14

Pro Met Ser Ala His Tyr Gly Phe Asn Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 15
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 15

cgaacaagtg aggacattta caatggttta gca

33

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 16

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

<210> 17

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

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 17
 agtgcaaata gcttacatat t
 <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

21

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 18
 Ser Ala Asn Ser Leu His Ile
 1 5

<210> 19
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 19

caacagtatt acgattatcc gctcgcg

27

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 20

Gln Gln Tyr Tyr Asp Tyr Pro Leu Ala
 1 5

<210> 21
 <211> 366
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 21

```

gcgggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ctagtgcagc ctggaggggtc cctgaaactc      60
tcctgtgcag tctcaggatt cactctcagt gactattaca tggcctgggt ccgccaggct      120
ccaaagaagg gtctggaatg ggtcgcaacc attagtgccg gtgggctcag aacttactat      180
ccagactccg tgaagggccg cttcactatc tccagagatg atgcaaaaag gagcctcttc      240
ctgcaaataa ccagtctgaa gtctgaggac acggccactt attactgtgc aagaccgatg      300
tctgcacact atggttttaa ctactttgat tactggggcc aaggagtcac ggtcacagtc      360
tcctca

```

<210> 22

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 22

```

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

```

<210> 23

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 23

```

gacatccaga tgacacagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctctgggaga aactgtcacc      60
atcgaatgtc gaacaagtga ggacatttac aatgggttag catggtatca gcagaagcca      120
gggaaatctc ctcagctcct ggtctatagt gcaaatagct tacatattgg ggtcccatca      180
cggttcagtg gcagtggatc tggtagacag tattctctca agataaacag cctgcaattt      240
gaagatgtcg caagttatct ctgtcaacag tattacgatt atccgctcgc gttcggttct      300
gggaccaagc tggagatcaa acgg                                           324

```

<210> 24

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 24

```

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

```

<210> 25

<211> 993

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 25

```

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacccct cctccaagag cacctctggg      60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg      120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca      180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      240

```

```

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccac ccgtgcccag cacctgaact cctggggggga      360
ccgtcagtcct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctc      420
gaggtcacat gcgtgggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaaagc cgcgggagga gcagtacaac      540
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag      600
gagtacaagt gcaagggtctc caacaaaagc ctcccagccc ccatcgcgaa aaccatctcc      660
aaagccaaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag      720
atgaccaaga accagggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc      780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg      840
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg      900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg      960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga                                  993

```

<210> 26

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 26

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1          5          10          15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          20          25          30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          35          40          45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
          50          55          60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65          70          75          80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
          85          90          95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
          100         105         110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
          115         120         125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
          130         135         140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
          145         150         155         160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
          165         170         175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
          180         185         190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
          195         200         205

```

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

<210> 27
 <211> 984
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 27
 gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
 agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 120
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtc 300
 aaatatggtc ccccatgccc accatgcccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360
 ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgagggtcacg 420
 tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
 ggcggtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720
 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 840
 gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
 aatgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
 ctctccctgt ctccgggtaa atga 984

<210> 28
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 28

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1          5          10          15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          20          25          30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          35          40          45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
          50          55          60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65          70          75          80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
          85          90          95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
          100          105          110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
          115          120          125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
          130          135          140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145          150          155          160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
          165          170          175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
          180          185          190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
          195          200          205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
          210          215          220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225          230          235          240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
          245          250          255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
          260          265          270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
          275          280          285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
          290          295          300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305          310          315          320
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          325

```

<210> 29

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 29

```
acggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga      60
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg      120
aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc      180
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa      240
cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc      300
ttcaacaggg gagagtgtta g                                     321
```

<210> 30

<211> 106

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 30

```
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
```

<210> 31

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 31

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1          5          10          15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          20          25          30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          35          40          45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
          50          55          60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65          70          75          80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
          85          90          95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
          100          105          110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
          115          120          125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
          130          135          140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145          150          155          160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
          165          170          175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
          180          185          190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
          195          200          205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
          210          215          220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225          230          235          240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
          245          250          255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
          260          265          270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
          275          280          285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
          290          295          300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305          310          315          320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          325          330

```

<210> 32

<211> 326

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 32

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1           5           10           15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          20           25           30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          35           40           45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
          50           55           60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65           70           75           80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
          85           90           95
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
          100          105          110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
          115          120          125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
          130          135          140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145          150          155          160
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
          165          170          175
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
          180          185          190
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
          195          200          205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
          210          215          220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225          230          235          240
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
          245          250          255
Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
          260          265          270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
          275          280          285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
          290          295          300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305          310          315          320
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          325

```

<210> 33

<211> 327

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 33

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 34
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 34

```

Ala Glu Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala
1           5           10           15
Leu Lys Ser Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
           20           25           30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Ser Ser
           35           40           45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Leu
           50           55           60
Thr Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val
65           70           75           80
Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
           85           90           95
Ile Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
           100          105          110
Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
           115          120          125
Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp
           130          135          140
Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val His Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp
145          150          155          160
Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Pro Glu Glu Gln Phe Asn
           165          170          175
Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Leu His Gln Asp Trp
           180          185          190
Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys Val Thr Ser Ala Ala Phe Pro
           195          200          205
Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Glu Gly Arg Thr Gln Val
           210          215          220
Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr Lys Glu Glu Met Thr Gln Asn
225          230          235          240
Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile
           245          250          255
Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn
           260          265          270
Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys
           275          280          285
Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys
           290          295          300

```

Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser His Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 35
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 35

caggtgcagc	tggtcgaatc	tgaggggggt	ctggtcaagc	ccggagggtc	actgcgtctg	60
tcatgcgccg	tctcaggggt	cacactgtct	gactactata	tggtctgggt	gcgacaggca	120
ccaggcaagg	gactggagtg	ggtcgccact	atctctgcta	gtggcctgag	gacctactat	180
cctgatagtg	tgaaggggaag	gttcacaatt	tcacgggacg	atgcaaaaaa	ctccctgtac	240
ctgcagatga	atagcctgag	agcagaagac	accgccgtct	actattgcgc	ccgcccgaatg	300
agcgctcact	atggcttcaa	ctactttgat	tattgggggc	agggtaccct	ggtgacagtc	360
tccagc						366

<210> 36
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 36

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

<210> 37
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 37

```
cagggtgcagc tggtcgaatc tgggggggga ctgggtcaaac ccggaggctc actgcgtctg      60
tcatgtgccg tctcaggctt tacactgagc gactactata tggcatggat ccgacaggca      120
ccaggcaagg gactggagtg ggtgtctact atttctgccca gtggcctgag gacctactat      180
cctgacagtg tcaagggaag gttcacaatc tcacgggata acgctaaaaa ttccctgtac      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaagac accgctgtgt actattgcgc tcgcccaatg      300
tccgcacact atggcttcaa ttactttgat tattgggggc aggggtaccct ggtgacagtc      360
tccagc      366
```

<210> 38
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 38

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

<210> 39
 <211> 366
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 39

```
caggtgcagc tggtcgaatc agggggggga ctgggtcaaac ccggggggctc actgcgtctg      60
tcatgtgccg tctcaggctt cactactgagc gactactata tggcatggat ccgacaggca      120
ccaggcaagg gactggagtg ggtgtctact atttctgcca gtggcctgag gacctactat      180
cctgacagtg tcaaggggaag gttcacaatc tcacgggata acgctaaaaa ttccctgtac      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaagac accgctgtgt actattgcgc tcgcccactg      300
tccgcacact atggcttcaa ttactttgat tattgggggc aggggtaccct ggtgacagtc      360
tccagc
```

<210> 40

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 40

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

<210> 41

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 41

```

gaaattgtga tgactcagtc tcccgtacc ctgtcagtct ctcccggcga acgtgctacc      60
ctgtcctgcc gaacctcaga agatatctac aacgggctgg cttgggtatca gcagaagccc      120
ggacaggccc ctaggctgct ggtgtactcc gctaattctc tgcacatcgg cattccagca      180
cggttctctg gtagtggctc aggaactgag tataccctga caatctccag cctgcagagc      240
gaagacttcg cagtgtactt ttgccagcag tactatgatt atcccctggc ctttggcgga      300
gggaccaagg tcgagatcaa g                                           321

```

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 42

```

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

```

<210> 43

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 43

```

gaaatcgtga tgactcagtc tcctgctact ctgtccgtgt cccctgggtga acgtgctact      60
ctgtcctgtc gtacctccga agatatctac aacgggctgg cttgggtatca gcagaagccc      120
ggacaggccc ctaggctgct gatctactcc gctaattctc tgcacatcgg cattccagca      180
cggttctctg gtagtggctc aggaactgag tttaccctga caatttccag cctgcagagc      240
gaagacttcg cagtgtacta ttgccagcag tactatgatt atcccctggc ctttggcgga      300

```

gggaccaagg tcgagatcaa a

321

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 44

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

<210> 45

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 45

gaaattgtga	tgactcagag	ccttgctaca	ctgtccgtca	gccctggaga	acgtgctaca	60
ctgtcctgtc	gcacctcaga	agatatattac	caggggctgg	cttgggtatca	gcagaagccc	120
ggacaggccc	ctaggctgct	gatctactcc	gctaacactc	tgacatcgg	cattccagca	180
cggttctctg	gtagtggctc	aggaaccgag	tttaccctga	caatttccag	cctgcagtct	240
gaagacttcg	cagtgtacta	ttgccagcag	tactatgatt	atcccctggc	ctttggcgga	300
gggacaaagg	tcgagatcaa	a				321

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 46

```

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

```

<210> 47

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 47

ccactgtccg cacactatgg cttcaattac ttgattat

39

<210> 48

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 48

```

Pro Leu Ser Ala His Tyr Gly Phe Asn Tyr Phe Asp Tyr
1           5           10

```

<210> 49

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 49

tgtcgcacct cagaagatat ttaccagggg ctggct

36

<210> 50

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 50

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

1 5 10

<210> 51

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 51

tccgctaaca ctctgcacat c

21

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 52

Ser Ala Asn Thr Leu His Ile

1 5

<210> 53

<211> 1350

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 53

```

caggtgcagc tggtcgaatc agggggggga ctgggtcaaac ccggggggctc actgcgtctg      60
tcatgtgccg tctcaggctt cacactgagc gactactata tggcatggat ccgacaggca      120
ccaggcaagg gactggagtg ggtgtctact atttctgccg gtggcctgag gacctactat      180
cctgacagtg tcaagggaag gttcacaatc tcacgggata acgctaaaaa ttccctgtac      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaagac accgctgtgt actattgcgc tcgcccactg      300
tccgcacact atggcttcaa ttactttgat tattgggggc aggggtaccct ggtgacagtc      360
tccagcgcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc      420
tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg      480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ctttcccggc tgtcctacag      540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg      600
aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagagagtt      660
gagtccaaat atgggtcccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcct gggggggacca      720
tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag      780
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac      840
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc      900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacgcgc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag      960
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa     1020
gccaaagggc agccccgaga gccacagtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg     1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc     1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg     1200
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag     1260
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag     1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaata      1350

```

<210> 54

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 54

```

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

```

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Pro Leu Ser Ala His Tyr Gly Phe Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 55

<211> 642
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 55

```

gaaattgtga tgactcagag ccctgctaca ctgtccgtca gccctggaga acgtgctaca      60
ctgtcctgtc gcacctcaga agatatttac caggggctgg cttggtatca gcagaagccc      120
ggacaggccc ctaggctgct gatctactcc gctaacactc tgcacatcgg cattccagca      180
cggttctctg gtagtggctc aggaaccgag tttaccctga caatttccag cctgcagtct      240
gaagacttcg cagtgtacta ttgccagcag tactatgatt atcccctggc ctttggcgga      300
gggacaaagg tcgagatcaa aacggtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct      360
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc      420
agagaggcca agtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag      480
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg      540
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg      600
agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag                        642

```

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

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 56

```

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

```

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 57
 <211> 439
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 57

Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Asp
 1 5 10 15
 Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val Asn Gly Ser Gln
 20 25 30
 His Ser Leu Thr Cys Ala Phe Glu Asp Pro Asp Val Asn Thr Thr Asn
 35 40 45
 Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val Lys Cys Leu Asn
 50 55 60
 Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe Leu
 65 70 75 80
 Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly Glu Lys Ser Leu
 85 90 95
 Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr Thr Ile Val Lys Pro Glu Ala Pro
 100 105 110
 Phe Asp Leu Ser Val Ile Tyr Arg Glu Gly Ala Asn Asp Phe Val Val
 115 120 125
 Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln Lys Lys Tyr Val Lys Val Leu Met
 130 135 140
 His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn Lys Trp Thr His
 145 150 155 160
 Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gln Arg Lys Leu Gln
 165 170 175
 Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile Pro Asp His Tyr
 180 185 190
 Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr Tyr Phe Arg Thr
 195 200 205
 Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp Pro Ile Leu Leu Thr
 210 215 220
 Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala Leu Leu Val Ile Leu Ala
 225 230 235 240
 Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu

245 250 255
 Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys
 260 265 270
 Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile
 275 280 285
 His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu
 290 295 300
 Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu Lys Gln Arg Leu
 305 310 315 320
 Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu Asp Val Val Ile
 325 330 335
 Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr Cys Leu Ala Gly
 340 345 350
 Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser Ser Arg Ser Leu
 355 360 365
 Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln Asp Leu
 370 375 380
 Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Pro Phe Ser
 385 390 395 400
 Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala Gln Gly Gln Pro
 405 410 415
 Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met
 420 425 430
 Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln
 435

<210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 58

Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu
 1 5 10 15

<210> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 59

Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser
 1 5 10 15

<210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 60

Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr
 1 5 10 15

<210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 61

Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 62

Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val Asn Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 63

Ser	Cys	Tyr	Ser	Gln	Leu	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Gln	His	Ser	Leu
1			5					10					15	

<210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 64

Gln	Leu	Glu	Val	Asn	Gly	Ser	Gln	His	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Phe
1			5					10					15	

<210> 65

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 65

Asn	Gly	Ser	Gln	His	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Phe	Glu	Asp	Pro	Asp
1			5					10					15	

<210> 66

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 66

His	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Phe	Glu	Asp	Pro	Asp	Val	Asn	Thr	Thr
1			5						10				15	

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 67

Cys	Ala	Phe	Glu	Asp	Pro	Asp	Val	Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Glu	Phe
1					5				10					15

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 68

Asp	Pro	Asp	Val	Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Glu	Phe	Glu	Ile	Cys	Gly
1				5					10					15

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 69

Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Glu	Phe	Glu	Ile	Cys	Gly	Ala	Leu	Val	Glu
1				5					10					15

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 70

Leu	Glu	Phe	Glu	Ile	Cys	Gly	Ala	Leu	Val	Glu	Val	Lys	Cys	Leu
1				5					10					15

<210> 71

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 71

Ile	Cys	Gly	Ala	Leu	Val	Glu	Val	Lys	Cys	Leu	Asn	Phe	Arg	Lys
1				5				10					15	

<210> 72

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 72

Leu	Val	Glu	Val	Lys	Cys	Leu	Asn	Phe	Arg	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile
1				5				10					15	

<210> 73

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 73

Lys	Cys	Leu	Asn	Phe	Arg	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Phe	Ile	Glu
1				5				10					15	

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 74

Phe	Arg	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Phe	Ile	Glu	Thr	Lys	Lys	Phe
1				5				10					15	

<210> 75

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 75

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

1 5 10 15

<210> 76

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 76

Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile

1 5 10 15

<210> 77

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 77

Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val

1 5 10 15

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 78

Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly Glu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 79

Ser	Asn	Ile	Cys	Val	Lys	Val	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Cys	Lys
1				5					10					15

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 80

Val	Lys	Val	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Cys	Lys	Lys	Ile	Asp	Leu
1				5					10					15

<210> 81

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 81

Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Cys	Lys	Lys	Ile	Asp	Leu	Thr	Thr	Ile	Val
1				5					10					15

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 82

Thr	Cys	Lys	Lys	Ile	Asp	Leu	Thr	Thr	Ile	Val	Lys	Pro	Glu	Ala
1				5					10					15

<210> 83
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 83

Ile	Asp	Leu	Thr	Thr	Ile	Val	Lys	Pro	Glu	Ala	Pro	Phe	Asp	Leu
1					5				10				15	

<210> 84
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 84

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

<210> 85
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 85

Pro	Glu	Ala	Pro	Phe	Asp	Leu	Ser	Val	Ile	Tyr	Arg	Glu	Gly	Ala
1				5					10				15	

<210> 86
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 86

Phe Asp Leu Ser Val Ile Tyr Arg Glu Gly Ala Asn Asp Phe Val
 1 5 10 15

<210> 87
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 87

Val Ile Tyr Arg Glu Gly Ala Asn Asp Phe Val Val Thr Phe Asn
 1 5 10 15

<210> 88
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 88

Glu Gly Ala Asn Asp Phe Val Val Thr Phe Asn Thr Ser His Leu
 1 5 10 15

<210> 89
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 89

Asp Phe Val Val Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln Lys Lys Tyr
 1 5 10 15

<210> 90
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 90

Thr	Phe	Asn	Thr	Ser	His	Leu	Gln	Lys	Lys	Tyr	Val	Lys	Val	Leu
1				5					10					15

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 91

Ser	His	Leu	Gln	Lys	Lys	Tyr	Val	Lys	Val	Leu	Met	His	Asp	Val
1				5					10					15

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 92

Lys	Lys	Tyr	Val	Lys	Val	Leu	Met	His	Asp	Val	Ala	Tyr	Arg	Gln
1				5					10					15

<210> 93

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 93

Lys	Val	Leu	Met	His	Asp	Val	Ala	Tyr	Arg	Gln	Glu	Lys	Asp	Glu
1				5					10					15

<210> 94

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 94

His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn Lys Trp Thr
 1 5 10 15

<210> 95

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 95

Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn Lys Trp Thr His Val Asn Leu
 1 5 10 15

<210> 96

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 96

Lys Asp Glu Asn Lys Trp Thr His Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys
 1 5 10 15

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 97

Lys Trp Thr His Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu
 1 5 10 15

<210> 98

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 98

Val	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Leu	Gln	Arg	Lys	Leu
1				5					10					15

<210> 99

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 99

Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Leu	Gln	Arg	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala
1				5					10					15

<210> 100

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 100

Thr	Leu	Leu	Gln	Arg	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	Met	Tyr	Glu	Ile
1				5					10					15

<210> 101

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 101

Arg	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	Met	Tyr	Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ser
1					5				10					15

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 102

Pro	Ala	Ala	Met	Tyr	Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Pro	Asp	His
1					5				10				15	

<210> 103

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 103

Tyr	Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly
1				5					10				15	

<210> 104

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 104

Val	Arg	Ser	Ile	Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Phe	Trp	Ser	Glu
1					5					10			15	

<210> 105

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 105

Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Phe	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Pro	Ser
1					5					10			15	

<210> 106

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 106

Phe	Lys	Gly	Phe	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Pro	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Arg
1				5					10					15

<210> 107

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 107

Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Pro	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Arg	Thr	Pro	Glu	Ile
1				5					10					15

<210> 108

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 108

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

<210> 109

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 109

Tyr	Phe	Arg	Thr	Pro	Glu	Ile	Asn	Asn	Ser	Ser	Gly	Glu	Met	Asp
1				5					10					15

<210> 110

<211> 31
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 110

Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr
 1 5 10 15

Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val
 20 25 30

<210> 111
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 111

Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile Pro Asp His Tyr Phe Lys Gly Phe
 1 5 10 15

Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile
 20 25 30

<210> 112
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 112

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

```

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
      85                      90                      95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
      100                    105                    110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
      115                    120                    125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
      130                    135                    140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
      145                    150                    155                    160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
      165                    170                    175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
      180                    185                    190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
      195                    200                    205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
      210                    215                    220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
      225                    230                    235                    240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
      245                    250                    255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
      260                    265                    270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
      275                    280                    285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
      290                    295                    300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
      305                    310                    315                    320
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      325

```

<210> 113

<211> 459

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 113

```

Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met Val Phe Ser Leu Leu Gln
1      5                      10                      15
Val Val Ser Gly Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp
      20                    25                    30
Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val
      35                    40                    45
Asn Gly Ser Gln His Ser Leu Thr Cys Ala Phe Glu Asp Pro Asp Val

```

50		55		60
Asn Thr Thr Asn Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val				
65		70		75
Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr				80
	85		90	95
Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly				
	100		105	110
Glu Lys Ser Leu Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr Thr Ile Val Lys				
	115		120	125
Pro Glu Ala Pro Phe Asp Leu Ser Val Ile Tyr Arg Glu Gly Ala Asn				
	130		135	140
Asp Phe Val Val Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln Lys Lys Tyr Val				
145		150		155
Lys Val Leu Met His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn				
	165		170	175
Lys Trp Thr His Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gln				
	180		185	190
Arg Lys Leu Gln Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile				
	195		200	205
Pro Asp His Tyr Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr				
210		215		220
Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp Pro				
225		230		235
Ile Leu Leu Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala Leu Leu				
	245		250	255
Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val				
	260		265	270
Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys				
	275		280	285
Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu				
290		295		300
Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val				
305		310		315
Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu				
	325		330	335
Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu				
	340		345	350
Asp Val Val Ile Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr				
	355		360	365
Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser				
370		375		380
Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val				
385		390		395
Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro				
	405		410	415
Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala				
	420		425	430
Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala				
	435		440	445

Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln
 450 455

<210> 114
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 114

Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Asp
 1 5 10 15
 Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val Asn Gly Ser Gln
 20 25 30
 His Ser Leu Thr Cys Ala Phe Glu Asp Pro Asp Val Asn Thr Thr Asn
 35 40 45
 Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val Lys Cys Leu Asn
 50 55 60
 Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe Leu
 65 70 75 80
 Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly Glu Lys Ser Leu
 85 90 95
 Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr Thr Ile Val Lys Pro Glu Ala Pro
 100 105 110
 Phe Asp Leu Ser Val Ile Tyr Arg Glu Gly Ala Asn Asp Phe Val Val
 115 120 125
 Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln Lys Lys Tyr Val Lys Val Leu Met
 130 135 140
 His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn Lys Trp Thr His
 145 150 155 160
 Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gln Arg Lys Leu Gln
 165 170 175
 Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile Pro Asp His Tyr
 180 185 190
 Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr Tyr Phe Arg Thr
 195 200 205
 Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp
 210 215

<210> 115
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 115

Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe
1 5

<210> 116

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 116

Asp Leu Ser Val Ile Tyr
1 5

<210> 117

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 117

Phe Lys Gly Phe
1

<210> 118

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 118

Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe
1 5 10

<210> 119

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 119

Asn	Phe	Arg	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile	Tyr	Phe	Ile	Glu	Thr	Lys	Lys	Phe
1				5					10					15	

<210> 120

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 120

Asp	Leu	Ser	Val	Ile	Tyr	Arg	Glu	Gly	Ala	Asn	Asp	Phe	Val	Val	Thr
1				5					10					15	
Phe															

<210> 121

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 121

Val	Val	Thr	Phe	Asn	Thr	Ser	His	Leu	Gln	Lys	Lys	Tyr
1				5						10		

<210> 122

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 122

Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Phe
1				5					10				15	

<210> 123

<211> 16

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 123

Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Phe	Trp
1				5					10					15	

<210> 124
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 124

Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Phe	Trp
1				5					10					15	

Ser Glu Trp

<210> 125
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 125

Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Phe	Trp
1				5					10					15	

Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr

20

<210> 126
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 126

Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp

1 5

<210> 127

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 127

Ile Tyr Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn

1 5 10 15

Ile Cys Val Lys Val Gly Glu

20

<210> 128

<211> 28

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 128

Lys Ser Leu Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr Thr Ile Val Lys Pro

1 5 10 15

Glu Ala Pro Phe Asp Leu Ser Val Ile Tyr Arg Glu

20

25

<210> 129

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 129

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

1 5 10 15

Tyr Arg Glu

<210> 130

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 130

Ala Pro Phe Asp Leu Ser Val Ile Tyr Arg Glu

1 5 10

<210> 131

<211> 27

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 131

Asn Lys Trp Thr His Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu

1 5 10 15

Gln Arg Lys Leu Gln Pro Ala Ala Met Tyr Glu

20 25

<210> 132

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

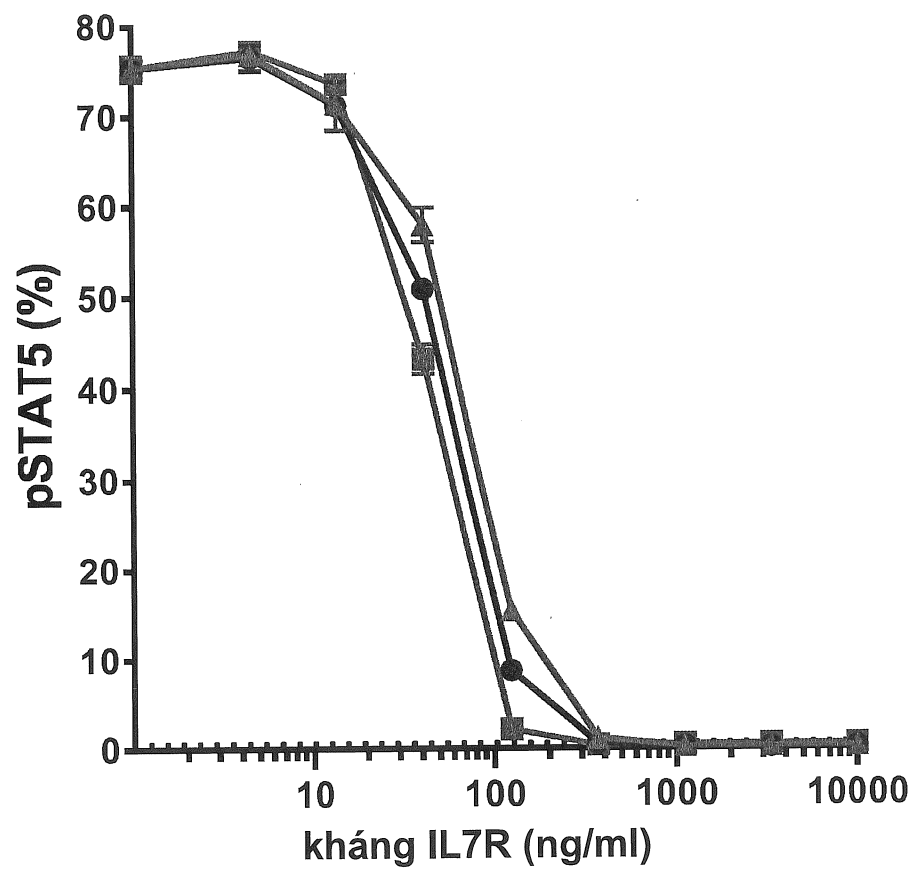
<400> 132

Ile Lys Val Arg Ser Ile Pro Asp His Tyr Phe Lys Gly Phe Trp Ser

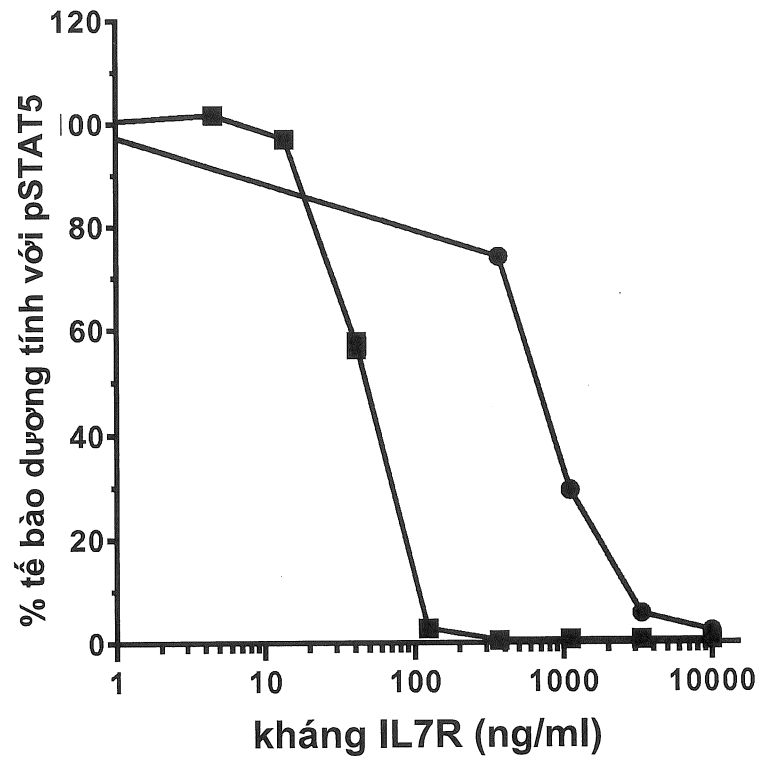
1 5 10 15

Glu

Fig.1



A.



B.

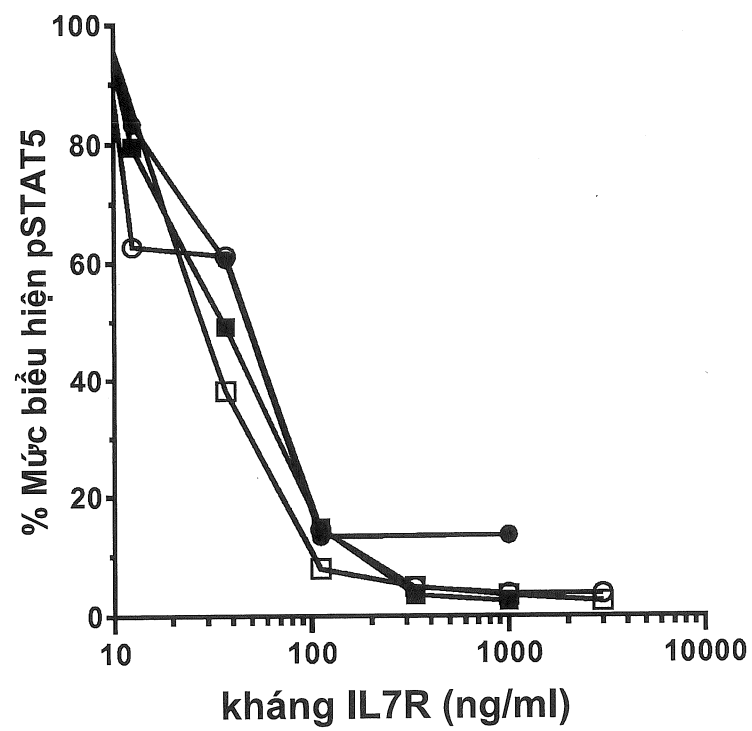


Fig.2

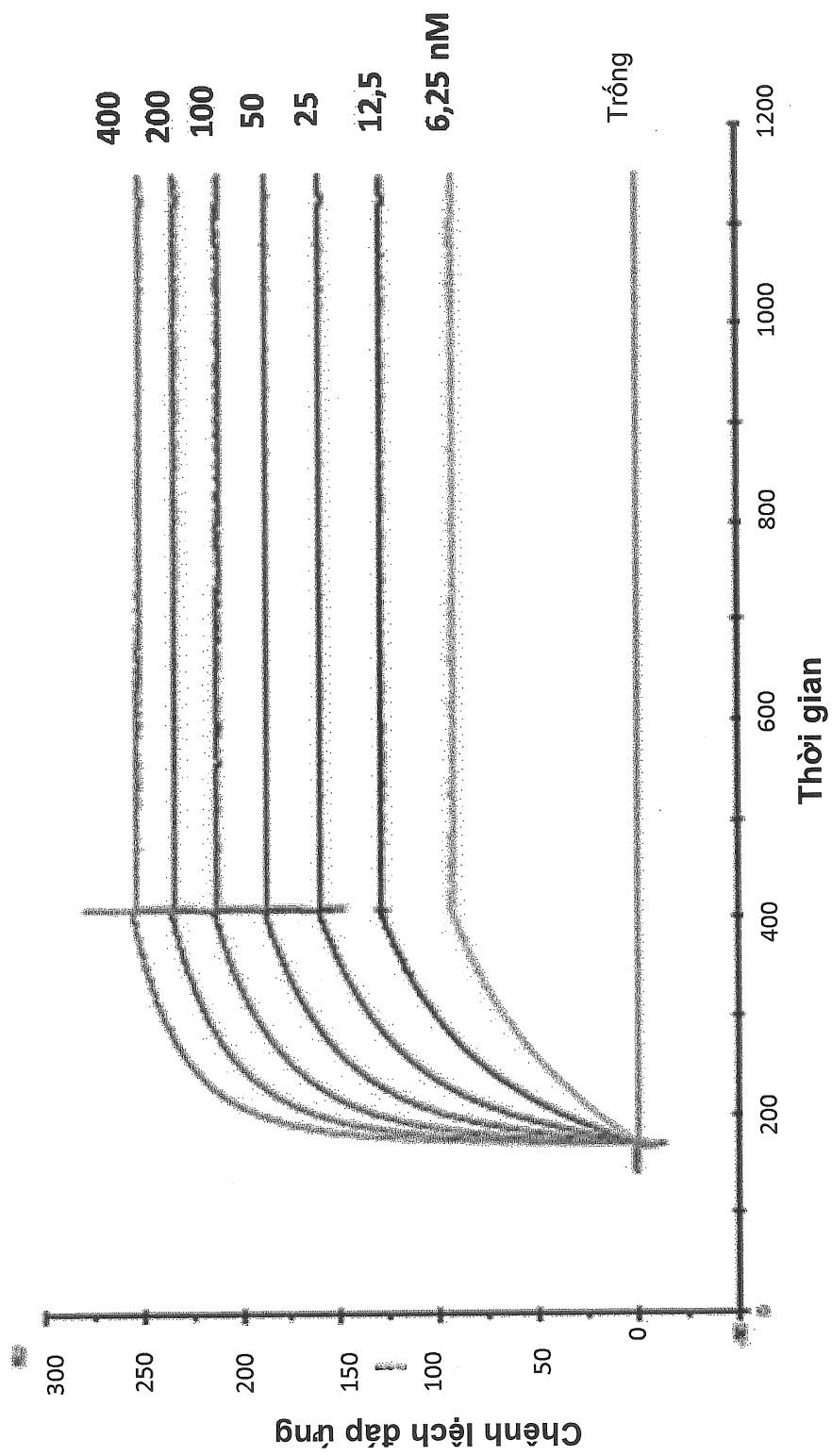


Fig.3

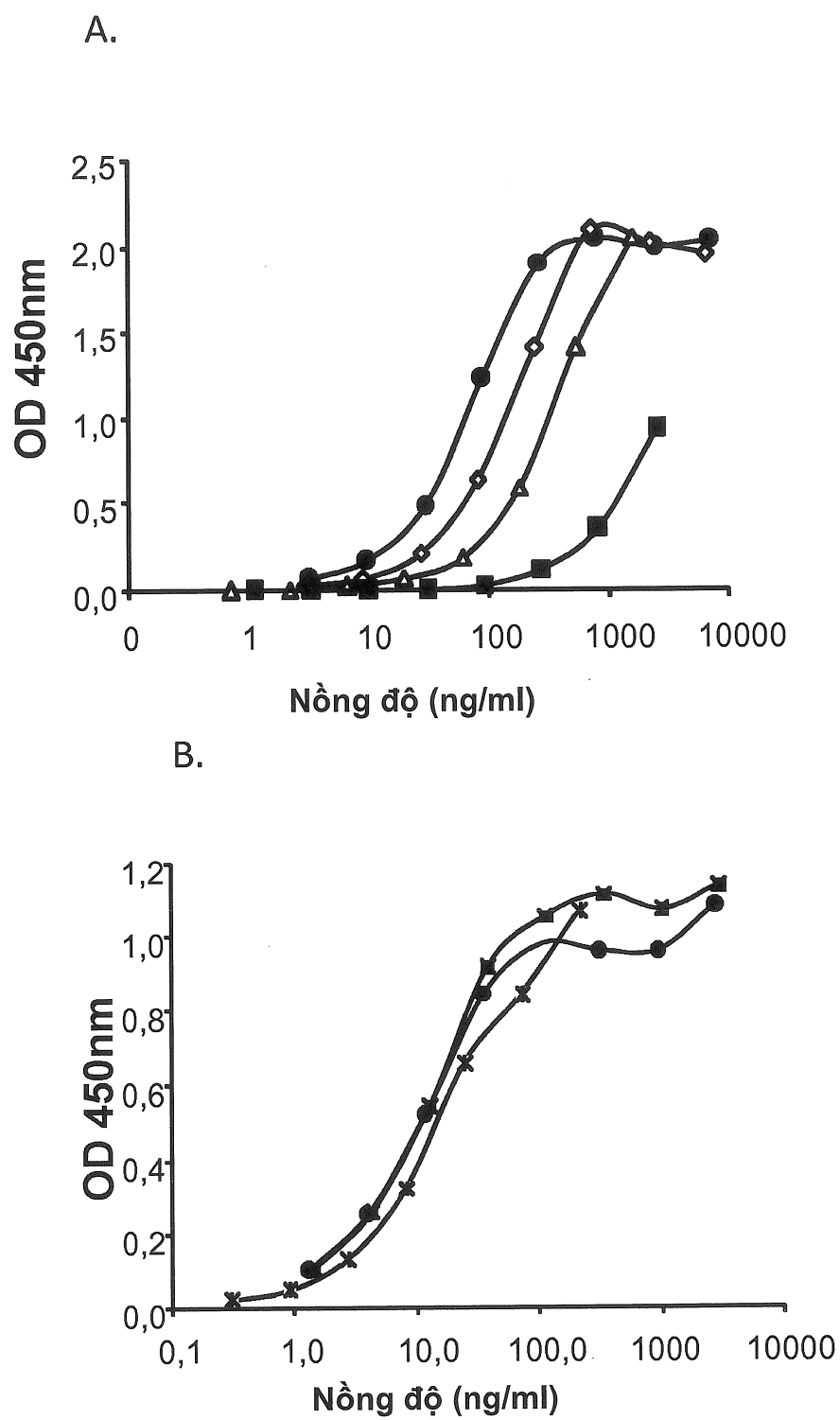
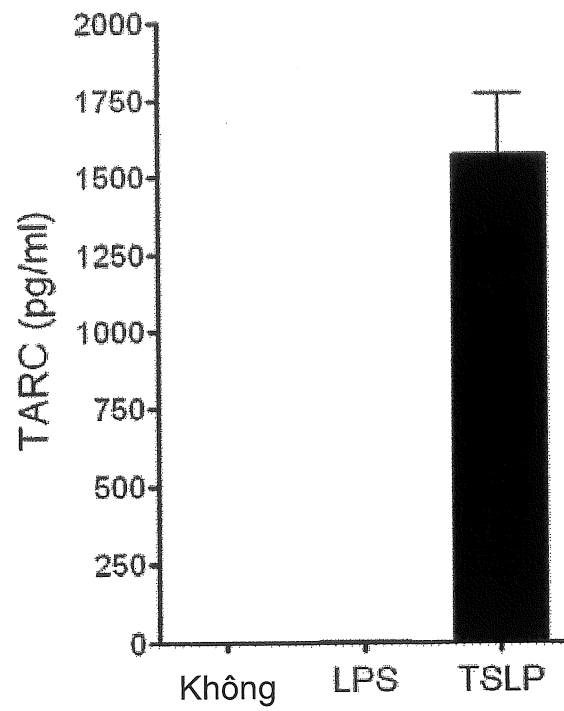


Fig.4

A.



B.

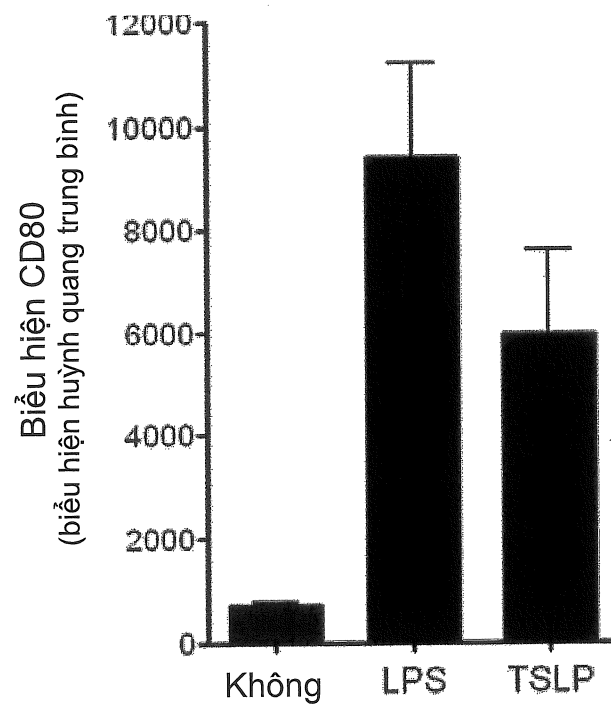


Fig.5

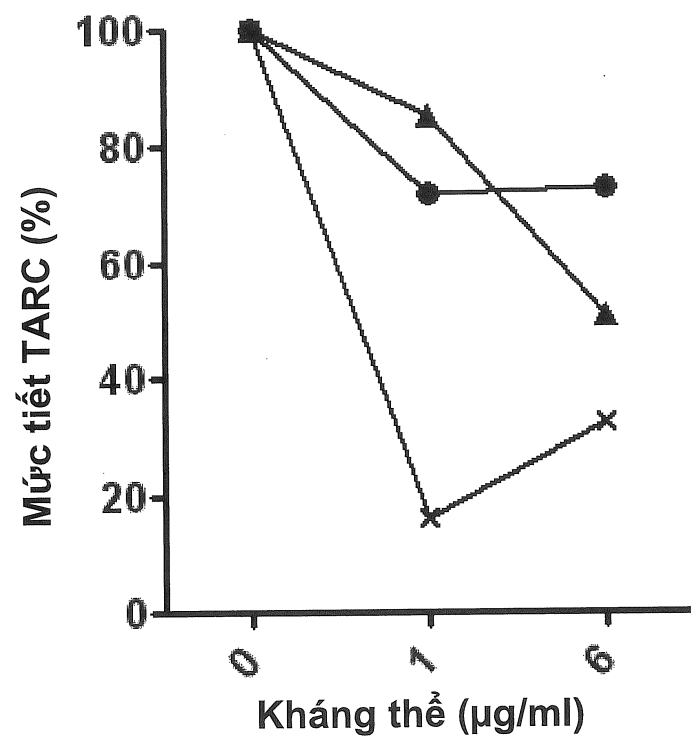
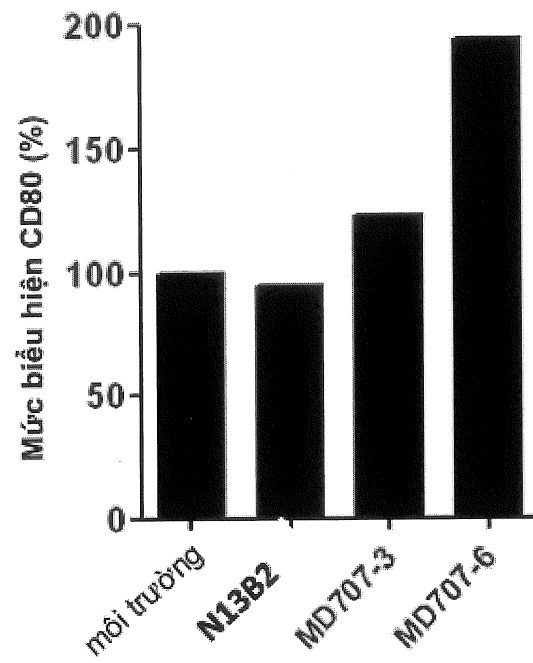


Fig.6

A.



B.

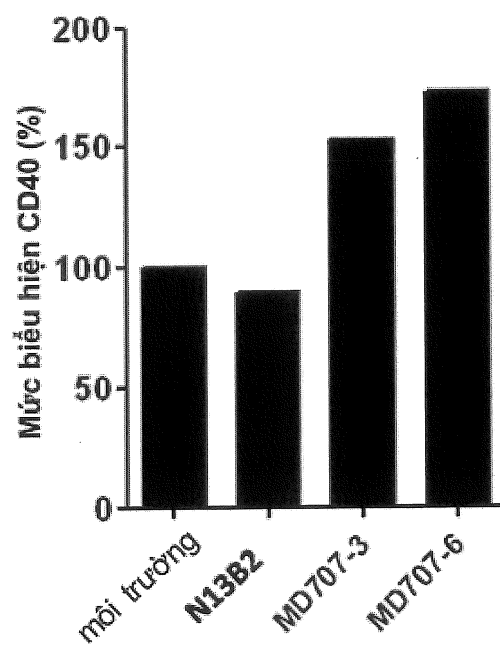


Fig.7

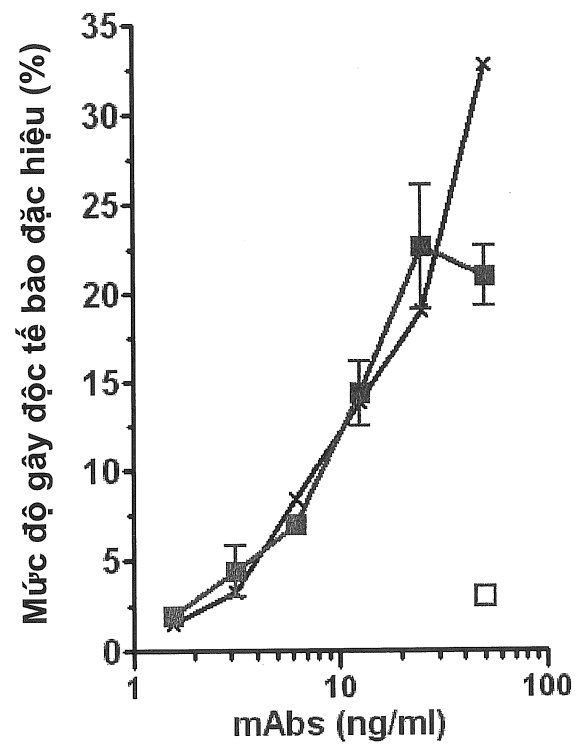


Fig.8

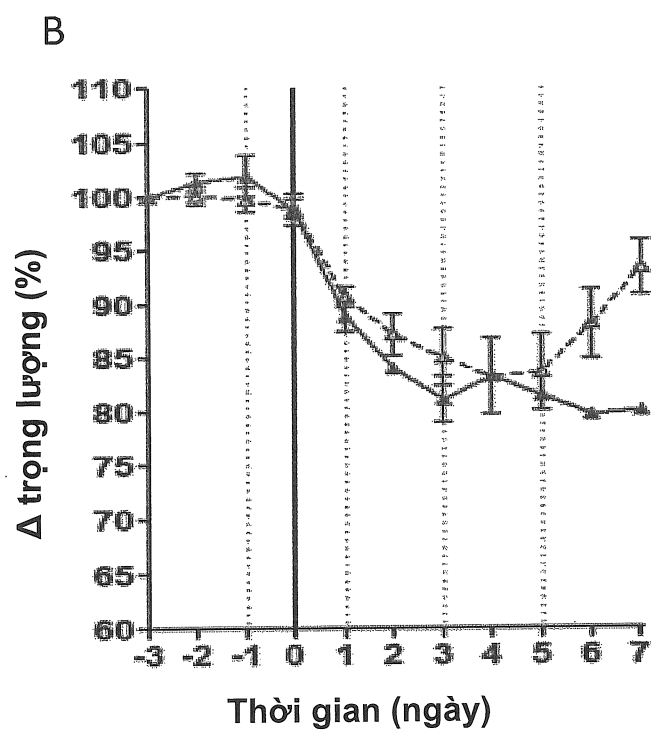
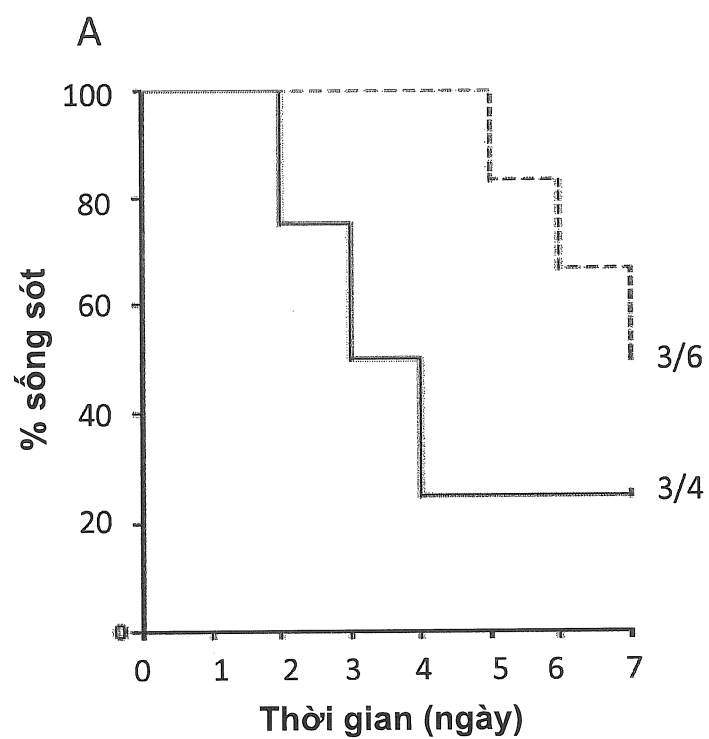


Fig.9

VH-FcG1M (E333A) - ADN

GCGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCCTAGTGCAGCCTGGAGGGTC
 CCTGAAACTCTCCTGTGCAGTCTCAGGATTCACTCTCAGTGACTATTACATGGC
CTGGGTCCGCCAGGCTCCAAAGAAGGGTCTGGAATGGGTCCGAACCATTAGT
GCCAGTGGGCTCAGAACTTACTATCCAGACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACTAT
 CTCCAGAGATGATGCAAAAAGGAGCCTCTTCCTGCAAATGACCAGTCTGAAGT
 CTGAGGACACGGCCACTTATTACTGTGCAAGACCGATGTCTGCACACTATGGT
TTAACTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCAAGTCTCCTCAgcta
 gcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacagcgccctgggc
 tgctgtgtaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcgcggtgcac
 accttcccggctgtctacagtcctcaggactctactccctcagcagcggtggtgaccgtgccctccagcagctggg
 caccagacctacatctgaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaa
 atctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctgggggaccgtcagcttctccttcc
 cccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccac
 gaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtgaggtgcataatgcaagacaaagccgcggg
 aggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaag
 gagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgcgaaaaccatctccaaagccaaaggg
 cagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctg
 acctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtgagtgaggagcaatgggcagccggagaaca
 actacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctcctctacagcaagctcaccgtggacaaga
 caggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaaga
 gcctctccctgtctccgggtaaatga

VL-CLKAPPA - ADN

GACATCCAGATGACACAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTGCATCTCTGGGAGAAAC
 TGTCACCATCGAATGTCGAACAAGTGAGGACATTTACAATGGTTTAGCATGGTA
 TCAGCAGAAGCCAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAGTGCAAATAGCT
TACATATTGGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACACAGTATT
CTCTCAAGATAAACAGCCTGCAATTTGAAGATGTCGCAAGTTATTTCTGTCAAC
AGTATTACGATTATCCGCTCGCGTTCGGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
 CGGacggtggtgcaccatctgtctcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtg
 gcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtaacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggtaact
 cccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagc
 aaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacac
 agagcttcaacaggggagagtgtag

VH-FcG1M (E333A) - Protein

AVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSGFTLSDIYMAWVRQAPKKGLEWVATISASGLRITYPDSVKGRF
 TISRDDAKRSLFLQMTSLKSEDTATYYCARPMSAHYGFNYFDYWGQGVMVTVSSastkgpsvfplapssks
 sggtaalglclvdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnvhkpsntkvdkkvepkscd
 kthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv
 svltvlhqdwlngkeyckvsnkalpapiaktiskakgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngq
 pennykthppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhleahnhytqkslspsgk*

VL-CLKAPPA - Protein

DIQMTQSPASLSASLGETVTIECRTSEDIYINGLAWYQQKPKGSPQLLVYSANSLHIGVPSRFSGSGSGTQ
 YSLKINSIQFEDVASYFCQQYYDYPLAFSGTKLEIKRtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfyepreakvqw
 kvdnalqsgnsqesvteqdsksdstyslstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec*

Fig.10

VH-FCG4M (S228P) - ADN

GCGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTAGTGCAGCCTGGAGGGT
 CCCTGAAACTCTCCTGTGCAGTCTCAGGATTCACTCTCAGTGACTATTACAT
GGCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAAAGAAGGGTCTGGAATGGGTCGCAACC
ATTAGTGCCAGTGGGCTCAGAACTTACTATCCAGACTCCGTGAAGGGCCGC
 TTCACTATCTCCAGAGATGATGCAAAAAGGAGCCTCTTCCTGCAAATGACCA
 GTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCACTTATTACTGTGCAAGACCGATGTCTG
CACACTATGGTTTTAACTACTTTGATTACTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCAC
 AGTCTCCTCAgctagaccaagggcccatcggctctccccctggcgccctgctccaggagcacctccg
 agagcacagccgcccctgggctgctgggtcaaggactactccccgaaccgggtgacggtgctgtggaactcag
 gcgcccgtgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtctacagtctcaggactctactccctcagcagcgt
 ggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacgaagacctacacgtgcaacgtagatcacaagcccagcaac
 accaaggtggacaagagagtgtagtccaaatatgggtcccccattgcccacatgcccagcacctgagttctg
 gggggaccatcagcttctgttccccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccggaaccctgagggtca
 cgtgcgtgggtgggtggacgtgagccaggaagaccccaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggag
 gtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcac
 cgtctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccgtcct
 ccatcgagaaaacatctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacaccctgccccatc
 ccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcg
 ccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccg
 acggctccttcttctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatg
 ctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

VL-CLKAPPA - ADN

GACATCCAGATGACACAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTGCATCTCTGGGAGAA
 ACTGTCACCATCGAATGTCGAACAAGTGAGGACATTTACAATGGTTTAGCAT
GGTATCAGCAGAAGCCAGGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAGTGCAA
ATAGCTTACATATTGGGGTCCCATCACGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTAC
 ACAGTATTCTCTCAAGATAAACAGCCTGCAATTTGAAGATGTCGCAAGTTATT
 TCTGTCAACAGTATTACGATTATCCGCTCGCGTTCCGGTCTGGGACCAAGCT
 GGAGATCAAACGGacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatct
 ggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgaaggtggataa
 cgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctc
 agcagcacctgacgtgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatc
 agggcctgagctcgccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgtag

VH-FCG4M (S228P) - Protein

AVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSGFTLSDYIMAWVRQAPKKGLEWVATISASGLRITYYPDSVKG
 RFTISRDDAKRSLFLQMTSLKSEDTATYYCARPMSAHYGFNYFDYWGQGVMVTVSSastkgpsvfpla
 pcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavllqssglylssvvtvpssslgtkytcnvdhkpstnkvd
 rveskygppcpapeflggsvfllfppkpkdtlmsrtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhnaktkpre
 qfnstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkgplssieltiskakgqprepvytlppsqeemtknqvslclvkgyfys
 diavewesngqpennyktpvldsdgsfflysrvtvdksrwqegnvfscsvmhealhnhytqkslsispkg*

VL-CLKAPPA - Protein

DIQMTQSPASLSASLGETVTIECRTSEDIYNGLAWYQQKPGKSPQLLVYSANSL
HIGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSIQFEDVASYFCQQYYDYPLAFSGGTKLEIKR
 tvaapsvfifppdeqlksgtasvvcllnnfyprcakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsksdstyslsstltlska
 dyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec*

Fig.11

Các trình tự Fc**IgG1 người** (Uniprot P01857):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

IgG2 người (Uniprot P01859):

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP
 PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS
 KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENN
 YKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPGK

IgG4 người (Uniprot P01861):

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPSCP
 APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS
 KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSLGK

IgG1 chuột (Uniprot P20759) được sử dụng trong N13B2

AETTAPSVYPLAPGTALKSNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGALSSTGVHTFP
 AVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRNCGGDCKP
 CICTGSEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVDISQDDPEVHFSWFVDDVEV
 HTAQTRPPEEQFNSTFRSVSELPILHQDWLNGRTRFRCKVTSAAFPSPIEKTISK
 EGRTQVPHVYTMSPTKEEMTQNEVSITCMVKGFYPPDIYVEWQMNGQPQE
 NYKNTPTPTMDTDGSYFLYSLNVKKEKWQQGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSL
 SHSPGK

Fig.12

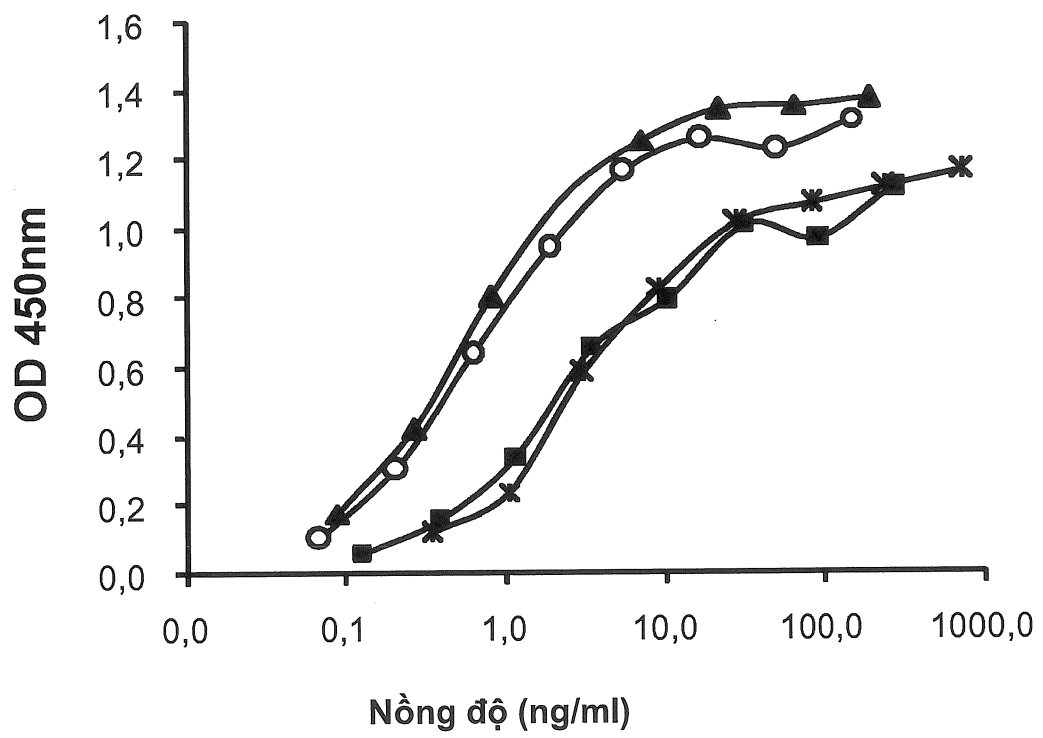
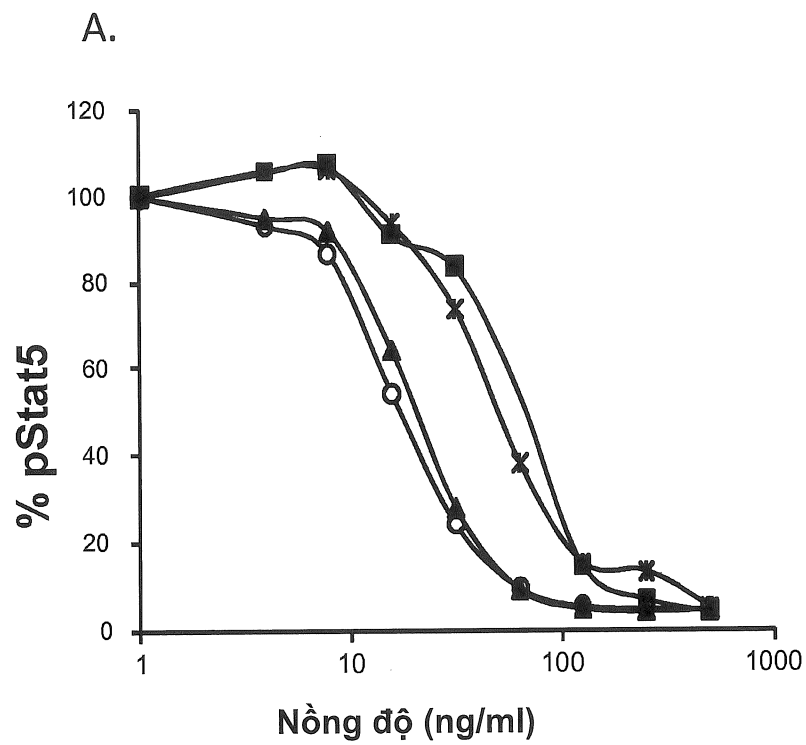


Fig.13



B.

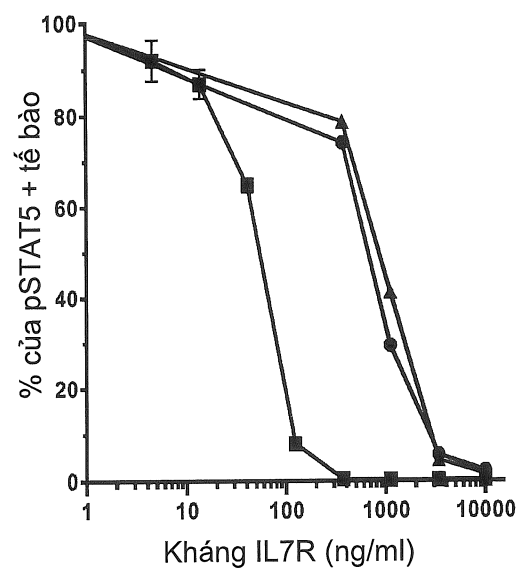


Fig.14

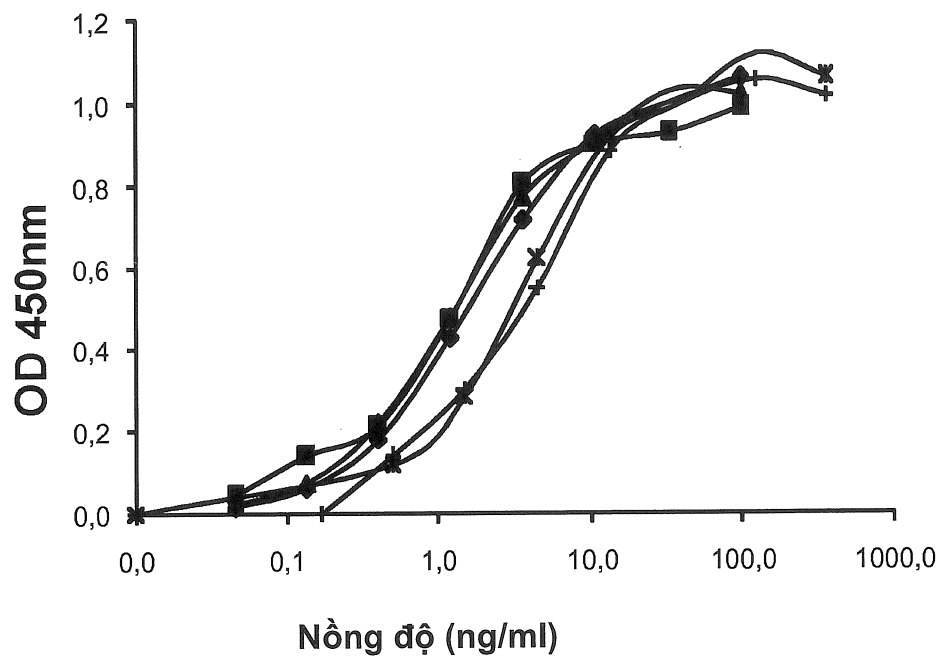
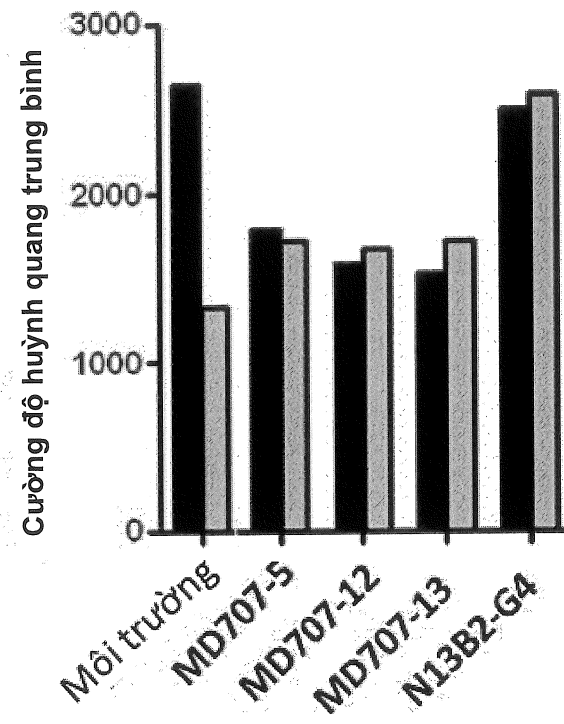
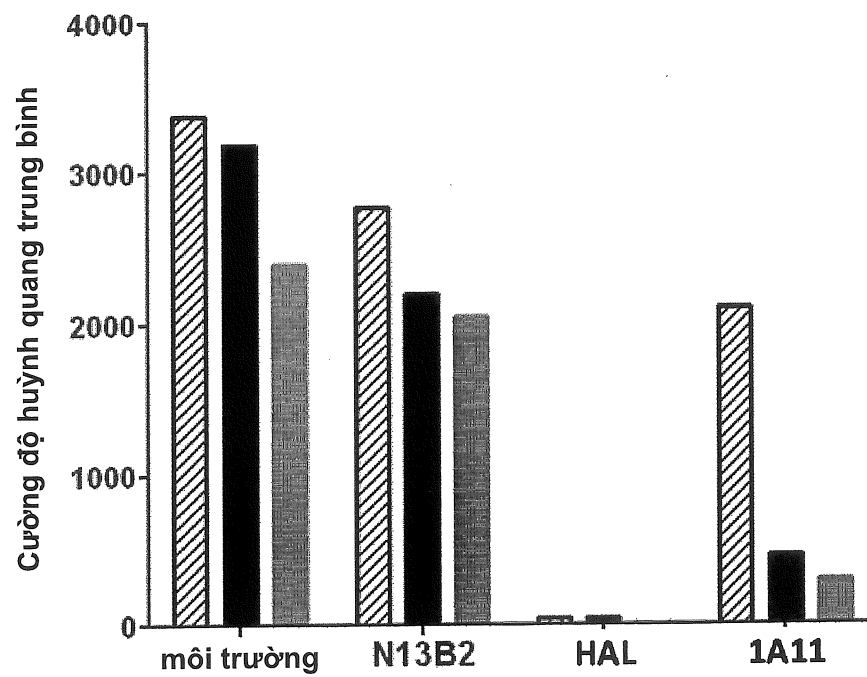


Fig.15

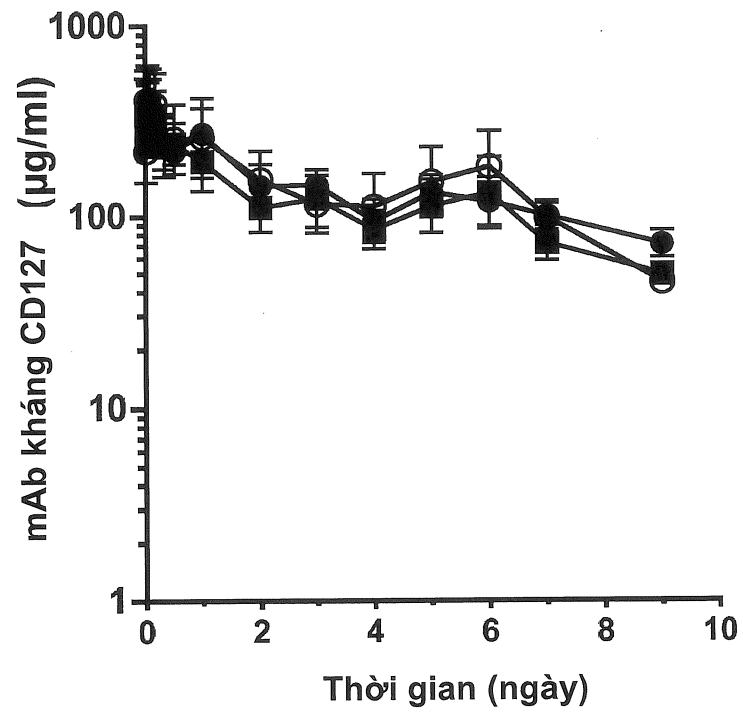
A.



B.



A.



B.

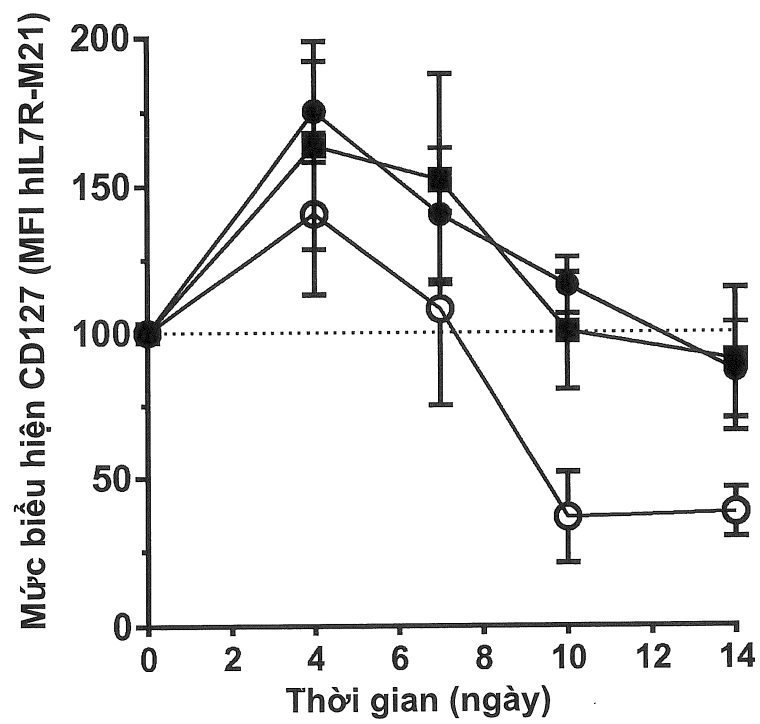
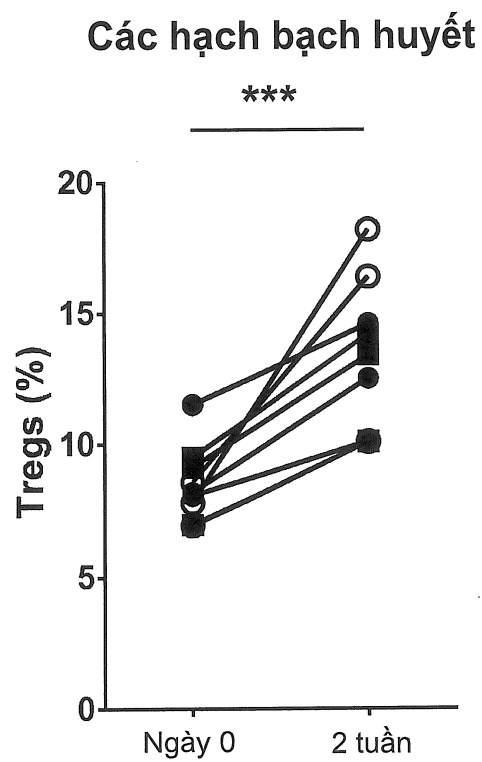
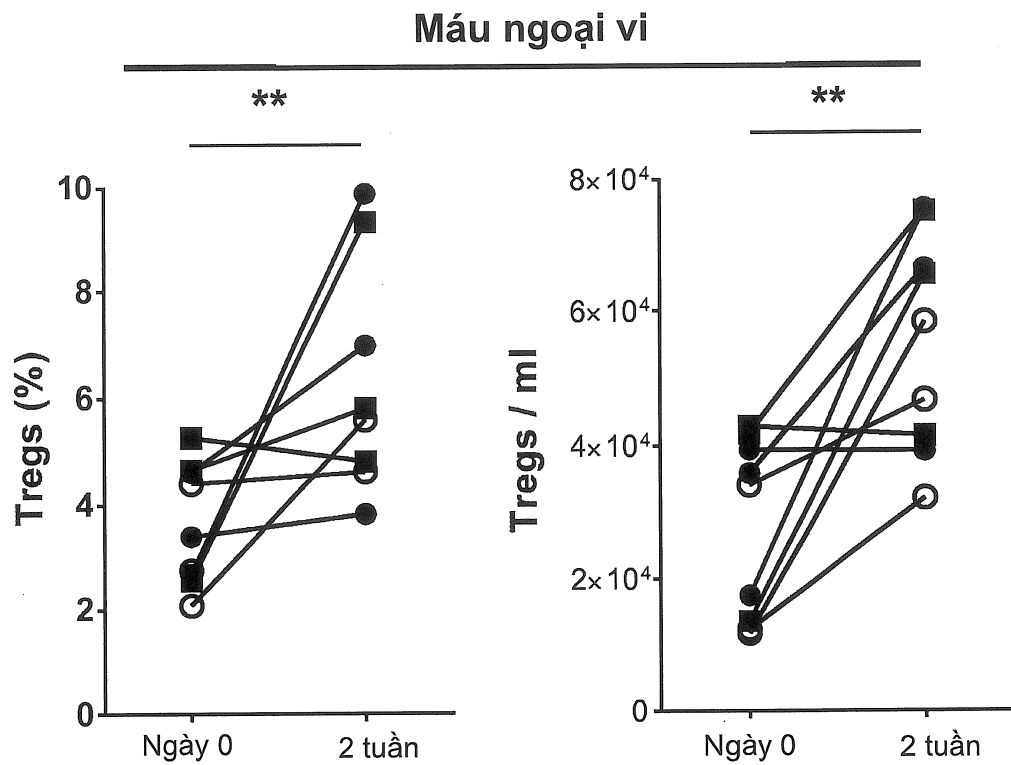


Fig.17

**Fig.18**

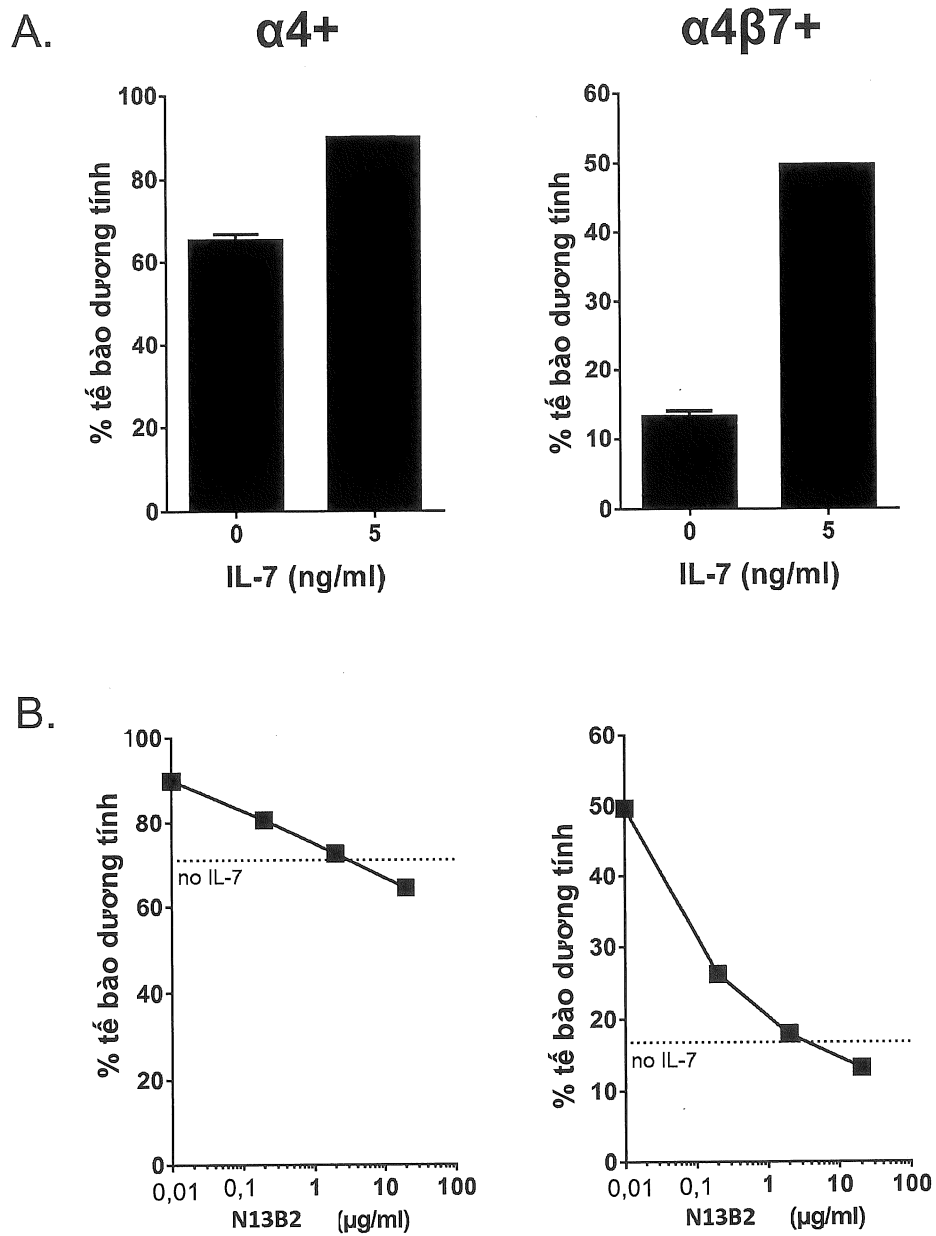


Fig.19

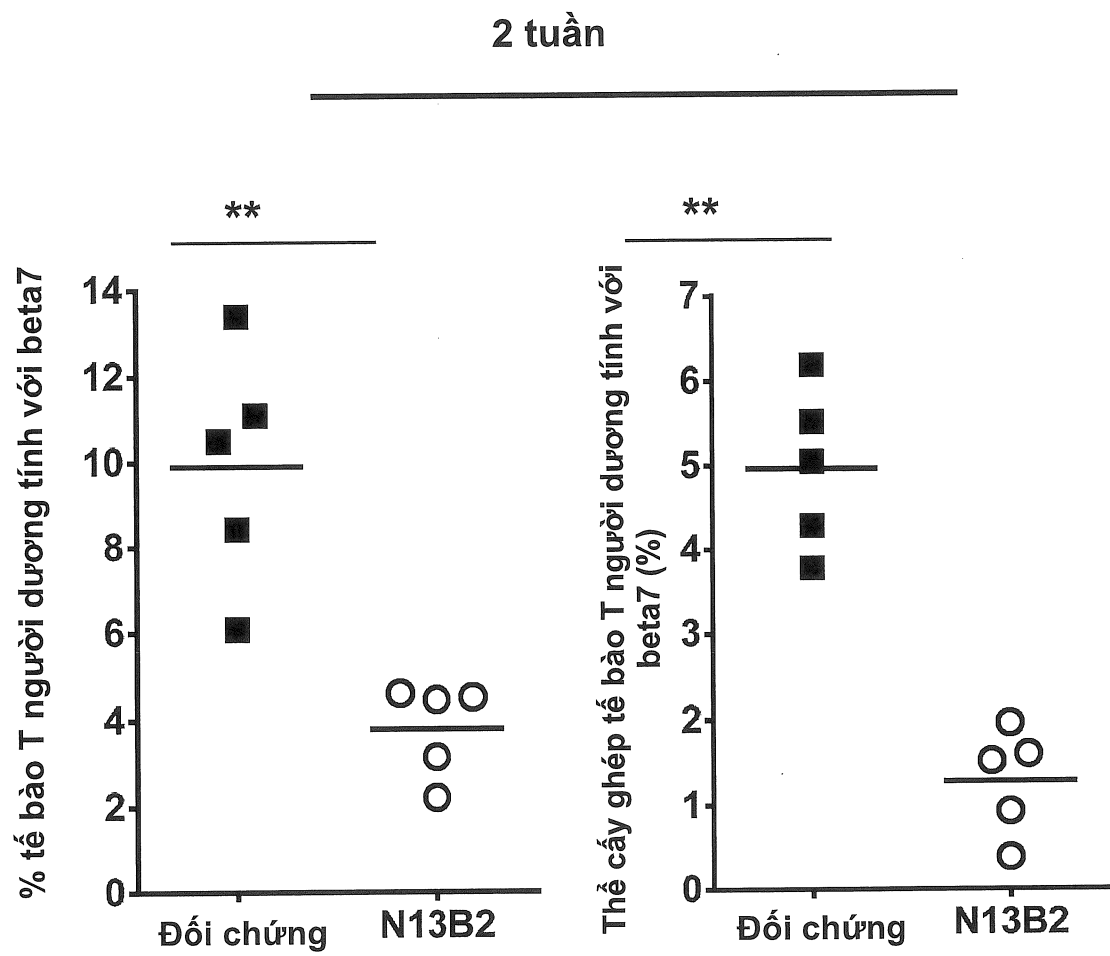


Fig.20

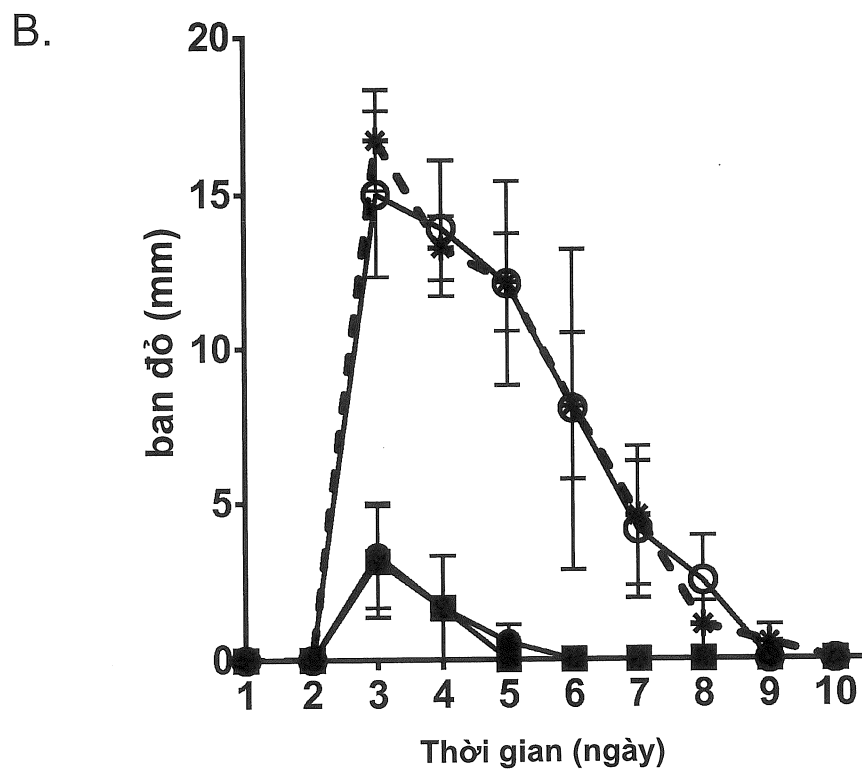
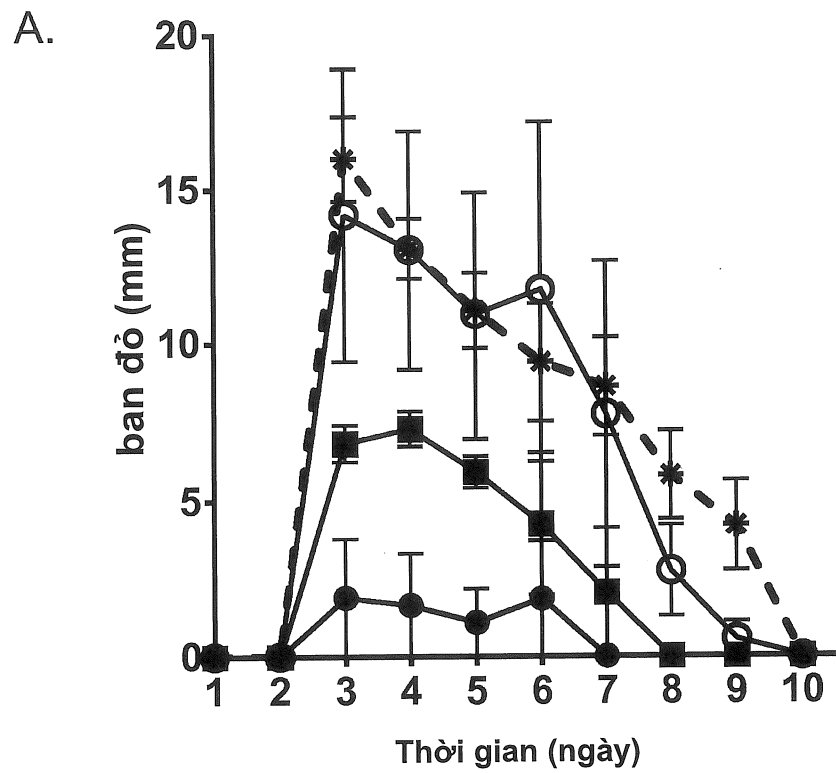


Fig.21

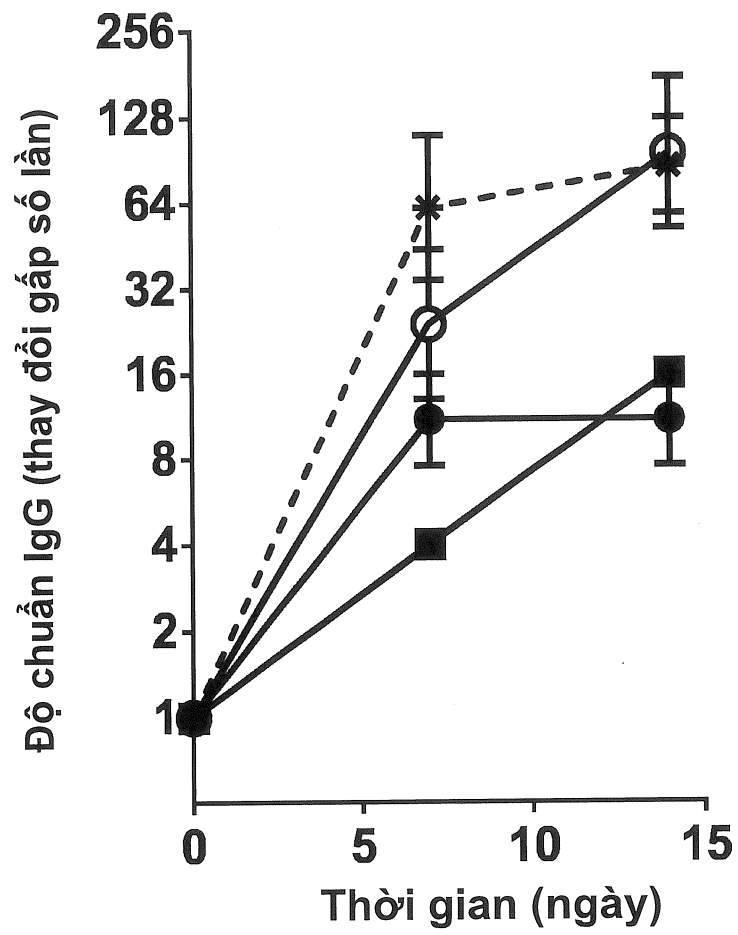


Fig.22

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAVSGFTLSDY~~YMAW~~IRQAPG
 KGLEWVSTISASGLRTYYPDSVKGRFTISRDN~~AKNSLYLQMNS~~
 LRAEDTAVYYCARP~~LSAHYGFNYFDY~~WGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Fig.23

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRTSEDIYQGLAWYQQKPGQA
PRLLIYSAN~~TL~~HIGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVY~~YC~~Q
~~QYYDYPLA~~FGGGTKVEIKTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

Fig.24

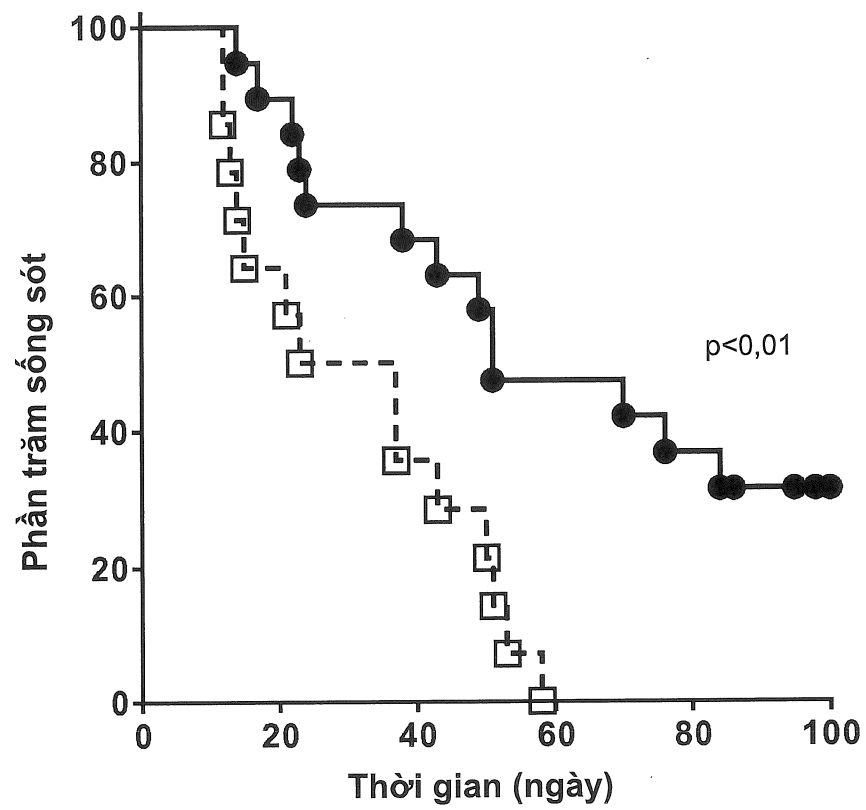


Fig.25

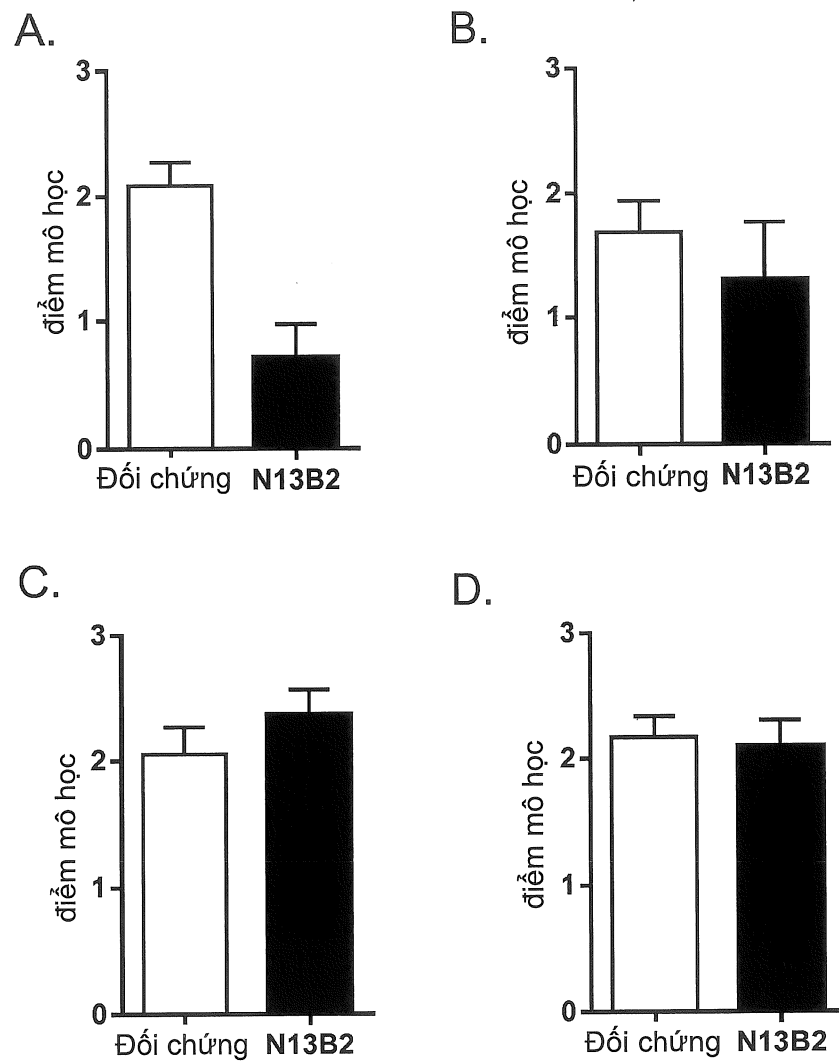
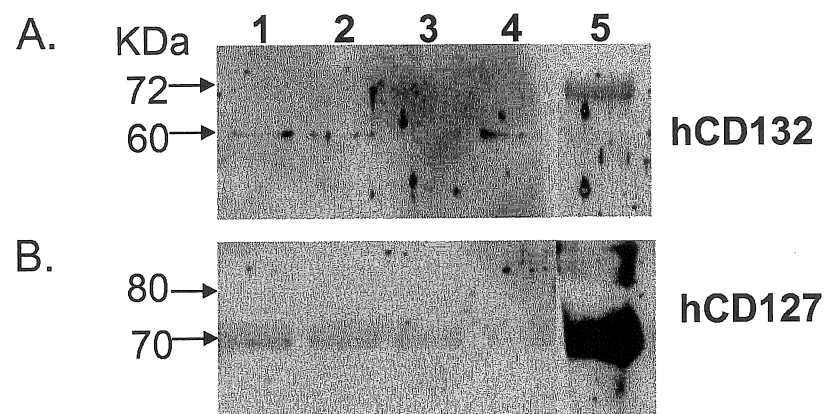


Fig.26

~~MTILGTTFCMVFSLLQVVS~~GESGYAQNGDLEDAELDDYSFS
 CYSQLEVNGS~~QHSLTCAFEDPDVNTTNLEFEICGALVEVKC~~
 LNFRKLQEIIY**FIETKKF**LLIGKSNICVKVGEKSLTCKKIDL
 TTIVKPEAPF**DLSVIY**REGANDEFVVTFNTSHLQKKYVKVLM
 HDVAYRQEKDENKWTHVNLSSTKLTLQKRLQPAAMYEIKV
 RSIPDHY**FKGF**~~WSEWS~~PSYYFRTPEINNSSGEMDPILLTIS
 ILSFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLC
 KKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTF
 PQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDDVITPESFGRDSSLTC
 LAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLLSLGT
 TNSTLPPPFSLQSGILTLPVAQGQPILTSLGSNQEEAYVT
 MSSFYQNQ

Fig.27

**Fig.28**