



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

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

(11)



1-0031859

(51)⁷ C07K 16/28; G01N 33/574; A61K
39/395; A61P 35/00

(13) B

(21) 1-2016-02720

(22) 22/12/2014

(86) PCT/IB2014/002868 22/12/2014

(87) WO2015/097536 02/07/2015

(30) 61/920,695 24/12/2013 US; 62/085,086 26/11/2014 US

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/11/2016 344A

(73) JANSSEN PHARMACEUTICA NV (BE)

Turnhoutseweg 30, B-2340 Beerse, Belgium

(72) SNYDER, Linda (US); POWERS, Gordon (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG YẾU TỔ ỨC CHẾ IG VÙNG V HOẠT HÓA TẾ BÀO T
(VISTA) VÀ CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể và đoạn kháng thể mà liên kết với yếu tố ức chế Ig vùng V hoạt hóa tế bào T (VISTA), và phương pháp sản xuất và chế phẩm chứa chúng. Sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic mã hóa các kháng thể và đoạn kháng thể này, vector biểu hiện chứa axit nucleic, và tế bào chủ được biến nạp bằng với vector biểu hiện này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể và đoạn kháng thể mà liên kết với yếu tố ức chế Ig vùng V hoạt hóa tế bào T (V-domain Ig Suppressor of T cell Activation - VISTA), phương pháp sản xuất chúng và được phẩm chứa kháng thể và đoạn kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự biểu hiện các yếu tố điều hòa điểm kiểm soát miễn dịch tiêu cực bởi các tế bào ung thư hoặc tế bào miễn dịch trong vi môi trường khối u có thể ức chế đáp ứng miễn dịch của vật chủ chống lại khối u. Để tấn công bệnh ung thư hiệu quả, cần phải ngăn cản sự ức chế đáp ứng miễn dịch của vật chủ bởi khối u. Theo đó, có nhu cầu về các tác nhân điều trị mới và hữu hiệu mà ức chế các yếu tố điều hòa điểm kiểm soát miễn dịch tiêu cực trong vi môi trường khối u mà ức chế đáp ứng miễn dịch chống khối u.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến các kháng thể và đoạn kháng thể chứa vùng liên kết kháng nguyên mà liên kết với yếu tố ức chế Ig vùng V hoạt hóa tế bào T (VISTA). VISTA là yếu tố điều hòa điểm kiểm soát mà ức chế các đáp ứng miễn dịch một cách tiêu cực. Xem tài liệu Wang et al., “VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses,” J. Exp. Med., 208(3) 577-92 (2011). Yếu tố này được biểu hiện trên các bạch cầu bạch cầu trung tính, bạch cầu đơn nhân to và tập hợp con các tế bào T bình thường của người. Ngoài ra, các tế bào khỉ cynomolgus biểu hiện VISTA theo kiểu tương tự với các tế bào người bình thường. VISTA cũng được biểu hiện trong các tế bào máu ngoại vi của bệnh nhân ung thư.

Liên kết của kháng thể hoặc đoạn kháng thể với VISTA điều chỉnh hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch. Đoạn kháng thể có thể bao gồm, ví dụ, đoạn kháng thể Fab, F(ab')₂, hoặc scFv. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể có thể chứa vùng hằng định của kháng thể. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể có thể liên kết với VISTA mà được biểu hiện trên tế bào tạo huyết, ví dụ, tế bào tủy và/hoặc lympho bào, bạch cầu đơn nhân to hoặc bạch cầu trung tính, tế bào T, tế bào giết tự nhiên (natural killer - NK), tế bào T

giết tự nhiên (natural killer T - NKT), tế bào khối u, và/hoặc trong vi môi trường khối u (tumor microenvironment - TME). Vi môi trường khối u là môi trường tế bào của khối u. Môi trường này có thể bao gồm các tế bào miễn dịch, nguyên bào sợi, các mạch máu, các tế bào khác, các phân tử phát tín hiệu, và các nền ngoại bào xung quanh.

Kháng thể hoặc đoạn kháng thể có thể chứa một hoặc nhiều vùng quyết định bổ cứu (complementary determining region - CDR) của chuỗi nặng và/hoặc một hoặc nhiều CDR của chuỗi nhẹ, bao gồm một hoặc nhiều CDR (ví dụ, cả ba CDR của chuỗi nặng, cả 3 CDR của chuỗi nhẹ, hoặc cả 6 CDR) của kháng thể kháng VISTA bất kỳ được mô tả trong bản mô tả, bao gồm các kháng thể gọi là VSTB112 (S2), VSTB116 (S5), VSTB95 (S16), VSTB50 (S41), VSTB53 (S43) và VSTB60 (S47). Theo một số phương án, các kháng thể hoặc đoạn của chúng được chọn từ nhóm gồm VSTB112, VSTB95, VSTB116, VSTB50, VSTB53 và VSTB60. Theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn kháng thể chứa một hoặc nhiều CDR của chuỗi nặng và một hoặc nhiều CDR của chuỗi nhẹ của kháng thể kháng VISTA bất kỳ được mô tả trong bản mô tả. Theo một số phương án, kháng thể hoặc đoạn kháng thể có thể chứa thêm ít nhất một chuỗi nặng và ít nhất một chuỗi nhẹ của kháng thể kháng VISTA bất kỳ được mô tả trong bản mô tả. Theo một số phương án, kháng thể hoặc đoạn kháng thể chứa ít nhất một chuỗi nặng chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng, và/hoặc ít nhất một chuỗi nhẹ chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Theo một số phương án, kháng thể này chứa vùng khung của người. Theo một số phương án, kháng thể này là kháng thể nguyên vẹn. Theo một số phương án, đoạn này là bộ phận liên kết kháng VISTA. Theo một số phương án, các CDR của chuỗi nặng của kháng thể được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1, 2, và 3 và các CDR của chuỗi nhẹ được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4, 5, và 6. Theo một số phương án, các trình tự axit amin vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ lần lượt được thể hiện bằng SEQ ID NO: 7 và 8.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể kháng VISTA mà về cơ bản tương tự với các kháng thể được mô tả trong bản mô tả. Ví dụ, theo một phương án, kháng thể hoặc đoạn kháng thể chứa miền VH của kháng thể chứa VH CDR1 có trình tự axit amin về cơ bản tương tự với SEQ ID NO: 1, VH CDR2 có trình tự axit amin về cơ bản tương tự với SEQ ID NO: 2 và VH CDR3 có trình tự axit amin về cơ bản tương tự với SEQ ID NO: 3, và còn chứa thêm miền VL của kháng thể chứa VL CDR1 có trình tự axit

amin về cơ bản tương tự với SEQ ID NO: 4, VL CDR2 có trình tự axit amin về cơ bản tương tự với SEQ ID NO: 5 và VL CDR3 có trình tự axit amin về cơ bản tương tự với SEQ ID NO: 6.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể kháng VISTA mà ức chế cạnh tranh, hoặc cạnh tranh để liên kết với kháng thể kháng VISTA được mô tả trong bản mô tả.

Theo một số phương án, kháng thể kháng VISTA là một phần của thể liên hợp, ví dụ, thể liên hợp chứa phân tử độc tế bào hoặc tác nhân khác được mô tả trong bản mô tả. Các phân tử như vậy là đã biết rõ trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc đoạn kháng thể là kháng thể đơn dòng. Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể khảm, kháng thể được làm giống như của người hoặc kháng thể người. Theo một số phương án, kháng thể hoặc đoạn kháng thể chứa vùng hằng định của người. Theo một số phương án, kháng thể hoặc đoạn kháng thể là đặc hiệu đối với epitop của VISTA, ví dụ, trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 9. Theo một số phương án, kháng thể hoặc đoạn kháng thể liên kết với epitop của VISTA với ái lực ít nhất 1×10^{-7} lít/mol, ví dụ, ít nhất 1×10^{-8} lít/mol, ví dụ, ít nhất 1×10^{-9} lít/mol.

Theo một số phương án, sự điều chỉnh đáp ứng miễn dịch bao gồm tăng bạch cầu CD45+, tế bào T CD4+, và/hoặc tế bào T CD8+. Theo một số phương án, sự điều chỉnh đáp ứng miễn dịch bao gồm tăng cường sản sinh xytokin (ví dụ, IFN γ , IL-10, TNF α , IL-17) (ví dụ, tế bào T), tăng cường đáp ứng tế bào T, và/hoặc điều chỉnh mức biểu hiện Foxp3.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể được mô tả trong bản mô tả (ví dụ, kháng thể kháng VISTA) và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng. Ví dụ, chế phẩm này có thể chứa chất đối kháng VISTA chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể của nó bao gồm vùng liên kết kháng nguyên mà liên kết với VISTA, và vacxin (như vacxin vector virus, vacxin vi khuẩn, vacxin ADN, vacxin ARN, vacxin peptit). Theo một số phương án, chế phẩm này là dược phẩm và liên kết của kháng thể hoặc đoạn kháng thể với VISTA điều chỉnh hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ung thư bao gồm việc cho cá thể (ví dụ, động vật có vú, ví dụ, người hoặc động vật không phải

người) cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu ít nhất một kháng thể, đoạn kháng thể hoặc chế phẩm được mô tả trong bản mô tả.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc đoạn kháng thể liên kết với VISTA, nhờ đó điều chỉnh hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch đối với bệnh ung thư. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh bạch cầu, u bạch huyết, hội chứng rối loạn sinh tủy và/hoặc u tủy. Theo một số phương án, bệnh ung thư có thể thuộc loại hoặc kiểu bất kỳ của bệnh bạch cầu, bao gồm bệnh bạch cầu lympho bào hoặc bệnh bạch cầu sinh tủy, như, ví dụ, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp (acute lymphoblastic leukemia - ALL), bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (chronic lymphocytic leukemia - CLL), bệnh bạch cầu tủy (sinh tủy) cấp (acute myeloid (myelogenous) leukemia - AML), bệnh bạch cầu sinh tủy mạn tính (chronic myelogenous leukemia - CML), bệnh bạch cầu tế bào lông, bệnh bạch cầu tiền lympho bào T, bệnh bạch cầu lympho bào hạt lớn, hoặc bệnh bạch cầu tế bào T ở người trưởng thành. Theo một số phương án, u lympho là u lympho mô bào, và theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh đa u tủy. Theo một số phương án, bệnh ung thư là khối u rắn, ví dụ, u hắc tố, hoặc ung thư bàng quang. Theo một số phương án, bệnh ung thư là ung thư phổi (ví dụ, caxinom phổi tế bào không nhỏ (non-small cell lung carcinoma - NSCLC)). Một số phương pháp điều trị còn bao gồm việc cho sử dụng vaccin (như vaccin vector virus, vaccin vi khuẩn, vaccin tế bào, vaccin ADN, vaccin ARN, vaccin peptit hoặc vaccin protein). Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp ức chế sự sinh trưởng của khối u ở cá thể cần điều trị, phương pháp này bao gồm việc cho sử dụng kháng thể hoặc đoạn kháng thể hoặc chế phẩm hữu hiệu được mô tả trong bản mô tả.

Chế phẩm, kháng thể hoặc đoạn kháng thể hoặc dược chất khác (ví dụ, vaccin) có thể được sử dụng đường tiêu hóa hoặc ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, trong tĩnh mạch (IV), dưới da (SQ) hoặc đường miệng (PO).

Theo một số phương án, chế phẩm, kháng thể hoặc đoạn kháng thể được sử dụng hằng quý, hằng tuần, hai tuần một lần, ba tuần một lần, hoặc bốn tuần một lần. Theo một số phương án, dược chất hoặc tác nhân điều trị khác được sử dụng cùng, trước, trong hoặc sau khi dùng kháng thể, đoạn kháng thể và chế phẩm được mô tả trong bản mô tả. Tác nhân đồng sử dụng có thể được dùng theo cùng đường dùng với kháng thể, đoạn kháng thể hoặc chế phẩm, hoặc bằng đường dùng khác.

Sáng chế cũng bao gồm phương pháp sản xuất kháng thể, đoạn kháng thể và chế phẩm, ví dụ, phương pháp sản xuất kháng thể hoặc đoạn kháng thể được mô tả trong bản mô tả, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ trong các điều kiện để sản xuất kháng thể này. Phương pháp này có thể bao gồm thêm bước phân lập kháng thể. Sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic, ví dụ, axit nucleic phân lập chứa trình tự nucleotit mã hóa kháng thể và đoạn kháng thể, vector biểu hiện chứa axit nucleic như vậy, ví dụ, được liên kết hoạt động với trình tự khởi đầu, và các tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện như vậy.

Sáng chế cũng đề cập đến kit và vật phẩm sản xuất chứa chế phẩm chứa kháng thể kháng VISTA và vật chứa, và còn chứa thêm tờ rời trong bao gói hoặc nhãn chỉ ra rằng chế phẩm này có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể phân lập hoặc đoạn kháng thể của nó chứa vùng liên kết kháng nguyên mà liên kết với yếu tố ức chế Ig vùng V hoạt hóa tế bào T (VISTA), trong đó kháng thể này chứa miền VH của kháng thể chứa VH CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 25, VH CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 26 và VH CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 27, và còn chứa thêm miền VL của kháng thể chứa VL CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 28, VL CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 29 và VL CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 30. Theo một số phương án, kháng thể hoặc đoạn kháng thể chứa một hoặc nhiều vùng được làm giống như của người hoặc vùng khung của người. Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc đoạn kháng thể chứa miền VH của kháng thể mà chứa SEQ ID NO: 37 và/hoặc miền VL của kháng thể chứa SEQ ID NO: 44. Theo các phương án nhất định, kháng thể này chứa vùng hằng định của chuỗi nặng (ví dụ, vùng hằng định của chuỗi nặng của người) và/hoặc vùng hằng định của chuỗi nhẹ (ví dụ, vùng hằng định của chuỗi nhẹ của người, như vùng hằng định của chuỗi nhẹ có trong SEQ ID NO: 56). Tốt hơn, nếu vùng hằng định của chuỗi nặng là vùng hằng định của chuỗi nặng của IgG1 (ví dụ, vùng hằng định của chuỗi nặng của IgG1 có trong SEQ ID NO: 61). Theo một phương án cụ thể, vùng hằng định của chuỗi nặng của IgG1 được biến đổi để tăng cường khả năng kháng proteaza của kháng thể. Ví dụ về vùng hằng định của chuỗi nặng của IgG1 mà đã được biến đổi để tăng cường khả năng kháng proteaza là vùng hằng định của chuỗi nặng của IgG1 có trong SEQ ID NO: 60. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc đoạn kháng thể chứa chuỗi nặng chứa SEQ ID NO: 60 và

chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO: 56; hoặc chuỗi nặng chứa SEQ ID NO: 61 và chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO: 56. Theo một phương án cụ thể, kháng thể hoặc đoạn kháng thể được biểu hiện trong tế bào thiếu các enzym fucosyl hóa (ví dụ, tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary - CHO) thiếu các enzym fucosyl hóa).

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể của nó chứa miền VH của kháng thể chứa VH CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 25, VH CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 26 và VH CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 27, và còn chứa thêm miền VL của kháng thể chứa VL CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 28, VL CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 29 và VL CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 30; và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dùng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh ung thư cho cá thể cần điều trị, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng sử dụng lượng hữu hiệu kháng thể hoặc đoạn kháng thể mà liên kết với yếu tố ức chế Ig vùng V hoạt hóa tế bào T (VISTA), trong đó kháng thể này chứa miền VH của kháng thể chứa VH CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 25, VH CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 26 và VH CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 27, và còn chứa thêm miền VL của kháng thể chứa VL CDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 28, VL CDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 29 và VL CDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 30. Theo một phương án cụ thể, bệnh ung thư là bệnh ung thư phổi. Theo một phương án khác, bệnh ung thư phổi là bệnh caxinom phổi tế bào không nhỏ (NSCLC). Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm thêm việc áp dụng phương pháp điều trị bệnh ung thư thứ hai (ví dụ, phẫu thuật, hóa trị, xạ trị, liệu pháp sinh học, liệu pháp điều biến miễn dịch, và kết hợp các phương pháp này).

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc đoạn kháng thể của nó chứa vùng liên kết kháng nguyên mà liên kết với yếu tố ức chế Ig vùng V hoạt hóa tế bào T (VISTA), trong đó kháng thể này liên kết với epitop cấu tạo trong VISTA (ví dụ, VISTA người). Theo một số phương án, epitop cấu tạo bao gồm, hoặc có trong, các gốc 103-111 (NLTLDSGL (SEQ ID NO: 62)) và 136-146 (VQTGKDAPSNC (SEQ ID NO: 63)) của VISTA người (SEQ ID NO: 46). Theo một phương án khác, epitop cấu tạo này bao gồm, hoặc có trong, các gốc 24-36 (LLGPVDKGHDVTF (SEQ ID NO: 64)), 54-65 (RRPIRNLTFQDL (SEQ ID NO: 65)) và 100-102 (TMR) của VISTA người (SEQ

ID NO: 46). Theo một phương án khác nữa, epitop cấu tạo bao gồm các gốc axit amin trong vòng FG của VISTA người (SEQ ID NO: 46).

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phương pháp tăng cường đáp ứng miễn dịch ở đối tượng khi cần, bao gồm việc cho cá thể sử dụng lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể liên kết với yếu tố ức chế Ig vùng V hoạt hóa tế bào T (VISTA), hoặc đoạn kháng thể của nó, chứa vùng liên kết kháng nguyên mà liên kết với VISTA, nhờ đó tăng cường đáp ứng miễn dịch đối với bệnh ung thư. Theo một phương án cụ thể, đáp ứng miễn dịch là đáp ứng miễn dịch chống khối u.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo đáp ứng sinh học ở đối tượng khi cần, bao gồm việc cho cá thể sử dụng lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể liên kết với yếu tố ức chế Ig vùng V hoạt hóa tế bào T (VISTA), hoặc đoạn kháng thể của nó, chứa vùng liên kết kháng nguyên mà liên kết với VISTA, nhờ đó tăng cường đáp ứng miễn dịch đối với bệnh ung thư. Ví dụ về các đáp ứng sinh học bao gồm hoạt hóa bạch cầu đơn nhân to; cảm ứng sự tăng sinh tế bào T và tiết cytokin; độc tố tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC) của các tế bào biểu hiện VISTA; và sự thực bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular phagocytosis - ADCP) của các tế bào biểu hiện VISTA.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế hoặc đơn sáng chế gồm ít nhất một hình vẽ dạng có màu. Bản sao sáng chế hoặc công bố đơn sáng chế với (các) hình vẽ có màu sẽ được Cơ quan sáng chế cung cấp khi có yêu cầu và sau khi trả phí cần thiết.

Fig. 1A-1C: Đồ thị thể hiện mức biểu hiện VISTA trên các tế bào TF1 AML biểu hiện protein VISTA bằng phương pháp đếm tế bào kiểu dòng được thể hiện trong dòng tế bào TF-1 AML.

Fig. 2A-2E: Đồ thị thể hiện chiến lược nhuộm và khoanh vùng để nhận biết các tập hợp con tủy và lympho người.

Fig. 3A-3G: Đồ thị thể hiện mức biểu hiện VISTA trên các tập hợp con tủy và lympho người từ người cho bình thường khỏe mạnh.

Fig. 4: Đồ thị thể hiện mức biểu hiện VISTA trên các tập hợp con tủy và lympho người giữa nhiều người cho bình thường khỏe mạnh.

Fig. 5A-5B: Đồ thị thể hiện việc chiến lược nhuộm và khoanh vùng để nhận biết sự biểu hiện VISTA trên các bạch cầu đơn nhân to của người và đại thực bào.

Fig. 6A-6C: Đồ thị thể hiện mức biểu hiện VISTA trên bạch cầu đơn nhân to của người và đại thực bào.

Fig. 7A-7E: Đồ thị thể hiện việc chiến lược nhuộm và khoanh vùng để nhận biết sự biểu hiện VISTA trên các tập hợp con tế bào T và tế bào NK của người.

Fig. 8A-8G: Đồ thị thể hiện mức biểu hiện VISTA trên các tập hợp con tế bào T và tế bào NK của người từ một người cho bình thường khỏe mạnh.

Fig. 9: Đồ thị thể hiện mức biểu hiện VISTA trên các tập hợp con tế bào T và tế bào NK của người giữa nhiều người cho bình thường khỏe mạnh.

Fig. 10A-10D: Đồ thị thể hiện việc chiến lược nhuộm và khoanh vùng để nhận biết sự biểu hiện VISTA trên các tập hợp con tế bào sợi nhánh của người.

Fig. 11A-11C: Đồ thị thể hiện mức biểu hiện VISTA trên các tập hợp con tế bào sợi nhánh và các bạch cầu ưa bazơ của người từ một người cho bình thường khỏe mạnh.

Fig. 12: Đồ thị thể hiện mức biểu hiện VISTA trên các tập hợp con tế bào sợi nhánh và các bạch cầu ưa bazơ của người giữa nhiều người cho bình thường khỏe mạnh.

Fig. 13A-13D: Phân tích mức biểu hiện VISTA trên các tế bào máu ngoại vi của người khỏe mạnh. Profin biểu hiện VISTA trên các tế bào máu ngoại vi của người khỏe mạnh bằng cách sử dụng phép phân tích đếm tế bào kiểu dòng đa sắc: Các mẫu máu toàn phần từ hai cá thể khác nhau được phân tích về mức biểu hiện VISTA trên (Fig. 13A) bạch cầu đơn nhân to $SSC^{lo}CD11b^{hi}CD14^{hi}CD16^{-ve}CD33^{+ve}HLA-DR^{+ve}CD19^{-ve}$ (Fig. 13B) bạch cầu trung tính ($SSC^{hi}CD177^{+}CD11b^{hi}CD14^{lo}CD16^{+ve}CD33^{+ve}HLA-DR^{-ve}CD19^{-ve}$). Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi được tách bằng cách sử dụng gradien Ficoll để phân tích (Fig. 13C) các tế bào T $CD4^{+}$ ($CD3^{+ve}CD4^{+ve}$), và (Fig. 13D) các tế bào T $CD8^{+}$ ($CD3^{+ve}CD8^{+ve}$).

Fig. 14A-14C: Phân tích mức biểu hiện VISTA trên các tế bào máu ngoại vi từ bệnh nhân ung thư phổi và người cho đối chứng khỏe mạnh. Profin biểu hiện VISTA trên các tế bào máu ngoại vi của bệnh nhân ung thư phổi bằng cách sử dụng phép phân tích đếm tế bào kiểu dòng đa sắc: Biểu đồ FACS đại diện (Fig. 14A) từ một cá thể được thể hiện. Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi được tách bằng Ficoll và phân tích về mức biểu hiện VISTA trên (Fig. 14B) bạch cầu đơn nhân to ($CD14^{+}CD11b^{+}$

CD33+ HLADR+ CD15-) và (Fig. 14C) tế bào ức chế thu được từ tủy (CD14- CD11b+ CD33-HLADR-CD15+ CD16+).

Fig. 15A-15C: Profin biểu hiện VISTA trên các tế bào máu ngoại vi từ bệnh nhân ung thư kết tràng, bằng cách sử dụng phép phân tích đếm tế bào kiểu dòng đa sắc: Biểu đồ FACS đại diện (Fig. 15A) từ một cá thể được thể hiện. Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi được tách bằng Ficoll và phân tích về mức biểu hiện VISTA trên (Fig. 15B) bạch cầu đơn nhân to (CD14+ CD11b+ CD33+ HLADR+ CD15-) và (Fig. 15C) tế bào ức chế thu được từ tủy (CD14- CD11b+ CD33-HLADR-CD15+ CD16+).

Fig. 16A-16D: Profin biểu hiện VISTA trên các tế bào máu ngoại vi của khỉ *Cynomolgus* bằng cách sử dụng phép phân tích đếm tế bào kiểu dòng đa sắc: Máu toàn phần từ 4 khỉ khác nhau được phân tích về mức biểu hiện VISTA trên (Fig. 16A) bạch cầu đơn nhân to ($SSC^{lo}CD11b^{hi}CD14^{hi}HLA-DR^{hi}CD16^{-ve}CD19^{-ve}$) và (Fig. 16B) bạch cầu trung tính $CD11b^{hi}CD14^{lo}HLA-DR^{-ve}CD16^{-ve}CD19^{-ve}$. Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi từ ba khỉ được tách bằng cách sử dụng gradien Ficoll để phân tích (Fig. 16C) các tế bào T CD4+ ($TCR\alpha/\beta^{+ve}CD4^{+ve}$) và (Fig. 16D) các tế bào T CD8+ ($TCR\alpha/\beta^{+ve}CD8^{+ve}$).

Fig. 17: Đồ thị thể hiện giá trị mức biểu hiện ARN VISTA tuyệt đối trong các dòng tế bào Heme.

Fig. 18: Các tế bào A20 của chuột được chuyển nhiễm ổn định GFP hoặc VISTA người. Các tế bào này được ủ với peptit tế bào trứng và với các tế bào T DO11.10. Mức biểu hiện CD25 của tế bào T được xác định sau khi bắt đầu ủ 24 giờ. Các tế bào A20-huVISTA ức chế sự biểu hiện CD25 bởi các tế bào T, nhưng số đo này được tái lập đáng kể bằng cách ủ với VSTB95.

Fig. 19A-19F: Đồ thị thể hiện kết quả ELISA của VISTA người.

Fig. 20A-20F: Kết quả FACS của VISTA người, thể hiện rằng kháng thể kháng VISTA liên kết với các tế bào biểu hiện VISTA người.

Fig. 21A-21D: Thử nghiệm pha loãng 6 ứng viên kháng thể kháng VISTA trong phản ứng lympho bào hỗn hợp từ 30 μ g/ml đến 0,0 μ g/ml.

Fig. 22A-22B: Thử nghiệm pha loãng 6 ứng viên kháng thể kháng VISTA trong thử nghiệm SEB (các số đếm CPM và nồng độ IFN-g riêng rẽ) từ 30 μ g/ml đến 0,0 μ g/ml.

Fig. 23: Đồ thị đáp ứng theo thời gian bằng cách sử dụng kháng thể kháng VISTA VSTB85 phủ trên chip Proteon SPR và protein VISTA với các chất cạnh tranh được chỉ thị chạy qua chip (các chất cạnh tranh được liệt kê trong Bảng 16).

Fig. 24: Thiết kế thử nghiệm đối với mô hình khối u bằng quang ở chuột MB49

Fig. 25A-25B: Sự phát triển của khối u MB49 ở chuột nhắt C57Bl/6 cái. Đồ thị minh họa sự phát triển của khối u ở các chuột riêng rẽ được điều trị bằng kháng thể kháng VISTA chuột (Fig. 25B) hoặc IgG đối chứng (Fig. 25A).

Fig. 26: Trình tự axit amin của VISTA người (SEQ ID NO: 46).

Fig. 27: Sắp thẳng hàng nhiều trình tự gen trực giao VISTA

Fig. 28: Các vùng của VISTA người liên kết với kháng thể VSTB50 và VSTB60 (phía trên) hoặc kháng thể VSTB95 và VSTB112 (phía dưới), như được xác định bằng HDX

Fig. 29: Epitop VISTA liên kết với VSTB112. VISTA (phía trên) được thể hiện trong hình vẽ với các dải được đánh dấu. Các gốc có ít nhất một nguyên tử trong 5 Å của VSTB112 trong phức hợp có màu xanh lam. Các hình cầu màu xanh lam và màu cam đánh dấu các đoạn ngắt chuỗi, và các hình cầu màu lục lam và màu xanh lục lần lượt đánh dấu đầu tận cùng N- và C- của cấu trúc VISTA. Trình tự (phía dưới) của cấu trúc VISTA được sử dụng để xác định cấu trúc. Các hình tròn phía dưới trình tự được sử dụng để chỉ ra các gốc mà làm cho chỉ có mạch chính tiếp xúc với VSTB112, hình tam giác chỉ ra tiếp xúc với mạch bên, và hình cầu chỉ ra tiếp xúc với mạch bên tạo ra liên kết hydro hoặc tương tác cầu muối như được tính toán bằng PISA. Các hình được tô màu để chỉ ra CDR có số nguyên tử lớn nhất tiếp xúc bằng gốc nhất định với các màu CDR được xác định trong Fig. 59. Các yếu tố cấu trúc bậc hai được xác định trong chương trình MOE với các mũi tên màu vàng đại diện cho các chuỗi β và các hình chữ nhật màu đỏ chỉ ra các chuỗi xoắn α .

Fig. 30: Paratop VSTB112. (Phía trên) kháng nguyên VISTA được thể hiện để minh họa và VSTB112 trong 5 angstrom (Å) VISTA được thể hiện trên bề mặt với các màu sắc được sử dụng để chỉ định nhận dạng CDR cụ thể như trong trình tự dưới đây. Các gốc vùng khung tiếp xúc liên kề với CDR được tô màu tương tự như trình tự CDR tương ứng (phía dưới) của vùng Fv VSTB112. Các nền được tô màu chỉ định các CDR theo định nghĩa Kabat. Các hình tròn phía dưới trình tự được sử dụng để chỉ ra các gốc mà làm cho mạch chính chỉ tiếp xúc với VISTA, hình tam giác chỉ ra tiếp xúc với

mạch bên, và hình cầu chỉ ra tiếp xúc với mạch bên tạo ra liên kết hydro hoặc tương tác cầu muối như được tính toán bằng PISA.

Fig. 31: So sánh các vùng epitop được nhận dạng bằng tinh thể học và phương pháp trao đổi hydro deuteri (hydrogen deuterium exchange - HDX). Trình tự của cấu trúc VISTA được sử dụng để xác định cấu trúc. Các hình tròn phía dưới trình tự được sử dụng để chỉ ra các gốc mà làm cho chỉ có mạch chính tiếp xúc với VSTB112, hình tam giác chỉ ra tiếp xúc với mạch bên, và hình cầu chỉ ra tiếp xúc với mạch bên tạo ra liên kết hydro hoặc tương tác cầu muối như được tính toán bằng PISA.

Fig. 32: Hoạt hóa các bạch cầu đơn nhân to CD14+ trong PBMC toàn phần bằng VSTB174 (thu được từ VSTB112). Trong mỗi phần của thử nghiệm, các tế bào được ủ với PBS, IgG1 kháng thể đối chứng, hoặc VSTB174 với nồng độ 1, 0,1 hoặc 0,01 $\mu\text{g/ml}$. Nhóm bên trái thể hiện CD80 MFI; nhóm bên phải thể hiện HLA-DR MFI (hai người cho được thử nghiệm với kết quả đại diện được thể hiện).

Fig. 33: Đồ thị thể hiện hoạt tính ADCC của VSTB174 được định hướng chống lại các tế bào K562-VISTA.

Fig. 34: Đồ thị thể hiện hoạt tính ADCP của VSTB174 được định hướng chống lại các tế bào K562-VISTA. Cả hai kháng thể được mô tả có cùng Fab, nhưng VSTB174 có IgG1 Fc và VSTB140 có IgG2 với Fc bất hoạt.

Fig. 35: Đồ thị thể hiện sự thực bào qua trung gian mAb của VSTB174, VSTB149 hoặc VSTB140 chống lại K562-VISTA. Mỗi mAb được thử nghiệm bằng 7 liều hơn kém nhau $10^{0,5}$ lần, nằm trong khoảng từ 0,0008 $\mu\text{g/ml}$ đến 0,56 $\mu\text{g/ml}$.

Fig. 36: Đồ thị thể hiện sự thực bào qua trung gian mAb của VSTB174, VSTB149 hoặc VSTB140 chống lại các tế bào thuộc dòng tế bào u tủy K562. Mỗi mAb được thử nghiệm bằng 7 liều hơn kém nhau $10^{0,5}$ lần, nằm trong khoảng từ 0,0008 $\mu\text{g/ml}$ đến 0,56 $\mu\text{g/ml}$.

Fig. 37: Nghiên cứu hiệu lực khối u MB49 đánh giá VSTB123 1, 5, 7,5, và 10 mg/kg ở chuột nhắt VISTA-KI cái. Thể tích khối u là khoảng 50 mm³ khi bắt đầu sử dụng liều vào ngày 6 sau khi cấy ghép. VSTB123 là VSTB112 Fab được ghép vào khung Fc của chuột và liên kết với VISTA người ở chuột nhắt VISTA-KI.

Fig. 38: Đồ thị thể hiện rằng các tế bào CD14+ biểu hiện VISTA ở mức cao/trung bình được phát hiện ở 13/13 mẫu ung thư phổi, cũng như ở mô phổi xa và máu ngoại vi của bệnh nhân.

Fig. 39: Nhuộm IHC đối với VISTA ở bệnh ung thư phổi bằng cách sử dụng GG8.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phần mô tả về các phương án làm ví dụ theo sáng chế là như sau.

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng phối tử họ globulin miễn dịch mới gọi là yếu tố ức chế globulin miễn dịch vùng V hoạt hóa tế bào T (V-domain Immunoglobulin Suppressor of T cell Activation - VISTA) (Genbank: JN602184) (Wang et al., 2010, 2011). VISTA tương đồng với PD-L1 nhưng thể hiện kiểu biểu hiện độc đáo mà bị giới hạn ở khoang tạo huyết. Cụ thể, VISTA được biểu hiện chủ yếu và ở mức cao trên các tế bào tủy CD11b^{high}, và được biểu hiện ở mức thấp trên các tế bào T CD4⁺ và CD8⁺. Thể tương đồng ở người có khoảng 85% tương đồng với VISTA chuột và có kiểu biểu hiện tương tự (Lines et al., Cancer Research 74:1924, 2014). VISTA được biểu hiện trên các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) ức chế sự tăng sinh tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ và sự sản xuất xytokin thông qua thụ thể cùng họ không phụ thuộc PD-1. Trong mô hình bệnh viêm não tủy tự miễn (EAE - experimental autoimmune encephalomyelitis) thụ động, kháng thể đơn dòng đặc hiệu VISTA tăng cường đáp ứng miễn dịch phụ thuộc tế bào T và làm bệnh thêm trầm trọng. Sự biểu hiện VISTA quá mức trên các tế bào khối u làm suy yếu miễn dịch bảo vệ chống khối u ở vật chủ có khối u. Nghiên cứu về VISTA người khẳng định chức năng ức chế của nó trên các tế bào T người (Lines et al Cancer Research 74:1924, 2014,. Các nghiên cứu của Flies và các đồng tác giả cũng cho thấy VISTA (gọi là PD-1H) là phân tử ức chế miễn dịch tiềm năng (Flies et al., 2011). VISTA được mô tả chi tiết hơn trong đơn Mỹ số US 20130177557 A1 đã công bố và Patent Mỹ số 7,919,585 và 8,236,304, được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

VISTA là yếu tố điều hòa điểm kiểm soát tiêu cực mà ức chế đáp ứng miễn dịch. Như được mô tả trong Ví dụ 12 trong bản mô tả, việc điều trị bằng kháng thể đơn dòng đặc hiệu VISTA ở các mô hình khối u chuột đã thể hiện đảo ngược đặc tính ức chế của vi môi trường khối u và tăng cường miễn dịch bảo vệ chống khối u, do đó, chúng tỏ tiềm năng làm liệu pháp mới để điều trị miễn dịch bệnh ung thư của kháng thể đơn dòng kháng VISTA.

Các kháng thể và đoạn kháng thể theo sáng chế

Thuật ngữ "kháng thể" nghĩa là bao gồm kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng (mAb), kháng thể khảm, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể người và kháng thể kháng idiotyp (anti-Id), cũng như đoạn, vùng hoặc dẫn xuất của chúng, được tạo ra bằng kỹ thuật bất kỳ đã biết, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, phân cắt bằng enzym, tổng hợp peptit hoặc các kỹ thuật tái tổ hợp. Kháng thể kháng VISTA theo sáng chế có khả năng liên kết với các vùng của VISTA mà điều biến, điều hòa, hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch. Theo một số phương án, các kháng thể ức chế cạnh tranh một hoặc nhiều kháng thể kháng VISTA được mô tả trong bản mô tả. Phương pháp xác định xem hai hay nhiều kháng thể có cạnh tranh liên kết với cùng đích hay không là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, thử nghiệm liên kết cạnh tranh có thể được sử dụng để xác định xem một kháng thể có chặn liên kết của kháng thể khác với đích hay không. Thông thường, thử nghiệm liên kết cạnh tranh bao gồm việc sử dụng kháng nguyên đích được tinh chế (ví dụ, PD-1) liên kết với cơ chất rắn hoặc tế bào, phân tử liên kết thử nghiệm không đánh dấu, và phân tử liên kết đối chứng đánh dấu. Khả năng ức chế cạnh tranh được đo bằng cách xác định lượng nhãn liên kết với bề mặt rắn hoặc tế bào với sự có mặt của phân tử liên kết thử nghiệm. Phân tử liên kết thử nghiệm luôn có mặt với lượng dư. Thông thường, khi phân tử liên kết cạnh tranh có mặt với lượng dư, nó sẽ ức chế liên kết đặc hiệu của phân tử liên kết đối chứng với kháng nguyên thông thường ít nhất 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, hoặc hơn. Theo một số phương án, khả năng ức chế cạnh tranh được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA ức chế cạnh tranh.

Các kháng thể đa dòng là các quần thể phân tử kháng thể khác nhau thu được từ huyết thanh của động vật được gây miễn dịch bằng kháng nguyên. Kháng thể đơn dòng chứa quần thể kháng thể gần như đồng nhất đặc hiệu với các kháng nguyên, quần thể này chứa các vị trí liên kết epitop gần như tương tự nhau. Có thể thu được các kháng thể đơn dòng bằng những phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ tài liệu của Kohler và Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975); U.S. Pat. No. 4,376,110; Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1987, 1992); và tài liệu của Harlow và Lane *ANTIBODIES: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Colligan et al., eds., *Current Protocols in*

Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), nội dung của các tài liệu này được kết hợp nguyên vẹn bằng cách viện dẫn. Các kháng thể như vậy có thể là lớp globulin miễn dịch bất kỳ bao gồm IgG, IgM, IgE, IgA, GILD và lớp phụ bất kỳ của chúng. Thể lai sản xuất kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể được nuôi cấy in vitro, tại chỗ hoặc in vivo.

Sáng chế cũng bao gồm các đoạn đồng hóa, các phần cụ thể và các biến thể của chúng, bao gồm các thể bất chức kháng thể hoặc bao gồm các phần của kháng thể mà bất chức cấu trúc và/hoặc chức năng của kháng thể hoặc đoạn cụ thể hoặc phần của chúng, bao gồm các kháng thể chuỗi đơn và đoạn kháng thể của chúng. Các đoạn chức năng bao gồm các đoạn liên kết kháng nguyên mà liên kết với protein VISTA của động vật có vú. Ví dụ, các đoạn kháng thể có khả năng liên kết với VISTA hoặc phần của nó, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở Fab (ví dụ, bằng cách đồng hóa bằng papain), Fab' (ví dụ, bằng cách đồng hóa bằng pepsin và khử một phần) và F(ab')₂ (ví dụ, bằng cách đồng hóa bằng pepsin), facb (ví dụ, bằng cách đồng hóa bằng plasmin), pFc' (ví dụ, bằng cách đồng hóa bằng pepsin hoặc bằng cách đồng hóa bằng plasmin), Fd (ví dụ, bằng cách đồng hóa bằng pepsin, khử một phần và tái kết tụ), các đoạn Fv hoặc scFv (ví dụ, bằng kỹ thuật sinh học phân tử), thuộc phạm vi của sáng chế (xem, ví dụ, Colligan, Immunology, trên đây). Các đoạn kháng thể theo sáng chế cũng bao gồm các đoạn được thảo luận và mô tả trong Aaron L. Nelson, mAbs 2:1, 77-83 (January/February 2010), được kết hợp toàn bộ bằng cách viện dẫn.

Các đoạn như vậy có thể được tạo ra, ví dụ, bằng cách phân cắt bằng enzym, các kỹ thuật tổng hợp hoặc tái tổ hợp, đã biết trong lĩnh vực này và/hoặc như được mô tả trong bản mô tả. Các kháng thể cũng có thể được tạo ra ở nhiều dạng cắt cụt khác nhau bằng cách sử dụng các gen kháng thể trong đó một hoặc nhiều codon kết thúc được đưa vào phía trước của vị trí kết thúc tự nhiên. Ví dụ, gen tổ hợp mã hóa phần chuỗi nặng F(ab')₂ có thể được thiết kế để bao gồm trình tự ADN mã hóa miền CH1 và/hoặc vùng bản lề của chuỗi nặng. Các phần khác nhau của kháng thể có thể được nối với nhau theo cách hóa học bằng các kỹ thuật thông thường, hoặc có thể được tạo ra dưới dạng protein liên kết bằng cách sử dụng các kỹ thuật xử lý di truyền.

Theo một phương án, trình tự axit amin của chuỗi globulin miễn dịch, hoặc phần của nó (ví dụ, vùng biến đổi, CDR) có khoảng 70-100% đồng nhất (ví dụ, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95,

96, 97, 98, 99, 100 hoặc khoảng hoặc giá trị bất kỳ trong đó) với trình tự axit amin của chuỗi trình tự biến đổi tương ứng được mô tả trong bản mô tả. Tốt hơn, nếu 70-100% đồng nhất về axit amin (ví dụ, 85, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 hoặc khoảng hoặc giá trị bất kỳ trong đó) được xác định bằng cách sử dụng thuật toán máy vi tính thích hợp, như đã biết trong lĩnh vực này.

Ví dụ về các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đưa ra trong bản mô tả.

Các kháng thể theo sáng chế, hoặc biến thể cụ thể của chúng, có thể chứa số gốc axit amin liền kề bất kỳ từ kháng thể theo sáng chế, trong đó số này được chọn từ nhóm các số nguyên gồm từ 10-100% số gốc liền kề trong kháng thể kháng TNF. Tùy ý, trình tự con gồm các axit amin liền kề có độ dài ít nhất khoảng 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 axit amin hoặc nhiều hơn, hoặc khoảng hoặc giá trị bất kỳ trong đó. Hơn nữa, số trình tự con như vậy có thể là số nguyên bất kỳ được chọn từ nhóm gồm từ 1 đến 20, như ít nhất 2, 3, 4, hoặc 5.

Như người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ thấy, the sáng chế bao gồm ít nhất một kháng thể hoạt động sinh học theo sáng chế. Kháng thể hoạt động sinh học có hoạt tính đặc hiệu ít nhất 20%, 30%, hoặc 40%, và tốt hơn là ít nhất 50%, 60%, hoặc 70%, và tốt nhất là ít nhất 80%, 90%, hoặc 95%-100% của kháng thể tự nhiên (không tổng hợp), nội sinh hoặc có liên quan và đã biết. Phương pháp thử nghiệm và định tính các số đo hoạt tính enzym và độ đặc hiệu cơ chất, là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này.

Gần như tương đồng chỉ hợp chất có ít nhất 85% (ví dụ, ít nhất 95%) đồng nhất và ít nhất 85% (ví dụ, ít nhất 95%) hoạt tính của kháng thể tự nhiên (không tổng hợp), nội sinh hoặc có liên quan và đã biết.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “kháng thể người” chỉ kháng thể trong đó gần như mọi phần của protein (ví dụ, CDR, vùng khung, các miền CL, CH (ví dụ, CH1, CH2, CH3), vùng bản lề, (VL, VH)) là gần như không sinh miễn dịch ở người, với chỉ các thay đổi hoặc biến đổi nhỏ về trình tự. Tương tự, các kháng thể được gọi là kháng thể linh trưởng (khỉ, khỉ đầu chó, khỉ chimpanzee, và tương tự), loài gặm nhấm (chuột nhắt, chuột cống, và tương tự) và các động vật có vú khác chỉ kháng thể đặc hiệu các loài, giống phụ, giống, họ phụ, họ. Hơn nữa, các kháng thể khám có

thể bao gồm tổ hợp bất kỳ của các kháng thể trên đây. Các thay đổi hoặc biến đổi như vậy tùy ý và tốt hơn là duy trì hoặc làm giảm tính sinh miễn dịch ở người hoặc các loài khác tương ứng với kháng thể không cải biến. Do đó, kháng thể người là khác với kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm giống như của người. Đã chỉ ra rằng kháng thể người có thể được sản xuất bằng các động vật không phải người hoặc tế bào nhân nguyên thủy hoặc tế bào nhân điển hình mà có khả năng biểu hiện các gen globulin người được sắp xếp lại về mặt chức năng (ví dụ, chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ). Hơn nữa, khi kháng thể người là kháng thể chuỗi đơn, nó có thể bao gồm peptit liên kết mà không phát hiện được trong kháng thể người tự nhiên. Ví dụ, Fv có thể bao gồm peptit liên kết, như hai đến khoảng tám glyxin hoặc các gốc axit amin khác, mà nối vùng biến đổi của nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Các peptit liên kết như vậy được xem là có nguồn gốc từ người.

Kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể dị đặc hiệu, kháng thể dị liên hợp hoặc kháng thể tương tự cũng có thể được sử dụng là đơn dòng, tốt hơn là kháng thể người hoặc được làm giống như của người mà có tính đặc hiệu liên kết cho ít nhất hai kháng nguyên khác. Trong trường hợp này, một trong số các tính đặc hiệu liên kết là đối với ít nhất một protein VISTA, tính đặc hiệu kia là cho kháng nguyên bất kỳ khác. Các phương pháp để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép là đã biết. Việc sản xuất kháng thể đặc hiệu kép theo cách tái tổ hợp có thể dựa trên việc đồng biểu hiện hai cặp globulin miễn dịch chuỗi nặng-chuỗi nhẹ, trong đó hai chuỗi nặng có tính đặc hiệu khác nhau (Milstein and Cuello, *Nature* 305:537 (1983)). Cũng xem trong WO 93/08829, U.S. Pat. Nos. 6,210,668, 6,193,967, 6,132,992, 6,106,833, 6,060,285, 6,037,453, 6,010,902, 5,989,530, 5,959,084, 5,959,083, 5,932,448, 5,833,985, 5,821,333, 5,807,706, 5,643,759, 5,601,819, 5,582,996, 5,496,549, 4,676,980, WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655 (1991), Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986), được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép hướng đích VISTA và protein đích thứ hai (ví dụ, protein điểm kiểm soát miễn dịch). Các kháng thể đặc hiệu kép làm ví dụ bao gồm kháng thể đặc hiệu kép hướng đích VISTA và PD-L1 và kháng thể đặc hiệu kép hướng đích VISTA và PD-L2.

Các kháng thể người đặc hiệu đối với các protein VISTA người hoặc đoạn của chúng có thể được tạo ra kháng lại kháng nguyên sinh miễn dịch thích hợp, như protein VISTA hoặc phần của nó (bao gồm các phân tử tổng hợp, như peptit tổng hợp).

Các kháng thể đặc hiệu khác hoặc kháng thể động vật có vú có chung có thể được tạo ra theo cách tương tự. Việc tạo ra các kháng nguyên sinh miễn dịch và sản xuất kháng thể đơn dòng có thể thực hiện bằng kỹ thuật thích hợp bất kỳ đã biết.

Ví dụ, thể lai được sản xuất bằng cách dung hợp dòng tế bào bất tử thích hợp (ví dụ, dòng tế bào u tủy như, nhưng không chỉ giới hạn ở, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A, hoặc tương tự, hoặc các tế bào dị u tủy, các sản phẩm dung hợp của chúng, hoặc tế bào hoặc tế bào dung hợp bất kỳ thu được từ đó, hoặc dòng tế bào thích hợp bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực này, xem, ví dụ, www.atcc.org, với các tế bào sản xuất kháng thể. Các tế bào sản xuất kháng thể có thể bao gồm tế bào lách được phân lập hoặc được tách dòng, tế bào máu ngoại vi, tế bào bạch huyết, tế bào amidal, hoặc các tế bào miễn dịch khác (ví dụ, tế bào B), hoặc các tế bào bất kỳ khác biểu hiện các trình tự vùng hằng định hoặc vùng biến đổi hoặc vùng khung hoặc vùng quyết định bổ cứu (complementarity determining region - CDR) của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ. Các tế bào sản xuất kháng thể như vậy có thể là tế bào tái tổ hợp hoặc tế bào nội sinh, và cũng có thể là tế bào có nhân nguyên thủy hoặc tế bào nhân thật (ví dụ, tế bào động vật có vú, như, loài gặm nhấm, ngựa, giống cừu, dê, cừu, động vật linh trưởng). Xem, ví dụ, Ausubel, trên đây, and Colligan, Immunology, trên đây, chapter 2, được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

Các tế bào sản xuất kháng thể cũng có thể thu được từ máu ngoại vi hoặc, tốt hơn là lách hoặc hạch bạch huyết, của người hoặc các động vật thích hợp khác mà đã được gây miễn dịch bằng kháng nguyên cần quan tâm. Tế bào chủ thích hợp bất kỳ khác cũng có thể được sử dụng để biểu hiện axit nucleic dị loại hoặc nội sinh mã hóa kháng thể, đoạn đặc hiệu hoặc biến thể của nó, theo sáng chế. Các tế bào dung hợp (tế bào lai) hoặc tế bào tái tổ hợp có thể được phân lập bằng cách sử dụng các điều kiện nuôi cấy chọn lọc hoặc các phương pháp thích hợp đã biết khác, và tách dòng bằng cách

pha loãng giới hạn hoặc sàng lọc tế bào, hoặc các phương pháp đã biết khác. Các tế bào mà sản xuất kháng thể với tính đặc hiệu mong muốn có thể được chọn bằng thử nghiệm thích hợp (ví dụ, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA)).

Các phương pháp thích hợp khác để sản xuất hoặc phân lập kháng thể có tính đặc hiệu cần thiết có thể được sử dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp chọn lọc kháng thể tái tổ hợp từ thư viện peptit hoặc protein (ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, thể thực khuẩn, ribosom, oligonucleotit, ARN, cADN, hoặc tương tự, thư viện biểu hiện; ví dụ, sẵn có từ Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; Bioinvent, Lund, Sweden; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, Calif.; Ixsys. Xem, ví dụ, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; ; WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; PCT/U594/1234; WO92/18619; WO96/07754; EP 614 989 ; WO95/16027 ; WO88/06630; WO90/3809 ; U.S. Pat. No. 4,704,692 ; PCT/US91/02989 ; WO89/06283; EP 371 998; EP 550 400; ; EP 229 046; PCT/US91/07149 ; hoặc các peptit hoặc protein được tạo ra một cách ngẫu nhiên --U.S. Patent Nos. 5,723,323; 5,763,192; 5,814,476; 5,817,483; 5,824,514; 5,976,862; WO 86/05803, EP 590 689, được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn, hoặc dựa trên việc gây miễn dịch động vật chuyển gen (ví dụ, chuột SCID, Nguyen et al., Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu et al., Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118 (1996); Eren et al., Immunol. 93:154-161 (1998), được kết hợp toàn bộ bằng cách viện dẫn cũng như các patent và đơn sáng chế liên quan) mà có khả năng sản xuất tập hợp các kháng thể người, như đã biết trong lĩnh vực này và/hoặc như được mô tả trong bản mô tả. Các kỹ thuật như vậy, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kỹ thuật biểu hiện ribosom (Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (May 1997); Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (November 1998)); công nghệ sản xuất kháng thể đơn bào (U.S. Pat. No. 5,627,052, Wen et al., J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)); kỹ thuật gel vi nhỏ giọt và kỹ thuật đếm tế bào kiểu dòng (Powell et al., Biotechnol. 8:333-337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, Mass.; Gray et al., J. Imm. Meth. 182:155-163

(1995); Kenny et al., *Bio/Technol.* 13:787-790 (1995)); B-cell selection (Steenbakkers et al., *Molec. Biol. Reports* 19:125-134 (1994); Jonak et al., *Progress Biotech*, Vol. 5, *In Vitro Immunization in Hybridoma Technology*, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands (1988)).

Các phương pháp thao tác kỹ thuật hoặc làm giống như của người các kháng thể người hoặc không phải của người cũng có thể được sử dụng và đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Thông thường, kháng thể được làm giống như của người hoặc được thao tác kỹ thuật có một hoặc nhiều các gốc axit amin từ nguồn không phải người non-human, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở chuột nhắt, chuột cống, thỏ, động vật linh trưởng không phải người hoặc động vật có vú khác. Các các gốc axit amin của người này thường gọi là gốc "nhập khẩu", mà thường thu được từ vùng biến đổi, vùng hằng định hoặc miền "nhập khẩu" khác của trình tự đã biết của người. Các trình tự Ig người đã biết được bộc lộ, ví dụ, tại www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html, được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

Các trình tự được nhập khẩu này có thể được sử dụng để làm giảm tính sinh miễn dịch hoặc làm giảm, tăng cường hoặc biến đổi khả năng liên kết, ái lực, khả lực, tính đặc hiệu, thời gian bán hủy, hoặc đặc điểm bất kỳ thích hợp khác, như đã biết trong lĩnh vực này. Nói chung, một phần hoặc toàn bộ các trình tự CDR người hoặc không phải của người được giữ lại trong khi một phần hoặc toàn bộ trình tự không phải của người thuộc vùng khung và/hoặc vùng hằng định được thay bằng các axit amin khác hoặc của người. Các kháng thể cũng có thể tùy ý được làm giống như của người duy trì được ái lực cao với kháng nguyên và các đặc tính sinh học mong muốn khác bằng cách sử dụng các mô hình globulin miễn dịch ba chiều đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này. Các chương trình máy tính mà minh họa và thể hiện các cấu trúc có cấu hình ba chiều có thể có của trình tự globulin miễn dịch được chọn là sẵn có. Việc kiểm tra các hiển thị này cho phép phân tích vai trò có vẻ thích hợp của các gốc trong việc tạo ra chức năng cho trình tự globulin miễn dịch tiềm năng, tức là phân tích các gốc mà ảnh hưởng đến khả năng liên kết của globulin miễn dịch tiềm năng với kháng nguyên của nó. Theo cách này, các gốc vùng khung (FR) có thể được chọn và kết hợp từ bên nhận và các trình tự nhập khẩu sao cho đạt được đặc tính mong muốn của kháng thể, như ái lực với (các) kháng nguyên đích tăng. Nói chung, các gốc CDR trực tiếp và gần như có liên quan nhất đến ảnh hưởng lên liên kết kháng nguyên.

Việc làm cho giống như của người hoặc thao tác kỹ thuật các kháng thể theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết, như nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp được mô tả trong, ví dụ, Winter (Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), U.S. Pat. Nos. 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5,814,476, 5,763,192, 5,723,323, 5,766,886, 5,714,352, 6,204,023, 6,180,370, 5,693,762, 5,530,101, 5,585,089, 5,225,539; 4,816,567, được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn, bao gồm các tài liệu tham khảo được biện dẫn trong đó.

Kháng thể kháng VISTA cũng có thể tùy ý được tạo ra bằng cách gây miễn dịch động vật chuyển gen (ví dụ, chuột nhắt, chuột cống, thỏ, chuột đồng, động vật linh trưởng không phải người, và tương tự) có khả năng sản xuất tập hợp các kháng thể người, như được mô tả trong bản mô tả và/hoặc như đã biết trong lĩnh vực này. Các tế bào mà sản sinh ra kháng thể kháng VISTA của người có thể được phân lập từ các động vật như vậy và làm cho bất tử bằng cách sử dụng các phương pháp thích hợp, như cả phương pháp được mô tả trong bản mô tả.

Các động vật chuyển gen mà có thể sản xuất tập hợp các kháng thể người mà liên kết với kháng nguyên người có thể được sản xuất bằng các phương pháp, đã biết (ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, U.S. Pat. Nos. 5,770,428, 5,569,825, 5,545,806, 5,625,126, 5,625,825, 5,633,425, 5,661,016 và 5,789,650 cấp cho Lonberg et al.; Jakobovits et al. WO 98/50433, Jakobovits et al. WO 98/24893, Lonberg et al. WO 98/24884, Lonberg et al. WO 97/13852, Lonberg et al. WO 94/25585, Kucherlapate et al. WO 96/34096, Kucherlapate et al. EP 0463 151 B1, Kucherlapate et al. EP 0710 719 A1, Surani et al. U.S. Pat. No. 5,545,807, Bruggemann et al. WO 90/04036, Bruggemann et al. EP 0438 474 B1, Lonberg et al. EP 0814 259 A2, Lonberg et al. GB 2 272 440 A, Lonberg et al. Nature 368:856-859 (1994), Taylor et al., Int. Immunol. 6(4):579-591 (1994), Green et al., Nature Genetics 7:13-21 (1994), Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997), Taylor et al., *axit nucleics Research* 20(23):6287-6295 (1992), Tuaillon et al., Proc Natl Acad Sci USA 90(8):3720-3724 (1993), Lonberg et al., Int Rev Immunol 13(1):65-93 (1995) and Fishwald et al., Nat

Biotechnol 14(7):845-851 (1996), được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn). Nói chung, các chuột này mang ít nhất một gen chuyển chứa ADN từ ít nhất một locus globulin miễn dịch người mà được sắp xếp lại về mặt chức năng, hoặc có thể trải qua sự sắp xếp lại về mặt chức năng. Các locus globulin miễn dịch nội sinh ở các chuột như vậy có thể bị phá vỡ hoặc xóa bỏ để loại bỏ khả năng sản xuất kháng thể được mã hóa bởi các gen nội sinh của động vật.

Việc sàng lọc các kháng thể về khả năng liên kết đặc hiệu với các protein hoặc đoạn tương tự có thể thực hiện một cách thuận tiện bằng cách sử dụng thư viện biểu hiện peptit. Phương pháp này bao gồm bước sàng lọc các bộ sưu tập peptit lớn để thu được các thành phần riêng rẽ có chức năng hoặc cấu trúc mong muốn. Việc sàng lọc kháng thể từ thư viện biểu hiện peptit đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Các trình tự peptit được biểu hiện có thể dài từ 3 đến 5000 axit amin hoặc hơn, thường dài từ 5-100 axit amin, và phổ biến là dài khoảng 8 đến 25 axit amin. Ngoài các phương pháp tổng hợp hóa học trực tiếp để tạo ra các thư viện peptit, một số phương pháp ADN tái tổ hợp đã được mô tả. Một loại bao gồm việc biểu hiện trình tự peptit trên bề mặt của thực khuẩn thể hoặc tế bào. Mỗi thực khuẩn thể hoặc tế bào chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự peptit cụ thể được biểu hiện. Các phương pháp như vậy được mô tả trong công bố đơn PCT số 91/17271, 91/18980, 91/19818, và 93/08278. Các hệ khác để tạo ra thư viện peptit có các khía cạnh cả về tổng hợp hóa học in vitro và phương pháp tái tổ hợp. Xem, Công bố đơn PCT số 92/05258, 92/14843, và 96/19256. Cũng xem, U.S. Patent Nos. 5,658,754; và 5,643,768. Các thư viện biểu hiện peptit, vector, và kit sàng lọc có bán trên thị trường từ những nhà cung cấp như Invitrogen (Carlsbad, Calif.), và Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, UK). Xem, ví dụ, U.S. Patent Nos. 4,704,692, 4,939,666, 4,946,778, 5,260,203, 5,455,030, 5,518,889, 5,534,621, 5,656,730, 5,763,733, 5,767,260, 5,856,456; 5,223,409, 5,403,484, 5,571,698, 5,837,500, được chuyển nhượng cho Dyax, 5,427,908, 5,580,717; 5,885,793, được chuyển nhượng cho Cambridge antibody Technologies; 5,750,373, được chuyển nhượng cho Genentech, 5,618,920, 5,595,898, 5,576,195, 5,698,435, 5,693,493, và 5,698,417.

Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng ít nhất một axit nucleic mã hóa kháng thể kháng VISTA để tạo ra động vật chuyển gen, như dê, bò, cừu, và tương tự, mà sản xuất ra các kháng thể như vậy trong sữa của chúng.

Các động vật như vậy cũng có thể được tạo ra bằng cách phương pháp đã biết. Xem, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, U.S. Pat. Nos. 5,827,690; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616; 5,565,362; 5,304,489, và tương tự, được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

The kháng thể kháng VISTA theo sáng chế cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng thực vật chuyển gen, theo các phương pháp đã biết. Cũng xem, ví dụ, Fischer et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:99-108 (October, 1999), Cramer et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:95-118 (1999) and references cited therein; Ma et al., *Trends Biotechnol.* 13:522-7 (1995); Ma et al., *Plant Physiol.* 109:341-6 (1995); Whitelam et al., *Biochem. Soc. Trans.* 22:940-944 (1994); và các tài liệu tham khảo được viện dẫn trong đó. Mỗi tài liệu tham khảo trên đây được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

Các kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với VISTA người với khoảng ái lực (K_D) rộng. Theo một phương án được ưu tiên, ít nhất một kháng thể đơn dòng người theo sáng chế tùy ý có thể liên kết với VISTA người với ái lực cao. Ví dụ, kháng thể đơn dòng người có thể liên kết với VISTA người với K_D bằng hoặc nhỏ hơn khoảng 10^{-7} M, như nhưng không chỉ giới hạn ở, 0,1-9,9 (hoặc khoảng hoặc giá trị bất kỳ trong đó) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} hoặc khoảng hoặc giá trị bất kỳ trong đó. Theo một số phương án, kháng thể hoặc đoạn kháng thể có thể liên kết với VISTA người với ái lực ít nhất 1×10^{-7} lít/mol, ví dụ, ít nhất 1×10^{-8} lít/mol, ví dụ, ít nhất 1×10^{-9} lít/mol lít/mol.

Ái lực và khả lực của kháng thể đối với kháng nguyên có thể được xác định bằng thực nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ. (Xem, ví dụ, Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions," In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kubly, Janis *Immunology*, W.H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992); và các phương pháp được mô tả trong bản mô tả). Ái lực đo được của tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể có thể thay đổi nếu được đo trong các điều kiện khác (ví dụ, nồng độ muối, độ pH). Do đó, các phép đo ái lực và các thông số liên kết kháng nguyên khác (ví dụ, K_D , K_a , K_d) tốt hơn nếu được thực hiện bằng các dung dịch kháng thể và kháng nguyên được chuẩn hóa, và dung dịch đệm được chuẩn hóa.

Phân tử axit nucleic

Bằng cách sử dụng các thông tin được cung cấp trong bản mô tả, các trình tự nucleotit mã hóa ít nhất 70-100% các axit amin liền kề của ít nhất một trong số các đoạn đặc hiệu, biến thể hoặc trình tự liên ứng của chúng, hoặc vector được ký gửi chứa ít nhất một trong số các trình tự này, phân tử axit nucleic theo sáng chế mã hóa ít nhất một kháng thể kháng VISTA chứa tất cả các vùng CDR biến đổi của chuỗi nặng có SEQ ID NO: 1, 2 và 3 và/hoặc tất cả các vùng CDR biến đổi của chuỗi nhẹ có SEQ ID NOS: 4, 5 và 6 có thể thu được bằng cách dùng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả hoặc như đã biết trong lĩnh vực này.

Các phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể ở dạng ARN, như mRNA, hnRNA, tRNA hoặc dạng bất kỳ khác, hoặc ở dạng ADN, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cADN và ADN hệ gen thu được bằng cách tách dòng hoặc tổng hợp, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. ADN có thể là ADN sợi ba, sợi kép hoặc sợi đơn, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Phần bất kỳ của ít nhất một sợi ADN hoặc ARN có thể là sợi mã hóa, còn gọi là sợi có nghĩa, hoặc có thể là sợi không mã hóa, còn gọi là sợi đối nghĩa.

Các phân tử axit nucleic phân lập theo sáng chế có thể bao gồm các phân tử axit nucleic chứa khung đọc mở (open reading frame - ORF), ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, ít nhất một phần cụ thể trong số ít nhất một CDR, như CDR1, CDR2 và/hoặc CDR3 của ít nhất một chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ; các phân tử axit nucleic chứa trình tự mã hóa của kháng thể hoặc đoạn kháng thể kháng VISTA, ví dụ, đoạn chứa cùng biến đổi; và các phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit khác với các trình tự được mô tả trên đây nhưng, do thoái hóa mã di truyền, vẫn mã hóa ít nhất một kháng thể kháng VISTA như được mô tả trong bản mô tả và/hoặc như đã biết trong lĩnh vực này. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ dễ dàng tạo ra các biến thể axit nucleic thoái hóa mà mã hóa kháng thể kháng VISTA cụ thể theo sáng chế. Xem, ví dụ, Ausubel, et al., trên đây, và các biến thể axit nucleic như vậy thuộc phạm vi của sáng chế.

Như được chỉ ra trong bản mô tả, các phân tử axit nucleic theo sáng chế mà chứa axit nucleic mã hóa kháng thể kháng VISTA có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của đoạn kháng thể; trình tự mã hóa của toàn bộ kháng thể hoặc phần của nó; trình tự mã hóa của kháng thể, đoạn

hoặc phần, cũng như các trình tự bổ sung, như trình tự mã hóa của ít nhất một trình tự dẫn hoặc peptit dung hợp, với các trình tự mã hóa óa bổ sung nêu trên hoặc không, như ít nhất một intron, cùng với các trình tự không mã hóa bổ sung, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự 5' và 3' không mã hóa, như các trình tự được phiên mã nhưng không được dịch mã mà đóng vai trò trong sự phiên mã, xử lý mARN, bao gồm ghép nối và các tính hiệu polyadenyl hóa (ví dụ, liên kết với ribosom và độ ổn định của mARN); trình tự mã hóa bổ sung mà mã hóa các axit amin bổ sung, như các axit amin mà tạo ra các chức năng bổ sung. Do đó, trình tự mã hóa kháng thể có thể được dung hợp với trình tự đánh dấu, như trình tự mã hóa peptit mà tạo thuận lợi cho việc tinh chế kháng thể dung hợp chứa đoạn hoặc phần kháng thể này.

Các gen của người mà mã hóa Human các vùng hằng định (C) của kháng thể, đoạn và vùng theo sáng chế có thể thu được từ thư viện gen bào thai người, bằng các phương pháp đã biết. Các gen vùng C người có thể thu được từ tế bào người bất kỳ bao gồm các tế bào mà biểu hiện và sản xuất các globulin miễn dịch người. Vùng C_H của người có thể thu được từ lớp hoặc lớp phụ kháng thể bất kỳ đã biết của các chuỗi H của người, bao gồm γ , μ , α , δ hoặc ϵ và các kiểu phụ của chúng, như G1, G2, G3 và G4. Vì lớp phụ kháng thể của chuỗi H chịu trách nhiệm cho nhiều chức năng tác động khác nhau của kháng thể, việc lựa chọn vùng C_H sẽ được dẫn dắt bởi các chức năng tác động mong muốn, như cố định bổ thể, hoặc hoạt tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity - ADCC).

Dược phẩm

Các dược phẩm được bộc lộ trong bản mô tả được bào chế theo các quy trình chuẩn và được sử dụng ở các liều được chọn để điều trị, ví dụ, làm giảm, ngăn ngừa, hoặc loại trừ, hoặc làm chậm hoặc làm ngừng sự tiến triển của, tình trạng bệnh lý cần điều trị (xem, ví dụ, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, and Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y., nội dung của các tài liệu này được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn, về mô tả chung các phương pháp để sử dụng các tác nhân khác nhau để điều trị cho người). Các dược phẩm này chứa các kháng thể được bộc lộ và tác nhân có thể được phân phối bằng các hệ phân phối có kiểm soát hoặc giải phóng kéo dài (ví dụ, viên nang, nền phân hủy sinh học). Ví dụ về các hệ giải phóng

chậm để phân phối thuốc mà có thể thích hợp để sử dụng được phẩm chứa các hợp chất được bộc lộ được mô tả trong, ví dụ, U.S. Patent Nos. US 5,990,092; 5,039,660; 4,452,775; và 3,854,480, the toàn bộ nội dung của các tài liệu này được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn.

Để bào chế được phẩm từ kháng thể và/hoặc đoạn kháng thể kháng VISTA theo sáng chế, các chất mang được dụng có thể ở dạng rắn hoặc lỏng. Các chế phẩm dạng rắn bao gồm bột, viên nén, viên tròn, viên nang, viên nhện, thuốc đạn, và các hạt phân tán được. Ví dụ, các hợp chất theo sáng chế có thể ở dạng bột để hoàn nguyên ở thời điểm phân phối. Chất mang rắn có thể là một hoặc nhiều chất mà cũng có thể hoạt động dưới dạng chất pha loãng, chất tạo hương, chất hòa tan, chất làm trơn, chất tạo huyền phù, chất kết dính, chất bảo quản, chất gây vỡ viên nén, hoặc nguyên liệu tạo nang. Trong thuốc bột, chất mang là chất rắn được nghiền mịn trong hỗn hợp với thành phần hoạt tính được nghiền mịn.

Các thuốc bột và viên nén tốt hơn là chứa từ khoảng một đến khoảng bảy mươi phần trăm là thành phần hoạt tính. Các chất mang thích hợp là magie carbonat, magie stearat, talc, đường, lactoza, pectin, dextrin, tinh bột, gelatin, tragacan, metylxenluloza, natri caboxymetylxenluloza, sap có nhiệt độ nóng chảy thấp, bơ ca cao, và tương tự. Viên nén, bột, viên nhện, viên ngâm dẹt, tấm mỏng tan chảy nhanh, viên nang và viên tròn có thể được sử dụng dưới dạng dạng liều rắn chứa thành phần hoạt tính thích hợp để dùng qua đường miệng.

Các được phẩm dạng lỏng bao gồm dung dịch, hỗn dịch, dạng thụt giữ, và nhũ dịch, ví dụ, nước hoặc dung dịch nước propylen glycol. Để tiêm ngoài đường tiêu hóa, các được phẩm dạng lỏng có thể được bào chế trong dung dịch nước polyetylen glycol.

Dược phẩm có thể ở dạng liều đơn vị. Ở dạng như vậy, dược phẩm được chia nhỏ thành các liều đơn vị chứa lượng thành phần hoạt tính thích hợp. Dạng liều đơn vị có thể là dược phẩm được bao gói, gói chứa lượng liều đơn vị riêng rẽ. Liều lượng có thể thay đổi tùy thuộc vào yêu cầu của bệnh nhân, mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh lý cần điều trị, hợp chất được sử dụng và đường sử dụng. Việc xác định liều lượng chính xác đối với từng trường hợp cụ thể là thuộc về kỹ năng của người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này.

Tương tự, dược phẩm có thể chứa, nếu muốn, các chất tương thích khác, ví dụ, dược chất, chất điều trị hoặc điều trị dự phòng. Các chất điều trị hoặc điều trị dự phòng

bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, peptit, polypeptit, protein, protein dung hợp, phân tử axit nucleic, phân tử nhỏ, chất bất chước, thuốc tổng hợp, phân tử vô cơ, và phân tử hữu cơ. Ví dụ về các loại chất như vậy (ví dụ, chất chống ung thư) bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất độc tế bào, chất ức chế tạo mạch, chất điều biến miễn dịch, chất các dùng trong miễn dịch ung thư, và các chất dùng để giảm đau hoặc để bù lại các tác động có hại của một hoặc nhiều tác nhân điều trị (ví dụ, sử dụng bisphosphonat để làm giảm tác dụng tăng canxi huyết của glucocorticoid).

Chất ức chế tạo mạch, các chất và liệu pháp thích hợp để sử dụng trong dược phẩm và phương pháp được mô tả trong bản mô tả bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, angiostatin (đoạn plasminogen); antithrombin III chống tạo mạch; angiozym. Các bisphosphonat bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, alendronat, clodronat, etidronat, ibandronat, pamidronat, risedronat, tiludronat, và zoledronat.

Các chất và liệu pháp điều biến miễn dịch thích hợp để sử dụng trong dược phẩm và phương pháp được mô tả trong bản mô tả bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể kháng thụ thể tế bào T như kháng thể kháng-CD3 (ví dụ, Nuvion (Protein Design Labs), OKT3 (Johnson & Johnson), hoặc kháng thể kháng-CD20 Rituxan (IDEC)), kháng thể kháng-CD52 (ví dụ, CAMPATH 1H (Ilex)), kháng thể kháng-CD11a (ví dụ, Xanelim (Genentech)); kháng thể kháng-xytokin hoặc kháng thể kháng-thụ thể xytokin và các chất đối kháng như kháng thể kháng-thụ thể IL-2 (Zenapax (Protein Design Labs)), kháng thể kháng-thụ thể IL-6 (ví dụ, MRA (Chugai)), và kháng thể kháng-IL-12 (CNT01275(Janssen)), kháng thể kháng-TNFalpha (Remicade(Janssen)) hoặc chất đối kháng thụ thể TNF (Enbrel (Immunex)), kháng thể kháng-IL-6 (BE8 (Diacclone) và siltuximab (CNT032 (Centocor)), và các kháng thể mà liên kết đặc hiệu miễn dịch với kháng nguyên liên quan đến khối u (ví dụ, trastuzimab (Genentech)).

Các chất dùng trong miễn dịch ung thư thích hợp để sử dụng trong dược phẩm và phương pháp được mô tả trong bản mô tả bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ipilimumab (kháng-CTLA-4), nivolumab (kháng-PD-1), pembrolizumab (kháng-PD-1), kháng thể kháng-PD-L1, và kháng thể kháng-LAG-3.

Tốt hơn nếu dược phẩm được bào chế ở dạng đơn vị liều chứa lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể hoặc đoạn kháng thể. Ví dụ về các đơn vị liều là viên nén và viên nang. Đối với mục đích điều trị, viên nén và viên nang có thể chứa, ngoài thành

phần hoạt tính, các chất mang thông thường như chất kết dính, ví dụ, gồm acacia, gelatin, polyvinylpyrrolidon, sorbitol, hoặc tragacan; chất độn, ví dụ, canxi phosphat, glyxin, lactoza, tinh bột ngô, sorbitol, hoặc sacaroza; chất làm trơn, ví dụ, magie stearat, polyetylen glycol, silic oxit, hoặc talc; chất gây rã, ví dụ tinh bột khoai tây, chất tạo hương hoặc tạo màu, hoặc chất làm ẩm chấp nhận được. Các dạng bào chế lỏng dùng qua đường miệng thường ở dạng dung dịch nước hoặc dầu, hỗn dịch, nhũ dịch, xi rô hoặc cồn ngọt có thể chứa các chất phụ gia thông thường như chất tạo huyền phù, chất nhũ hoá, chất không chứa nước, chất bảo quản, chất tạo màu và chất tạo hương. Ví dụ về các chất phụ gia dùng cho dạng bào chế lỏng bao gồm acacia, dầu hạnh nhân, rượu etylic, dầu dừa phân đoạn, gelatin, xi rô glucoza, glyxerin, chất béo hydro hóa ăn được, lexithin, metyl xenluloza, metyl hoặc propyl para-hydroxybenzoat, propylen glycol, sorbitol, hoặc axit sorbic.

Các chi tiết chung khác về các phương pháp bào chế và sử dụng hợp chất và được phẩm được mô tả trong bản mô tả là đã biết rõ trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, U.S. Patent No. 7,820,169, nội dung của tài liệu này được viện dẫn toàn bộ.

Phương pháp điều trị

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này, ví dụ, bác sĩ lâm sàng, có thể xác định liều lượng thích hợp và đường sử dụng cho kháng thể, đoạn kháng thể hoặc được phẩm cụ thể đối với cá thể, cân nhắc việc chọn tác nhân, dạng bào chế và đường sử dụng, các yếu tố khác nhau liên quan đến bệnh nhân và các cân nhắc khác. Tốt hơn, nếu liều lượng không gây ra hoặc chỉ gây ra các tác dụng phụ bất lợi tối thiểu. Theo chế độ chia nhiều liều chuẩn, được chất có thể được sử dụng theo lịch sử dụng liều mà được thiết kế để duy trì nồng độ định trước hoặc nồng độ trong huyết tương tối ưu ở đối tượng được điều trị. Kháng thể, đoạn kháng thể và chế phẩm có thể được bổ sung ở khoảng liều thích hợp bất kỳ hoặc ở lượng hữu hiệu điều trị, ví dụ, 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 5,0 mg/kg, 6,0 mg/kg, 7,0 mg/kg, 8,0 mg/kg, 9,0 mg/kg, 10,0 mg/kg, 11,0 mg/kg, 12,0 mg/kg, 13,0 mg/kg, 14,0 mg/kg, 15,0 mg/kg, 16,0 mg/kg, 17,0 mg/kg, 18,0 mg/kg, 19,0 mg/kg, 20,0 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg

và 100 mg/kg. Theo một phương án, liều lượng được phẩm, kháng thể hoặc đoạn kháng thể được sử dụng là 0,1-15 mg/kg mỗi lần dùng.

Kháng thể hoặc đoạn kháng thể có thể được sử dụng một lần, ít nhất một lần, hai lần, ít nhất hai lần, ba lần, hoặc ít nhất ba lần một ngày. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể có thể được sử dụng một lần, ít nhất một lần, hai lần, ít nhất hai lần, ba lần, ít nhất ba lần, bốn lần, ít nhất bốn lần, năm lần, ít nhất năm lần, sáu lần một tuần, hoặc ít nhất sáu lần một tuần. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể có thể được sử dụng một lần một tháng, ít nhất một lần một tháng, hai lần một tháng, ít nhất hai lần một tháng, ba lần một tháng hoặc ít nhất ba lần một tháng. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể có thể được sử dụng một lần một năm, ít nhất một lần một năm, hai lần một năm, ít nhất hai lần một năm, ba lần một năm, ít nhất ba lần một năm, bốn lần một năm, ít nhất bốn lần một năm, năm lần một năm, ít nhất năm lần một năm, sáu lần một năm hoặc ít nhất sáu lần một năm.

Kháng thể, đoạn kháng thể kháng VISTA và dược phẩm có thể, ví dụ, được sử dụng ngoài đường tiêu hóa hoặc trong đường tiêu hóa, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trong tĩnh mạch, dưới da, qua đường miệng, đường trực tràng, trong cơ, trong màng bụng, qua niêm mạc, qua da, trong vỏ, đường mũi, hoặc dùng khu trú. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ nhận thấy rằng các dạng liều sau đây có thể chứa các hợp chất hoặc muối được dùng tương ứng của hợp chất theo sáng chế làm thành phần hoạt tính. Theo một số phương án, các dạng liều có thể chứa hợp chất hoặc muối được dùng tương ứng của hợp chất làm thành phần hoạt tính.

Kháng thể kháng VISTA theo sáng chế có thể được sử dụng làm một phần của liệu pháp kết hợp (ví dụ, với nhau, hoặc với một hoặc nhiều tác nhân điều trị khác). Các hợp chất theo sáng chế có thể được sử dụng trước, sau hoặc đồng thời với một hoặc nhiều tác nhân điều trị khác. Theo một số phương án, hợp chất theo sáng chế và tác nhân điều trị khác có thể được cùng sử dụng đồng thời (ví dụ, cùng lúc) dưới dạng bào chế riêng rẽ hoặc dạng bào chế kết hợp. Theo các khác, các tác nhân có thể được sử dụng lần lượt, dưới dạng các dược phẩm riêng rẽ, trong khung thời gian thích hợp, như được xác định bởi bác sĩ lâm sàng có kỹ năng (ví dụ, thời gian đủ để tác dụng dược lý của các phương pháp điều trị gộp lên nhau). Hợp chất theo sáng chế và một hoặc nhiều tác nhân điều trị khác có thể được sử dụng ở dạng liều đơn hoặc nhiều liều, theo thứ tự và theo lịch thích hợp để đạt được hiệu quả điều trị mong muốn.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều biến hoặc điều trị ít nhất một bệnh ác tính ở tế bào, mô, cơ quan, động vật hoặc bệnh nhân. Theo một số phương án, các hợp chất và dược phẩm theo sáng chế được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư. Bệnh ung thư có thể bao gồm khối u ác tính hoặc lành tính của cơ quan hoặc hệ cơ thể bất kỳ. Các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bệnh sau đây: ung thư vú, ung thư hệ tiêu hóa/dạ dày ruột, ung thư nội tiết, ung thư thần kinh nội tiết, ung thư mắt, ung thư cơ quan sinh dục niệu, ung thư tế bào mầm, ung thư phụ khoa, ung thư đầu và cổ, ung thư huyết học/máu, ung thư cơ xương, ung thư thần kinh, ung thư hô hấp/lồng ngực, ung thư bàng quang, ung thư kết tràng, ung thư trực tràng, ung thư phổi, ung thư nội mạc tử cung, ung thư thận, ung thư tuyến tụy, ung thư gan, ung thư dạ dày, ung thư tinh hoàn, ung thư thực quản, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư não, ung thư cổ tử cung, ung thư buồng trứng và ung thư tuyến giáp. Các bệnh ung thư khác có thể bao gồm bệnh bạch cầu, u hắc tố, và u lympho, và bệnh ung thư bất kỳ được mô tả trong bản mô tả. Theo một số phương án, khối u rắn bị thâm nhiễm bởi các tế bào tủy và/hoặc tế bào T. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh bạch cầu, u bạch huyết, hội chứng rối loạn sinh tủy và/hoặc u tủy. Theo một số phương án, bệnh ung thư có thể thuộc loại hoặc kiểu bất kỳ của bệnh bạch cầu, bao gồm bệnh bạch cầu lympho bào hoặc bệnh bạch cầu sinh tủy, như, ví dụ, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp (acute lymphoblastic leukemia - ALL), bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (chronic lymphocytic leukemia - CLL), bệnh bạch cầu tủy (sinh tủy) cấp (acute myeloid (myelogenous) leukemia - AML), bệnh bạch cầu sinh tủy mạn tính (chronic myelogenous leukemia - CML), bệnh bạch cầu tế bào lông, bệnh bạch cầu tiền lympho bào T, bệnh bạch cầu lympho bào hạt lớn, hoặc bệnh bạch cầu tế bào T ở người trưởng thành. Theo một số phương án, u lympho là u lympho mô bào, u lympho nang hoặc u lympho Hodgkin và theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh đa u tủy. Theo một số phương án, bệnh ung thư là khối u rắn, ví dụ, u hắc tố, hoặc ung thư bàng quang. Theo một phương án cụ thể, bệnh ung thư là ung thư phổi, như bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (non-small cell lung cancer - NSCLC).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều biến hoặc điều trị ít nhất một bệnh ác tính ở tế bào, mô, cơ quan, động vật hoặc bệnh nhân, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ít nhất một trong số các bệnh: bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu cấp, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp (acute lymphoblastic leukemia - ALL), ALL tế bào B, tế bào

T hoặc FAB, bệnh bạch cầu tủy cấp (acute myeloid leukemia - AML), bệnh bạch cầu tủy bào mạn tính (chronic myelocytic leukemia - CML), bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (chronic lymphocytic leukemia - CLL), bệnh bạch cầu tế bào lông, hội chứng loạn sản tủy (myelodysplastic syndrome - MDS), u lympho, bệnh Hodgkin, u lympho ác tính, u lympho không Hodgkin, u lympho Burkitt, đa u tủy, sarcom Kaposi, caxinom kết trực tràng, caxinom tuyến tụy, caxinom mũi hầu, u mô bào-huyết ác tính, hội chứng cận thận sinh/tăng canxi-huyết ác tính, các khối u rắn, caxinom tuyến, sarcom, u hắc tố ác tính, u mạch, bệnh di căn, bệnh ung thư có liên quan đến tiêu xương, bệnh ung thư có liên quan đến đau xương, và các bệnh tương tự. Theo một số phương án, khối u rắn bị thâm nhiễm bởi các tế bào tủy và/hoặc tế bào T. Theo một phương án cụ thể, khối u rắn là ung thư phổi, như bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (non-small cell lung cancer - NSCLC).

Theo một số phương án, các hợp chất và liệu pháp được mô tả trong bản mô tả được đồng sử dụng với vaccin (như vaccin vector virus, vaccin vi khuẩn, vaccin dựa trên tế bào, vaccin ADN, vaccin ARN, vaccin peptit, hoặc vaccin protein). Các vaccin như vậy là đã biết rõ trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Jeffrey Schlom, "Therapeutic Cancer vaccines: Current Status and Moving Forward," J Natl Cancer Inst; 104:599–613 (2012), nội dung của tài liệu này được kết hợp toàn bộ trong bản mô tả bằng cách viện dẫn.

Theo một số phương án, các hợp chất và liệu pháp được mô tả trong bản mô tả được đồng sử dụng với các tác nhân hóa liệu pháp, điều trị bằng hormon và liệu pháp sinh học, và/hoặc bisphosphonat. Theo một số phương án, (các) tác nhân hóa liệu pháp bao gồm một hoặc nhiều chất sau: carboplatin (Paraplatin), cisplatin (Platinol, Platinol-AQ), cyclophosphamid (Cytosan, Neosar), doxorubicin (Adriamycin), etoposide (VePesid), fluorouracil (5-FU), gemcitabin (Gemzar), irinotecan (Camptosar), paclitaxel (Taxol), topotecan (Hycamtin), vincristin (Oncovin, Vincasar PFS), vinblastin (Velban).

Theo các phương án khác, các hợp chất và liệu pháp kháng VISTA được mô tả trong bản mô tả được đồng sử dụng với một hoặc nhiều kháng thể điểm kiểm soát miễn dịch, như, ví dụ, nivolumab, pembrolizumab, tremelimumab, ipilimumab, kháng thể kháng PD-L1, kháng thể kháng PD-L2, kháng thể kháng TIM-3, kháng thể kháng LAG-3, kháng thể kháng OX40 và kháng thể kháng GITR.

Theo một phương án khác, các hợp chất và liệu pháp kháng VISTA được mô tả trong bản mô tả được đồng sử dụng với các chất ức chế phân tử nhỏ của indoleamin 2,3-dioxygenaza (IDO).

Các hợp chất và dược phẩm kháng VISTA theo sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng khi cần để ngăn ngừa (bao gồm ngăn ngừa tái phát bệnh ung thư) hoặc điều trị (ví dụ, kiểm soát hoặc làm thuyên giảm bệnh ung thư hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó) bệnh ung thư. Tác nhân hoặc liệu pháp bất kỳ (ví dụ, hóa liệu pháp, liệu pháp phóng xạ, liệu pháp hướng đích, như imatinib, sorafenib và vemurafenib, liệu pháp hormon, và/hoặc liệu pháp sinh học hoặc liệu pháp miễn dịch) mà đã biết là hữu dụng, hoặc đã được sử dụng hoặc đang được sử dụng để ngăn ngừa, điều trị, kiểm soát hoặc làm thuyên giảm bệnh ung thư hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó có thể được sử dụng kết hợp với hợp chất hoặc dược phẩm theo sáng chế được mô tả trong bản mô tả. Các chất chống ung thư, nhưng không chỉ giới hạn ở: 5-fluoruracil; acivicin; aldesleukin; altretamin; aminoglutethimide; amsacrine; anastrozole; anthramycin; asparaginase; azacitidine; azetepa; azotomycin; batimastat; bicalutamide; bleomycin sulfat; brequinar natri; bropirimine; busulfan; carboplatin; carmustine; carubicin hydrochlorua; carzelesin; cedefingol; chlorambucil; cirolemycin; cisplatin; cladribine; crisnatol mesylate; cyclophosphamide; cytarabine; dacarbazine; dactinomycin; daunorubicin hydrochlorua; decitabine; dexormaplatin; dezaguanine; dezaguanine mesylat; diaziquone; docetaxel; doxorubicin; doxorubicin hydrochlorua; droloxifene; droloxifene citrate; dromostanolone propionate; duazomycin; edatrexate; eflornithine hydrochlorua; enloplatin; enpromate; epipropidine; epirubicin hydrochlorua; erbulozole; esorubicin hydrochlorua; estramustine; estramustine phosphate natri; etanidazole; etoposide; etoposide phosphat; fazarabine; fenretinide; floxuridine; fludarabine phosphate; fluorouracil; flurocitabine; fosquidone; fostriecin natri; gemcitabine; gemcitabine hydrochlorua; hydroxyurea; idarubicin hydrochlorua; ifosfamide; ilmofofosine; interleukin II (bao gồm interleukin II tái tổ hợp, hoặc rIL2), interferon alpha-2a; interferon alpha-2b; interferon alpha-m; interferon alpha-n3; interferon beta-I a; interferon gamma-I b; iproplatin; irinotecan hydrochlorua; lanreotide axetat; letrozole; leuprolide axetat; liarozole hydrochlorua; lometrexol natri; lomustine; losoxantrone hydrochlorua; masoprocol; mechlorethamine hydrochlorua; megestrol axetat; melengestrol axetat; melphalan; menogaril; mercaptopurine; methotrexate;

methotrexate natri; metoprine; meturedapa; mitomycin; mitosper; mitotane; mitoxantrone hydroclorua; axit mycophenolic; nocodazole; ormaplatin; paclítaxel; pegaspargase; porfromycin; prednimustine; procarbazine hydroclorua; puromycin; rogletimide; safingol hydroclorua; semustine; simtrazene; sparfosate natri; sparsomycin; spiromustine; spiropatin; streptonigrin; streptozocin; sulofenur; talisomycin; tegafur; teloxantrone hydroclorua; temoporfin; teniposide; teroxirone; testolactone; thiamiprine; thioguanine; thiotepa; tiazofurin; tirapazamine; topotecan; trimetrexate; trimetrexate glucuronate; triptorelin; uracil mustard; uredepa; vapreotide; verteporfn; vinblastine sulfat; vincristine sulfat; vindesine; vindesine sulfat; vinepidine sulfat; vinglycinate sulfat; vinleurosine sulfat; vinorelbine tartrat; vinrosidine sulfat; vinzolidine sulfat; vorozole; zeniplatin; zinostatin; zorubicin hydroclorua. Các liệu pháp hướng đích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất ức chế tyrosin kinaza (ví dụ, imatinib, sorafenib, và vemurafenib). Sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng hợp chất kháng VISTA theo sáng chế kết hợp với liệu pháp phóng xạ bao gồm việc sử dụng tia X, tia gamma và các nguồn phóng xạ khác để phá hủy tế bào ung thư. Các phương pháp điều trị bệnh ung thư đã biết trong lĩnh vực này và đã được mô tả trong tài liệu như Physician's Desk Reference (57th ed., 2003).

Kháng thể kháng VISTA được mô tả trong bản mô tả cũng hữu dụng, ví dụ, trong điều trị các bệnh nhiễm trùng mạn tính, như HIV, HBV, HCV, và HSV, các bệnh khác.

Các tính chất và thông tin về trình tự để chọn kháng thể kháng VISTA theo sáng chế được đưa ra trong các Bảng 1A, 1B và 2 trong bản mô tả.

Bảng 1A: Các trình tự CDR của kháng thể kháng VISTA đầy đủ của người hoặc được làm giống như của người

Mã nhận dạng mAb	Họ VH	CDR1 của chuỗi nặng (Imgt)	CDR2 của chuỗi nặng (Imgt)	CDR3 của chuỗi nặng (Imgt)	CDR1 của chuỗi nhẹ (Imgt)	CDR2 của chuỗi nhẹ (Imgt)	CDR3 của chuỗi nhẹ (Imgt)
VSTB 50	B	GYTFTN YG (SEQ ID NO: 1)	INPYTGE P (SEQ ID NO: 2)	AREGYG NYIFPY (SEQ ID NO: 3)	ESVDTY ANSL (SEQ ID NO: 4)	RAS (SEQ ID NO: 5)	QQTNED PRT (SEQ ID NO: 6)
VSTB 53		GYTFTH YT (SEQ ID NO: 7)	IIPSSGYS (SEQ ID NO: 8)	ARGAYD DYDYDY AMDY (SEQ ID NO: 9)	QTIVHSN GNTY (SEQ ID NO: 10)	KVS (SEQ ID NO: 11)	FQASHV PWT(SEQ ID NO: 12)
VSTB 60	B	GYTFTN YG (SEQ ID NO: 13)	INTYTGE S (SEQ ID NO: 14)	ARDYYG IYVSAY (SEQ ID NO: 15)	ESVDNY ANSF (SEQ ID NO: 16)	RAS (SEQ ID NO: 17)	QQSHED PYT (SEQ ID NO: 18)
VSTB 95		GFTFRN YG (SEQ ID NO: 19)	IISGGSY T (SEQ ID NO: 20)	ARIYDH DGDYYA MDY (SEQ ID NO: 21)	QSIVHSN GNTY (SEQ ID NO: 22)	KVS (SEQ ID NO: 23)	FQGSHV PWT (SEQ ID NO: 24)
VSTB 112	D	GGTFSSY A (SEQ ID NO: 25)	IIPIFGTA (SEQ ID NO: 26)	ARSSYG WSYEFD Y (SEQ ID NO: 27)	QSIDTR (SEQ ID NO: 28)	SAS (SEQ ID NO: 29)	QQSAYN PIT (SEQ ID NO: 30)
VSTB 116	D	GGTFSSY A (SEQ ID NO: 31)	IIPIFGTA (SEQ ID NO: 32)	ARSSYG WSYEFD Y (SEQ ID NO: 33)	QSINTN (SEQ ID NO: 34)	AAS (SEQ ID NO: 35)	QQARDT PIT(SEQ ID NO: 36)

Bảng 1B: Các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể kháng VISTA đầy đủ của người hoặc được làm giống như của người chọn lọc

Mã nhận dạng protein	Chuỗi nặng AA CDS	Chuỗi nhẹ AA CDS
VSTB50	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTF TNYGLNWVRQAPGQGLEWMGWNPYTGE PTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLK AEDTAVYYCAREGYGNYIFPYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 47)	DIVMTQTPLSLSVTPGQP ASISCRASESVDTYANSL MHWYLQKPGQPPQLLIY RASNLESGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCQQTNEDPRTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDS KDYSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 48)
VSTB53	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTF THYTIHWVRQAPGQGLEWMGYIIPSSGYS EYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCARGAYDDYDYDYAMDYWG QGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 49)	DIVMTQSPLSLPVTPGEP ASISCRSSQTIVHSNGNT YLEWYLQKPGQSPQLLI YKVSNRFSGVDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCFQASHVPWTFG QGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQD SKDYSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 50)
VSTB60	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTF TNYGMTWVRQAPGQGLEWMGWINTYTG ESTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQICSL KAEDTAVYYCARDYYGIYVSAIYWGQGL TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ	DIVMTQTPLSLSVTPGQP ASISCRASESVDNYANSF MHWYLQKPGQSPQLLIY RASNLESGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCQQSHEDPYTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDS KDYSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGL

	VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 51)	SSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 52)
VSTB95	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR NYGMSWVRQAPGKGLEWVASIISGGSYTY YPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARIYDHDGDYYAMDYWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 53)	DIVMTQSPLSLPVTPGEP ASISCRSSQSIVHSNGNT YLEWYLQKPGQSPQLLI YKVSNNRFSGVDPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCFQGSHVPWTFG QGTKLEIKRTVAAPSFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 54)
VSTB112	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTF SSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTAN YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARSSYGWSYEFDYWGQGTLLV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 55)	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIDTRLNW YQQKPGKAPKLLIYSAS SLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYC QQSAYNPITFGQGQTKVEI KRTVAAPSFIFFPSDEQ LKSGTASVCLNNFY REAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC (SEQ ID NO: 56)
VSTB116	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTF SSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTAN YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARSSYGWSYEFDYWGQGTLLV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSINTNLNW YQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYC QQARDTPITFGQGQTKVEI KRTVAAPSFIFFPSDEQ LKSGTASVCLNNFY REAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC (SEQ ID NO: 58)

	QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 57)	
VSTB140 *	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGGTF</u> <u>SSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTAN</u> <u>YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE</u> <u>DTAVYYCARSSYGWSYEFDYWGQGLVT</u> <u>VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL</u> <u>VKDYPFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVL</u> <u>QSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV</u> <u>VDH</u> <u>KPSNTKVDKTV</u> <u>VERKCCVECP</u> <u>PCAPPAAAS</u> <u>SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSA</u> <u>EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF</u> <u>NSTFRVVS</u> <u>VLTVLHODWLN</u> <u>GKEYKCKVS</u> <u>NKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR</u> <u>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTTPPMLDS</u> <u>DGSFFLYSKLTVD</u> <u>KSRWQOGNVFSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSL</u> <u>SLSPGK</u> (SEQ ID NO: 59)	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIDTRLNW YQQKPGKAPKLLIYSAS SLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYC QQSAYNPITFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSTYS LSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSPVTKS FNRGEC (SEQ ID NO: 56)
VSTB149 *Δ	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGGTF</u> <u>SSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTAN</u> <u>YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE</u> <u>DTAVYYCARSSYGWSYEFDYWGQGLVT</u> <u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC</u> <u>LVKDYPFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAV</u> <u>LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN</u> <u>HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP</u> <u>VAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV</u> <u>DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR</u> <u>EEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLN</u> <u>GKEYK</u> <u>CKVSNAALPAPIAKTISKAKGQPREPQVYT</u> <u>LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE</u> <u>WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL</u> <u>TVDKSRWQOGNVFSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQ</u> <u>KSLSLSPGK</u> (SEQ ID NO: 60)	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIDTRLNW YQQKPGKAPKLLIYSAS SLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYC QQSAYNPITFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSTYS LSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSPVTKS FNRGEC (SEQ ID NO: 56)
VSTB174 *	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGGTF</u> <u>SSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTAN</u> <u>YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE</u> <u>DTAVYYCARSSYGWSYEFDYWGQGLVT</u> <u>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC</u> <u>LVKDYPFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAV</u> <u>LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN</u> <u>HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE</u> <u>LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV</u> <u>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP</u> <u>REEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLN</u> <u>GKEY</u> <u>KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY</u> <u>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV</u> <u>EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK</u>	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIDTRLNW YQQKPGKAPKLLIYSAS SLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYC QQSAYNPITFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSTYS LSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSPVTKS FNRGEC (SEQ ID NO: 56)

	<u>LTVDKSRWQOQNVFSCSVMHEALHNHYT</u> <u>QKSLSLSPGK</u> (SEQ ID NO: 61)	
--	--	--

Các trình tự vùng hằng định trong VSTB140, VSTB149 và VSTB174 được gạch chân. ^Acác gốc axit amin tạo ra khả năng kháng proteaza trong chuỗi nặng của VSTB149 được in đậm.

Bảng 2: Hằng số phân ly (K_D) để chọn lọc kháng thể kháng VISTA

Mẫu	KD (M)	ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)			
S1	1,71E-10	1,69E+06	2,89E-04	1,09E-10	1,11E+06	1,21E-04
S40	5,07E-10	1,46E+05	7,40E-05	6,96E-10	1,39E+05	9,69E-05
S41	6,32E-10	4,82E+05	3,05E-04	3,10E-10	7,08E+05	2,19E-04
S42	1,04E-10	1,05E+06	1,09E-04	2,65E-10	5,13E+05	1,36E-04
S43	2,64E-11	1,25E+06	3,30E-05	5,28E-11	1,18E+06	6,22E-05
S44	2,53E-11	1,23E+06	3,12E-05	6,40E-11	9,93E+05	6,36E-05
S45	2,35E-11	1,58E+06	3,72E-05	2,58E-11	1,46E+06	3,77E-05
S46	1,06E-10	1,56E+06	1,66E-04	2,96E-10	1,50E+06	4,44E-04
S47	3,56E-10	5,14E+05	1,83E-04	2,52E-10	5,69E+05	1,43E-04
S33	8,30E-10	1,23E+06	1,02E-03	1,22E-09	8,96E+05	1,10E-03
S34	1,08E-09	5,95E+05	6,43E-04	2,80E-09	5,20E+05	1,46E-03
S35	8,06E-11	2,08E+06	1,68E-04	1,35E-10	1,78E+06	2,41E-04
S36	6,29E-11	1,77E+06	1,12E-04	2,90E-11	1,58E+06	4,58E-05
S37	2,23E-09	5,10E+05	1,14E-03	4,43E-09	3,94E+05	1,75E-03
S38	2,26E-09	5,18E+05	1,17E-03	2,03E-09	5,37E+05	1,09E-03
S39	5,62E-10	3,97E+05	2,23E-04	3,47E-10	4,15E+05	1,44E-04
S25	1,31E-09	6,21E+05	8,12E-04	1,10E-09	5,65E+05	6,24E-04
S26	Không gắn kết			3,53E-09	2,38E+05	8,41E-04
S27	1,13E-09	8,86E+05	9,97E-04	1,61E-09	7,12E+05	1,15E-03
S48	3,12E-10	1,24E+06	3,87E-04	1,21E-09	8,78E+05	1,06E-03
S28	2,03E-09	1,08E+06	2,19E-03	2,03E-09	9,30E+05	1,88E-03
S29	3,78E-11	1,42E+06	5,38E-05	8,90E-11	9,06E+05	8,06E-05
S30	Không gắn kết			Không gắn kết		
S31	Liên kết yếu			Liên kết yếu		
S32	Liên kết yếu			Liên kết yếu		
S15	9,34E-11	6,46E+05	6,04E-05	5,13E-10	3,50E+05	1,80E-04
S16	1,26E-10	5,54E+05	6,99E-05	1,92E-10	4,43E+05	8,53E-05
S17	7,68E-10	9,88E+05	7,59E-04	4,10E-10	7,09E+05	2,91E-04
S18	2,28E-09	4,90E+05	1,12E-03	1,05E-09	3,13E+05	3,29E-04

S19	1,54E-09	1,02E+06	1,58E-03	2,86E-10	7,03E+05	2,01E-04
S20	1,48E-09	6,67E+05	9,85E-04	4,57E-10	6,36E+05	2,91E-04
S21	3,18E-09	3,16E+05	1,00E-03	1,34E-09	2,70E+05	3,60E-04
S22	2,98E-09	1,09E+06	3,25E-03	1,27E-09	1,25E+06	1,59E-03
S6	6,36E-10	5,28E+05	3,36E-04	3,02E-10	5,98E+05	1,80E-04
S7	6,75E-10	1,31E+06	8,87E-04	3,27E-10	1,15E+06	3,75E-04
S8	1,15E-10	1,89E+06	2,18E-04	5,97E-11	1,25E+06	7,48E-05
S9	1,67E-10	1,87E+06	3,11E-04	9,31E-11	1,27E+06	1,18E-04
S10	8,90E-11	1,55E+06	1,38E-04	4,30E-11	1,22E+06	5,27E-05
S12	4,94E-10	1,57E+06	7,76E-04	2,39E-10	1,19E+06	2,86E-04
S13	1,02E-10	1,42E+06	1,44E-04	6,46E-11	9,55E+05	6,17E-05
S14	2,02E-10	1,26E+06	2,55E-04	7,55E-11	1,12E+06	8,43E-05
S1	2,06E-10	1,60E+06	3,29E-04	8,35E-11	1,21E+06	1,01E-04
S2	1,56E-10	9,74E+05	1,52E-04	8,66E-11	7,25E+05	6,28E-05
S3	4,33E-11	9,07E+05	3,93E-05	4,89E-11	7,41E+05	3,63E-05
S4	1,52E-10	8,98E+05	1,36E-04	7,54E-11	6,93E+05	5,23E-05
S49	1,45E-10	1,01E+06	1,46E-04	1,04E-10	7,28E+05	7,60E-05
S5	2,13E-10	1,25E+06	2,67E-04	1,37E-10	8,51E+05	1,17E-04

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân tích mức biểu hiện vista trên các tế bào tạo huyết của người

Phương pháp:

Chuẩn bị và nhuộm tế bào PBMC người tươi để biểu hiện VISTA

Mức biểu hiện VISTA được kiểm tra trên các tế bào PBMC (tế bào đơn nhân máu ngoại vi) người mới phân lập from một số người cho. Biotin kháng VISTA người (GA-1) được sử dụng để nhuộm (5 µg/ml). IgG1 chuột, K-biotin (dòng MOPC-21 ở nồng độ 5 µg/ml) được sử dụng làm đối chứng lớp phủ kháng thể.

Nguyên liệu cho

Mẫu máu do Biological Specialty Corp. (Colmar, PA) cung cấp và được thu thập và phân tích trong cùng ngày. 10 ml máu toàn phần chứa heparin sulfat được vận chuyển để phân tích.

Chuẩn bị mẫu

Máu được pha loãng 1:1 trong PBS vô trùng. 22 ml máu cuống rốn pha loãng được phân lớp trong 20ml Ficoll-Hypaque vô trùng (GE Healthcare Cat# 17-144003) trong các ống đáy nón 50 ml. Các ống được ly tâm ở 1800 vòng/phút trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Các tế bào đơn nhân ở mặt phân giới sau khi ly tâm được thu

gom bằng cách sử dụng pipet 1 ml và kết hợp vào hai ống đáy nón 50 ml. PBS vô trùng được bổ sung vào từng ống để tạo thể tích không quá 50 ml và các tế bào được ly tâm ở 300g trong 10 phút ở 4°C. Dịch nổi được loại bỏ. Các tế bào được tạo huyền phù lại trong 50 ml PBS vô trùng và các ống được ly tâm nhẹ ở 300g trong 10 phút ở 4°C. Dịch nổi được loại bỏ. Các tế bào được kết hợp và tạo huyền phù lại trong 50 ml PBS vô trùng trước khi đếm.

Quy trình nhuộm: Các lọ lạnh đông chứa 5×10^7 tế bào PBMC được sử dụng để bù chỉnh đối chứng và làm đối chứng để nhuộm.

Các chất phản ứng và/hoặc vật tư tiêu hao sau được sử dụng:

Dung dịch đệm nhuộm FACS (BSA) từ hãng BD Biosciences (Cat# 554657) có bổ sung 0,2% EDTA; nước muối đệm bằng phosphat (PBS) (Gibco cat#14190); đĩa polypropylen đáy tròn 96 giếng (BD #3077); ống góp polypropylen 1,2 ml (Corning #4451); dòng kháng VISTA được biotiny hóa GA-1 từ hãng ImmunoNext Lot# 080612B (được sử dụng ở nồng độ 5 µg/ml); mIgG1 được biotiny hóa, đối chứng lớp phủ kháng thể K (dòng MOPC-21); Biolegend cat#400104, Lot#B116649 (được sử dụng ở nồng độ 5 µg/ml); kháng thể kháng người (xem bảng nhuộm dưới đây); thuốc nhuộm sống/chết vùng hồng ngoại gần (Invitrogen, cat# L10119); và các chất phản ứng streptavidin bao gồm STP-APC (BD Biosciences cat#554067, Lot#04251) (được sử dụng ở độ pha loãng 1:200 trong dung dịch đệm FACS), STP-PE (Biolegend cat# 405203, Lot#B139688) (được sử dụng ở độ pha loãng 1:200 trong dung dịch đệm FACS), STP-PE Cy7 (thể hiện liên kết không đặc hiệu trong các mẫu đối chứng lớp phủ của kháng thể), STP-Q605 (Invitrogen cat# Q10101MP, Lot#53449A) (được sử dụng ở độ pha loãng 1:200 trong dung dịch đệm FACS).

Quy trình nhuộm bề mặt tế bào

Trước khi nhuộm, 1×10^6 tế bào được chuyển vào các đĩa đáy tròn 96 giếng và rửa bằng 150 µl PBS. Sau đó các đĩa được ly tâm ở 1300 vòng/phút ở 4°C trong 3 phút.

Sau đó, các tế bào được rửa lại trong PBS và ly tâm như mô tả trên đây.

Sau đó việc nhuộm sống/chết được thực hiện trong 50 µl PBS chứa 0,25 µl thuốc nhuộm sống/chết vùng hồng ngoại gần. Sau 10 phút ở nhiệt độ trong phòng các giếng được rửa bằng 150 µl dung dịch đệm nhuộm FACS và ly tâm ở 1300 vòng/phút ở 4°C trong 3 phút. Dịch nổi được loại bỏ.

Các tế bào được phong bế bằng huyết thanh người ở nồng độ 1:100 trong 50 μ l dung dịch đệm nhuộm FACs. Các đĩa được ủ ở 4°C trong 15 phút. Sau đó các giếng được rửa bằng 150 μ l dung dịch đệm nhuộm FACs và ly tâm ở 1300 vòng/phút ở 4°C trong 3 phút. Dịch nổi được loại bỏ.

Sau đó, hỗn hợp chứa các kháng thể sau được bổ sung vào từng giếng để nhuộm bề mặt: Các hỗn hợp được mô tả trong các Bảng 3-6 dưới đây. Mỗi hỗn hợp có thể được sử dụng riêng rẽ với hỗn hợp khác tùy thuộc vào quần thể cần quan tâm.

Bảng 3: Nhuộm dòng sinh trưởng

Đích										
Flo	Kháng nguyên	Chuột nhất	Chuột cổng	Người	Lớp phụ của kháng thể	Dòng vô tính	Nhà cung cấp	Số mục	Số lô	Hiệu giá (μ l/10 ⁶ tế bào)
FITC/AF488	CD19			X	mIgG1	HIB19	Biolegend	302206	B123019	2
PE	CD11b			X	mIgG1, K	ICRF44	BD Bio.	555388	45134	2
PerCP-Cy5.5	HLA-DR			X	mIgG2a, K	G46-6	BD Bio.	560652	25161	0,5
PE Cy7	CD16			X	mIgG1, K	3G8	BD Bio.	557744	87825	0,2
APC Cy7	NIR sống/chết			X						
AF700	CD56			X	mIgG1, K	B159	BD Bio.	557919	19470	1
APC/A-F647	VISTA-Bio			X						
PB/V450	CD3			X	mIgG1, K	UCHT1	BD Bio.	558117	90926	0,5
Q605	CD14			X	mIgG2a, K	TuK4	Invitrogen	Q10013	1049158	0,2

Bảng 4: Nhuộm tế bào T

Đích										
Flo	Kháng nguyên	Chuột nhất	Chuột cổng	Người	Lớp phụ của kháng thể	Dòng vô tính	Nhà cung cấp	Số mục	Số lô	Hiệu giá (μ l/10 ⁶ tế bào)
FITC/AF488	CD4			X	mIgG1, K	RPA-T4	BD Bio.	555346	38460	2
PE	VISTA-Bio			X						
PerCP-Cy5.5	CD8			X	mIgG1, K	RPA-T8	BD Bio.	560662	1037	0,5
PE Cy7	CD56			X	mIgG1, K	B159	BD Bio.	557747	47968	0,5
APC Cy7	NIR			X						
AF700	CD45RO			X	mIgG2a, K	UCHL1	Biolegend	304218	B143062	1
APC/AF647	TCRgd			X	mIgG, K	B1	Biolegend	331212	B126473	2

PB/V450	CD45RA			X	mIgG2b, K	HI100	BD Bio.	560363	90928	0,5
Q655	CD3			X	mIgG2a	S4,1	Invitrogen	Q10012	982352	0,5

Bảng 5: Nhuộm DC

Đích										
Flo	Kháng nguyên	Chuột nhất	Chuột cống	Người	Lớp phụ của kháng thể	Dòng vô tính	Nhà cung cấp	Số mục	Số lô	Hiệu giá ($\mu\text{l}/10^6$ tế bào)
FITC/AF488	Lin1			X	Hỗn hợp	Hỗn hợp	BD Bio.	340546	2152758	5
PE	CD11c			X	mIgG1, K		BD Bio.	555392	45123	2
PerCP-Cy5.5	HLA-DR			X	mIgG2a, K	G46-6	BD Bio.	560652	25161	0,5
APC Cy7	NIR			X						
APC/A F647	CD83			X	mIgG1, K	HB15e	BD Bio.	551073	57688	2
BV421	CD123			X	mIgG1, K	6H6	Biolegend	306017	B148193	0,5
Q605	VISTA-Bio			X						

Bảng 6: Nhuộm tủy

Đích										
Flo	Kháng nguyên	Chuột nhất	Chuột cống	Người	Lớp phụ của kháng thể	Dòng vô tính	Nhà cung cấp	Số mục	Số lô	Hiệu giá ($\mu\text{l}/10^6$ tế bào)
FITC/AF488	CD33			X	mIgG1	HM3-4	Biolegend	303304	B100963	3
PE	CD11b			X	mIgG1, K	ICRF44	BD Bio.	555388	45134	2
APC Cy7	NIR			X						
APC/A F647	VISTA-Bio			X						
Q605	CD45			X	mIgG1, K	HI30	Invitrogen	Q10051	880470	1

Sau khi nhuộm bề mặt, các tế bào được rửa hai lần như đã mô tả bằng dung dịch đệm nhuộm FACS và ly tâm ở 1300 vòng/phút ở 4°C trong 5 phút. Các mẫu được tạo huyền phù lại trong 50 μl dung dịch đệm nhuộm FACS chứa streptavidin được gắn nhãn huỳnh quang thích hợp. Các mẫu được ủ ở 4°C trong 30 phút. Các tế bào được rửa bằng 150 μl dung dịch đệm nhuộm FACS và ly tâm ở 1300 vòng/phút ở 4°C trong 5 phút. Bước này được lặp lại trước khi mẫu được tạo huyền phù lại trong 250 μl dung

dịch đệm nhuộm FACS. Các mẫu được phân tích trên máy phân tích tế bào BD LSRFortessa™ (BD Biosciences) vào cùng ngày.

Phân tích dữ liệu

Các dữ liệu đếm tế bào kiểu dòng được phân tích lại bằng cách sử dụng phần mềm FlowJo Version 9 để khoanh vùng các quần thể có kiểu hình đặc hiệu. Nhiều phương pháp hình học được sử dụng để so sánh mức biểu hiện VISTA trong các tập hợp tế bào khác nhau. Mỗi quần thể được chuẩn hóa so với nền bằng cách lấy giá trị trung bình của các mẫu được xử lý kháng VISTA trừ đi giá trị đối chứng lớp phủ của kháng thể. Các biểu đồ được xây dựng bằng Prism và các phép thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng kiểm định T student nếu chỉ có hai mẫu được so sánh, hoặc bằng ANOVA một chiều với Bonferroni sau thử nghiệm.

Kết quả:

Mức biểu hiện VISTA trên các tập hợp tế bào tủy và lympho người:

Như được thể hiện trong các Fig. 2A-2E, 3A-3G, 4, 5A-5B và 6A-6C, mức biểu hiện VISTA trên các bạch cầu đơn nhân to $CD14^+$ khác đáng kể so với các quần thể khác ($p < 0,001$). Không thấy có khác biệt đáng kể giữa các quần thể khác. Các bạch cầu đơn nhân to biểu hiện VISTA ở mức cao nhất trong máu ngoại vi, với tập hợp con $CD14^+CD16^-$ có mức biểu hiện cao hơn đáng kể so với các tế bào $CD14^{lo}CD16^+$. Trong khi đó APC thể hiện mức biểu hiện VISTA trung bình, các tập hợp tế bào lympho thể hiện mức biểu hiện thấp nhất.

Mức biểu hiện VISTA trên các tập hợp con tế bào T và NK người:

Như được thể hiện trong các Fig. 7A-7E, 8A-8G và 9, với các tập hợp con NK, các tế bào $CD56^{lo}$ thể hiện mức biểu hiện VISTA cao hơn đáng kể so với các tế bào $CD56^{Hi}$ NK. Trong số các tập hợp con tế bào T, các tế bào nhớ $CD8^+$ biểu hiện ở mức cao nhất, dù không cao hơn đáng kể so với các tế bào T $CD8^+$ tự nhiên hoặc T $CD4^+$.

Mức biểu hiện VISTA trên các tập hợp con tế bào sợi nhánh của người:

Như được thể hiện trên các Fig. 10A-10D, 11A-11C và 12, không quan sát được khác biệt đáng kể về mức biểu hiện VISTA; các DC và bạch cầu ưa bazơ thể hiện mức biểu hiện VISTA thấp, với các tế bào sợi nhánh dạng tương bào (plasmacytoid dendritic cells - pDCs) thường cao hơn nhưng không đáng kể.

Kết luận: Các kết quả này thể hiện mức biểu hiện VISTA trên các tập hợp con tế bào miễn dịch khác nhau, và thể hiện rằng VISTA được biểu hiện ở mức cao nhất trên

bạch cầu đơn nhân to, với một số mức biểu hiện trên các tập hợp con tế bào T khác và tế bào NK, và ít hoặc không biểu hiện trên các tế bào B.

Ví dụ 2: Mức biểu hiện VISTA trên các tế bào máu ngoại vi

Phương pháp:

Nhuộm máu toàn phần: Máu toàn phần mới tách (100 μ l) được nhuộm bằng hỗn hợp kháng thể như chỉ ra dưới đây bằng cách ủ trong 30 phút ở 4°C. Các tế bào hồng cầu (Red blood cells - RBCs) được dung giải bằng dung dịch đệm dung giải RBC và các tế bào còn lại được rửa 1x bằng dung dịch đệm nhuộm. Các tế bào được tạo huyền phù lại trong 200 μ l dung dịch đệm nhuộm. Dữ liệu được thu thập bằng cách sử dụng máy đếm tế bào kiểu dòng MACSQuant và phân tích bằng phần mềm phân tích FlowJo.

Nhuộm tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC): Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi được tách từ máu toàn phần bằng cách sử dụng gradien Ficoll. 1×10^6 PBMC mới tách được nhuộm bằng các hỗn hợp kháng thể trong 100 μ l dung dịch đệm nhuộm. Các mẫu được ủ trong 30 phút ở 4°C sau đó rửa một lần bằng dung dịch đệm nhuộm. Các tế bào được tạo huyền phù lại trong 100 μ l dung dịch đệm nhuộm. Dữ liệu được thu thập bằng cách sử dụng máy đếm tế bào kiểu dòng MACSQuant® (Miltyeni Biotec) và phân tích bằng phần mềm phân tích FlowJo.

Các kháng thể được sử dụng là kháng thể CD11b, CD33, CD177, CD16, CD15, CD14, CD20, HLADR, CD3, CD4, CD8, CD127, CD69, và FOXP3 (Biolegend, San Diego, CA). Kháng thể chuột kháng VISTA người được liên hợp APC (dòng GG8) do hãng ImmuNext (Lebanon, NH) sản xuất.

Kết luận:

Mức biểu hiện VISTA trên các tế bào máu ngoại vi của người khỏe mạnh

Máu toàn phần và tế bào đơn nhân máu ngoại vi được phân tích về mức biểu hiện VISTA bằng cách sử dụng phương pháp đếm tế bào kiểu dòng đa sắc. Như được thể hiện trên Fig. 15A và 15B, mức biểu hiện VISTA cao nhất được phát hiện trên bạch cầu đơn nhân to sau đó là bạch cầu trung tính. Cả tế bào T CD4+ và T CD8+ biểu hiện mức VISTA thấp như được thể hiện trên Fig. 13C và 13D.

Mức biểu hiện VISTA trên các tế bào máu ngoại vi của bệnh nhân ung thư

Như được thể hiện trên các Fig. 14A-C, tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ bệnh nhân ung thư phổi được phân tích. Fig. 14A là đồ thị luồng đại diện thể hiện phép phân tích các bạch cầu đơn nhân to $CD14^+$ và các tế bào ức chế $CD15^+$ nguồn gốc tủy (myeloid derived suppressive cells - MDSC). Các kết quả cho thấy các tế bào có kiểu hình $CD15^+$ là các MDSC có nguồn gốc từ bạch cầu trung tính. Ngoài ra, các tế bào này không có trong các mẫu máu khỏe mạnh. Fig. 14B là biểu đồ đại diện về mức biểu hiện VISTA trên bạch cầu đơn nhân to thu được từ người khỏe mạnh và bệnh nhân ung thư, cho thấy mức biểu hiện VISTA trên các tế bào của bệnh nhân ung thư cao hơn so với các đối chứng khỏe mạnh. Tương tự mức VISTA cao hơn được phát hiện trên các MDSC của bệnh nhân ung thư, như được thể hiện trên Fig. 14C.

Fig. 15A là đồ thị FACS đại diện thể hiện sự có mặt của MDSC nguồn bạch cầu trung tính trong máu của bệnh nhân ung thư kết tràng. Fig. 15B và 15C biểu đồ đại diện thể hiện mức biểu hiện VISTA cao hơn trên các bạch cầu đơn nhân to của bệnh nhân ung thư so với các mẫu máu từ người cho khỏe mạnh.

Mức biểu hiện VISTA trên các tế bào máu ngoại vi của khỉ cynomolgus

Như được thể hiện trên Fig. 16A và 16B phép phân tích tế bào kiểu dòng máu toàn phần khỉ cho thấy kiểu biểu hiện VISTA tương tự các tế bào người. Cả bạch cầu đơn nhân to và bạch cầu trung tính biểu hiện mức VISTA cao nhất so với các tế bào T $CD4^+$ (Fig. 16C) và $CD8^+$ (Fig. 16D).

Ví dụ 3: Sự biểu hiện VISTA trong các dòng tế bào bệnh máu ác tính ở mức ARN và mức protein

Vì VISTA được biểu hiện ở các bệnh máu ác tính, kháng thể kháng VISTA có khả năng hướng đến các tế bào ác tính này để phá hủy, cũng như phong bế VISTA và thúc đẩy đáp ứng miễn dịch chống khối u.

Dữ liệu bao gồm kết quả phân tích ARNseq của ~140 dòng tế bào bệnh máu ác tính (một số dòng tế bào bị lặp trong phép phân tích). Kết quả được chỉ ra trên Fig. 17.

Các giá trị ARNseq được liệt kê dưới dạng giá trị FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped - số đoạn trên một kilobazơ exon trên một triệu đoạn được lập bản đồ).

Về bản chất, điều này có nghĩa là tất cả các số đo rơi vào vùng exon của gen được đếm và được chuẩn hóa bằng ca độ dài gen và tổng số số đo cho một mẫu (để

giải thích các khác biệt trong mẫu). Giá trị ngưỡng là 1; trên 1 là dương tính với biểu hiện VISTA(ở mức ARN), dưới 1 là âm tính với biểu hiện VISTA.

Các kết quả chỉ ra rằng nhiều dòng tế bào là dương tính ở mức ARN, chủ yếu là bệnh bạch cầu tủy cấp và bệnh bạch cầu sinh tủy mạn tính. Điều này đã được dự đoán vì VISTA được biểu hiện ở mức cao trong các tế bào tu bình thường, và vì chức năng của nó được cho là suy yếu đáp ứng miễn dịch, bao gồm các đáp ứng miễn dịch chống khối u.

Ví dụ 4: Tạo kháng thể đơn dòng kháng VISTA

Sàng lọc thể thực khuẩn

Hai mươi bốn thể thử nghiệm sàng lọc thực khuẩn được tiến hành để làm phong phú thể thực khuẩn phản ứng với Cyno VISTA-His. Protein VISTA của cynomolgus được sử dụng trong các thử nghiệm này vì nó thể hiện khả năng liên hợp biotin tốt hơn so với protein VISTA người. Để xác định sự thành công của thử nghiệm thể thực khuẩn, các hỗn hợp thể thực khuẩn từ các vòng sàng lọc riêng rẽ được bổ sung vào các đĩa neutravidin được phủ cyno VISTA-His biotinyl hóa và phát hiện bằng kháng thể kháng M13 liên hợp HRP. Các khuẩn lạc riêng rẽ được chọn từ các vòng chọn lọc thể thực khuẩn và các protein Fab được tạo ra trong các đĩa 96 giếng. Các dịch nổi chứa Fab được biểu hiện được thử nghiệm về liên kết với cyno VISTA-His biotinyl hóa. Thu được trên 200 kết quả.

Các vùng VH và VL từ các đĩa Fab được khuếch đại, giải trình tự ADN và xuất ra dưới dạng các tệp tin FASTA. Khi chọn các dòng vô tính mà có thể chuyển hóa và thử nghiệm dưới dạng MAB, các dòng được chọn dựa trên đa dạng trình tự cũng như có ít nguy cơ biến đổi sau dịch mã và ít gốc kỵ nước càng tốt.

VH và VL từ các dòng thể thực khuẩn được tách dòng phụ vào các vector biểu hiện IgG1/kappa động vật có vú và chuyển nhiễm vào các tế bào HEK293. Các kháng thể được tinh chế trên hựa áo lực Protein A Sepharose Fast Flow. Nồng độ MAB thể thực khuẩn được xác định bằng ELISA định lượng bằng các phép đo Nanodrop. Nhóm kháng thể được biểu hiện ở mức cao. Phân tích SDS-PAGE chứng tỏ sự nguyên vẹn của từng biến thể kháng thể được biểu hiện.

Việc làm thuần thực trong dòng các kháng thể thể thực khuẩn được thực hiện bằng cách khuếch đại các miền VH từ hỗn hợp kháng thể đa dòng từ vòng sàng lọc

cuối để tách dòng vào vector thể thực khuẩn có đa dạng VL. Điều này tạo ra hỗn hợp VH phong phú mà được lấy mẫu với tính đa dạng bổ sung trong VL. Thể thực khuẩn được sàng lọc qua 1-2 vòng nghiêm ngặt với mong muốn nhận dạng liên kết với protein VISTA ECD His với ái lực rất cao. Phương pháp ELISA Fab đơn dòng được thực hiện để xác định thành công của việc làm thuần thực. Dữ liệu ELISA và dữ liệu biểu hiện được chuẩn hóa đến tập hợp dòng quy chiếu đặt là 100% từ thử nghiệm sàng lọc ban đầu và lực các dòng thuần thực ái với tín hiệu liên kết với kháng nguyên cyno VISTA cao hơn so với dòng đối chứng được nhận dạng. Quy trình này tạo ra một số dòng mà cho thấy khả năng liên kết lên tới 200% khi sàng lọc ở nồng độ kháng nguyên thấp (1 nM), các đỉnh với ái lực cao hơn được xác định trình tự và sản xuất dưới dạng MABs.

Tạo thể lai

Một nhóm chuột nhắt BALB/cAnNCrI được tiêm một lần trong màng bụng (IP) 50 µg protein tái tổ hợp Hu VISTA-Ig (Sino) được nhũ hóa trong tá dược Freund đầy đủ tiếp theo hai tuần sau đó tiêm IP một lần 50 µg protein tái tổ hợp Hu VISTA-Ig được nhũ hóa trong tá dược Freund không đầy đủ. Hai tuần sau, chuột được tiêm IP một lần 50 µg protein tái tổ hợp cyno VISTA-Fc được nhũ hóa trong tá dược Freund không đầy đủ. Tất cả chuột được tiêm lần cuối 25 µg VISTA người và 25 µg VISTA cyno ở gốc đuôi trong PBS, năm ngày trước khi thu lách để dung hợp.

Một nhóm chuột BALB/cAnNCrI khác được tiêm IP một lần 50 µg Hu VISTA-His protein tái tổ hợp được nhũ hóa trong tá dược Freund đầy đủ. Hai tuần sau, chuột được tiêm IP một lần 50 µg protein tái tổ hợp Hu VISTA-His được nhũ hóa trong tá dược Freund không đầy đủ. Hai tuần sau, chuột được tiêm IP một lần 50 µg protein tái tổ hợp Cyno VISTA-His được nhũ hóa trong tá dược Freund không đầy đủ. Hai tuần sau, tất cả chuột được tiêm lần cuối 25 µg Hu VISTA-His và 25 µg Cyno VISTA-His trong PBS, ba ngày trước khi thu lách để dung hợp.

Vào ngày dung hợp, chuột bị giết bằng cách làm ngạt bằng CO₂, lách được lấy ra và đặt vào 10 mL nước muối đệm bằng phosphat lạnh. Huyền phù chứa tế bào đơn của các tế bào lách được chuẩn bị bằng cách nghiền lách qua rây mịn bằng chày nhỏ và rửa bằng PBS ở nhiệt độ trong phòng. Các tế bào được rửa một lần trong PBS và phân giải bằng RBC. Tóm lại, các tế bào được tạo huyền phù lại trong 3mL dung dịch đệm dung giải RBC (Sigma #R7757) cho mỗi lách và đặt trên nước đá trong 5 phút. Các tế bào

này được rửa lại một lần trong PBS ở nhiệt độ trong phòng và dán nhãn để phân loại bằng từ tính. Theo hướng dẫn của nhà sản xuất, các tế bào được dán nhãn hạt từ tính kháng Thy1.2 chuột, kháng CD11b chuột và kháng IgM chuột (lần lượt Miltenyi Biotec # 130-049-101, 130-049-601 và 130-047-301) sau đó phân loại bằng cách sử dụng cột MS với Midi MACS. Các phân đoạn tế bào âm tính (các phân đoạn tế bào dương tính bị loại bỏ) được dung hợp với tế bào FO. Việc dung hợp được tiến hành với tỷ lệ tế bào tủy chuột so với tế bào lách sống được là 1:1. Tóm lại, các tế bào lách và tủy được trộn cùng nhau, kết viên và rửa một lần trong 50 mL PBS. Viên này được tạo huyền phù lại với 1 mL dung dịch polyetylen glycol (PEG) (2 g PEG trọng lượng phân tử 4000, 2 mL DMEM, 0,4 mL DMSO) trên 10^8 tế bào lách ở 37°C trong 30 giây. Hỗn hợp tế bào/dung hợp sau đó được nhúng trong bể nước ở 37°C trong khoảng 60 giây có lắc nhẹ. Phản ứng dung hợp được dừng lại bằng cách bổ sung từ từ DMEM ở 37°C trong 1 phút. Các tế bào được dung hợp được để cho nghỉ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó ly tâm ở 150 x g trong 5 phút. Sau đó các tế bào được tạo huyền phù lại trong môi trường E-HAT (MediumE (StemCell Technologies cat#03805) chứa HAT (Sigma cat#H0262) và gieo trong các đĩa nuôi cấy mô đáy phẳng 96 giếng bằng polystyren (Corning # 3997).

EIA bắt giữ được sử dụng để sàng lọc các dịch nuôi cấy nổi chứa thể lai về kháng thể đặc hiệu đối với cyno VISTA. Tóm lại, các đĩa (Nunc-Maxisorp #446612) được phủ trong ít nhất 60 phút bằng kháng thể dê kháng IgG chuột (Fc) ở nồng độ 4 µg/ml (Jackson #115-006-071) trong dung dịch đệm phủ (Thermo 28382). Các đĩa được phong bế bằng 200 µl/giếng albumin huyết thanh bò (BSA) ở nồng độ 0,4% (trọng lượng/thể tích) trong PBS trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được rửa một lần và 50 µl/giếng dịch nổi chứa thể lai được bổ sung vào và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong ít nhất 30 phút. Các đĩa được rửa một lần và 50 µl/giếng cyno VISTA-huỷ 0,1 µg/mL được bổ sung vào và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Các đĩa được rửa một lần và 1:40.000 Streptavidin HRP (Jackson 016-030-084) trong BSA/PBS 0,4% được bổ sung vào các đĩa và ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được rửa 3x và sau đó được phát triển bằng cách sử dụng 100µl/giếng cơ chất TMB Turbo (Thermo Scientific 34022) ủ khoảng 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Phản ứng được dừng bằng cách sử dụng 25µl/giếng axit sulfuric 4N và độ hấp thụ được đo ở 450 nm bằng cách sử dụng quang phổ kế đĩa tự động. Mười lăm kết quả đầu tiên được chọn để

tách dòng phụ bằng cách pha loãng giới hạn và sàng lọc theo cùng cách sàng lọc đầu tiên.

Tất cả các dòng tế bào lai phản ứng với cyno VISTA được sàng lọc chéo bằng cách sử dụng VISTA-Ig người để đánh giá khả năng phản ứng chéo. Tóm lại, các đĩa (Nunc-Maxisorp #446612) được phủ bằng kháng thể dê kháng ms Fc ở nồng độ 4µg/mL (Jackson#115-006-071) trong dung dịch đệm natri carbonat-bicarbonat 0,1M, độ pH=9,4 (Pierce 28382 BupH™) qua đêm ở 4°C. Không cần rửa, các giếng được phong bế bằng 200 µl dung dịch phong bế (0,4% BSA (Sigma) (trọng lượng/thể tích) trong PBS (Invitrogen)) qua đêm ở 4°C. Sau khi loại bỏ dung dịch phong bế, các dịch nổi chứa thể lai không pha loãng được ủ trên các đĩa được phủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được rửa một lần bằng PBST (0,02% Tween 20 (Sigma) (trọng lượng/thể tích) trong PBS), và sau đó ủ trong 30 phút với Hu VISTA-Ig được pha loãng đến 100 ng/ml trong dung dịch phong bế. Các đĩa được rửa một lần bằng và dò bằng kháng thể dê kháng Fc-HRP người (Jackson #109-036-098) được pha loãng 1:10,000 trong dung dịch phong bế trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa được rửa lại và sau đó được phát triển bằng cách sử dụng 100µl/giếng cơ chất TMB Turbo (Thermo Scientific 34022) ủ khoảng 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Phản ứng được dừng bằng cách sử dụng 25µl/giếng axit sulfuric 4N và độ hấp thụ được đo ở 450 nm bằng cách sử dụng quang phổ kế đĩa tự động.

Các thể lai mà thể hiện là phản ứng với cả VISTA người và cynomolgus có trình tự kháng thể vùng V của chúng được tách dòng. Các tế bào lai được chuẩn bị trước cho phản ứng phiên mã ngược (reverse transcriptase - RT) bằng hệ SuperScript III cells Direct cDNA của Invitrogen. Tóm lại, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và đã được đặt trên đá và được tạo huyền phù lại trong 200 µl PBS lạnh. Bốn mươi microlít được chuyển sang đĩa phản ứng PCR MicroAmp fast 96 giếng và đĩa này được đặt trên đế đặt đĩa kim loại lạnh, bịt kín bằng màng nhựa và ly tâm nhẹ ở 700 vòng/phút trong 3 phút. PBS được loại bỏ và 10 µl dung dịch đệm tạo huyền phù lại và 1 µl dung dịch tăng cường phân giải được bổ sung vào. Đĩa được bịt kín và ủ ở 75°C trong 10 phút và bảo quản ở -80°C.

Đối với phản ứng RT, mỗi giếng chứa 5 µl nước, 1,6 µl dung dịch đệm ADNaze 10X, 1,2 µl EDTA 50 mM, 2 µl Oligo(dT)20 (50 mM) và 1 µl dNTP Mix 10 mM. Đĩa được ủ ở 70°C trong 5 phút, tiếp theo là ủ trên nước đá trong 2 phút, sau đó các chất

phản ứng được bổ sung vào mỗi giếng; 6 µl dung dịch đệm RT 5X, 1 µl RNaseOUT™ (40 U/µl), 1 µl SuperScript™ III RT (200 U/µl) và 1 µl DTT 0,1M. Đã được bịt kín và đặt trong máy chu trình nhiệt được làm nóng trước đến 50°C và ủ ở 50°C trong 50 phút, tiếp theo là bất hoạt (ủ 5 phút ở 85°C). Phản ứng được làm lạnh trên nước đá và cADN sợi đơn được bảo quản ở -80°C đến khi sử dụng tiếp.

Để khuếch đại vùng V, các phản ứng PCR 20 µl được thiết lập. Mỗi giếng chứa 16,2 µl nước, 2,0 µl dung dịch đệm phản ứng PCR 10X, 0,8 µl MgSO₄ (50 mM), 0,4 µl dNTP 10mM, 0,15 µl hỗn hợp đoạn môi xuôi 100 uM, 0,05 µl đoạn môi ngược 100 uM, 0,2 µl enzym HiFi Tag. cADN, được tạo ra như mô tả trên đây, được chuyển (2 µl/giếng) vào hỗn hợp thành phần PCR, đã được bịt kín và phản ứng khuếch đại được thực hiện; đối với VH chương trình là (i) 94°C trong 1 phút (ii) 94°C trong 15 giây (iii) 55°C trong 30 giây (iv) 68°C trong 1 phút. Các bước (ii – iv) được lặp lại trong tổng số 35 chu kỳ tiếp theo là kéo dài lần cuối ở 68°C trong 3 phút. Đối với VL chương trình là (i) 94°C trong 1 phút (ii) 94°C trong 15 giây (iii) 55°C trong 30 giây (iv) 65°C trong 30 giây, (v) 68°C trong 1 phút. Các bước (ii – v) được lặp lại trong tổng số 35 chu kỳ tiếp theo là kéo dài lần cuối ở 68°C trong 3 phút.

Các đoạn môi xuôi được trộn trước và hỗn hợp này được sử dụng theo tỷ lệ 3:1 với đoạn môi ngược. Các sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarosa. Các sản phẩm phản ứng được chuẩn bị để tác động bằng dung hợp bằng cách bổ sung chất tăng cường Enhancer (In-Fusion HC Cloning Kit, cat #639650, Clontech). Năm microlit sản phẩm phản ứng PCR được chuyển vào đĩa PCR tiếp theo là chuyển 2 µl chất tăng cường/giếng. Đã được bịt kín và ủ trong thiết bị chu trình nhiệt (15 phút ở 37°C và 15 phút ở 80°C). Vector đích (vDR243 hoặc vDR301) được chuẩn bị bằng cách đồng hóa bằng Esp3I; (1,5 µg vector được đồng hóa trong 3 µl dung dịch đệm Tango, 2 l Esp3I và nước trong 30 µl sản phẩm phản ứng ở 37°C trong 2 giờ).

Để tách dòng bằng dung hợp, 2 µl sản phẩm PCR được xử lý bằng chất tăng cường được trộn với 100 ng vector được đồng hóa bằng Esp3I và 2 µl enzym dung hợp 5X (Clontech). Phản ứng dung hợp được thực hiện trong đĩa PCR 96 giếng. Đã này được ủ trong 15 phút ở 50°C trên máy PCR và các tế bào Stella thuần thực được biến nạp bằng cách sốc nhiệt 40 giây ở 42°C không lắc và trải trên các đĩa aga LB với kháng sinh chọn lọc và ủ qua đêm ở 37°C. Ngày tiếp theo, các khuẩn lạc được chọn vào các đĩa sâu 96 giếng chứa môi trường LB/Carbenixilin và nuôi qua đêm ở 37°C.

Các phần bảo quản lạnh đông được chuẩn bị từ sản phẩm nuôi cấy qua đêm trộn với cùng thể tích glycerol 30% trọng lượng/thể tích. Các vùng V được xác định trình tự bằng cách sử dụng đoạn môi giải trình tự SPF0052. Các trình tự được phân tích, một giếng dương tính cho mỗi thể lai vH và vL được chọn, tạo mảng lại trên các đĩa mới và nuôi qua đêm trong môi trường giàu dinh dưỡng có chứa ampicilin. Sau đó các dòng được chuẩn bị miniprep ADN để chuyển nhiễm quy mô nhỏ trong đĩa 96 giếng.

Bốn mươi tám trình tự lai của chuột được chọn cho cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được lắp vùng khung của người bằng chương trình phần mềm nội bộ. Một vùng khung của người được chọn cho mỗi một trong số vH hoặc vL chuột. Các trình tự ADN vùng V thu được thông qua việc dịch mã ngược. Các vùng ADN tổng hợp tương ứng với các trình tự axit amin HFA được đặt mua từ hãng Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Việc tách dòng được thực hiện vào vDR149 và vDR157 đã cắt trước, lần lượt IgG1 người và kappa người. Kit Qiagen Endo-free Maxi-prep được sử dụng để chuẩn bị ADN. Các sản phẩm nuôi cấy Expi293 (100 ml) được sử dụng để biểu hiện nhóm kháng thể.

Ví dụ 5: Quy trình thử nghiệm ức chế VISTA-IG tế bào T in vitro

Các tế bào A20 của chuột được chuyển nhiễm ổn định GFP hoặc VISTA người. Các tế bào này được ủ với peptit tế bào trứng và với các tế bào T DO11.10. Mức biểu hiện CD25 của tế bào T được xác định sau khi bắt đầu ủ 24 giờ. Các tế bào A20-huVISTA ức chế sự biểu hiện CD25 bởi các tế bào T, nhưng số đo này được tái lập đáng kể bằng cách ủ với VSTB95 (Fig. 18).

Ví dụ 6: Lắp vùng khung của người vào kháng thể kháng VISTA

Các trình tự lai của chuột cho cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được lắp vùng khung của người bằng cách ghép CDR (Jones, et al. Nature, 321: 522-525 (1986) bằng chương trình phần mềm nội bộ. Chương trình này phác họa các vùng xác định bổ cứu (complementarity determining region - CDR) của trình tự vùng V theo định nghĩa Kabat (Wu, T. T. & Kabat, E. A. (1970). J Exp Med, 132, 211-50) và so sánh các vùng khung với các gen dòng mầm của người bằng Blast. Dòng mầm của người với độ đồng nhất về trình tự cao nhất với các vùng khung của chuột được chọn làm gen nhận để lắp vùng khung của người (HFA). Trong một số ít trường hợp, các gen dòng mầm có liên

quan mật thiết được chọn, dựa trên kinh nghiệm trước đó với các vùng khung của người được biểu hiện tốt. Các trình tự ADN vùng khung của người được chọn đối với mỗi một trong số các vùng V_H hoặc V_L thu được thông qua việc dịch mã ngược. Các cùng ADN tổng hợp tương ứng với các trình tự axit amin HFA được đặt mua từ hãng Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Việc tách dòng được thực hiện lần lượt vào IgG1 người và kappa người.

Ví dụ 7: Các cấu trúc kháng thể kháng VISTA

Thông tin về plasmit và trình tự đối với các phân tử để phát triển dòng tế bào: Các cấu trúc plasmit được tạo ra đối với kháng thể kháng VISTA có các vùng biến đổi VSTB112 và các vùng hằng định IgG1 κ (VSTB174, số mới do thay đổi allotyp trong vùng hằng định), vùng hằng định IgG2sigma (VSTB140) hoặc vùng hằng định IgG1 kháng proteaza (VSTB149).

Vector Lonza

Hệ vector biểu hiện tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary - CHO) pEE6.4 và pEE12.4 (Lonza Biologics, PLC) được thiết lập bởi Biologics Research (BR) và Pharmaceutical Development & Manufacturing Sciences (PDMS) làm hệ biểu hiện chính để tạo ra các mAb trị liệu ở các dòng tế bào biểu hiện của động vật có vú. Mỗi vector chứa trình tự khởi đầu cytomegalovirus của người (huCMV-MIE) để điều khiển sự biểu hiện chuỗi nặng (HC) hoặc chuỗi nhẹ (LC) và chứa gen kháng ampicilin. Vector pEE12.4 cũng bao gồm gen mã hóa enzym glutamin synthetaza (GS). Các điều kiện sinh trưởng đòi hỏi hoạt tính glutamin synthetaza đặt ra áp lực chọn lọc đối với tế bào để duy trì vector biểu hiện (GS Gene Expression System Manual Version 4.0). pEE6.4 được sử dụng để tách dòng gen HC và pEE12.4 để tách dòng gen LC dưới dạng các vector gen đơn. Plasmit gen kép Lonza được tạo ra từ hai vector gen đơn Lonza này.

Các trình tự axit amin vùng biến đổi của chuỗi nặng của các mAb VISTA chọn lọc

> Chuỗi nặng VSTB112 (SEQ ID NO: 37)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGII
PIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARSSYGWSY
EFDYWGQGTLVTVSS

> Chuỗi nặng VSTB50 (SEQ ID NO: 38)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGLNWVRQAPGQGLEWMGW
INPYTGEPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDNAVYYCAREGYGN
YIFPYWGQGTLVTVSS

> Chuỗi nặng VSTB53 (SEQ ID NO: 39)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHYTIHWVRQAPGQGLEWMGYI
IPSSGYSEYNQKFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCARGAYDD
YYDYYAMDYWGQGTLVTVSS

> Chuỗi nặng VSTB95 (SEQ ID NO: 40)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRNYGMSWVRQAPGKGLEWVASII
SGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDNAVYYCARIYDHDG
DYYAMDYWGQGTTVTVSS

Các trình tự axit amin vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của các mAb VISTA chọn lọc

> Chuỗi nhẹ VSTB50 (SEQ ID NO: 41)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASESVDTYANSLMHWYLQKPGQPPQLLIYR
ASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQTNEPRTFGQGTK
LEIK

> Chuỗi nhẹ VSTB53 (SEQ ID NO: 42)

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQTIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYK
VSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASHVPWTFGQGTK
LEIK

> Chuỗi nhẹ VSTB95 (SEQ ID NO: 43)

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYK
VSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPWTFGQGTK
LEIK

> Chuỗi nhẹ VSTB112 (SEQ ID NO: 44)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDTRLNWYQQKPGKAPKLLIYSASSL
QSGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSAYNPITFGQGTKVEIK

> Chuỗi nhẹ VSTB116 (SEQ ID NO: 45)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINTNLNWWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQARDTPITFGQGTKVEIK

Ví dụ 8: Sàng lọc ELISA và FACS kháng thể kháng VISTA

Các thử nghiệm này để xác định khả năng liên kết với protein VISTA người hoặc cynomolgus của kháng thể được tạo ra trong ELISA, cũng như để xác định, bằng cách sàng lọc FACS, khả năng liên kết với protein VISTA trên bề mặt các tế bào K562 (dòng tế bào bệnh bạch cầu sinh tủy người) biểu hiện protein VISTA người hoặc cynomolgus của kháng thể.

Phương pháp:

Tóm tắt quy trình ELISA: Các đĩa được phủ qua đêm ở 4°C với 1 µg/ml protein SB0361 (người) hoặc SB0361 (cyno (cynomolgus)), là các miền ngoại bào của VISTA từ các loài tương ứng. Các kháng thể này được pha loãng đến 1 µg/ml làm nồng độ ban đầu với các lần pha loãng từng bước 1:4 cho tổng số 4 nồng độ và ủ ở nhiệt độ trong phòng (room temperature - RT) trong 2 giờ. HRP (peroxidaza cây cải ngựa) chuột kháng IgG1 người được sử dụng để phát hiện và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Thực hiện tất cả các lần rửa bằng PBS-Tween (0,05%).

Tóm tắt quy trình FACS: 2×10^5 tế bào K562-G8 (người) hoặc K562-C7 (cyno) được nhuộm bằng 5 µg/ml mỗi kháng thể thử nghiệm và ủ trong 30 phút ở 4°C. Kháng thể PE (phycoerythrin) dê kháng IgG1 người được sử dụng làm kháng thể phát hiện thứ cấp ở nồng độ 5 µg/ml. Các tế bào được chạy trên BD Fortessa và phân tích bằng phần mềm FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR) về cường độ huỳnh quang trung bình (mean fluorescence intensity- MFI) của quần thể sống.

Phân tích dữ liệu/Kết quả: Đối với mỗi kháng thể, điểm chủ quan (Có/Không (Y/N)) được đưa ra liên quan đến việc kháng thể có liên kết mạnh hay không đối với cả hai phép phân tích ELISA và FACS đối với mỗi trong số 4 thử nghiệm. Nếu kháng thể cho kết quả “Không” liên kết trong cả hai thử nghiệm, kháng thể này được lặp lại thử nghiệm để khẳng định nó âm tính. Kết quả được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây và trong các Fig. 19A-19F và 20A-20F.

Bảng 7.

Mã INX	ELISA người	ELISA Cyno	FACS người	FACS Cyno
1	Y	Y	Y	Y
2	Y	Y	Y	Y

3	Y	Y	Y	Y
4	Y	Y	Y	Y
5	Y	Y	Y	Y
6	Y	Y	Y	Y
7	Y	Y	Y	Y
8	Y	Y	Y	Y
9	Y	Y	Y	Y
10	Y	Y	Y	Y
11	N	N	N	N
12	Y	Y	Y	Y
14	Y	Y	Y	Y
16	Y	Y	Y	Y
17	Y	Y	Y	Y
18	Y	Y	Y	Y
19	Y	Y	Y	Y
20	Y	Y	Y	Y
21	Y	Y	Y	Y
22	Y	Y	Y	Y
23	N	N	N	N
24	N	N	N	N
25	Y	Y	Y	Y
26	N	Y	N	Y
28	Y	Y	Y	Y
30	N	N	N	N
31	N	N	N	N
32	N	N	N	N
33	Y	Y	Y	Y
34	Y	Y	Y	Y
35	Y	Y	Y	Y
36	Y	Y	Y	Y
37	Y	Y	Y	Y
38	Y	Y	Y	Y
39	Y	Y	N	N
40	Y	Y	Y	Y
41	Y	Y	Y	Y
42	Y	Y	Y	Y
43	Y	Y	Y	Y
44	Y	Y	Y	Y
45	Y	Y	Y	Y
46	Y	Y	Y	Y
47	Y	Y	Y	Y
48	Y	Y	Y	Y
49	Y	Y	Y	Y

Ví dụ 9: Kết quả sàng lọc kháng thể kháng VISTA người bằng cách sử dụng thử nghiệm phản ứng lympho bào hỗn hợp (mixed lymphocyte reaction - MLR) và thử nghiệm hoạt hóa Staphylococcus độc tố ruột B (SEB)

Mục đích của thử nghiệm này là thể hiện dữ liệu hỗ trợ việc nhận dạng kháng thể kháng α -VISTA đa chức năng mà tăng cường đáp ứng miễn dịch tế bào trong thử nghiệm phản ứng lympho bào hỗn hợp (MLR), cũng như thử nghiệm hoạt hóa Staphylococcus độc tố ruột B (SEB).

Phản ứng lympho bào hỗn hợp (MLR) là thử nghiệm miễn dịch chuẩn mà phụ thuộc vào sự ghép không đối xứng MHC lớp I và II để điều khiển đáp ứng tế bào T dị sinh. Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi được tách từ hai cá thể không đối xứng, ủ cùng nhau và kết quả là các yếu tố không đối xứng, tăng sinh và sản sinh xytokin xảy ra.

Vật liệu và phương pháp:

Môi trường AB 10% được điều chế bằng cách kết hợp 500 ml RPMI với 50 ml huyết thanh AB người, 5 ml Penixilin/Streptomycin (10.000 U/ml), 5 ml L-glutamin (100x) và 10 ml HEPES (1M). Môi trường này được bảo quản không quá 14 ngày. 1 mCi thymidin được đánh dấu bằng triti được điều chế bằng cách pha loãng 0,2 ml dung dịch thymidin gốc (1 mCi/ml) trong 9,8 ml RPMI.

Các kháng thể kháng VISTA hòa tan được pha loãng đến nồng độ 20 μ g/ml trong môi trường huyết thanh AB 10%. 100 μ l dung dịch kháng thể thích hợp được bổ sung vào các giếng thích hợp của đĩa đáy chữ U 96 giếng (sản phẩm của hãng Falcon #353077 hoặc tương đương). Sau khi bổ sung nhiều quần thể tế bào khác nhau, nồng độ cuối là 10 μ g/ml.

Tách tế bào bạch cầu: Người cho phải ít nhất 18 tuổi, nhìn chung là khỏe mạnh và được chọn ngẫu nhiên từ dân số địa phương. Máu của người cho được chuyển từ các ống tách sang các ống đáy nón 50 ml. Đưa 15 ml Ficoll 1077 vào phía dưới 25 ml máu cẩn thận để không trộn lẫn với máu. Ly tâm các tế bào ở 1250g trong 25 phút ở nhiệt độ trong phòng mà không nghỉ. Các tế bào bạch cầu được tách ở giữa các pha Ficoll và huyết thanh và pha loãng các tế bào vào 40 ml dung dịch muối cân bằng Hanks (Hanks Balances Salt Solution - HBSS). Ly tâm các tế bào ở 453g (1500 vòng/phút) trong 10 phút ở 4°C. Tạo huyền phù lại các tế bào trong 50 ml HBSS và đếm bằng cách chuyển 500 μ l sang ống riêng.

Thiết lập phản ứng lympho bào hỗn hợp (MLR) đĩa 96 giếng: Xác định số “tế bào kích thích” và “tế bào đáp ứng” thích hợp cần để thử nghiệm dựa trên số mẫu cần phân tích. Quần thể kích thích được gieo ở mật độ $0,5 \times 10^5$ tế bào/giếng và quần thể đáp ứng được gieo ở mật độ $1,0 \times 10^5$ tế bào/giếng của đĩa đáy chữ i 96 giếng. Tất cả các điều kiện phải được thực hiện thành bộ ba. Số “tế bào kích thích” thích hợp được chuyển bằng pipet vào ống đáy nón mới và ly tâm như đã mô tả. Tạo huyền phù lại các tế bào trong 10 ml và chiếu xạ bằng 4000 rads. Ly tâm tế bào như đã mô tả và tạo huyền phù lại ở nồng độ 1×10^6 /ml trong môi trường huyết thanh AB 10% và bổ sung 50 μ l vào các giếng thích hợp. Tách số tế bào đáp ứng cần thiết và ly tâm như đã mô tả và tạo huyền phù lại ở nồng độ 2×10^6 /ml trong môi trường huyết thanh AB 10% và bổ sung 50 μ l vào các giếng thích hợp. Ủ các tế bào trong 5 ngày ở 37°C và 5% CO_2 . Vào ngày thứ năm, lấy ra 30 μ l dịch nổi để phân tích về sự sản sinh interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$). Vào ngày thứ năm, bổ sung 25 μ l dung dịch thymidin được đánh dấu bằng triti 40 $\mu\text{Ci/ml}$ vào mỗi giếng và ủ trong 8 giờ ở 37°C và 5% CO_2 . Chuyển các tế bào vào đĩa vi nhấp nháy 96 theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đếm bằng cách sử dụng máy đếm vi nhấp nháy theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ $\text{IFN-}\gamma$ được xác định bằng ELISA (eBioscience cat# 88-7316-88) theo quy trình của nhà sản xuất.

Phân tích dữ liệu: Tính toán các số đếm trung bình trong một phút (counts per minute- CPM) hoặc nồng độ $\text{IFN-}\gamma$ đối với các giếng không được điều trị. Tính toán CPM trung bình hoặc $\text{IFN-}\gamma$ đối với từng nhóm thử nghiệm. Chuyển tập hợp dữ liệu sang Log_{10} . Sử dụng điểm 12 MLR lần đối với mỗi hợp chất, tính toán trung bình cho tập gồm 12 nhóm thử nghiệm của từng hợp chất. Điểm trung bình đối với 12 thử nghiệm = $\Sigma [(\log_{10} (\text{CPM trung bình của ba lần lặp của hợp chất thử nghiệm})) - (\log_{10} (\text{CPM trung bình của ba lần lặp của mẫu không điều trị}))]/12$

Tiêu chuẩn nhận: Tất cả các chất phản ứng và đối chứng thích hợp được thử nghiệm về nội độc tố trước khi tiến hành thử nghiệm và có mức $< 0,1 \text{ EU/mg}$. Các tế bào đáp ứng một mình có số đếm CPM trung bình dưới 700 CPM cho thấy rằng các tế bào này không hoạt động khi được ủ một mình. CPM của nhóm MLR cao hơn ít nhất 2 lần so với CPM của các tế bào đáp ứng được ủ một mình cho thấy rằng phản ứng đã xảy ra và người cho không đối xứng. Tất cả các thử nghiệm MLR bao gồm protein đối chứng âm IgG1 người. Kết quả của đối chứng âm IgG1 người không khác biệt đáng kể về mặt thống kê so với các mẫu không được điều trị dựa trên kiểm định student t-test.

Sàng lọc kháng thể kháng VISTA trong MLR: Sàng lọc ban đầu tất cả các hợp chất. Trước khi tiến hành MLR với kháng thể kháng VISTA, các kháng thể được khẳng định là liên kết với cả VISTA liên kết tế bào thông qua phân tích FACS và protein VISTA thông qua ELISA. Các kháng thể S26 (VSTB77), S30 (VSTB86), S31 (VSTB88), S32 (VSTB90) và S39 (VSTB74) không vượt qua phép sàng lọc ban đầu nhưng vẫn được thử nghiệm trong thử nghiệm này. Để sàng lọc ban đầu, tất cả các kháng thể được thử nghiệm ở nồng độ 10 µg/ml trong MLR mức độ tăng sinh và IFN- γ là các thông số được xác định (Fig. 21A-21D và 22A-22B).

Chọn lọc sáu kháng thể hàng đầu. Từ phép sàng lọc ban đầu, sáu ứng viên được chọn để phân tích tiếp: VSTB112 (S2), VSTB116 (S5), VSTB95 (S16), VSTB50 (S41), VSTB53 (S43) và VSTB60 (S47).

Các nghiên cứu pha loãng trên sáu ứng viên hàng đầu trong MLR: Điều chỉnh quy trình. Quy trình là giống như đã mô tả với điều chỉnh ở chỗ các kháng thể được pha loãng đến nồng độ sau: 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 và 0 µg/ml.

Xác định các giá trị IC₅₀: Các số đếm CPM thô và nồng độ IFN- γ được sử dụng để xác định IC₅₀ cho từng kháng thể. Các kết quả tính toán IC₅₀ được xác định qua việc sử dụng chương trình “EZ-R stats.” Sau yếu tố đáp ứng riêng rẽ được sử dụng để xác định các giá trị IC₅₀. Các số đếm CPM riêng rẽ và nồng độ IFN- γ trong MLR với chuẩn độ liều của các ứng viên hàng đầu.

Bảng 8: Các giá trị IC₅₀ cho cả CPM và IFN- γ trong MLR

	VSTB112 (S2)	VSTB116 (S5)	VSTB95 (S16)	VSTB50 (S41)	VSTB53 (S43)	VSTB60 (S47)
CPM	-0,67	-0,78	-0,54	-0,12	-0,33	0,02
Gama	-0,42	-0,16	0,22	0,06	0,27	0,4

** Các giá trị tính theo log₁₀ của nồng độ kháng thể.

Kết luận: Phép sàng lọc ban đầu cho thấy rằng nhiều kháng thể đặc hiệu VISTA có khả năng tăng cường đáp ứng miễn dịch tế bào MLR. Các kháng thể sau đó được xếp hạng dựa trên hiệu lực và biến trạng và dựa trên các kết quả này, VSTB112, VSTB116, VSTB95, VSTB50, VSTB53 và VSTB60 được chọn để đánh giá trong các thử nghiệm chuẩn độ liều. VSTB60 gây ra đáp ứng yếu hơn so với năm kháng thể khác trong thử nghiệm chuẩn độ liều.

Thử nghiệm hoạt hóa staphylococcus độc tố ruột B (SEB): SEB là siêu kháng nguyên vi khuẩn mà gây ra sự hoạt hóa các tế bào T V β + đặc hiệu. Các tế bào đơn

nhân máu ngoại vi được tách và ủ với kháng nguyên SEB trong môi trường nuôi cấy, mà cảm ứng sự sản sinh xytokin mạnh mẽ. Thử nghiệm này được tiến hành trên năm ứng viên hàng đầu.

Việc điều chế môi trường AB 10%, điều chế 1 mCi thymidin được đánh dấu bằng triti, điều chế kháng thể kháng VISTA hòa tan, và tách tế bào bạch cầu được thực hiện như đã mô tả trên đây trong MLR.

Thiết lập đĩa SEB 96 giếng: Xác định số tế bào đáp ứng thích hợp cần để thử nghiệm dựa trên số mẫu cần phân tích. Quần thể đáp ứng được gieo ở mật độ $2,0 \times 10^5$ tế bào/giếng trong đĩa đáy chữ U 96 giếng. Tất cả các điều kiện phải được thực hiện thành bộ ba. Ly tâm tế bào như đã mô tả và tạo huyền phù lại ở nồng độ 4×10^6 /ml trong môi trường huyết thanh AB 10% và bổ sung 50 μ l vào các giếng thích hợp. Bổ sung 50 μ l môi trường huyết thanh AB 10% chứa kháng nguyên SEB ở nồng độ 40 ng/ml. Trong các thử nghiệm đã mô tả, SEB thu do hãng Sigma Aldrich (cat# S0812) cung cấp. Nồng độ cuối trong một giếng là 10 ng/ml. Ủ các tế bào trong 3 ngày ở 37°C và 5% CO₂. Vào ngày thứ ba, lấy ra 30 μ l dịch nổi để phân tích về sự sản sinh IFN- γ . Bổ sung 25 μ l dung dịch thymidin được đánh dấu bằng triti 1 μ Ci/ml vào mỗi giếng và ủ trong 8 giờ ở 37°C và 5% CO₂. Chuyển các tế bào vào đĩa vi nhấp nháy 96 theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đếm bằng cách sử dụng máy đếm vi nhấp nháy theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ IFN- γ được xác định bằng ELISA (eBioscience cat# 88-7316-88) theo quy trình của nhà sản xuất.

Phương thức: Phân tích dữ liệu. Tính toán các số đếm trung bình trong một phút (CPM) hoặc nồng độ IFN- γ đối với mỗi kháng thể ở tất cả các nồng độ. Tiêu chuẩn nhận được tiến hành như đã mô tả. Việc xác định giá trị IC₅₀ được tiến hành như đã mô tả. Các số đếm CPM riêng rẽ và nồng độ IFN- γ trong thử nghiệm SEB với chuẩn độ liều của các ứng viên hàng đầu.

Bảng 9: Các giá trị IC₅₀ cho cả CPM và IFN- γ trong SEB.

	VSTB112 (S2)	VSTB116 (S5)	VSTB95 (S16)	VSTB50 (S41)	VSTB53 (S43)	VSTB60 (S47)
CPM	-1,16	-1,44	-1,12	-0,74	-1,06	không thực hiện
Gama	-1,24	-0,35	0,05	1,69	-1,05	không thực hiện

** Các giá trị tính theo log₁₀ của nồng độ kháng thể.

Kết luận: Các kháng thể đặc hiệu VISTA tăng cường khả năng sản sinh xytokin và khả năng tăng sinh theo cách phụ thuộc liều trong thử nghiệm SEB. Các giá trị IC₅₀ từ nghiên cứu SEB thường tương tự với các kết quả từ nghiên cứu pha loãng MLR.

Ví dụ 10: Thử nghiệm liên kết epitop

Phương pháp: Hệ ProteOn XPR36 (BioRad) được sử dụng để thực hiện liên kết epitop. Chip ProteOn GLC (BioRad, Cat#176-5011) được phủ hai tập hợp gồm 6 kháng thể đơn dòng (mAb) theo hướng dẫn của nhà sản xuất dành cho hóa học kết hợp amin (BioRad, cat #176-2410).

Các mAb cạnh tranh được ủ trước ở lượng dư (nồng độ cuối 250 nM) với VISTA người (nồng độ cuối 25 nM) trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng và 6 mẫu cùng lúc được chạy qua chip phủ nhóm mAb được phủ với thời gian liên kết 4 phút tiếp theo là phân ly trong 5 phút. Sau mỗi lần chạy, các chip được tái tạo bằng axit phosphoric 100 mM.

Việc phân tích dữ liệu bao gồm nhóm tất cả các đồ thị đáp ứng theo thời gian bởi phối tử và áp dụng thuật toán sắp thẳng hàng, mà tự động thực hiện sự sắp thẳng hàng theo trục X và Y, và loại bỏ giả hình. Sau đó áp dụng phép sửa chữa Interspot lên dữ liệu.

mAb không cạnh tranh được xác định là có tín hiệu liên kết giống hoặc > tín hiệu A1 (chỉ liên kết với VISTA người).

mAb cạnh tranh được xác định là có tín hiệu liên kết << tín hiệu A1 (tức là, chỉ liên kết với VISTA người).

Kết quả: Theo đồ thị đáp ứng theo thời gian làm ví dụ được thể hiện trên Fig. 23, kháng thể VSTB85 được phủ lên chip Proteon SPR và protein VISTA được ủ trước với các chất cạnh tranh được chỉ định được chạy qua chip. VSTB50 là ví dụ về không liên kết cạnh tranh, ví đáp ứng dương được phát hiện khi phức hợp VISTA/VSTB50 được chạy. GG8, VSTB49 và VSTB51 được tạo phức với VISTA không liên kết với VSTB85 được phủ trên chip và do đó được phân loại là cạnh tranh đối với cùng vị trí liên kết trên VISTA với VSTB85.

Bảng 10:

Mẫu	Nhóm	Tập mẫu #1: kết hợp với cảm biến						Tập mẫu #2: kết hợp với cảm biến					
		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L1	L2	L3	L4	L5	L6
GG8	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB100.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB101.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB102.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB103.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB104.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB105.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB106.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB107.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB108.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB109.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB110.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB111.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB112.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB113.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB114.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB115.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB116.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB49.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB51.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB53.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB59.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB65.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB67.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB70.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB81.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB92.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB95.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB97.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB98.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB99.001	1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y
VSTB50.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB54.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB56.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB60.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB63.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB66.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB73.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB76.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB78.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB84.001	2	N	N	N	N	N	N	Y	N	Y	N	N	N
VSTB85.001	3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	I	Y
VSTB74.001	4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
IE8	5	Y	I	Y	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y

mAb được cố định trên cảm biến

Y = Có cạnh tranh (tín hiệu << so với A1- chỉ có VISTA người)

N = Không cạnh tranh (tín hiệu > so với A1- chỉ có VISTA người)

I = không kết luận (tín hiệu tương tự với A1- chỉ có VISTA người)

Ví dụ 11: Xác định ái lực proteon

Các kháng thể được bắt giữ trên các chips ProteOn bằng cách sử dụng các bề mặt được phủ Fc kháng IgG. Các kháng thể được thử nghiệm về liên kết với các miền ngoại bào (ECD) của VISTA người và cynomolgus (cyno) ở nồng độ protein VISTA nằm trong khoảng từ 0,39 nM đến 100 nM. Các kháng nguyên được để cho liên kết/kết hợp với chip phủ kháng thể trong 4 phút sau đó sự phân ly được theo dõi trong 30 phút. Các chip được tái tạo với hai lần xử lý bằng axit phosphoric 100 mM trong 18 giây. Tất cả các thử nghiệm được tiến hành ở 25°C và dữ liệu được khớp với mô hình liên kết 1:1 Langmuir.

Ví dụ 12: Tác dụng của việc điều trị kháng VISTA trong mô hình khối u bằng quang ở chuột MB49

Phương pháp:

Chuột nhắt C57Bl/6 được tiêm tế bào khối u MB49. Khi các khối u đã hình thành, việc điều trị kháng VISTA được bắt đầu. Sau đó theo dõi sự sinh trưởng của khối u 3 lần/tuần. Các chuột bị giết, theo quy định của IACUC, khi các khối u đạt 15 mm theo chiều bất kỳ.

Đối với mỗi thử nghiệm, một lọ tế bào MB49 lạnh đông được làm tan và nuôi trong RPMI 1640 (+ L-Glut) với 10% huyết thanh và các chất kháng sinh penixilin/streptomycin. Sau ba ngày trong môi trường nuôi cấy, các tế bào được thu nhận bằng các sử dụng StemPro Accutase và được tạo huyền phù lại trong RPMI ở nồng độ 5×10^6 tế bào/ml và 50 μ l được tiêm vào mỗi chuột.

Các chuột C57Bl/6 cái, 6-8 tuần tuổi được mua từ National Cancer Institute. Khi về chúng được để cho thích nghi với hoàn cảnh trong một ngày trước khi suture bên phải của chúng được cạo lông và đuôi được xăm. Sau đó chúng được tiêm ba-năm ngày sau đó.

Tiêm khối u (trong da): Các chuột được tiêm trong da (i.d.) vào bên sườn được cạo lông của chúng bằng 50 μ l huyền phù tế bào MB49 (~250.000 tế bào).

Theo dõi sự phát triển của khối u: Sự phát triển của khối u được đo bằng compa đo ngoài điện tử đầu tiên ngang qua kích thước lớn nhất (L) và thứ hai là ở góc 90° so với phép đo đầu tiên (W). Thể tích khối u thu được như sau:

$$\text{Thể tích} = (L^2 \cdot W^2) / 2$$

Các khối u được xem là đã hình thành khi chúng đạt đường kính ~5mm (thể tích ~60 mm³). Khi đã hình thành, bắt đầu điều trị. Sự phát triển của khối u được đo ba lần một tuần trong khóa điều trị và đến khi thử nghiệm kết thúc.

Điều trị kháng VISTA: Kháng thể đơn dòng 13F3-mIgG2a dạng khảm được tiêm trong màng bụng ở 10 mg/kg. Lịch tiêm là ba lần một tuần trong bốn tuần.

Giết chuột: Theo yêu cầu của IACUC, các động vật bị giết khi khối u của chúng đạt 15mm theo kích thước lớn nhất.

Phân tích hiệu lực: Thể tích khối u ở chuột được phân tích bằng Excel để quản lý dữ liệu, và GraphPad Prism để xây dựng đồ thị. Phép phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng macro cho phần mềm máy tính thống kê R.

Thiết kế thử nghiệm được thể hiện trên Fig. 24.

Kết quả:

Việc điều trị bằng Ch13F3-mIgG2a ở chuột cái dẫn đến loại bỏ khối u hoàn toàn (CR) ở 70% động vật và thuyên giảm một phần (PR) ở 30% (n=7) (Bảng 13 và Fig. 25B). Trái lại, tất cả các chuột được điều trị bằng đối chứng mIgG2a thể hiện khó u tiến triển (6/6) (Fig. 25A). Các dữ liệu này chứng tỏ rằng việc điều trị kháng VISTA có thể có ảnh hưởng sâu sắc đến sự phát triển của khối u.

Bảng 11: Loại bỏ hoàn toàn (CR) so với thuyên giảm một phần (PR)

	Chuột 13F3 IgG2a cái (n=7)
CR	5
PR	2 cho đến ngày 32

Trình tự VISTA người được thể hiện trên Fig. 26 và 27, phỏng theo Wang et al., 2011, trên đây, nội dung của tài liệu này được kết hợp toàn bộ bằng cách viện dẫn.

Ví dụ 13: Lập bản đồ epitop của kháng thể kháng VISTA bằng các nghiên cứu trao đổi hydro/đơteri (H/D)

Để nhận dạng các epitop cho VSTB50, 60, 95 và 112 trên VISTA người, phương pháp phổ khối trao đổi hydro/đơteri (hydrogen/deuterium exchange-mass spectrometry

- HDX-MS) trong dung dịch được tiến hành bằng cách sử dụng các Fab tương ứng. Để trao đổi H/D, quy trình được sử dụng để phân tích sự xáo trộn Fab là tương tự như quy trình đã được mô tả trước đây (Hamuro et al., J. Biomol. Techniques 14:171–182, 2003; Horn et al., Biochemistry 45:8488-8498, 2006) với một số thay đổi. Các Fab được điều chế từ các IgG bằng cách đồng hóa bằng papain và bắt giữ Protein A bằng cách sử dụng Pierce Fab Preparation Kit (Thermo Scientific, Cat# 44985). Trình tự protein VISTA người chứa sáu vị trí glycosyl hóa liên kết N. Để cải thiện độ che phủ của trình tự, protein này được loại bỏ glycosyl bằng PNGase F. Protein VISTA được loại bỏ glycosyl được ủ trong dung dịch nước được xử lý bằng đơteri trong thời gian định trước tạo ra sự kết hợp đơteri ở các nguyên tử hydro trao đổi được. Protein VISTA được đơteri hóa được tạo phức với Fab của VSTB50, VSTB60, VSTB95 hoặc VSTB112 trong 46 μ L đơteri oxit (D_2O) ở 4 °C trong 30 giây, 2 phút, 10 phút và 60 phút. Phản ứng trao đổi được ngừng bằng độ pH thấp và các protein được đồng hóa bằng pepsin. Mức đơteri trong các peptit xác định được theo dõi từ độ tăng khối lượng trên LC-MS. Để làm đối chứng, protein VISTA được xử lý tương tự trừ việc nó không được tạo phức với các phân tử Fab. Các vùng liên kết với Fab được xen kẽ bởi các vị trí tương ứng được bảo vệ khỏi sự trao đổi và, do đó, chứa phân đoạn đơteri cao hơn so với protein VISTA đối chứng. Khoảng 94% protein có thể được lập bản đồ thành các peptit cụ thể.

Bản đồ xáo trộn HDX-MS dung dịch của VISTA với VSTB50 / VSTB60, và VSTB95 / VSTB112 lần lượt được thể hiện trên Fig. 28 trên và dưới. Hai nhóm epitop được nhận dạng. VSTB50 kháng VISTA nhận biết cùng epitop với VSTB60; VSTB95 liên kết với vùng epitop khác với VSTB112 trên VISTA. VSTB50 và 60 kháng VISTA có cùng epitop chứa các đoạn, $_{103}NLTLDSGL_{111}$ (SEQ ID NO: 62), và $_{136}VQTGKDAPSNC_{146}$ (SEQ ID NO: 63) (Fig. 28 trên). VSTB95 và 112 kháng VISTA cho thấy là hướng đích các epitop tương tự nhau, chứa các đoạn $_{27}PVDKGHDVTF_{36}$ (SEQ ID NO: 75), và $_{54}RRPIRNLTFQDL_{65}$ (SEQ ID NO: 65) (Fig. 28 dưới). Có hai đoạn khác thể hiện sự xáo trộn yếu bởi VSTB95 và 112, bao gồm các gốc 39-52 và 118-134. Tuy nhiên, các mức không mạnh bằng các vùng trước (27-36 và 54-65) trong bản đồ khác nhau. Mặc dù một peptit, $_{100}TMR_{102}$ thể hiện sự xáo trộn mạnh bởi VSTB95 và 112, ở mặt kia của bề mặt VISTA, tách khỏi các vùng epitop, 27-36 và 54-65. Sự xáo trộn này có thể do ảnh hưởng dị lập thể. Các kết quả

HDX-MS này đưa ra các epitop ở mức peptit cho kháng thể kháng VISTA. Không có các vùng epitop gối nhau đối với hai nhóm epitop này. Các kết quả này phù hợp với dữ liệu về liên kết cạnh tranh trước đó ở chỗ chúng không cạnh tranh với nhau.

Ví dụ 14: Xác định cấu trúc của phức ECD VISTA người:VSTB112 Fab bằng tinh thể học protein

Trong nỗ lực xác định cấu trúc của VISTA và phác họa epitop và paratop định ra tương tác giữa miền ngoại bào (extracellular domain - ECD) của VISTA và đoạn của kháng thể hàng đầu VSTB112, phức này được kết tinh và cấu trúc được xác định đến độ phân giải 1,85 Å. Cấu trúc của ECD VISTA người trong phức với đoạn Fab của kháng thể VSTB112 được xác định trong nỗ lực vừa để xác định cấu trúc của ECD VISTA vừa để xác định epitop/paratop cho tương tác này. Cấu trúc cho thấy VISTA có đoạn gấp nếp IgV với hình học topo của chuỗi tương tự với chuỗi TCR V α . Ngoài liên kết disulfua hợp quy nối các sợi B và F ở mặt sau và trước của cấu trúc bánh kẹp β , cấu trúc này cho thấy CD có thêm hai liên kết disulfua, một liên kết nối vòng CC' với tấm trước và liên kết thứ hai giữa các sợi A' và G'. Mặc dù có các tiếp xúc tinh thể giữa các phân tử VISTA, chúng chỉ là thứ yếu và không có bằng chứng về dime của các ECD VISTA dựa trên cấu trúc này. Epitop VSTB112 thể hiện là bao gồm các phần của vòng BC, CC', và FG của VISTA cùng với các gốc của tấm trước beta (C'CFG) gần các vòng nhất. Paratop chủ yếu thiên về tương tác chuỗi nặng với CDR L3 tạo ra tiếp xúc tối thiểu.

Epitop/paratop định ra tương tác VISTA:VSTB112

VSTB112 Fab che đi vùng bề mặt 1024,3 Å² khi liên kết với ECD VISTA, phần bề mặt chuỗi nặng bị che chiếm 715,3 Å² trong tổng số này. Bảy liên kết hydro và 4 tương tác cầu muối được tạo ra giữa VISTA và chuỗi nhẹ VSTB112 và 10 liên kết hydro và 2 tương tác cầu muối giữa VISTA và chuỗi nặng VSTB112. VSTB112 nhận biết các gốc trong tấm trước của sợi C', C, F, và G trên các đầu gần vòng FG cũng như các gốc trong vòng BC, FG, và CC' (Fig. 29 và 30). Các tương tác với vòng CC' chiếm hầu hết các tương tác với chuỗi nhẹ Fab, với chỉ các gốc E125 và R127 trong vòng FG tạo ra thêm tương tác chuỗi nhẹ. Các gốc 119 đến 127 tương ứng với vòng FG của VISTA chiếm 38% trong tổng số 1034,8 Å² vùng bề mặt bị che khi liên kết

với VSTB112. Đáng lưu ý, vòng này phân cực cao, bao gồm trình tự sau-IRHHHSEHR- (SEQ ID NO: 76). Ngoài ra, W103 trong CDR H3 của VSTB112 xếp gọn gàng trên khung các gốc VISTA H122 và H123, và gốc H121 VISTA tạo ra gờ khi tương tác với vòng thơm F55 trong CDR H2.

So sánh các vùng epitop được nhận dạng bằng tinh thể học và HDX được thể hiện trên Fig. 31.

Ví dụ 15: Hoạt hóa tế bào T và bạch cầu đơn nhân to bằng kháng thể kháng VISTA

Các ảnh hưởng chức năng của kháng thể kháng VISTA được đánh giá trong hai thử nghiệm in vitro, phản ứng bạch cầu hỗn hợp (mixed leukocyte reaction - MLR) và SEB (Staphylococcus độc tố ruột B). Cả hai thử nghiệm xác định mức tăng sinh tế bào T và sự cảm ứng xytokin dưới dạng các số đo chính của chúng, nhưng các tác dụng này là do các cơ chế khác nhau. Trong MLR, tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ hai người cho khác nhau được ủ cùng nhau, và phức tương hợp mô chính (major histocompatibility complex - MHC) không phù hợp giữa các tế bào T của một người cho và các tế bào sợi nhánh của người cho kia dẫn đến sự tăng sinh tế bào T và sản sinh interferon ($\text{IFN}\gamma$). Trong thử nghiệm SEB, PBMC từ một người cho duy nhất được ủ với siêu kháng nguyên vi khuẩn, mà liên kết trực tiếp protein MHC lớp II trên bề mặt tế bào trình diện kháng nguyên (antigen-presenting cells - APC) với thụ thể tế bào T (T-cell receptor - TCR) trên tế bào T, gây ra sự hoạt hóa, tăng sinh tế bào T, và tiết xytokin. Trong cả hai thử nghiệm này, VSTB112, là phân tử gốc của VSTB174, chứng tỏ khả năng cảm ứng phụ thuộc liều sự tăng sinh tế bào T và sản sinh xytokin, và có tiềm năng nhất trong số các ứng viên (Fig. 21A-21D, Bảng 12).

Bảng 12. Các giá trị EC_{50} đối với các số đo của thử nghiệm MLR. VSTB112 (gốc của VSTB174) là phân tử tiềm năng nhất.

Ứng viên	EC_{50} tăng sinh ($\mu\text{g/ml}$)	EC_{50} sản sinh $\text{IFN}\gamma$ ($\mu\text{g/ml}$)
VSTB112	0,21	0,38
VSTB116	0,17	0,69
VSTB95	0,29	1,67
VSTB50	0,77	1,14
VSTB53	0,47	1,88
VSTB60	1,04	2,48

Thử nghiệm hoạt hóa bạch cầu đơn nhân to

Dữ liệu thử nghiệm, được thể hiện trong Bảng 12, thu được từ VSTB112, phân tử gốc của VSTB174. Để hiểu hơn về hoạt tính của VSTB174, các thử nghiệm hoạt hóa bạch cầu đơn nhân to được thực hiện. Kết quả thể hiện rằng việc ủ VSTB174 với PBMC toàn phần gây ra sự điều hòa tăng các dấu chuẩn hoạt hóa (CD80 và HLA-DR) trên bạch cầu đơn nhân to CD14+, cho thấy tác dụng của kháng thể liên kết với tập hợp con tế bào miễn dịch đã biết là biểu hiện VISTA ở mức cao (Fig. 32). Câu hỏi tiếp theo là liệu các tác dụng lên sự hoạt hóa bạch cầu đơn nhân to trong PBMC toàn phần có thể được tạo thuận lợi bởi kháng thể bất kỳ liên kết với VISTA và có IgG1 Fc hay không. Các kháng thể VSTB103 và VSTB63 liên kết với VISTA với ái lực cao (KD lần lượt là $6,36E-10$ và $8,30E-10$) và với các tế bào biểu hiện protein VISTA, tương tự với VSTB112 và VSTB111. VSTB103 có cùng epitop với VSTB112, trong khi VSTB63 không cùng epitop; không kháng thể nào tạo thuận lợi cho sự hoạt hóa bạch cầu đơn nhân to. Xem xét tổng thể, các kết quả này thể hiện rằng một cơ chế mà nhờ đó VSTB174 có thể thể hiện tác dụng trên sự hoạt hóa/tăng sinh tế bào T thông qua sự hoạt hóa bạch cầu đơn nhân to được tạo thuận lợi bởi các tế bào NK.

Điều chế môi trường

500 ml RPMI 1640 (Corning, 10-040-CV) được kết hợp với 50 ml huyết thanh AB người (Valley Biomedical, Inc, Lot # 3C0405), 5 ml Penixilin/Streptomycin (Lonza, 17-602E) 10.000 U/ml, 5 ml L-glutamin (100x) (Gibco, 25030-081) và 10 ml HEPES (1M) (Fisher BP299-100, Lot#-1). Môi trường này được bảo quản không quá 14 ngày ở 4°C.

Điều chế kháng thể kháng VISTA hòa tan và kháng thể đối chứng

Các kháng thể được pha loãng đến 2X nồng độ mong muốn trong môi trường huyết thanh AB 10%: VSTB174: lô VSTB174.003

Bổ sung 100 μ l dung dịch kháng thể thích hợp vào các giếng thích hợp của đĩa đáy chữ U 96 giếng (Falcon, 353077). Sau khi bổ sung nhiều quần thể tế bào khác nhau trong 100 μ l, nồng độ cuối của mỗi kháng thể là 1, 0,1 hoặc 0,01 g/ml. Kháng thể đối chứng IgG1 CNTO 3930 (Lô 6405, ENDO <0,1 EU/mg) được bổ sung vào ở nồng độ cuối 1 μ g/ml.

Các PBMC được tách

Người cho phải ít nhất 18 tuổi, nhìn chung là khỏe mạnh và được chọn ngẫu nhiên từ dân số địa phương.

Máu của người cho được chuyển từ các ống tách sang các ống đáy nón 50 ml.

Đưa 15 ml Ficoll 1077 (SIGMA, 10771) vào phía dưới cẩn thận để không trộn lẫn với máu. Việc này được thực hiện cho mỗi 25 ml máu.

Ly tâm các tế bào ở 1250g trong 25 phút ở nhiệt độ trong phòng mà không nghỉ.

Các tế bào bạch cầu được tách ở giữa các pha Ficoll và huyết thanh và pha loãng các tế bào vào 40 ml dung dịch muối cân bằng Hanks (HBSS).

Các ống được ly tâm ở 453g (1500 vòng/phút) trong 10 phút ở 4°C.

Các tế bào được tạo huyền phù lại trong 50 ml HBSS và được đếm bằng cách chuyển 500 l sang ống eppendorf riêng.

Ngoài ra, kit tách bạch cầu đơn nhân to từ Miltenyi được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất (cat# 130-096-537) để tách các tế bào CD14+ bằng cách chọn lọc âm tính trong một số nhóm điều trị.

Thiết lập sản phẩm nuôi cấy in vitro

Xác định số tế bào thích hợp cần thiết để thử nghiệm dựa trên số mẫu cần phân tích. Quần thể đáp ứng được gieo ở mật độ $2,0 \times 10^5$ tế bào/giếng trong đĩa đáy chữ U 96 giếng. Đối với quần thể CD14 được chọn theo cách âm tính, $0,5 \times 10^5$ tế bào được gieo. Tất cả các điều kiện được thực hiện thành bộ ba.

Các tế bào được ly tâm như mô tả trên đây và được tạo huyền phù lại ở nồng độ 2×10^6 /ml đối với quần thể PBMC toàn phần và $0,5 \times 10^6$ /ml đối với quần thể CD14 được chọn theo cách âm tính trong môi trường huyết thanh AB 10% và bổ sung 100 l kháng thể thử nghiệm vào các giếng thích hợp làm cho tổng thể tích trong mỗi giếng là 200 l.

Các tế bào được ủ trong 1, 2, hoặc 3 ngày ở 37° C và 5% CO₂.

Nhuộm kháng thể và đếm tế bào kiểu dòng

Đĩa 96 giếng đáy chữ U được ly tâm trong 5 phút ở 453g và lấy dịch nổi ra.

Các tế bào được rửa bằng 200 µl PBS và ly tâm như ở bước 5.5.1.

Dịch nổi được bỏ đi và tế bào được tạo huyền phù lại trong 50 µl PBS chứa các kháng thể sau:

CD14-APC (dòng HCD14) 1:250 (Biolegend cat #325608)

HLA-DR-PE Cy7 (dòng L243) 1:250 (Biolegend cat # 307616)

CD80-PE (dòng 2D10) 1:250 (Biolegend cat # 305208)

Chất ức chế liên kết Hu FcR (eBioscience cat # 14-9161-73)

Được ủ trong 20 phút trên nước đá ướt trong tối.

150 µl PBS được bổ sung vào và lý tâm như ở bước 5.5.1.

150 l dung dịch đệm PBS được bổ sung vào và phân tích bằng FACS.

Các mẫu được chạy trên bào kế kiểu dòng Miltenyi MACSQuant 10 thông số và phân tích bằng FlowJo 9.7.5 về mức biểu hiện HLA-DR và CD80 trên quần thể CD14+. Cường độ huỳnh quang trung bình (mean fluorescence intensity - MFI) hình học, thông số mà xác định xu hướng chính của tập số, được sử dụng làm thông số định nghĩa để so sánh các phép điều trị.

Phân tích thống kê

Tất cả các phép thống kê được thực hiện theo Prism GraphPad, phiên bản 6. Việc so sánh từng cặp giữa các nhóm được thực hiện ở từng thời điểm bằng cách sử dụng ANOVA một chiều với hiệu chỉnh Tukey đối với bội số. Giá trị P nhỏ hơn 0,05 đối với tất cả các thử nghiệm và các phép so sánh được xem là có ý nghĩa. Đối với tất cả các đồ thị và bảng, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Ví dụ 16: Hoạt tính ADCC và ADCP của kháng thể kháng VISTA

VSTB174 có IgG1 Fc, mà có thể tạo ra hoạt tính độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC) và hoạt tính thực bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated phagocytosis - ADCP). Cả hai loại thử nghiệm được tiến hành và thể hiện rằng VSTB174 có thể phân giải hoặc thực bào các tế bào K562-VISTA (Fig. 33-34), nhưng không phải là các tế bào gốc thuộc dòng tế bào u tủy K562 (dữ liệu không được thể hiện). Cơ chế hoạt động khác của VSTB174 để điều biến hoạt tính ức chế của VISTA có thể là khả năng phân giải hoặc phá hủy các tế bào biểu hiện VISTA ở mức cao, do đó loại chúng khỏi vi môi trường cục bộ.

Ví dụ 17: Hoạt tính ADCP của kháng thể kháng VISTA khác

Thử nghiệm thực bào in vitro được sử dụng để nghiên cứu sự tăng cường thực bào qua trung gian đại thực bào của các tế bào biểu hiện VISTA lạc vị bởi các mAb kháng VISTA người (VSTB173 và VSTB174). Các mAb được tách dòng vào các khung Fc khác nhau (IgG1 WT (kiểu hoang dại), IgG1 PR (kháng proteaza), và IgG2 σ) và được coi là có tiềm năng có các hoạt tính khác nhau để tăng cường khả năng thực bào. Các khung IgG1 và IgG1 PR có khả năng liên kết với các thụ thể Fc và có tiềm năng gây ra ADCP, trong khi IgG2 σ không liên kết với thụ thể Fc và không gây ra ADCP.

Kháng thể kháng VISTA được thử nghiệm trong các thử nghiệm ADCP với các tế bào gốc K562 và tế bào đích K562-VISTA. Như được thể hiện trên các Fig. 35-36, VSTB174, VSTB149, VSTB173 và VSTB145 tăng cường sự thực bào hMac của các tế bào K562-VISTA. Các kháng thể kháng VISTA VSTB140 hoặc VSTB132, với IgG2 σ Fc mà không liên kết với các thụ thể Fc, không tăng cường khả năng thực bào như mong đợi. Các mAb VISTA VSTB174 và VSTB173 với IgG1 Fc thể hiện khả năng thực bào mạnh mẽ hơn so với VSTB149 và VSTB145 với IgG1PR Fc (xem Bảng 13 và 14 về các giá trị EC₅₀).

Bảng 13. Các giá trị EC₅₀ của mAb kháng VISTA người.

Điều trị	VSTB174	VSTB149	VSTB140
EC ₅₀	0,0782	0,1142	NA

Bảng 14. Các giá trị EC₅₀ của mAb kháng VISTA người.

Điều trị	VSTB173	VSTB145	VSTB132
EC ₅₀	0,0146	0,1075	NA

VSTB174 và VSTB173 thể hiện sự gia tăng khả năng thực bào yếu của các tế bào gốc K562 ở nồng độ cao nhất (Fig. 35-36), mà có thể do mức biểu hiện VISTA thấp của các tế bào K562. Kháng thể kháng VISTA khác mà không tăng cường khả năng thực bào của các tế bào K562.

Từng kháng thể đối chứng âm được thử nghiệm ở hai nồng độ khác nhau trong thử nghiệm thực bào K562-VISTA, nhưng không gây ra sự thực bào bất kỳ. Kết quả này cho thấy rằng sự thực bào qua trung gian kháng thể kháng VISTA là đặc hiệu và do sự biểu hiện kháng nguyên VISTA bởi các tế bào K562-VISTA.

Ví dụ 18: Hoạt tính ADCC của kháng thể kháng VISTA khác

Để kiểm tra khả năng gây ra ADCC của chúng, ba kháng thể kháng VISTA người sau được thử nghiệm:

VSTB174 (IgG1)

VSTB149 (IgG1 PR)

VSTB174.LF (IgG1 LF (fucoza thấp)).

Mỗi kháng thể được thử nghiệm ở sáu nồng độ khác nhau trong cùng đĩa, theo bộ ba trong hai thử nghiệm riêng rẽ cho tổng số sau điểm dữ liệu.

Mỗi VSTB174, VSTB149, và VSTB174.LF chứng tỏ hoạt tính ADCC đo được ở nồng độ 10, 1, 0,1 và 0,01 $\mu\text{g/mL}$, trong khi đó chỉ có kháng thể LF chứng tỏ hoạt tính ADCC đo được ở 0,001 $\mu\text{g/mL}$; không có kháng thể nào chứng tỏ ADCC ở 0,0001 $\mu\text{g/mL}$. Vì mỗi kháng thể có IgG1 hoặc biến thể Fc IgG1, điều này là đã dự đoán được. Kháng thể LF chứng tỏ hiệu lực ADCC tăng thể hiện ở giá trị EC_{50} nhỏ hơn đối với đường cong kháng thể LF (0,002293 $\mu\text{g/mL}$) so với đường cong kháng thể IgG1 thông thường (0,02381 $\mu\text{g/mL}$). Đường cong kháng thể IgG1 PR có giá trị EC_{50} tương tự với đường cong IgG1 thông thường (0,01846 $\mu\text{g/mL}$).

Bảng 15. Các giá trị EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) của ba kháng thể kháng VISTA được thử nghiệm xác định bằng phép phân tích ADCC.

Kháng thể kháng VISTA	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
VSTB174 (IgG1)	0,02381
VSTB149 (IgG1 PR)	0,01846
VSTB174.LF (IgG1 LF)	0,002293

Các kháng thể IgG1 người, IgG1 PR người và IgG1 LF người đều thể hiện khả năng tiêu diệt qua trung gian ADCC đo được ở nồng độ kháng thể 10, 1, 0,1 và 0,01 $\mu\text{g/mL}$, trong khi đó chỉ có kháng thể LF thể hiện khả năng tiêu diệt ở nồng độ kháng thể 0,001 $\mu\text{g/mL}$. Không có kháng thể kháng VISTA nào thể hiện khả năng tiêu diệt ở nồng độ kháng thể 0,0001 $\mu\text{g/mL}$.

Kháng thể LF thể hiện khả năng tiêu diệt ADCC tiềm năng gấp gần 10 lần so với kháng thể IgG1 thông thường hoặc kháng thể IgG1 PR, như thấy được qua các giá trị EC_{50} .

Ví dụ 19: Ải lực của VSTB174 với VISTA người và cynomolgus

Ải lực của VSTB174 đối với miền ngoại bào (ECD) VISTA người và khi cynomolgus được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance - SPR) trên thiết bị ProteOn. VSTB174 thể hiện giá trị KD tương tự đối với mỗi protein, $1,56\text{E}-10$ M đối với ECD VISTA người và $8,66\text{E}-11$ M đối với VISTA cynomolgus.

Ví dụ 20: Kháng thể kháng VISTA thể hiện hiệu lực trong các mô hình khối u ở chuột

Các chủng, chất phản ứng và mô hình khối u

Để thử nghiệm in vivo, sử dụng chuột được chuyển gen VISTA người có định hướng (VISTA-KI) được lai ngược trên nền C57Bl/6.

Kháng thể kháng VISTA người được tạo ra để thử nghiệm ở chuột VISTA-KI, bằng cách sử dụng vùng biến đổi VSTB174 được ghép trên Fc IgG2a chuột (VSTB123).

Bệnh ung thư bàng quang MB49 được đánh giá ở chuột VISTA KI,

Ngoài các nghiên cứu đã công bố chứng tỏ rằng liệu pháp kháng thể kháng VISTA ức chế sự phát triển khối u ở chuột kiểu hoang dại (Le Mercier et al., 2014), hiệu lực chống khối u đã được chứng tỏ với kháng thể chuột đồng thay thế ở chuột kiểu hoang dại bằng các lịch sử dụng liều khác nhau, và ở chuột VISTA-KI được điều trị bằng VSTB123.

Nghiên cứu hiệu lực in vivo ở mô hình khối u MB49 ở chuột VISTA-KI

Các nghiên cứu hiệu lực MB49 được tiến hành trên chuột VISTA-KI cái, thử nghiệm VSTB123 ở một số liều nằm trong khoảng từ 1- 10 mg/kg. Các chuột được tiêm trong da bằng 250.000 tế bào khối u MB49 vào ngày 0. Vào ngày 6, việc sử dụng liều bắt đầu như được chỉ định trên Fig. 37 (10 mg/kg đối chứng lớp phụ của kháng thể mIgG2a, hoặc các liều VSTB123 được chỉ định; 10 chuột/nhóm).

VSTB123 hiệu quả hơn ở liều cao hơn so với liều thấp hơn, như được thể hiện trên Fig. 37. Các liều 10 mg/kg và 7,5 mg/kg là tương đương, trong khi đó khối u phát triển nhanh hơn ở chuột được dùng liều 5 hoặc 1 mg/kg.

Ví dụ 21: Phát hiện sự biểu hiện VISTA ở các khối u người bằng kháng thể kháng VISTA

Fig. 1 thể hiện sự biểu hiện VISTA bởi dòng tế bào khối u AML — điều này và dữ liệu biểu hiện trình tự ARN trong Fig. 17 củng cố ý tưởng rằng VISTA được biểu hiện bởi các tế bào AML và rằng thuốc kháng VISTA là hữu hiệu thông qua việc hướng đích trực tiếp các tế bào này để điều biến miễn dịch hoặc tiêu diệt bằng kháng thể.

Dữ liệu để đánh giá sự biểu hiện VISTA ở bệnh ung thư phổi thu được từ các mẫu khối u phổi từ việc cắt bỏ bằng phẫu thuật. Các tế bào được phân ly và xác định đặc tính biểu hiện VISTA và nhiều dấu chuẩn khác. Kết quả thể hiện rằng 13/13 khối u phổi (caxinom vảy hoặc caxinom tuyến) chứa các tế bào tủy CD14+ VISTA+ (Fig. 38).

Ví dụ 22: Phát hiện sự biểu hiện VISTA ở các khối u phổi bằng kháng thể kháng VISTA

Thử nghiệm hóa mô miễn dịch được phát triển bằng cách sử dụng dòng GG8, IgG1 chuột kháng VISTA người. mAb này được sử dụng để nghiên cứu việc nhuộm VISTA trong các lát cắt khối u FFPE ở bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ (NSCLC).

Các lát cắt khối u FFPE được xử lý bằng phương pháp thu hồi kháng nguyên chuẩn trước khi nhuộm. Kháng thể chuột GG8 kháng người VISTA được sử dụng ở độ pha loãng 1:500. Liên kết của GG8 được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng thổ kháng chuột, tiếp theo là polyme HRP kháng thổ. Tiếp theo là nhuộm tương phản bằng hematoxylin, sau đó các lát cắt khối u được tính điểm.

Sự biểu hiện VISTA ở bệnh ung thư phổi chủ yếu hạn chế ở sự thâm nhiễm miễn dịch (ví dụ thể hiện trên Fig. 39) và các tế bào dương tính VISTA ở mức cao có mặt trong nhiều mẫu ung thư phổi

Ví dụ 23: Cấu trúc của miền ngoại bào (ECD) của VISTA người trong phức hợp với đoạn Fab của VSTB174

Các biến thể kháng nguyên VISTA được tạo ra và tinh chế để nghiên cứu tinh thể học. VSTB174 Fab tái tổ hợp đuôi his được biểu hiện bên trong và tinh chế. Các tinh thể được tạo ra và sử dụng để thu thập dữ liệu độ phân giải cao hơn đối với phức ECD

VISTA:VSTB174 Fab bằng cách sử dụng bức xạ đồng bộ và xác định cấu trúc bằng cách sử dụng các tổ hợp mô hình hóa đồng nhất và phân tích mật độ electron (Fig. 29(Top)).

Cấu trúc phức ECD VISTA:VSTB174 Fab được xác định bằng tinh thể học tia X đến độ phân giải 1,85Å, đưa ra cấu trúc đầu tiên của ECD VISTA và phác họa epitop và paratop VSTB174. ECD VISTA có nếp gấp IgV với hình học topo tương tự với CTLA-4 ECD, nhưng có sợi G' độc nhất mà kéo dài tấm trước của cấu trúc bánh kẹp β . A' và G' được nối với nhau tiếp theo cách hóa học thông qua cầu disulfua được tạo ra giữa các gốc C12 trong sợi A' và C146 trong sợi G'. Sáu cysteine được phát hiện là được gắn trong ba liên kết disulfua nội phân tử, và, dựa trên các tiếp xúc tinh thể, không có bằng chứng về VISTA dạng dime.

VSTB174 nhận biết các gốc trong tấm trước của sợi C', C, F, và G trên các đầu gần vòng FG cũng như các gốc trong vòng BC, FG, và CC'.

Các hướng dẫn về tất cả các patent, đơn được công bố và các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong bản mô tả này được kết hợp toàn bộ vào đây để tham khảo.

Mặc dù sáng chế đã được thể hiện cụ thể và được mô tả có tham khảo các phương án làm ví dụ của sáng chế, nhưng những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu được rằng có thể thực hiện các thay đổi về dạng và các chi tiết trong đó mà không vượt ra ngoài phạm vi của sáng chế như được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn kháng thể của nó chứa vùng liên kết kháng nguyên mà liên kết với yếu tố ức chế Ig vùng V hoạt hóa tế bào T (VISTA), trong đó liên kết của kháng thể hoặc đoạn kháng thể với VISTA điều biến hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch và kháng thể này:

(i) chứa vùng VH chứa VH CDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19, VH CDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20 và VH CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21, và còn chứa vùng VL chứa VL CDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 22, VL CDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23 và VL CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 24; hoặc

(ii) chứa vùng VH chứa VH CDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25, VH CDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26 và VH CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 27, và còn chứa vùng VL chứa VL CDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 28, VL CDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 29 và VL CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 30.

2. Kháng thể được phân lập theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng VH chứa VH CDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19, VH CDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 20 và VH CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 21, và còn chứa vùng VL chứa VL CDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 22, VL CDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 23 và VL CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 24.

3. Kháng thể được phân lập theo điểm 1, trong đó vùng VH chứa VH CDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 25, VH CDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26 và VH CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 27, và còn chứa vùng VL chứa VL CDR1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 28, VL CDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 29 và VL CDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 30.

4. Kháng thể được phân lập theo điểm 2, trong đó kháng thể này chứa polypeptit vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO: 40.

5. Kháng thể được phân lập theo điểm 2, trong đó kháng thể này chứa polypeptit vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 40.
6. Kháng thể được phân lập theo điểm 2, trong đó kháng thể này chứa polypeptit vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO: 43.
7. Kháng thể được phân lập theo điểm 2, trong đó kháng thể này chứa polypeptit vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 43.
8. Kháng thể được phân lập theo điểm 2, trong đó kháng thể này chứa polypeptit vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 43 và polypeptit vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 40.
9. Kháng thể được phân lập theo điểm 3, trong đó kháng thể này chứa polypeptit vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO: 37.
10. Kháng thể được phân lập theo điểm 3, trong đó kháng thể này chứa polypeptit vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 37.
11. Kháng thể được phân lập theo điểm 3, trong đó kháng thể này chứa polypeptit vùng biến đổi của chuỗi nhẹ đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO: 44.
12. Kháng thể được phân lập theo điểm 3, trong đó kháng thể này chứa polypeptit vùng biến đổi của chuỗi nhẹ đồng nhất với SEQ ID NO: 44.
13. Kháng thể được phân lập theo điểm 3, trong đó kháng thể này chứa polypeptit vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 44 và polypeptit vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 37.
14. Kháng thể được phân lập theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định của người.

15. Kháng thể được phân lập theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định IgG1 của người.

16. Kháng thể được phân lập theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định của người mà chứa đột biến làm suy yếu liên kết FcR hoặc sự phân cắt proteaza.

17. Kháng thể được phân lập theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định IgG1 của người mà chứa đột biến làm suy yếu liên kết FcR hoặc sự phân cắt proteaza.

18. Kháng thể được phân lập theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 60 hoặc SEQ ID NO: 61.

19. Kháng thể được phân lập theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định chuỗi nhẹ IgG1 của người có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 56.

20. Kháng thể được phân lập theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 của người chứa SEQ ID NO: 60 hoặc SEQ ID NO: 61 và còn chứa vùng hằng định chuỗi nhẹ IgG1 của người chứa SEQ ID NO: 56.

21. Kháng thể được phân lập theo điểm 2, trong đó kháng thể này chứa polypeptit chuỗi nặng có trình tự đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO: 53 và polypeptit chuỗi nhẹ đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO: 54.

22. Kháng thể được phân lập theo điểm 2, trong đó kháng thể này chứa polypeptit chuỗi nặng có trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 53 và polypeptit chuỗi nhẹ có trình tự đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO: 54.

23. Kháng thể được phân lập theo điểm 3, trong đó kháng thể này chứa polypeptit chuỗi nặng có trình tự đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO: 55 và polypeptit chuỗi nhẹ có trình tự đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO: 56.

24. Kháng thể được phân lập theo điểm 3, trong đó kháng thể này chứa polypeptit chuỗi nặng có trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 55 và polypeptit chuỗi nhẹ có trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 56.
25. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 1, trong đó đoạn kháng thể là đoạn kháng thể Fab, F(ab')₂, hoặc scFv.
26. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng.
27. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể người hoặc được làm tương thích với người.
28. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể này liên kết với VISTA người với ái lực ít nhất là 1×10^{-9} lít/mol.
29. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này liên kết với VISTA người với ái lực ít nhất là 1×10^{-8} lít/mol.
30. Kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này liên kết với VISTA người với ái lực ít nhất là 1×10^{-7} lít/mol.
31. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 1 và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.
32. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 4 và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.
33. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 5 và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

34. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 6 và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

35. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 7 và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

36. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 8 và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

37. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 9 và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

38. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 10 và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

39. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 11 và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

40. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 12 và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

41. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 13 và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

42. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 22 và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

43. Chế phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo điểm 24 và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

44. Chế phẩm theo điểm 31, trong đó chế phẩm này còn chứa kháng nguyên khối u hoặc kháng nguyên virut.

45. Kháng thể được phân lập theo điểm 13, trong đó kháng thể này được chọn trong số các kháng thể sau đây:

- a) kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 55 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 56;
- b) kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 59 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 56;
- c) kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 60 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 56;
- d) kháng thể chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 61 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 56.

46. Kháng thể được phân lập theo điểm 13, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 61 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 56.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Janssen Pharmaceutica NV;
 Linda Snyder;
 Gordon Powers;

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG YẾU TỔỨC CHẾ IG VÙNG V HOẠT HÓA TẾ BÀO T (VISTA)
 VÀ CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 0148.1142-003

<140> PCT/IB2014/0002868
 <141> 2014-12-22

<150> 61/920,695
 <151> 2013-12-24

<150> 62/085,086
 <151> 2014-11-26

<160> 79

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 1
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
 1 5

<210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 2
 Ile Asn Pro Tyr Thr Gly Glu Pro
 1 5

<210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 3
 Ala Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Ile Phe Pro Tyr
 1 5 10

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 4

Glu Ser Val Asp Thr Tyr Ala Asn Ser Leu
 1 5 10

<210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 5
 Arg Ala Ser
 1

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 6
 Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Arg Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 7
 Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr Thr
 1 5

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 8
 Ile Ile Pro Ser Ser Gly Tyr Ser
 1 5

<210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 9
 Ala Arg Gly Ala Tyr Asp Asp Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 10
 Gln Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

1	5	10
---	---	----

<210> 11
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

 <400> 11
 Lys Val Ser
 1

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

 <400> 12
 Phe Gln Ala Ser His Val Pro Trp Thr
 1 5

<210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

 <400> 13
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
 1 5

<210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

 <400> 14
 Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser
 1 5

<210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

 <400> 15
 Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ile Tyr Val Ser Ala Tyr
 1 5 10

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

 <400> 16
 Glu Ser Val Asp Asn Tyr Ala Asn Ser Phe
 1 5 10

<210> 17
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 17
 Arg Ala Ser
 1

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 18
 Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 19
 Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr Gly
 1 5

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 20
 Ile Ile Ser Gly Gly Ser Tyr Thr
 1 5

<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 21
 Ala Arg Ile Tyr Asp His Asp Gly Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 22
 Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

<210> 23
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 23
 Lys Val Ser
 1

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 24
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
 1 5

<210> 25
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 25
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 26
 Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala
 1 5

<210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 27
 Ala Arg Ser Ser Tyr Gly Trp Ser Tyr Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 28
 Gln Ser Ile Asp Thr Arg
 1 5

<210> 29

<211> 3
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 29
 Ser Ala Ser
 1

<210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 30
 Gln Gln Ser Ala Tyr Asn Pro Ile Thr
 1 5

<210> 31
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 31
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 32
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 32
 Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala
 1 5

<210> 33
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 33
 Ala Arg Ser Ser Tyr Gly Trp Ser Tyr Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 34
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 34
 Gln Ser Ile Asn Thr Asn
 1 5

<210> 35
 <211> 3

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 35
 Ala Ala Ser
 1

<210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 36
 Gln Gln Ala Arg Asp Thr Pro Ile Thr
 1 5

<210> 37
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 37
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Ser Tyr Gly Trp Ser Tyr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 38
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 38
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Ile Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 39
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 39
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Ile Pro Ser Ser Gly Tyr Ser Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ala Tyr Asp Asp Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 40
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 40
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ile Ser Gly Gly Ser Tyr 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 Ile Tyr Asp His Asp Gly Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 41
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 41
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

```

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

```

<210> 42
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

```

<400> 42
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
  1                5                10                15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
      20                25                30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35                40                45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
      50                55                60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
      65                70                75                80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
      85                90                95
Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100                105                110

```

<210> 43
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

```

<400> 43
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
  1                5                10                15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
      20                25                30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35                40                45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
      50                55                60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
      65                70                75                80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85                90                95
Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100                105                110

```

<210> 44
 <211> 107
 <212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 44

```

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

```

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 45

```

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

```

<210> 46

<211> 295

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 46

```

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

```

```

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

```

<210> 47
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

```

<400> 47
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
  1              5              10              15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
      20              25              30
Gly Leu Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35              40              45
Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
      50              55              60
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
      65              70              75              80
Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Ala Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Ile Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly
      100              105              110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
      115              120              125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
      130              135              140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
      145              150              155              160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
      165              170              175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
      180              185              190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
      195              200              205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
      210              215              220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
      225              230              235              240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

```

```

                245                250                255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
                260                265                270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
                275                280                285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
                290                295                300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                310                315                320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                330                335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
                340                345                350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
                355                360                365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
                370                375                380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                390                395                400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                410                415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
                420                425                430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                435                440                445
Lys

```

<210> 48

<211> 218

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 48

```

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

```

210

215

<210> 49

<211> 453

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 49

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Ile Pro Ser Ser Gly Tyr Ser Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ala Tyr Asp Asp Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

			420					425					430				
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser		
		435					440					445					
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys													
	450																

<210> 50
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 50

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

<210> 51
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 51

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

```

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

```

<210> 52
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

```

<400> 52
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1      5      10      15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
      20      25      30
Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
      35      40      45
Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
      50      55      60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser

```

```

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

```

<210> 53

<211> 452

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 53

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr
      20          25          30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35          40          45
Ala Ser Ile Ile Ser Gly Gly Ser Tyr 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 Ile Tyr Asp His Asp Gly Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
      100          105          110
Gly Gln Gly Thr Thr 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

```

[illegible]

```
<210> 54
<211> 219
<212> PRT
<213> Người hiện đại
```

[illegible]

<210> 55
<211> 450

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 55

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Ser Tyr Gly Trp Ser Tyr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys

450

<210> 56
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 56
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Thr Arg
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ala Tyr Asn Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 57
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 57
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Ser Tyr Gly Trp Ser Tyr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

```

      130              135              140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145              150              155              160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
      165              170              175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
      180              185              190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
      195              200              205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
      210              215              220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225              230              235              240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
      245              250              255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
      260              265              270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
      275              280              285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
      290              295              300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305              310              315              320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
      325              330              335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
      340              345              350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
      355              360              365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
      370              375              380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385              390              395              400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
      405              410              415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
      420              425              430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
      435              440              445
Gly Lys
      450

```

<210> 58

<211> 214

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 58

```

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

<211> 446

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 59

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

```

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

```

<210> 60
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

```

<400> 60
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50          55          60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg Ser Ser Tyr Gly Trp Ser Tyr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
          100          105          110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
          115          120          125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
          130          135          140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
          145          150          155          160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
          165          170          175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
          180          185          190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
          195          200          205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
          210          215          220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
          225          230          235          240
Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
          245          250          255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
          260          265          270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
          275          280          285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

```

```

      290              295              300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305              310              315              320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Lys
      325              330              335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
      340              345              350
Leu Pro Pro Ser Arg 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 Lys Leu Thr Val Asp Lys
      405              410              415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
      420              425              430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      435              440              445
Lys

```

<210> 61
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

```

<400> 61
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1              5              10              15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20              25              30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35              40              45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50              55              60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85              90              95
Ala Arg Ser Ser Tyr Gly Trp Ser Tyr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100              105              110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115              120              125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130              135              140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145              150              155              160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165              170              175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180              185              190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195              200              205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210              215              220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225              230              235              240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245              250              255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

```

```

                260                265                270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
                275                280                285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
                290                295                300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                310                315                320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                330                335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
                340                345                350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
                355                360                365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
                370                375                380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                390                395                400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                410                415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
                420                425                430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                435                440                445
Gly Lys
                450

```

```

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> Người hiện đại

```

```

<400> 62
Asn Leu Thr Leu Leu Asp Ser Gly Leu
 1                5

```

```

<210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

```

```

<400> 63
Val Gln Thr Gly Lys Asp Ala Pro Ser Asn Cys
 1                5                10

```

```

<210> 64
<211> 13
<212> PRT
<213> Người hiện đại

```

```

<400> 64
Leu Leu Gly Pro Val Asp Lys Gly His Asp Val Thr Phe
 1                5                10

```

```

<210> 65
<211> 12
<212> PRT
<213> Người hiện đại

```

<400> 65

Arg Arg Pro Ile Arg Asp Leu Thr Phe Gln Asp Leu
 1 5 10

<210> 66

<211> 309

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 66

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

<210> 67

<211> 311

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 67

Met Gly Val Pro Thr Ala Leu Glu Ala Gly Ser Trp Arg Trp Gly Ser
 1 5 10 15

```

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

```

<210> 68

<211> 312

<212> PRT

<213> Macropus rufus

<400> 68

```

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

```

[illegible]

```
<210> 69
<211> 310
<212> PRT
<213> Delphinus delphis
```

<400>	69														
Met	Gly	Val	Pro	Pro	Val	Pro	Glu	Ala	Gly	Ser	Trp	Arg	Arg	Gly	Pro
1				5					10					15	
Val	Leu	Leu	Ala	Phe	Phe	Leu	Ala	Ala	Ser	Arg	Gly	Leu	Val	Ala	Ala
			20					25					30		
Phe	Lys	Val	Ala	Thr	Pro	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Val	Cys	Pro	Glu	Gly	Gln
		35					40					45			
Asn	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Arg	Leu	Leu	Gly	Pro	Leu	Ala	Lys	Gly	His
	50					55					60				
Asp	Val	Thr	Phe	Tyr	Lys	Thr	Trp	Tyr	Arg	Ser	Ser	Arg	Gly	Glu	Val
65					70					75				80	
Gln	Ala	Cys	Ser	Glu	Arg	Arg	Pro	Ile	Arg	Asn	Leu	Thr	Phe	Gln	Asp
				85					90					95	
Leu	His	Leu	His	His	Gly	Gly	His	Gln	Ala	Asn	Ser	Ser	Gln	Asp	Leu
			100					105					110		
Ala	Gln	Arg	His	Gly	Leu	Glu	Ser	Ala	Ser	Asp	His	His	Gly	Asn	Phe
			115				120					125			
Thr	Ile	Thr	Met	Arg	Asn	Leu	Thr	Leu	Leu	Asp	Gly	Gly	Leu	Tyr	Cys
	130					135					140				
Cys	Leu	Val	Val	Glu	Ile	Arg	His	Arg	His	Ser	Glu	Gln	Arg	Leu	Tyr
145					150					155				160	
Gly	Ala	Met	Glu	Leu	Gln	Val	Gln	Arg	Gly	Glu	Glu	Ala	Pro	Ser	Lys
				165					170					175	
Cys	Thr	Val	Tyr	Pro	Pro	Ser	Ser	Lys	Glu	Ser	Glu	Ser	Ile	Thr	Ala
			180					185					190		
Ala	Ala	Leu	Ala	Thr	Ser	Ala	Cys	Ile	Val	Gly	Ile	Leu	Cys	Leu	Pro
			195				200					205			
Leu	Ile	Leu	Ile	Leu	Val	Trp	Lys	Gln	Arg	Gln	Val	Ala	Ser	Asn	Arg
	210					215					220				
Arg	Ala	Gln	Glu	Leu	Val	Arg	Met	Asp	Ser	Asn	Thr	Gln	Gly	Ile	Glu

```

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

```

<210> 70
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus

```

<400> 70
Gly Gly Thr Ala Ala Phe Leu Val Thr Val Pro Tyr Thr Leu Cys Ile
 1          5          10          15
Cys Pro Glu Gly Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Arg Val Ser Gly Pro
 20          25          30
Pro Ala Asp His His Asp Leu Ile Phe Lys Thr Trp Tyr Phe Ser Asn
 35          40          45
Asn Gly Asp Gln Ser Cys Ser Glu Lys Arg His Val Arg Asn Leu Thr
 50          55          60
Glu Lys Glu Leu Arg His Asp Pro Gly Arg His His Ser Thr Ala Ala
 65          70          75          80
Asn Ser Thr Ala Arg Ser Pro His Gly Ser Leu Ala Ser His His Gly
 85          90          95
Val Glu Phe Val Pro Asp His His Gly Ala Phe His Ile Val Val Met
 100          105          110
Asn Leu Thr Leu Gln Asp Ser Gly Asn Tyr Cys Cys Tyr Ala Met Glu
 115          120          125
Thr Arg Arg Asp His Gly Lys Ala His Thr Leu His Ile Ala His Gly
 130          135          140
Phe Val Glu Leu Gln Ile Gln Arg Gly Arg Gly Ser Leu Gln Asn Cys
 145          150          155          160
Thr Phe His Thr Ala Thr Ser Lys Asp Ile Thr Ala Ala Ala Leu Ala
 165          170          175
Thr Gly Ala Cys Ile Val Gly Ile Leu Cys Leu Pro Leu Ile Leu Leu
 180          185          190
Leu Ile Tyr Lys Gln Arg Gln Ala Val Ser His Arg Arg Ala His Glu
 195          200          205
Leu Val Arg Met Glu Ser Ser Ala Gln Gly Ile Glu Asn Pro Val Phe
 210          215          220
Glu Ala Leu Pro Ala Gly Ser Thr Glu Gln Arg Pro Arg Pro Gln Leu
 225          230          235          240
Ser Tyr Leu Gly Gly Arg Gln Leu Ser Glu Ser Gly Arg His Leu Leu
 245          250          255
Ser Glu Pro Asn Thr Pro Leu Ser Pro Pro Ala Pro Gly Glu Cys Phe
 260          265          270
Phe Pro Thr Leu Asp Pro Val Pro Asp Ser Pro Asn Ser Leu Lys Ala
 275          280          285

```

<210> 71
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Xenopus laevis

<400> 71

```

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

```

<210> 72

<211> 315

<212> PRT

<213> Taeniopygia guttata

<400> 72

```

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

```

```

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

```

<210> 73

<211> 275

<212> PRT

<213> Danio rerio

<400> 73

```

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

```

245 250 255
 Pro Asn Ile Gln Gly Glu Leu Phe Phe Ser Ala Gln Gly Leu Pro Glu
 260 265 270
 Ser Asn Ile
 275

<210> 74
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> Fugu rubripes

<400> 74
 Leu Glu Lys Phe Thr Ser Ala His His Thr Lys Gln Thr Leu Glu Lys
 1 5 10 15
 Gly Leu Asn Leu Leu Cys Leu Thr Lys Ser Asn Ala His His Gly His
 20 25 30
 Pro Ala Met Ser Val Ser Ala Ser His Leu Tyr Tyr Thr Cys Pro Glu
 35 40 45
 Gly Ala Asn Ala Thr Leu Val Cys Asn Gln Arg Gly Gly Ala Leu His
 50 55 60
 Pro Asn Asp Ser Leu Trp Arg Leu Trp Phe Phe Thr Pro His Lys Asp
 65 70 75 80
 Gln His Cys Thr Lys His Gly Pro Arg Asn Val Thr Phe Lys His Ser
 85 90 95
 Lys Leu Ser Ser Gly Leu His Phe Gly Ala Thr Gln Glu Asn Phe Trp
 100 105 110
 Val Gln Leu Gln Asn Val Thr His Ala Asp Gln Gly Arg Tyr Cys Cys
 115 120 125
 Ala Ala Leu Glu Ile Glu Ser Ile His His Glu Ala Val Gln Arg Thr
 130 135 140
 His Ser His Met Phe Leu Asn Ile Ile Pro Arg Gly Thr Gly Ser Pro
 145 150 155 160
 Asn Cys Thr Val Ser Ala Pro Ser Ala Pro Glu Gly Asn Ala Thr Leu
 165 170 175
 Cys Thr Val Pro Val Ala Leu Ala Met Gly Ala Cys Ile Leu Ala Leu
 180 185 190
 Leu Ser Leu Pro Leu Ile Leu Leu Leu Val Tyr Arg Gln Arg Gln Ser
 195 200 205
 Ala Gln Ser Arg Arg Arg Ala Gln Glu Leu Val Arg Met Asp Ser Glu
 210 215 220
 Ala His Gly His Glu Asn Pro Val Phe Leu Gly Gly Ser Pro Gln Ile
 225 230 235 240
 Lys Asn Arg Thr Val Ser Gln Ile Met Ala Arg Gln Ser Ser Glu Thr
 245 250 255
 Gly Arg His Leu Leu Ser Glu Pro Gly Thr Pro Leu Ser Pro Pro Ala
 260 265 270
 His Gly Asp Val Phe Phe Pro Ala Glu Asp Thr Ile Phe Glu Thr Pro
 275 280 285
 Glu Leu Arg Gln Val
 290

<210> 75
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 75
 Phe Lys Val Ala Thr Pro Tyr Ser Leu Tyr Val Cys Pro Glu Gly Gln
 1 5 10 15

```

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

```

<210> 76
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 76
 Ile Arg His His His Ser Glu His Arg
 1 5

<210> 77
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 77

```

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

```

<210> 78
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 78
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Thr Arg
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ala Tyr Asn Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Gln Gln Val Gln Leu Val Gln Ser
 115 120 125
 Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
 130 135 140
 Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln
 145 150 155 160
 Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe
 165 170 175
 Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr
 180 185 190
 Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg
 195 200 205
 Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Ser Tyr Gly Trp
 210 215 220
 Ser Tyr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 225 230 235 240
 Ser

<210> 79
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 79
 Ala Phe Lys Val Ala Thr Pro Tyr Ser Leu Tyr Val Cys Pro Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Val Thr Leu Thr Cys Arg Leu Leu Gly Pro Val Asp Lys Gly
 20 25 30
 His Asp Val Thr Phe Tyr Lys Thr Trp Tyr Arg Ser Ser Arg Gly Glu
 35 40 45
 Val Gln Thr Cys Ser Glu Arg Arg Pro Ile Arg Gln Leu Thr Phe Gln
 50 55 60
 Asp Leu His Leu His His Gly Gly His Gln Ala Ala Gln Thr Ser His
 65 70 75 80
 Asp Leu Ala Gln Arg His Gly Leu Glu Ser Ala Ser Asp His His Gly
 85 90 95
 Asn Phe Ser Ile Thr Met Arg Asn Leu Thr Leu Leu Asp Ser Gly Leu
 100 105 110
 Tyr Cys Cys Leu Val Val Glu Ile Arg His His His Ser Glu His Arg

		115					120				125				
Val	His	Gly	Ala	Met	Glu	Leu	Gln	Val	Gln	Thr	Gly	Lys	Asp	Ala	Pro
		130					135				140				
Ser	Asn	Cys	Val	Val	Tyr	Pro	Ser	Ser	Ser	Gln	Glu	Ser	Glu	Gln	Ile
145					150					155					160
Thr	Ala	Ala	His	His	His	His	His	His							
					165										

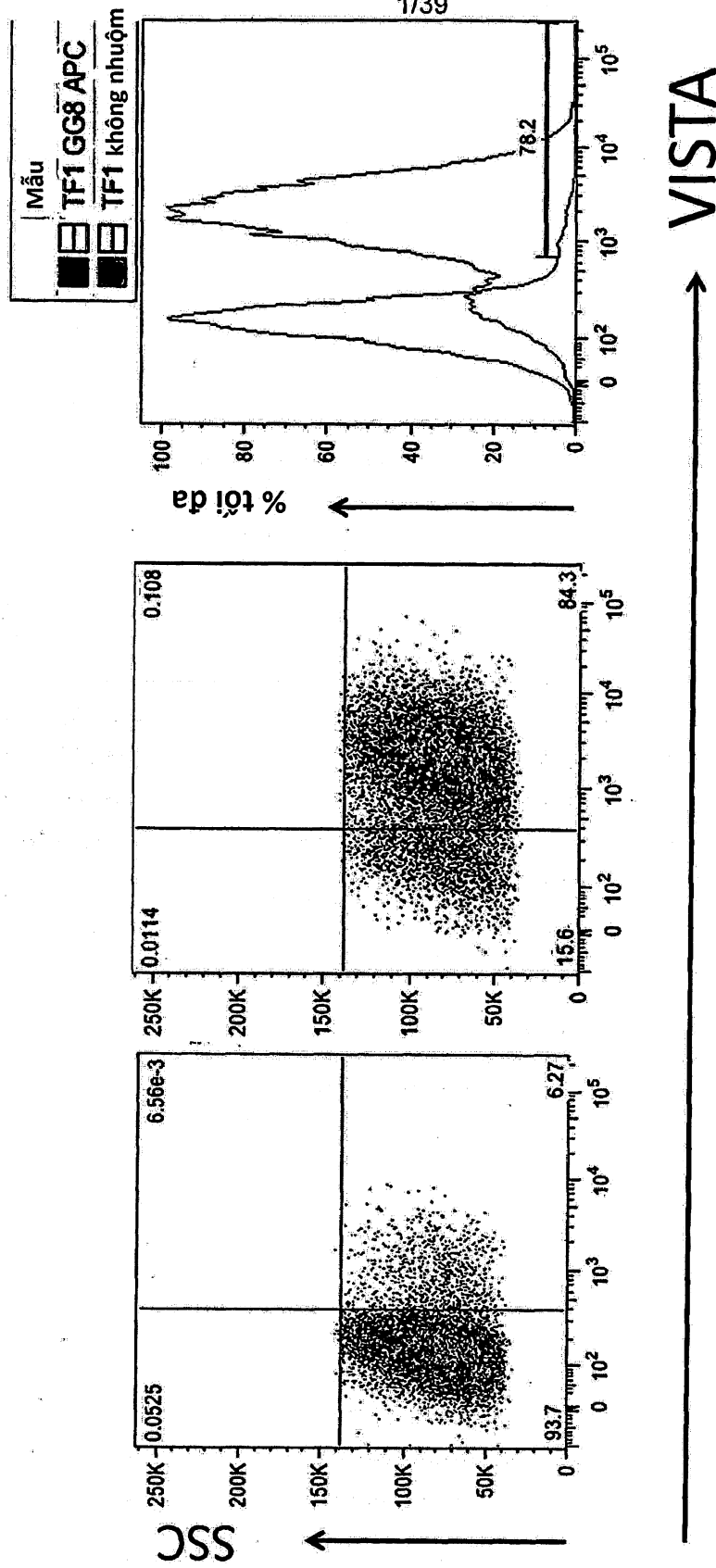


Fig. 1C

Fig. 1B

Fig. 1A

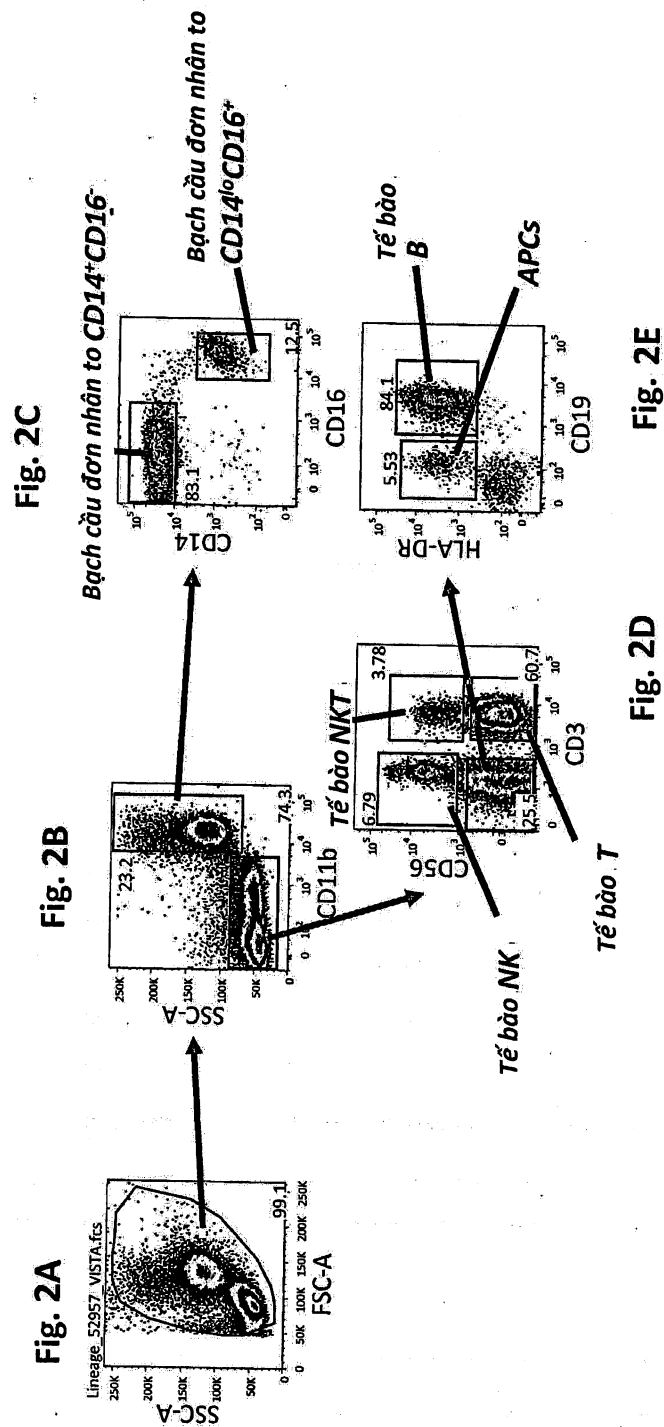


Fig. 3D

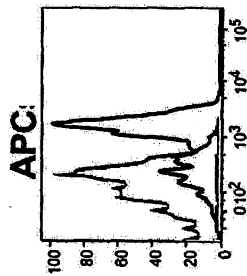


Fig. 3C

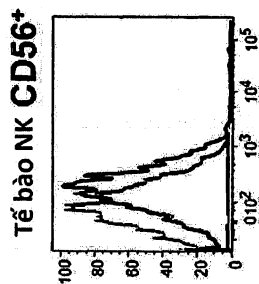


Fig. 3B

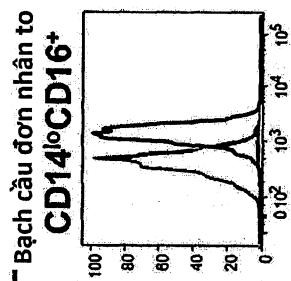
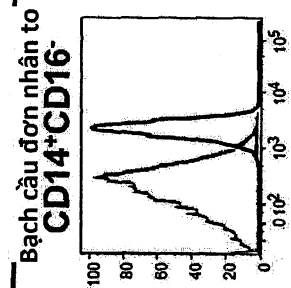
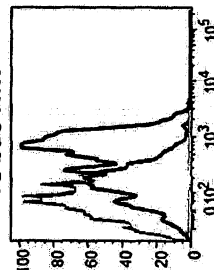


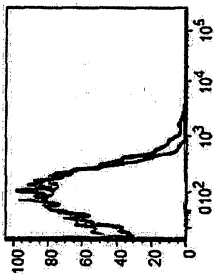
Fig. 3A



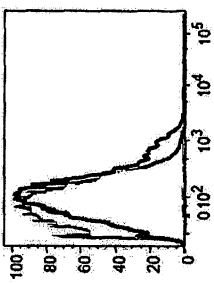
Tế bào NK



Tế bào B



Tế bào T CD3+



□ Đối chứng lớp phụ kháng thể
— VISTA

VISTA

Fig. 3G

Fig. 3F

Fig. 3E

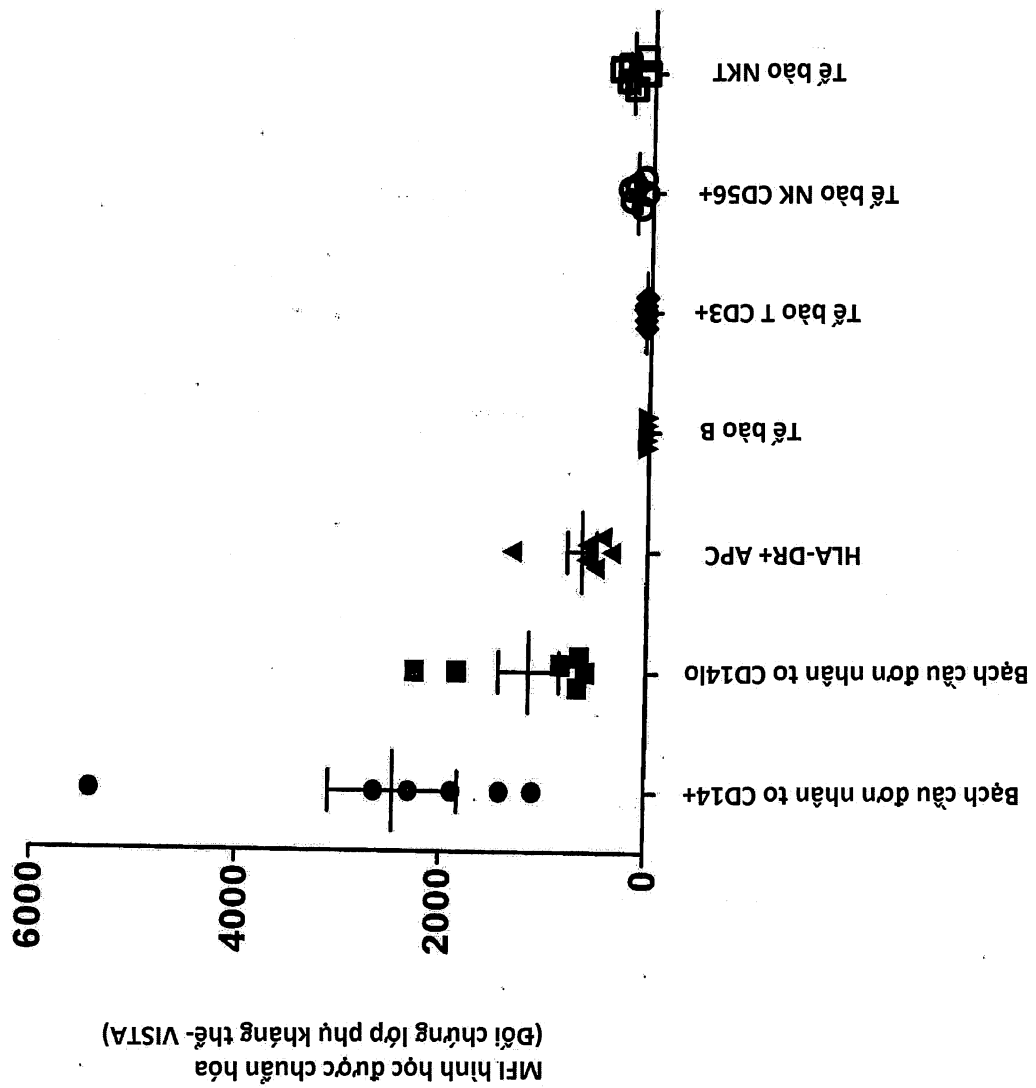


Fig. 4

5/39

Bạch cầu đơn nhân to
CD14⁺CD16⁻
Bạch cầu đơn nhân to
CD14^{lo}CD16⁺
Tế bào **SSC^{lo}**

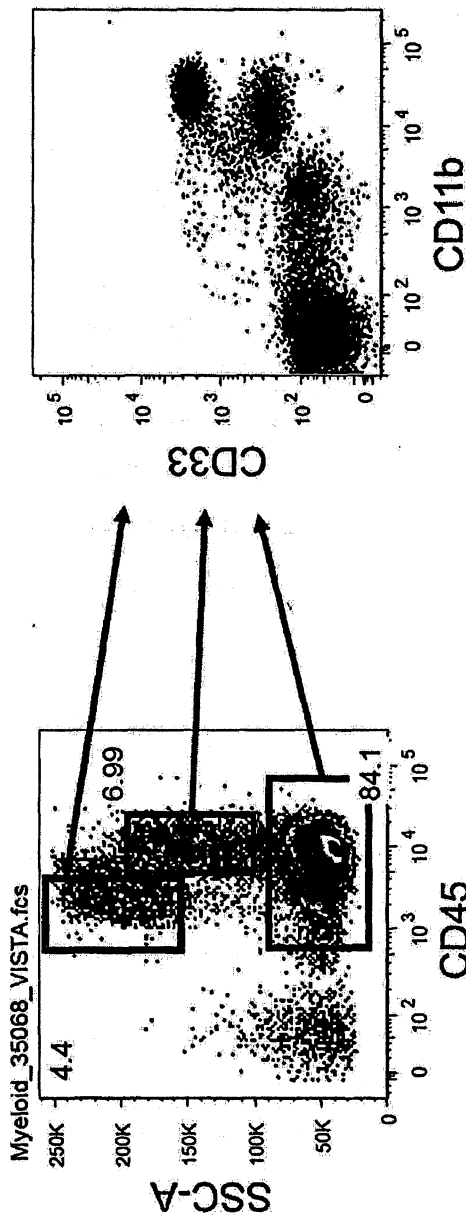


Fig. 5B

Fig. 5A

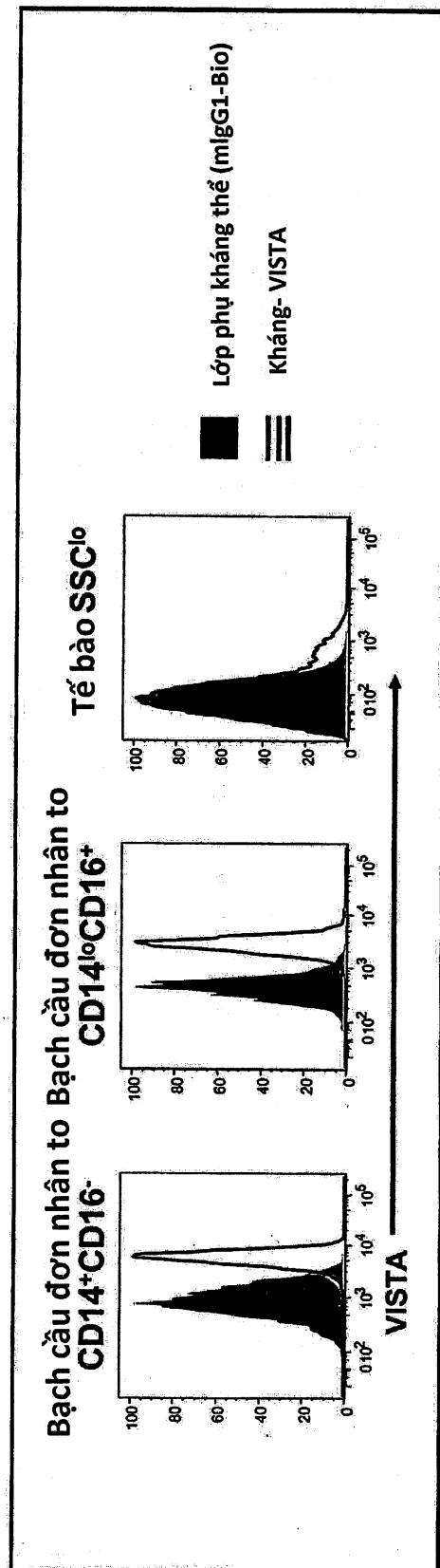


Fig. 6A

Fig. 6B

Fig. 6C

Fig. 7D

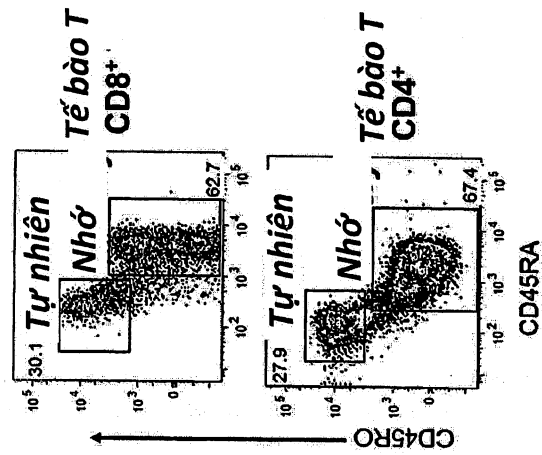


Fig. 7E

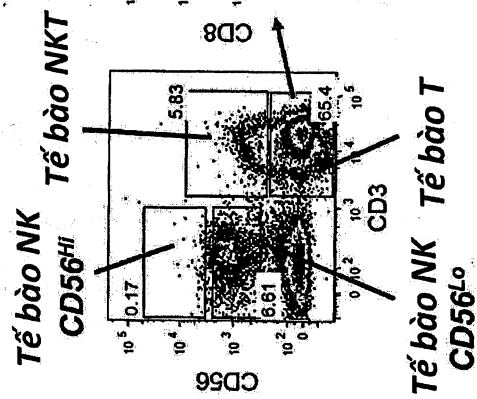


Fig. 7C

Fig. 7B

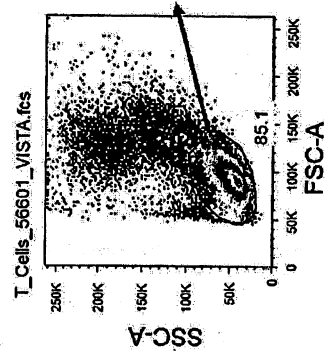


Fig. 7A

Fig. 8A

Fig. 8B

Fig. 8C

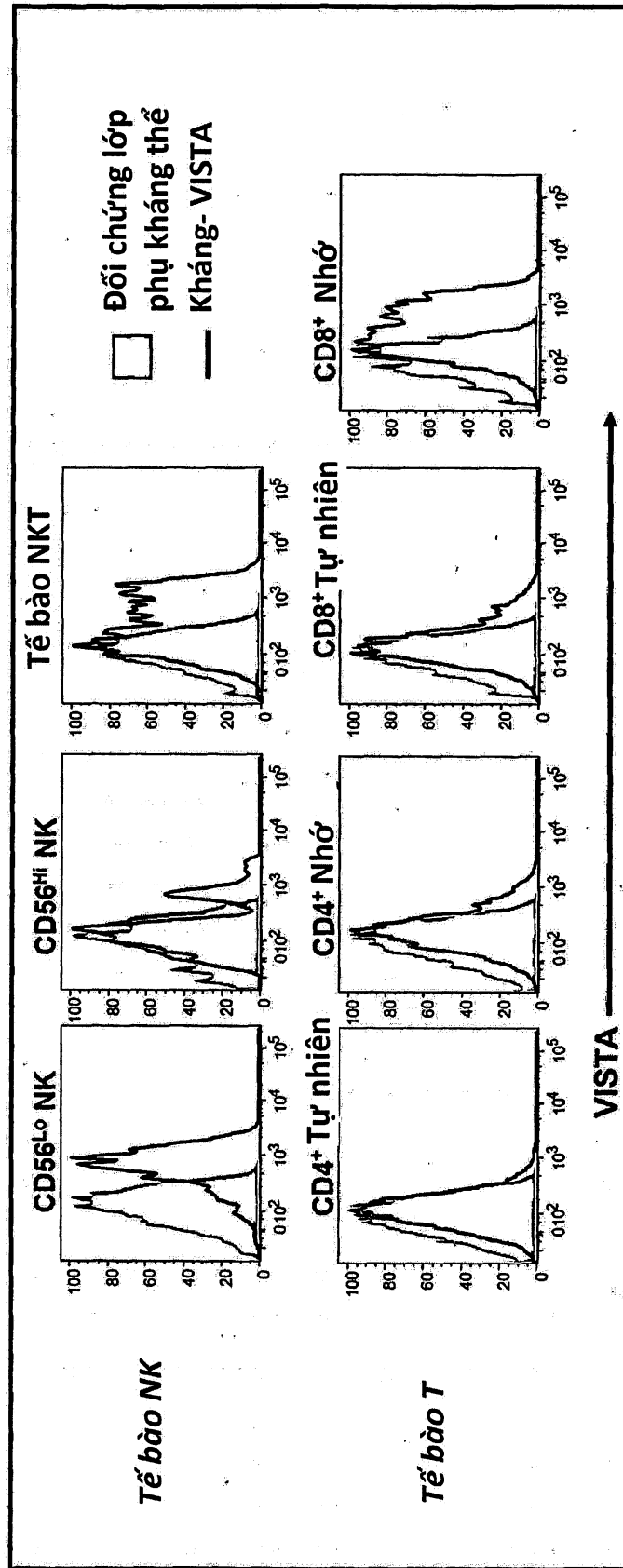


Fig. 8D

Fig. 8E

Fig. 8F

Fig. 8G

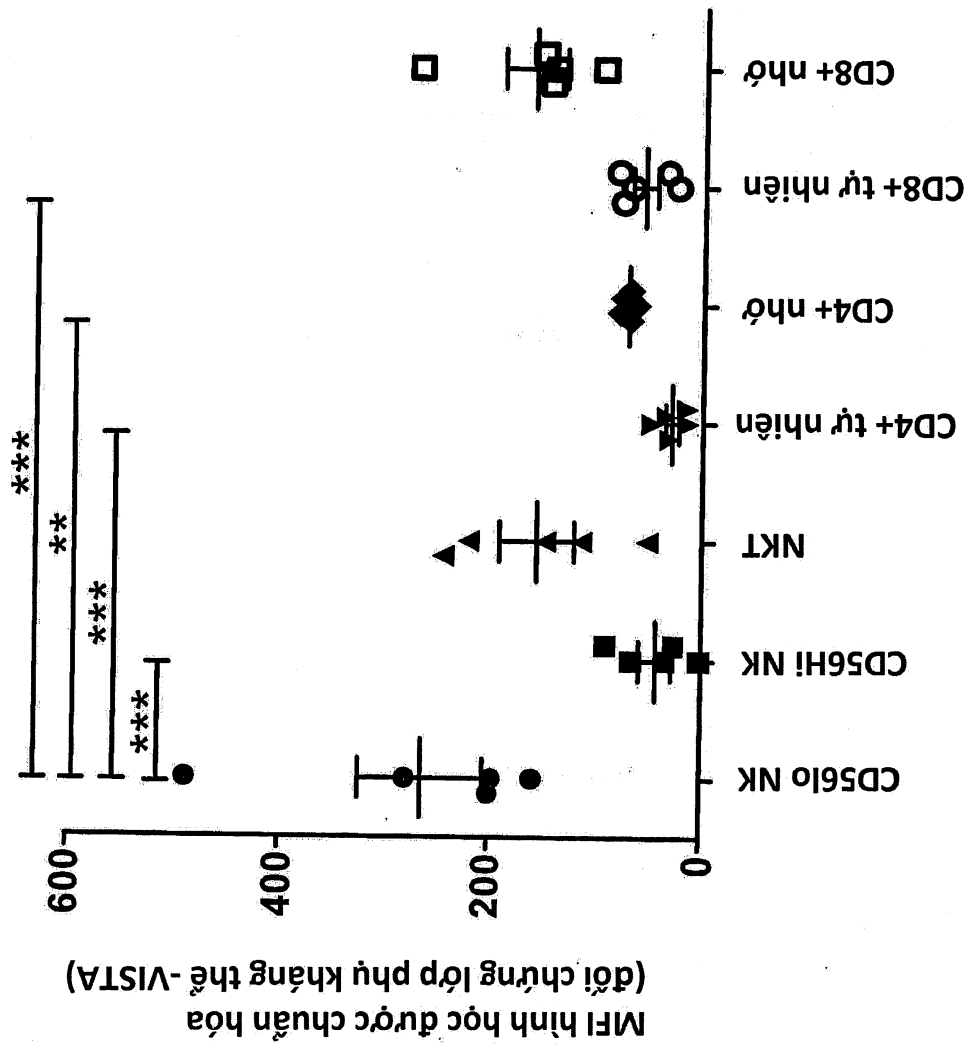


Fig. 9

10/39

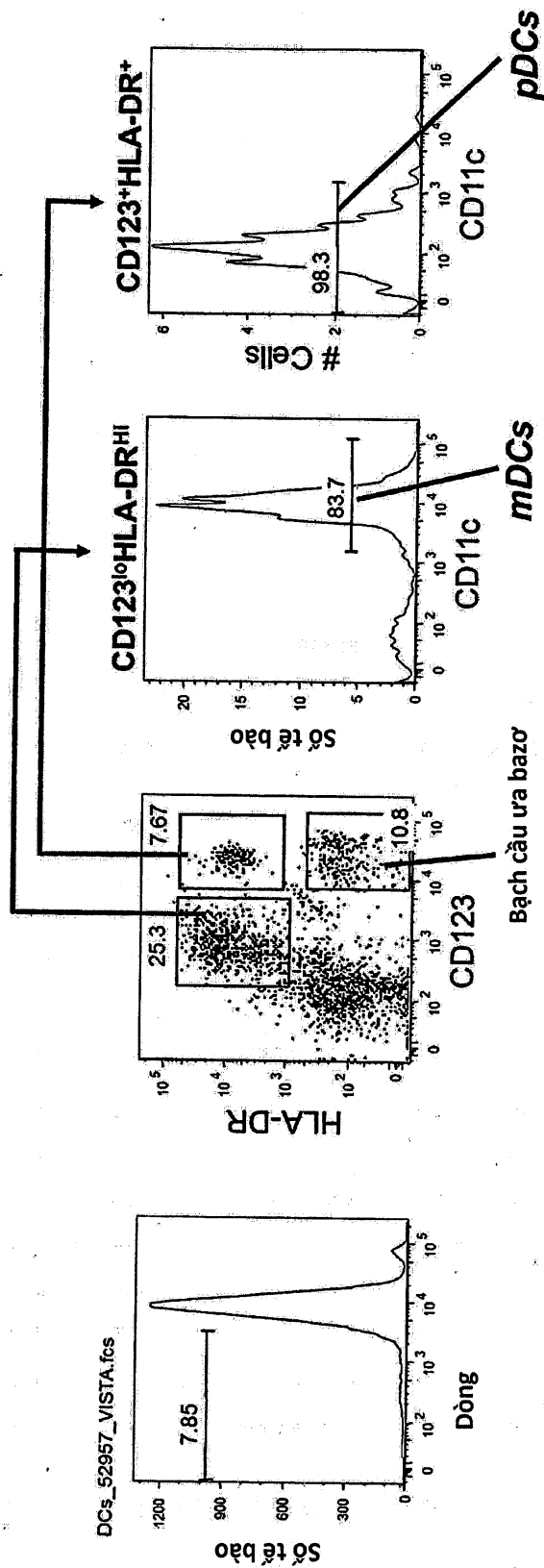


Fig. 10A

Fig. 10B

Fig. 10C

Fig. 10D

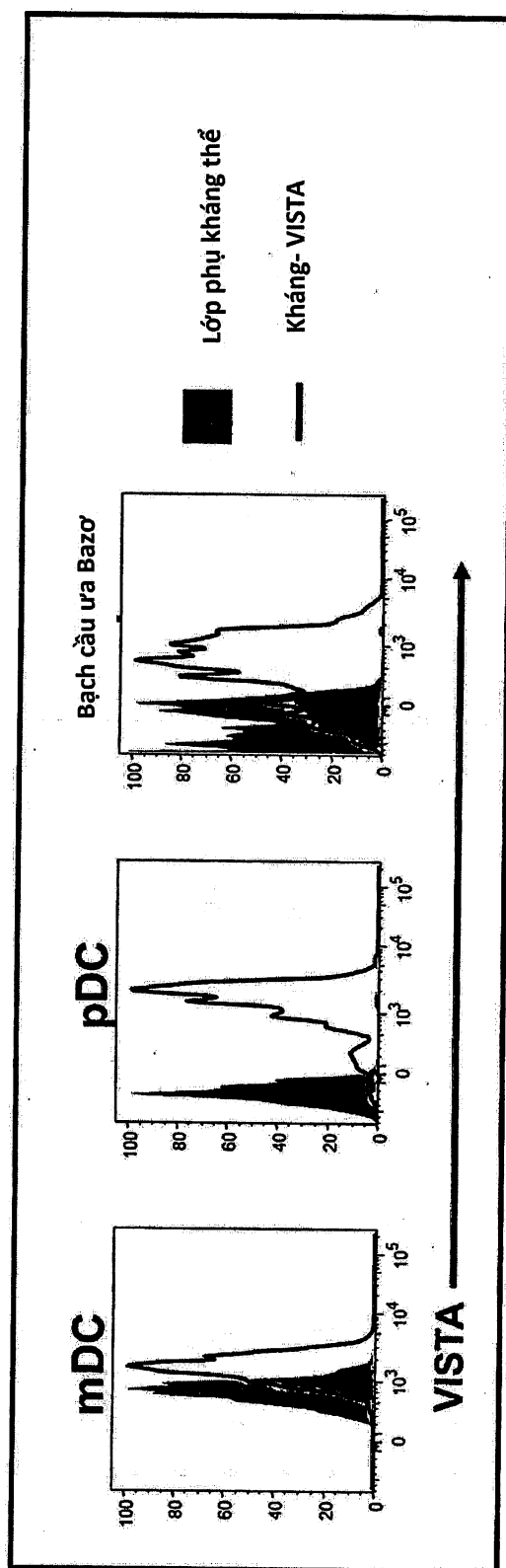


Fig. 11A

Fig. 11B

Fig. 11C

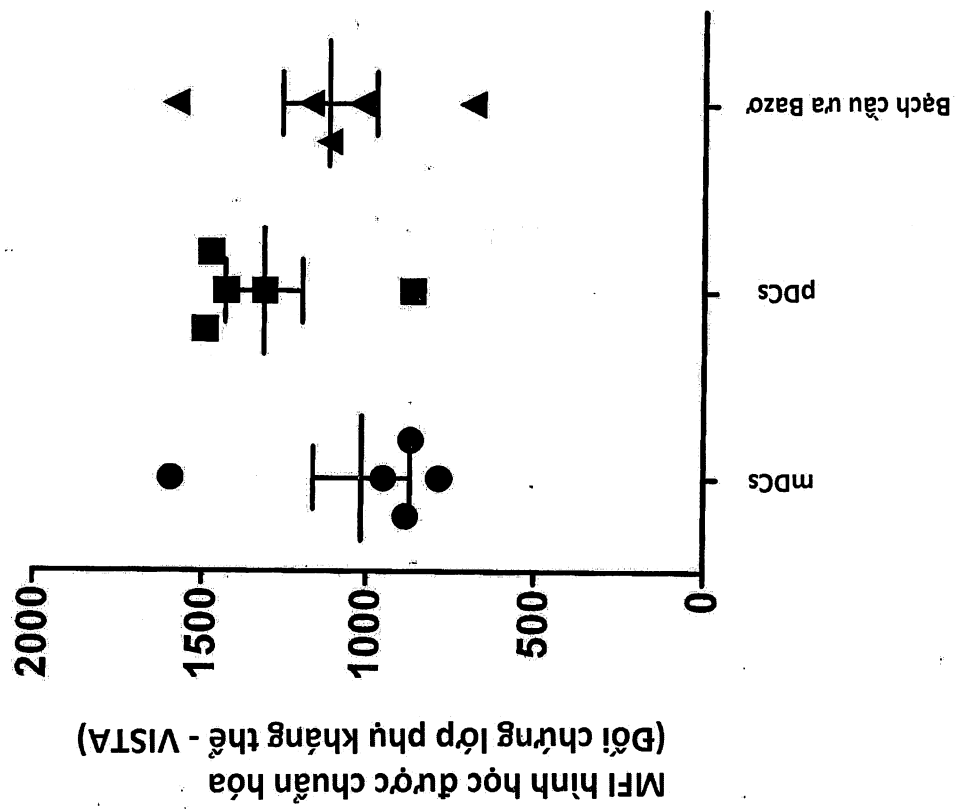


Fig. 12

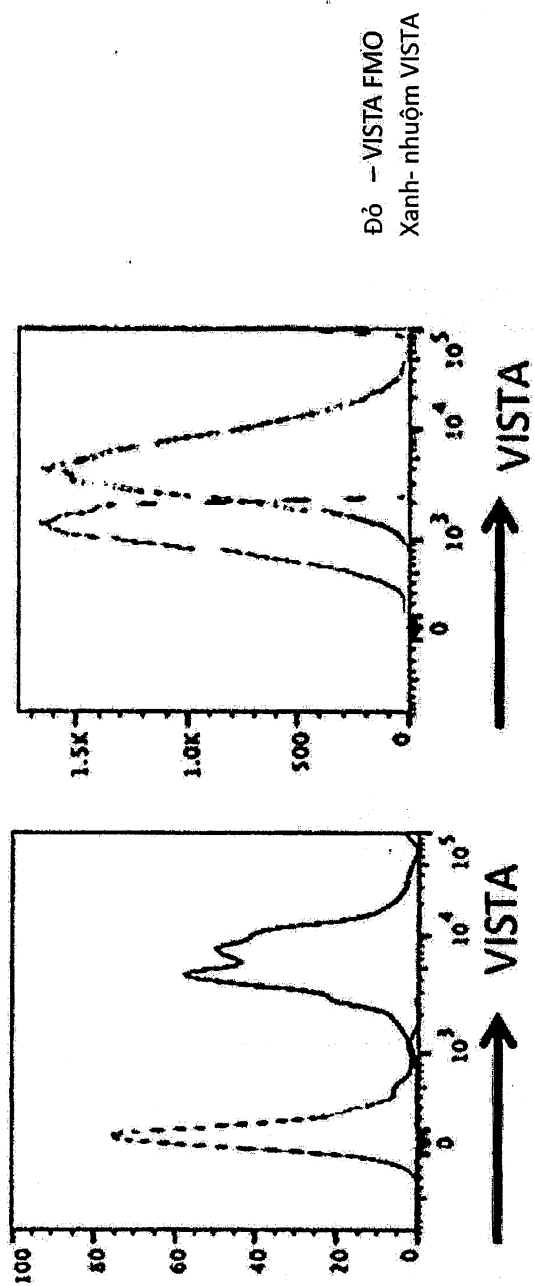


Fig. 13B

Fig. 13A

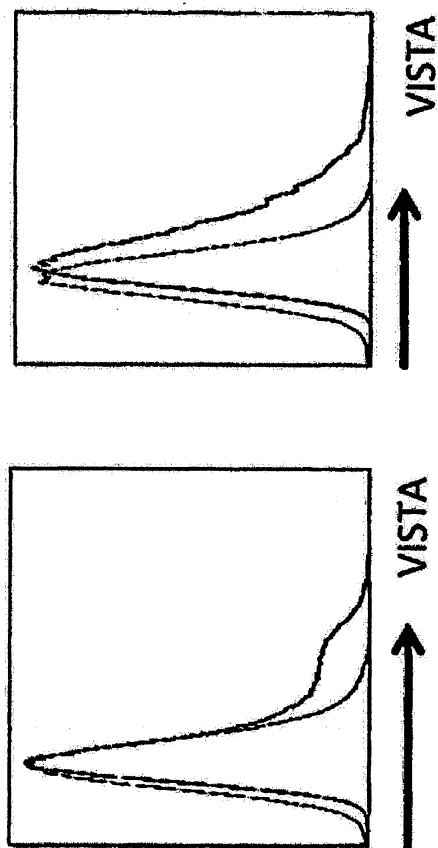


Fig. 13D

Fig. 13C

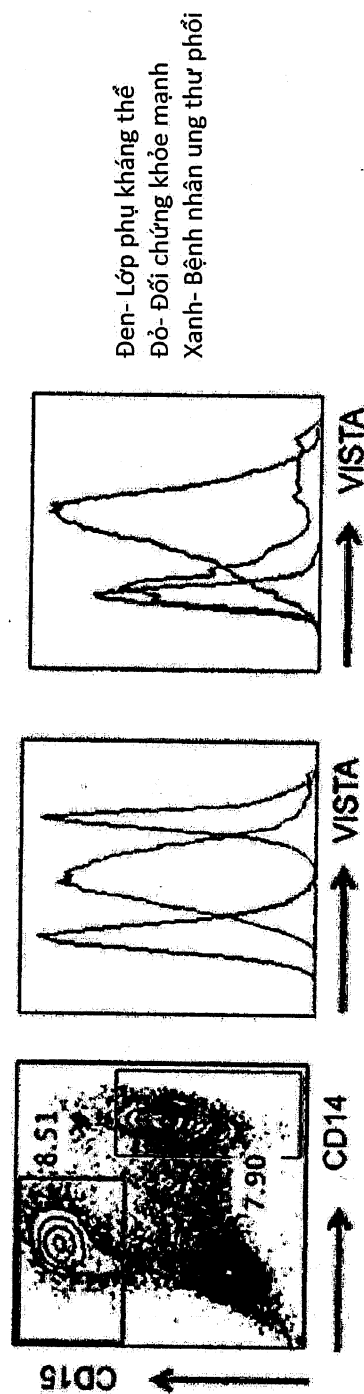


Fig. 14C

Fig. 14B

Fig. 14A

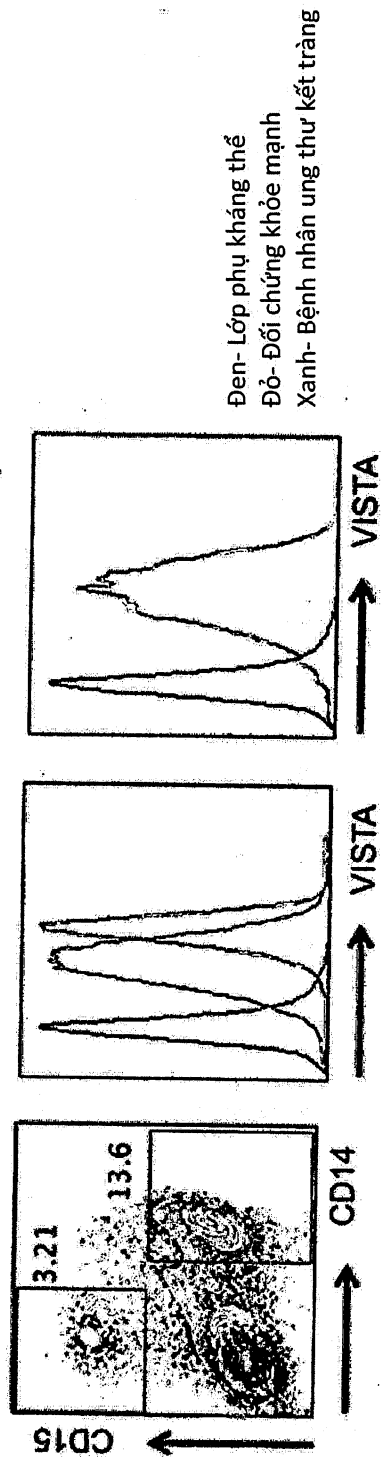


Fig. 15A

Fig. 15B

Fig. 15C

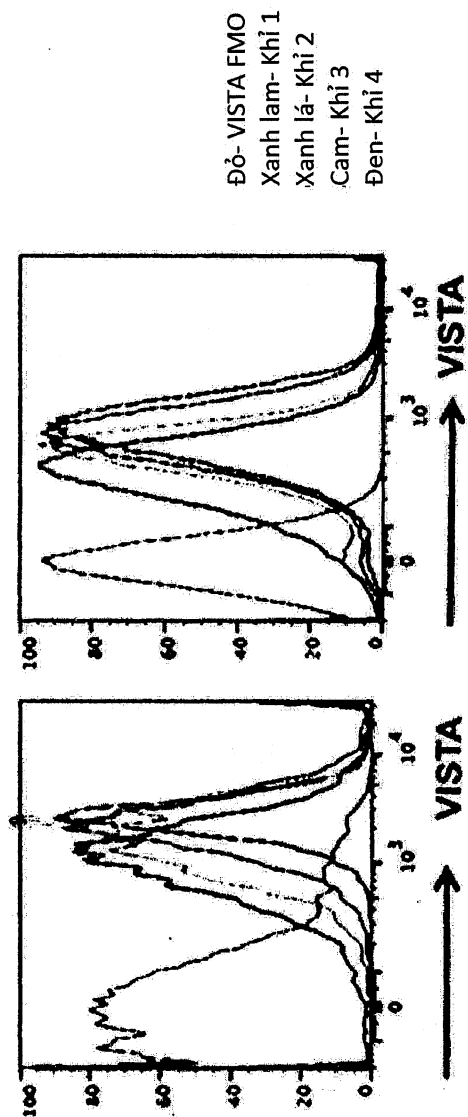


Fig. 16B

Fig. 16A

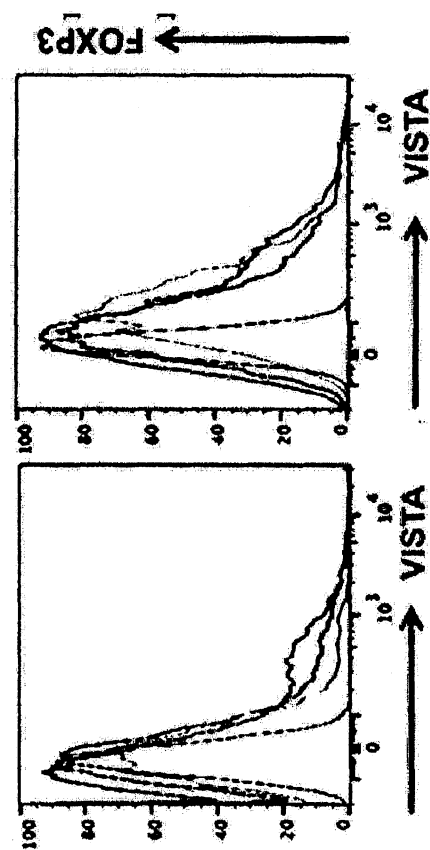


Fig. 16C

Fig. 16D

17/39

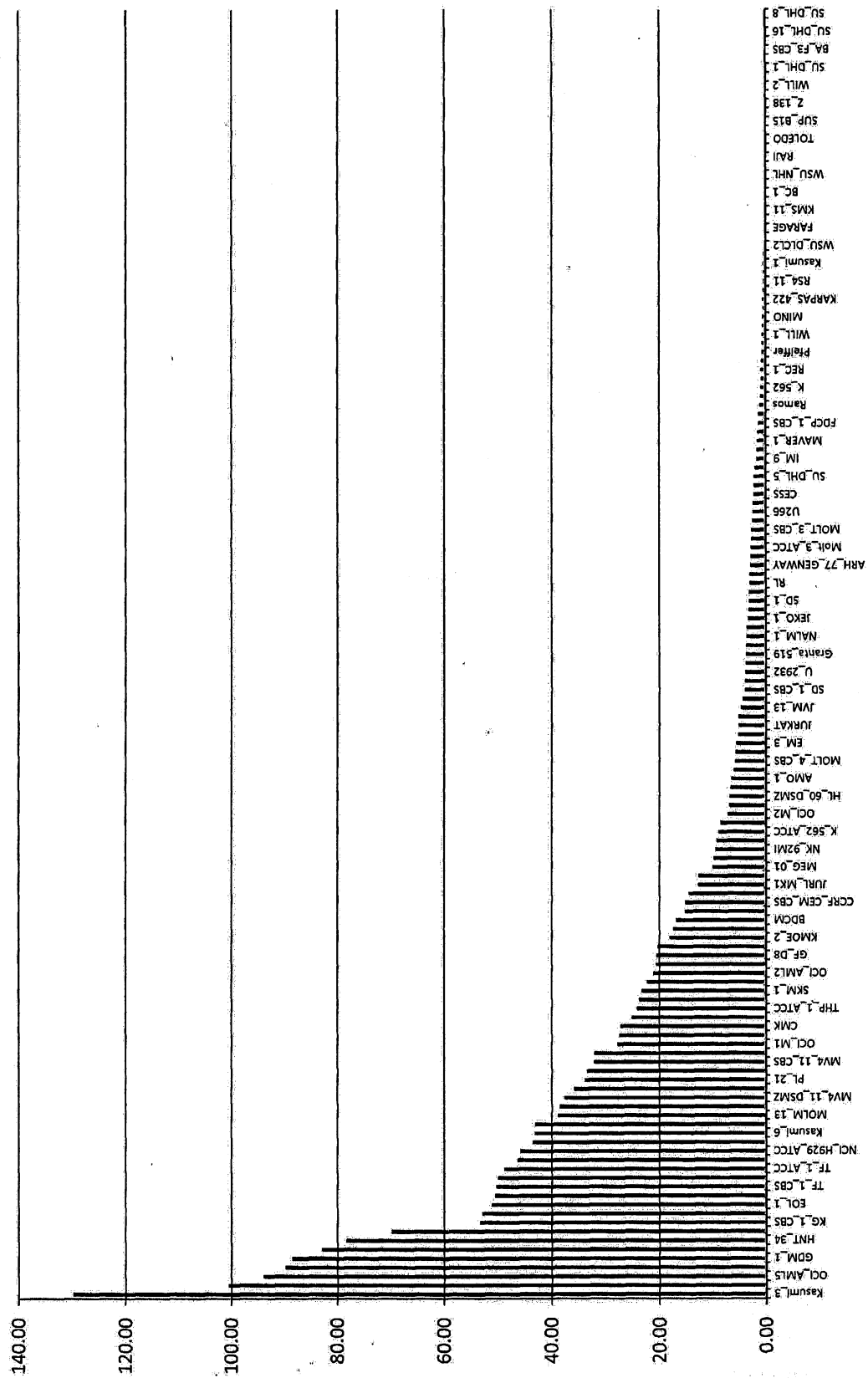


Fig. 17

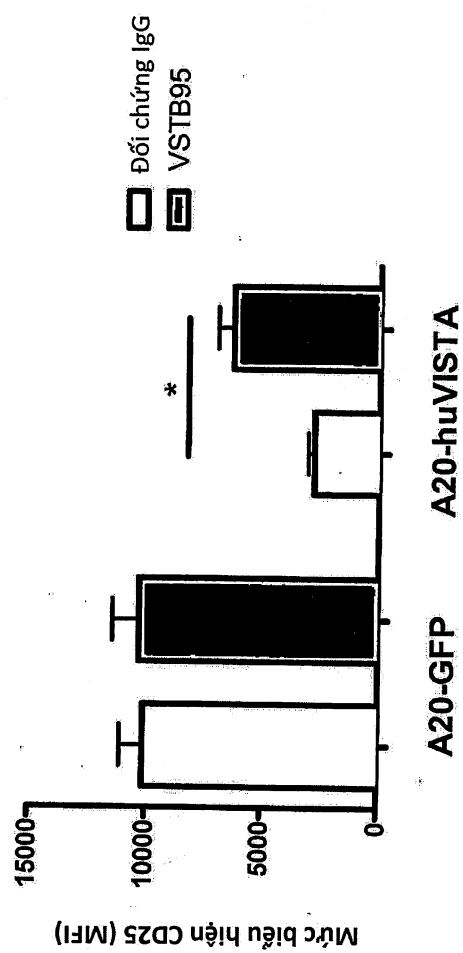


Fig. 18

Fig. 19D

9
10
11
12
14
16
17
18

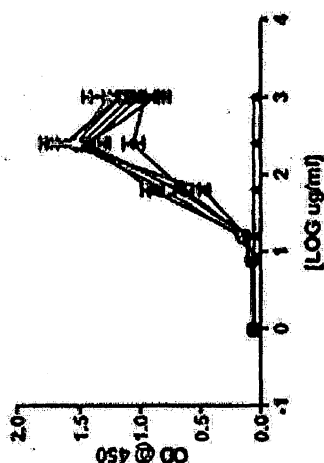


Fig. 19E

28
30
31
32
33
34
35
36

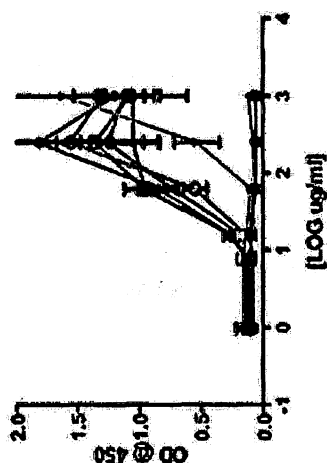


Fig. 19F

45
46
47
513
515
527
529
buffer
48
49

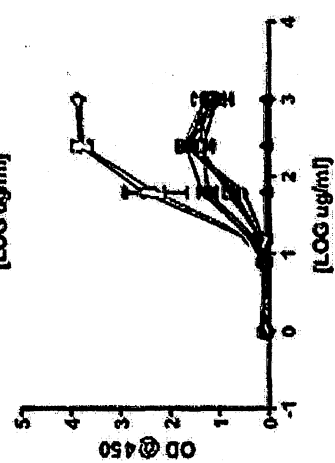


Fig. 19A

1
2
3
4
5
6
7
8

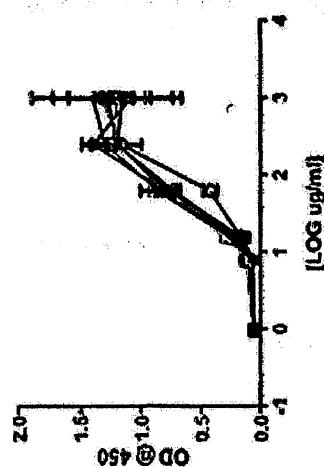


Fig. 19B

19
20
21
22
23
24
25
26

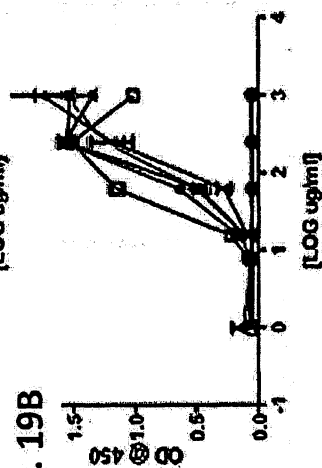
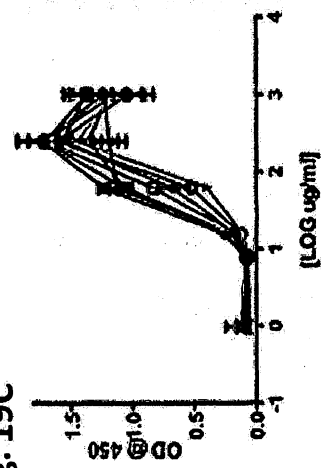


Fig. 19C

37
38
39
40
41
42
43
44



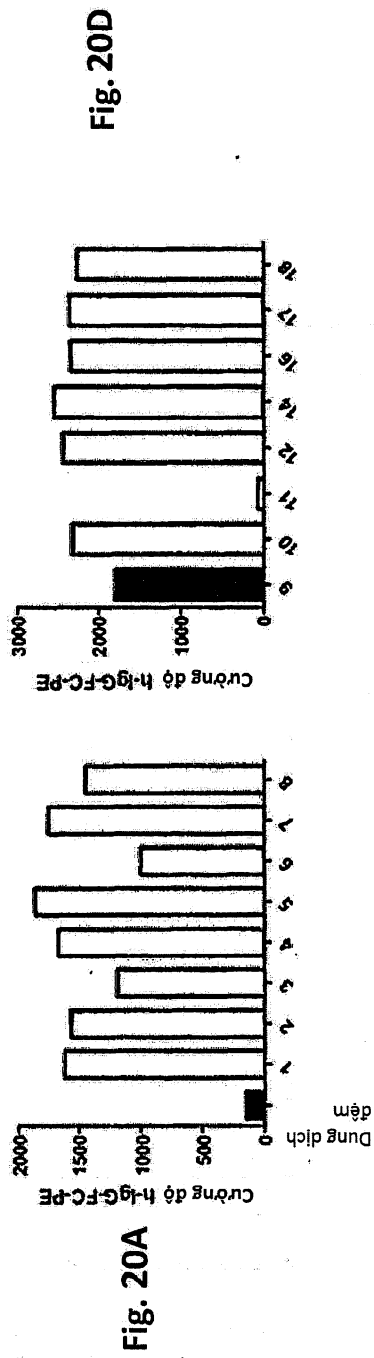


Fig. 20D

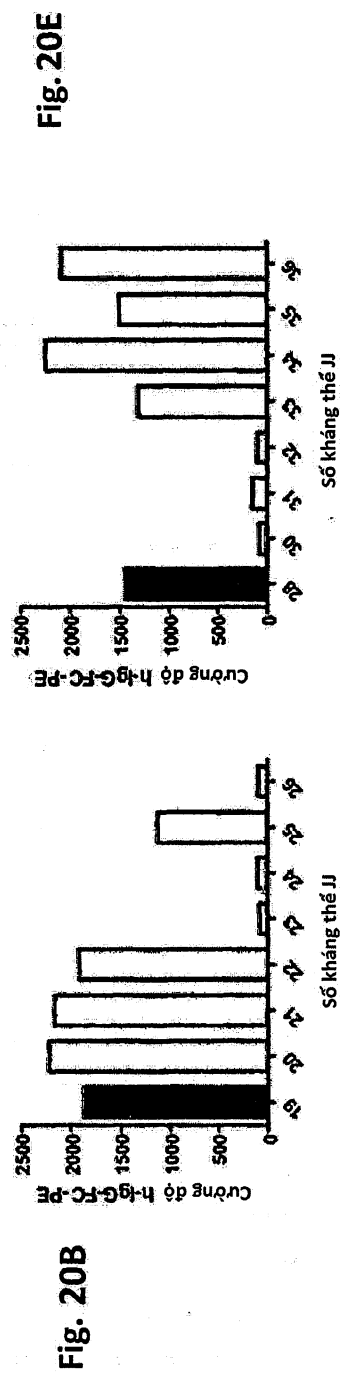


Fig. 20E

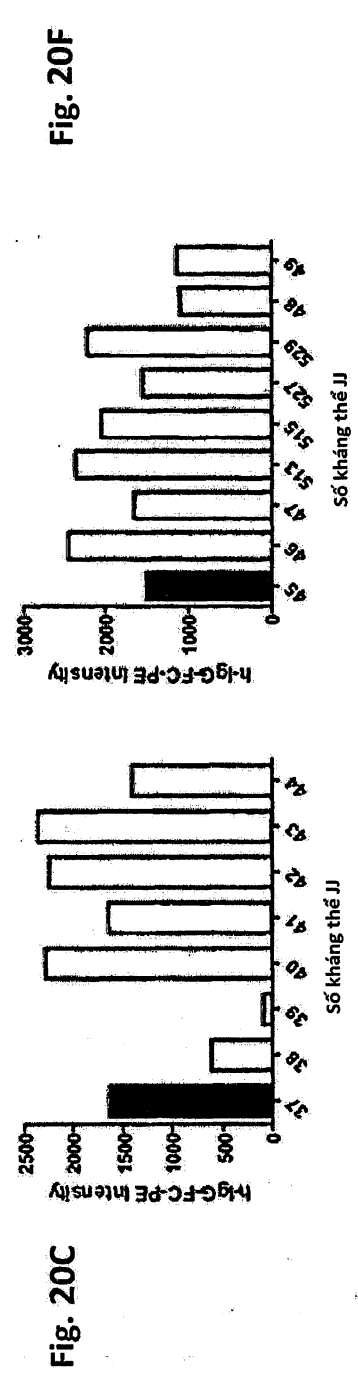


Fig. 20F

Fig. 21A

Người cho 60 -> Người cho 62

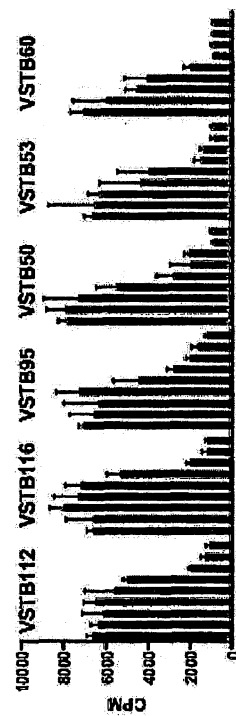
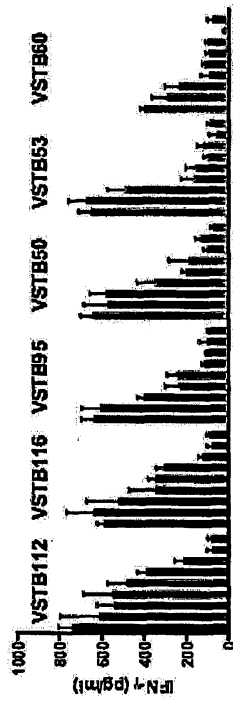
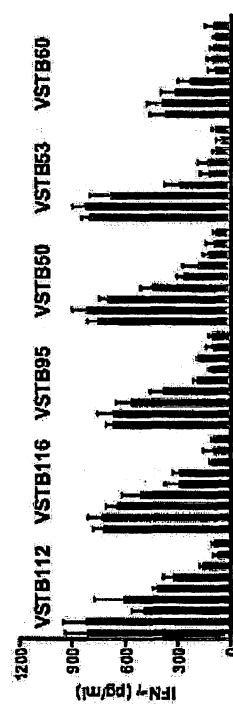
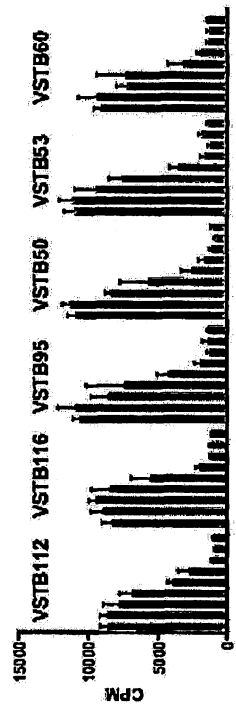


Fig. 21B

Người cho 62 -> Người cho 60

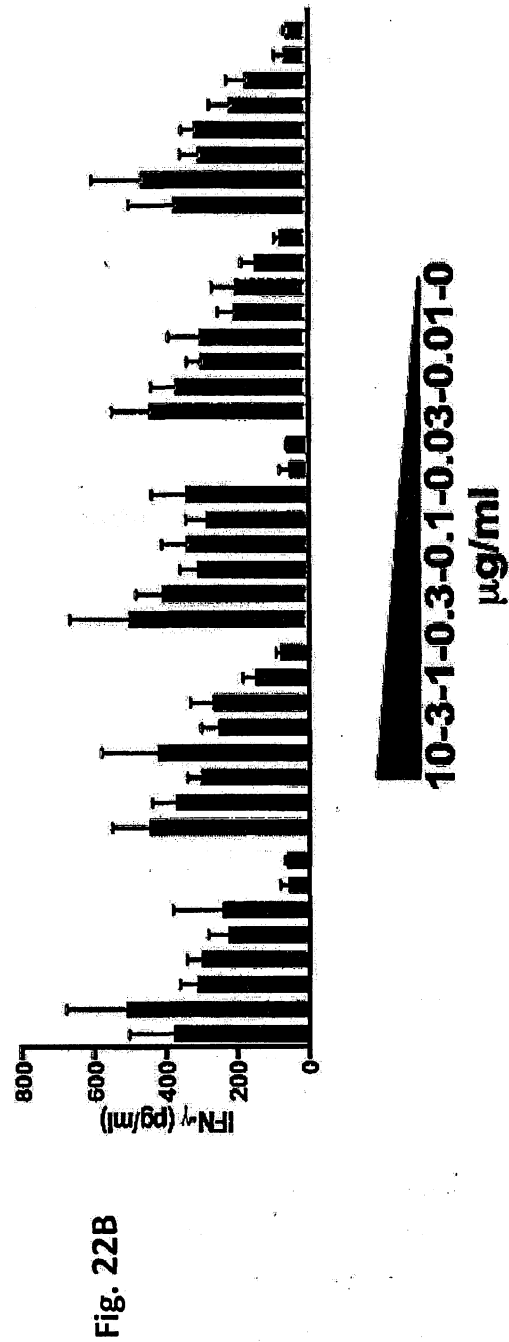
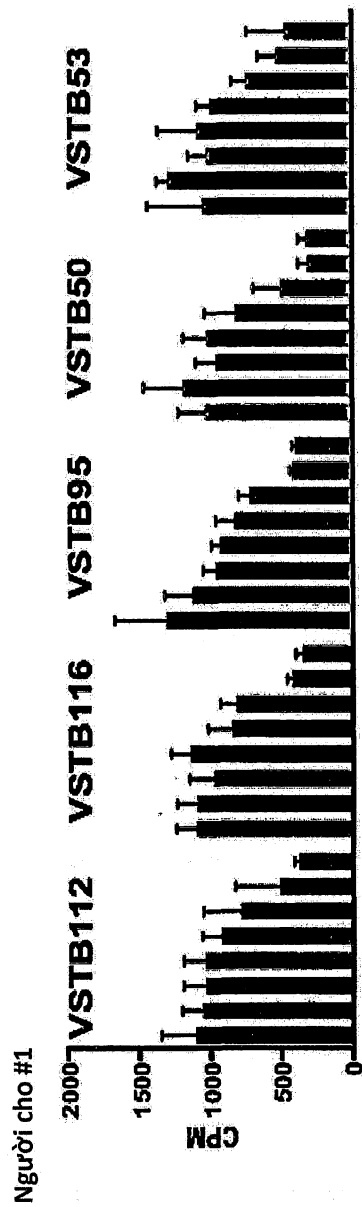


30-10-3-1-0.3-0.1-0.03-0.01-0

 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 21C

Fig. 21D



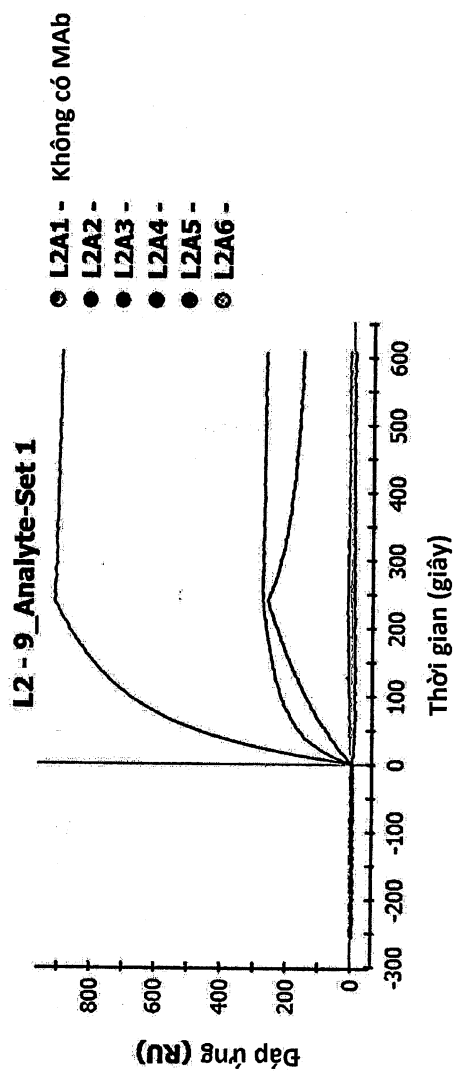


Fig. 23

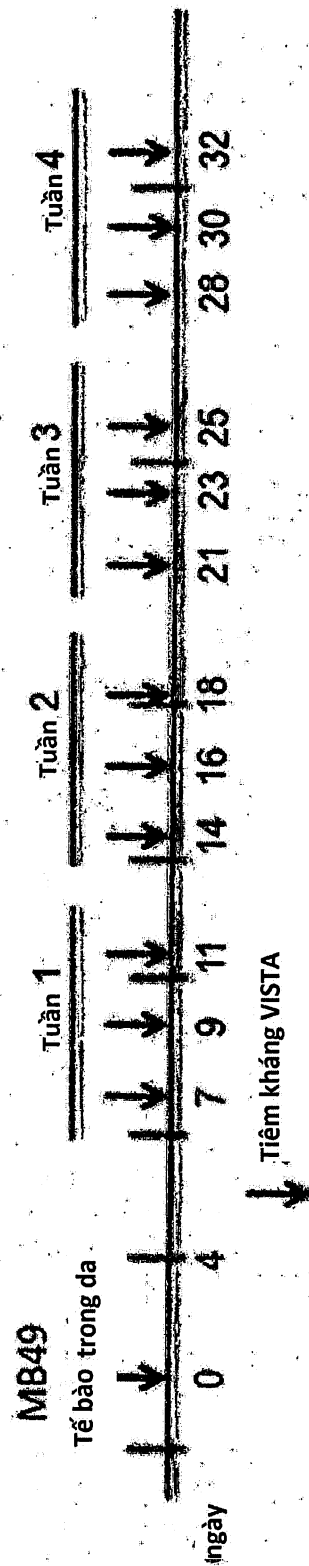


Fig. 24

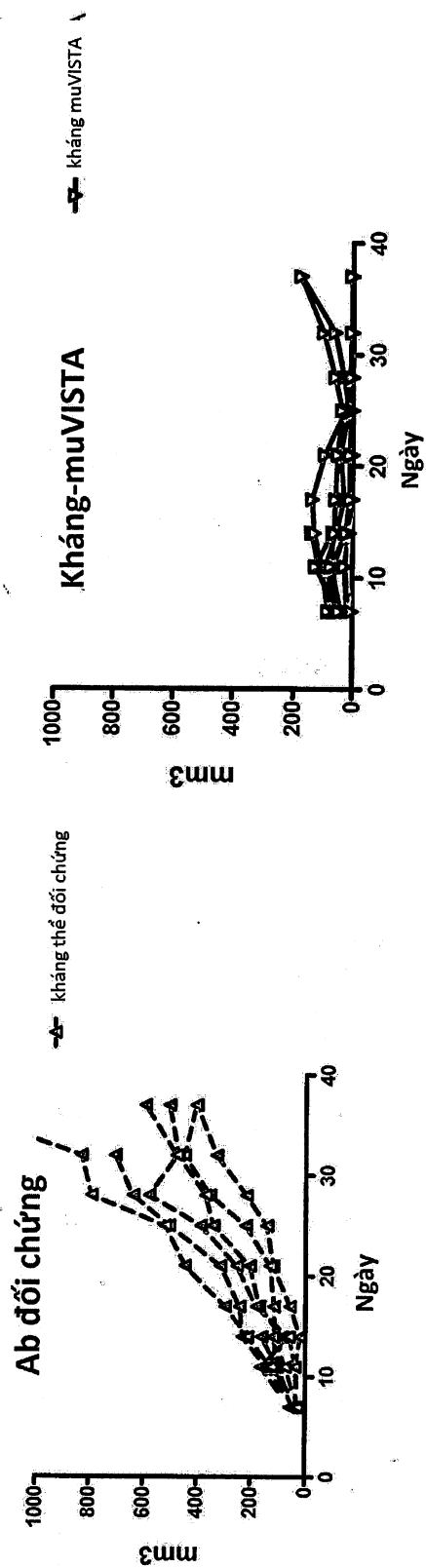


Fig. 25B

Fig. 25A

MGVPTALEAGSWRWGSLLFALFLAASLGPVAAAFKVATPYSLYVCP
EGQNVTLTCRLLGPVDKGHDVTFYKWTYRSSRGEVQTCSEERRPI
RNLTQDLHLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLEASDHHGNFSIT
MRNLTLLDSGLYCCLVVEIRHHHSEHRVHGAMELQVQTGKDAPS
NCVYPSSSQESENITAAALATGACIVGILCLPLILLVYKQ
RQAASNRRAQELVRMDSNIQGIENPGFEASPPAQGIPEAKVRHP
LSYVAQRQPSESGRHLLSEPSTPLSPPPGPDVF (SEQ ID NO:46)

Fig. 26



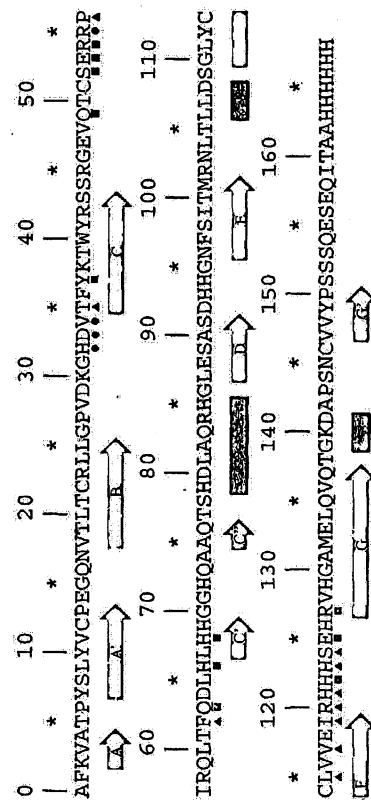
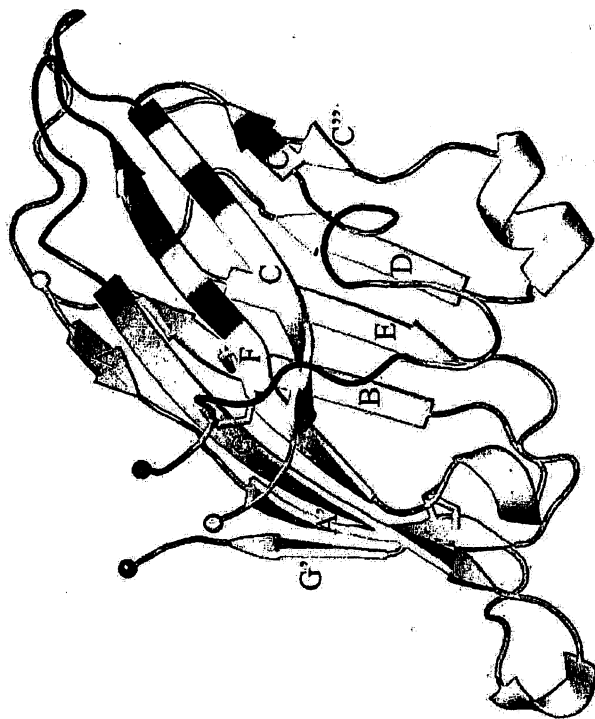


Fig. 29

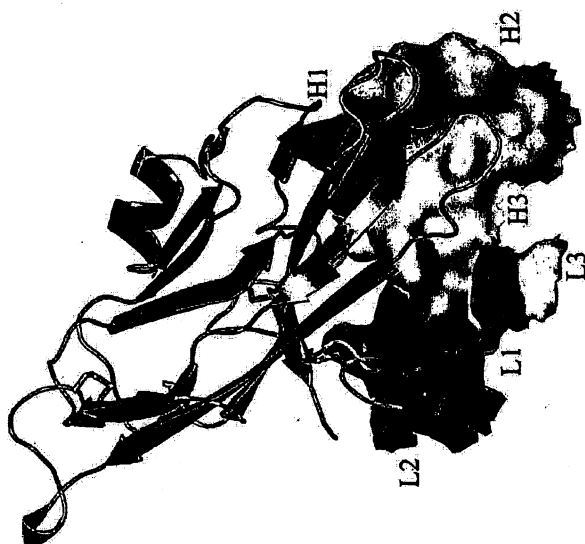
[illegible]

Fig. 30

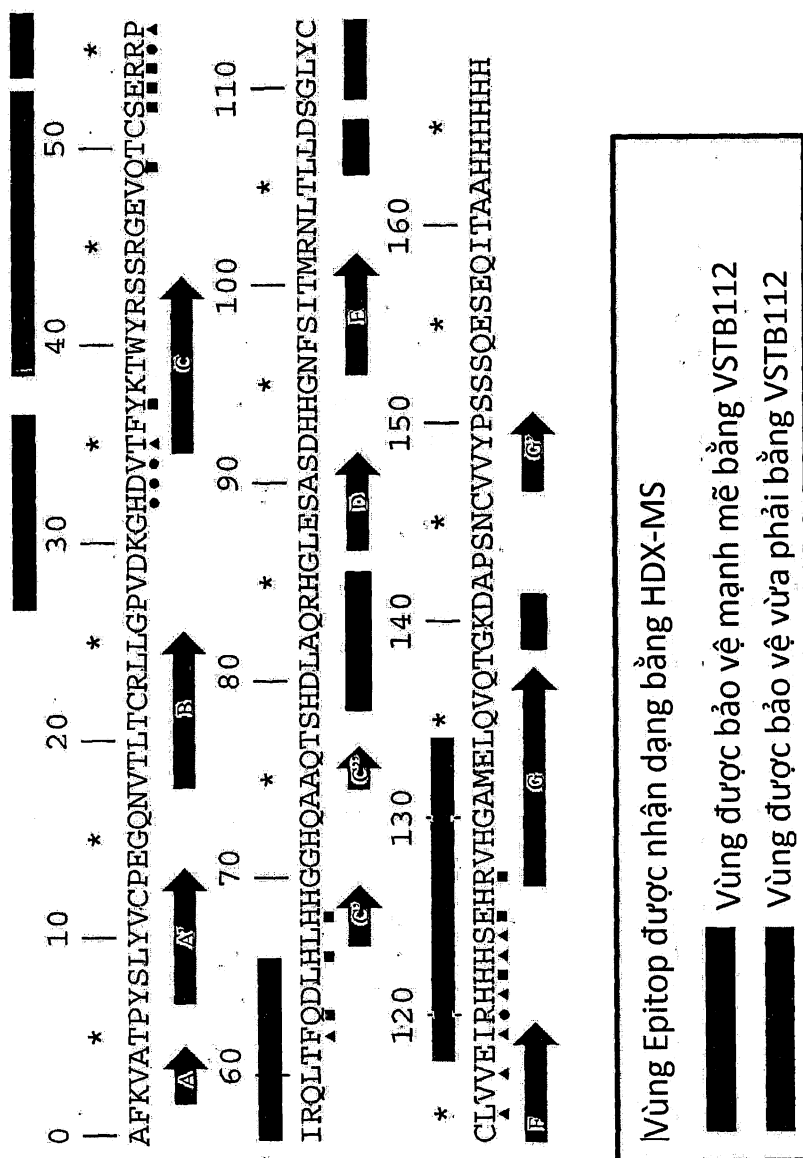


Fig. 31

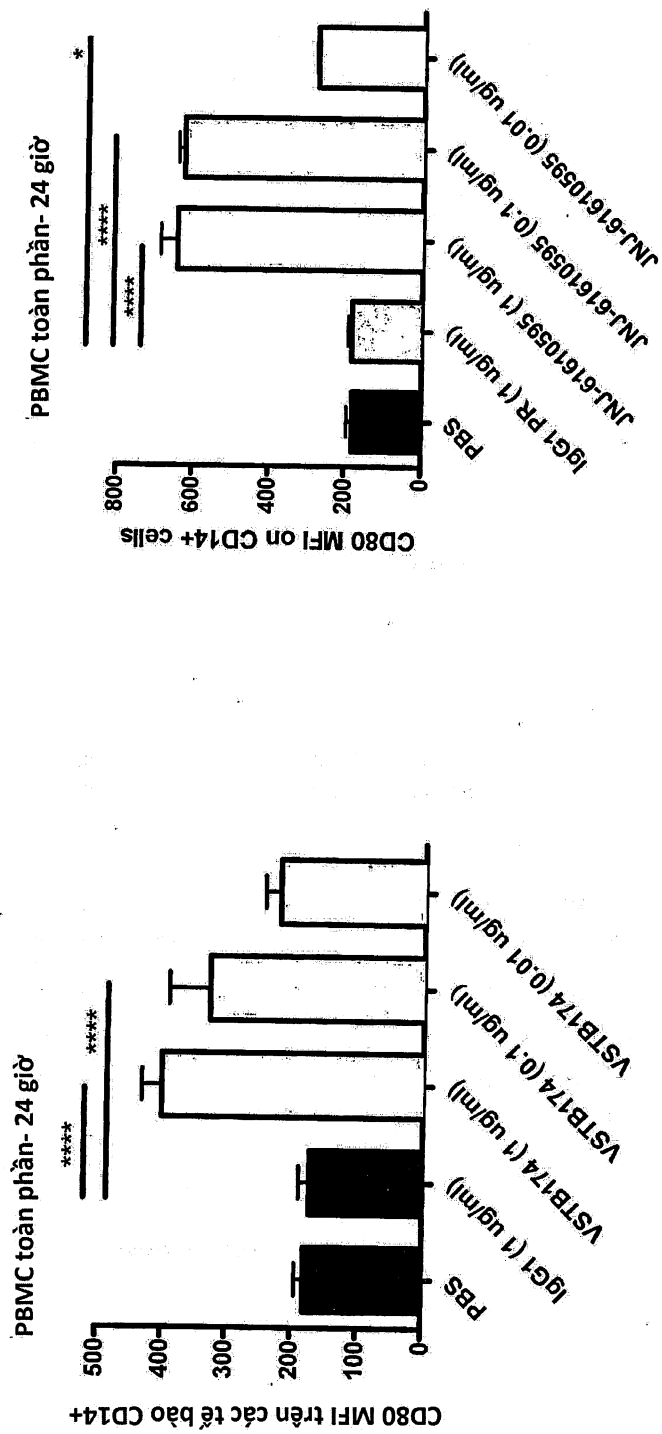


Fig. 32

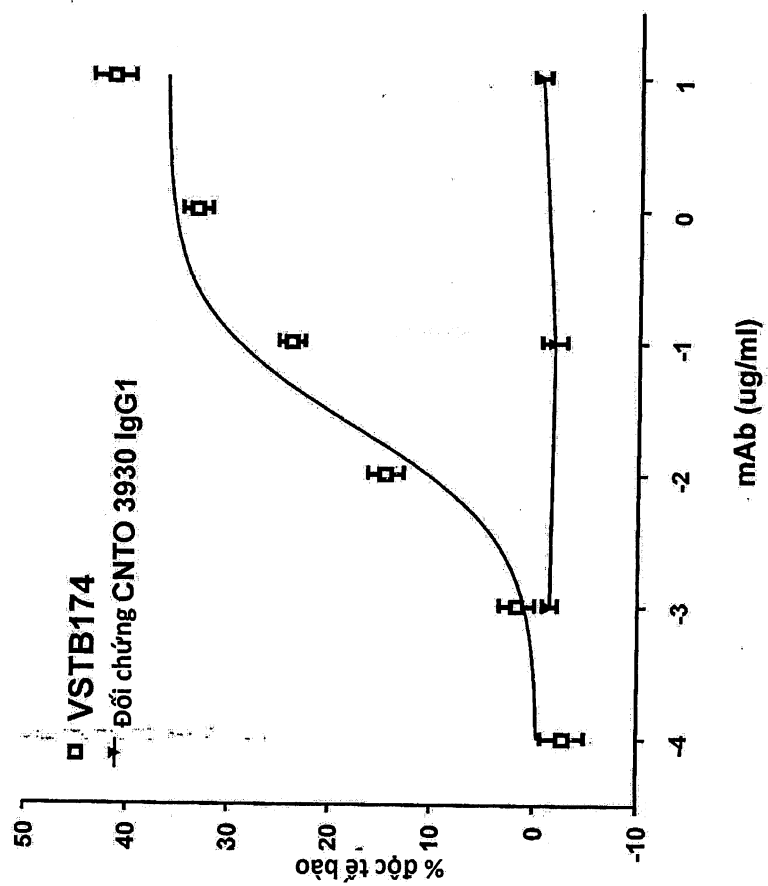


Fig. 33

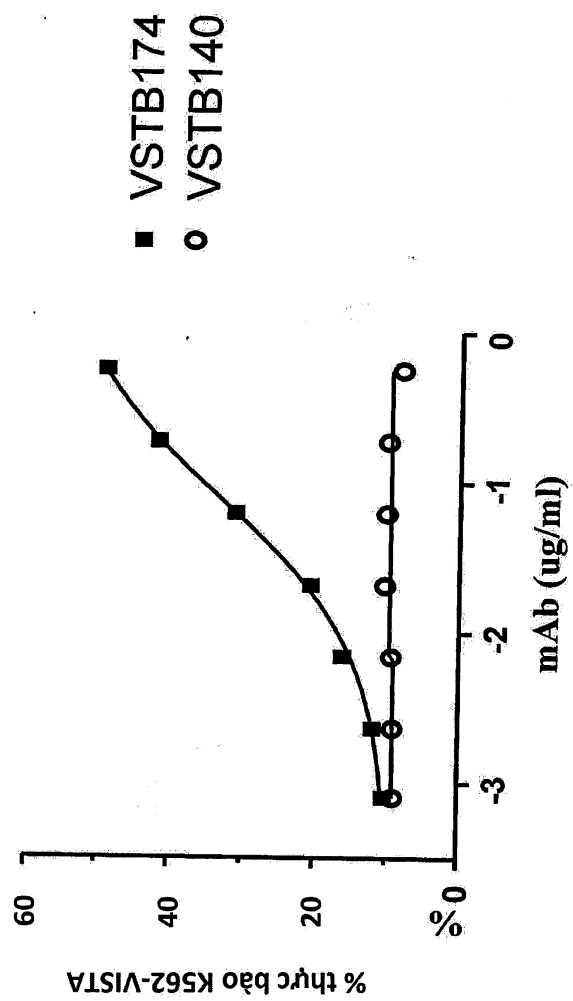


Fig. 34

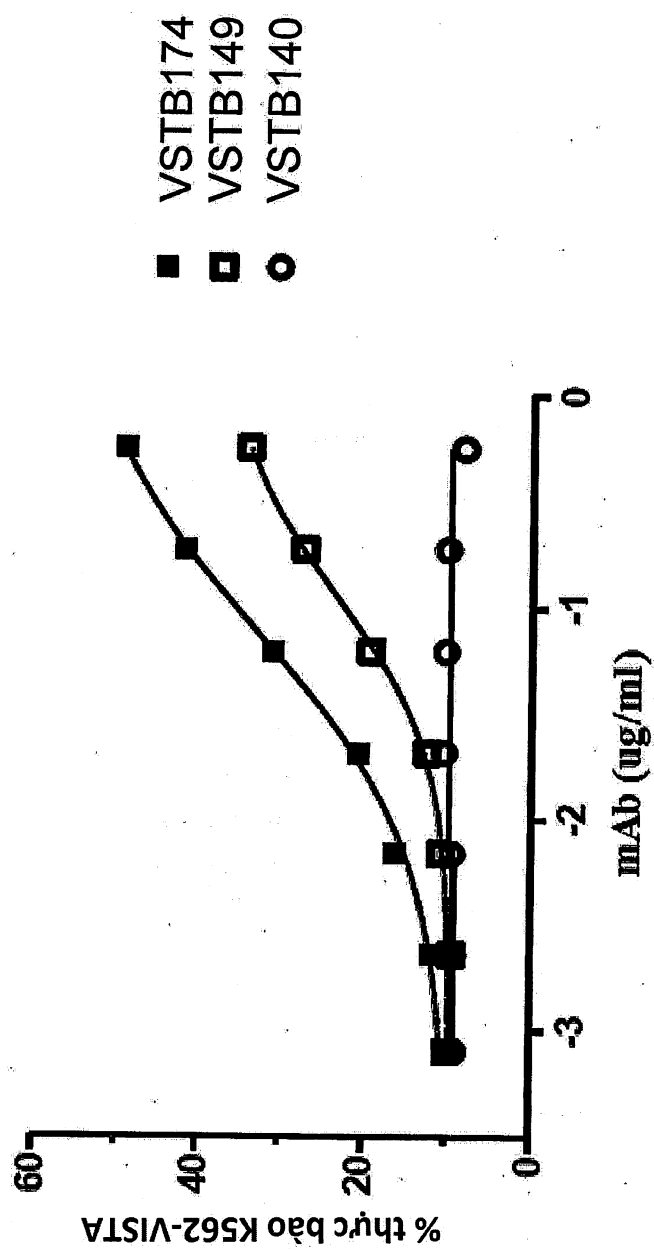


Fig. 35

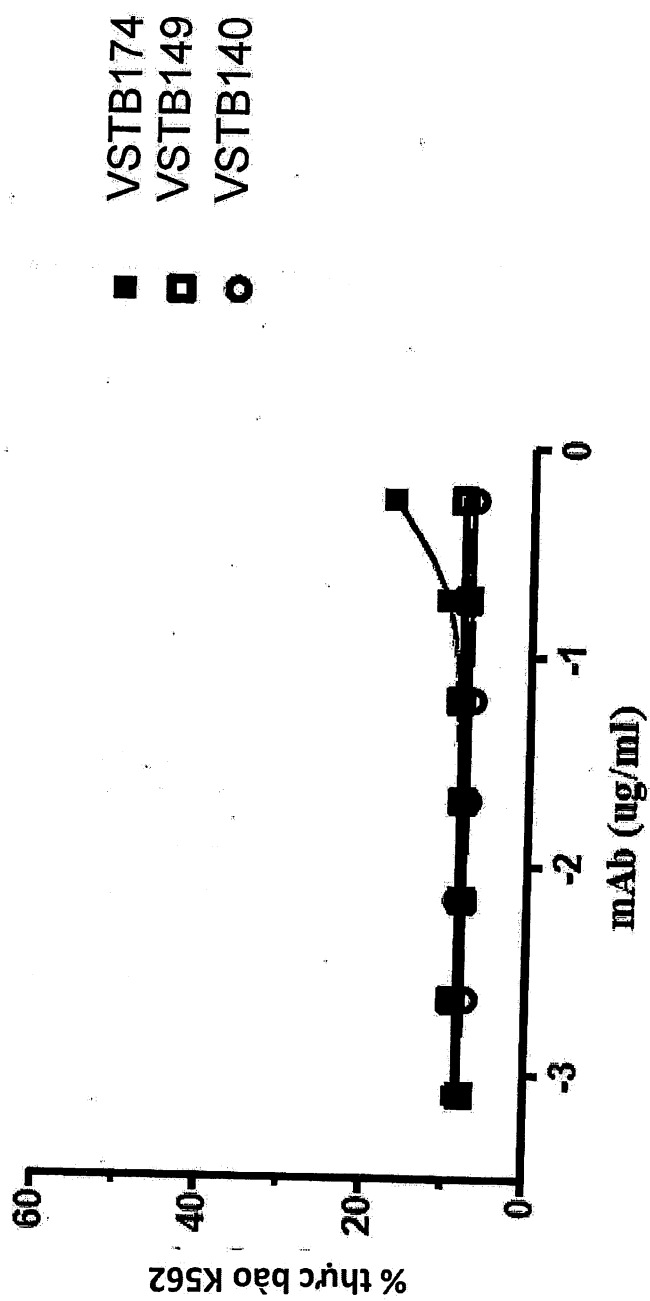


Fig. 36

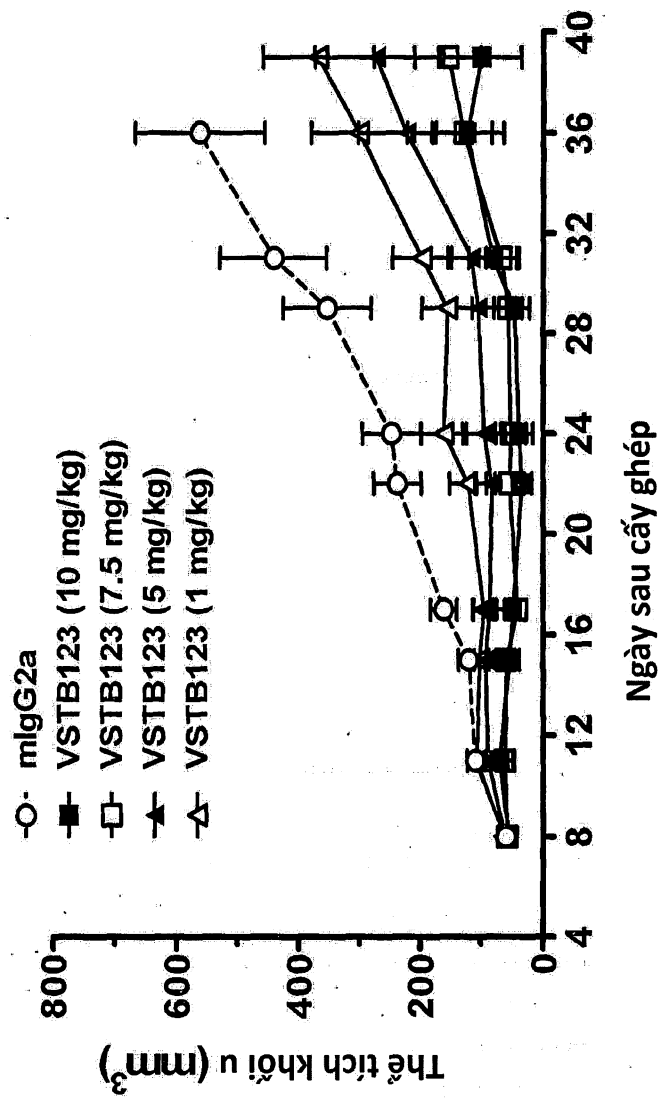


Fig. 37

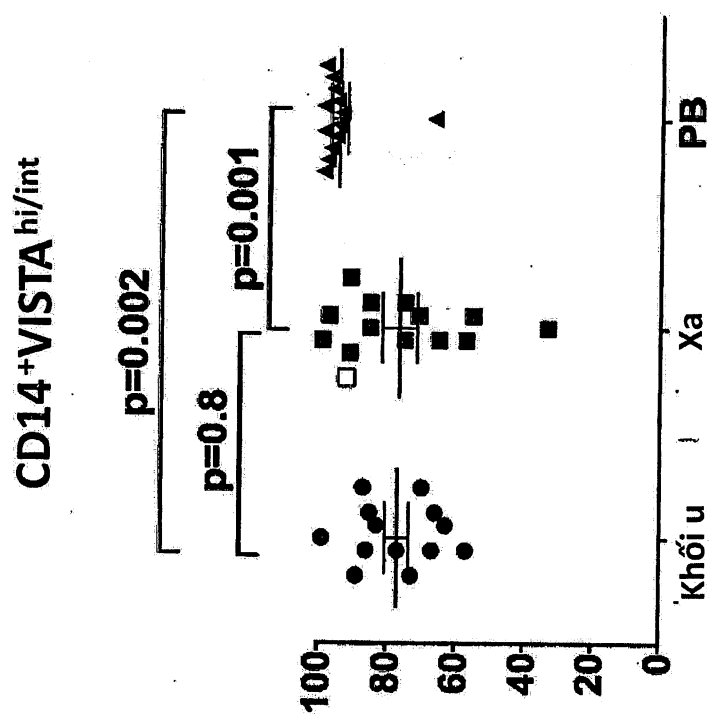


Fig. 38

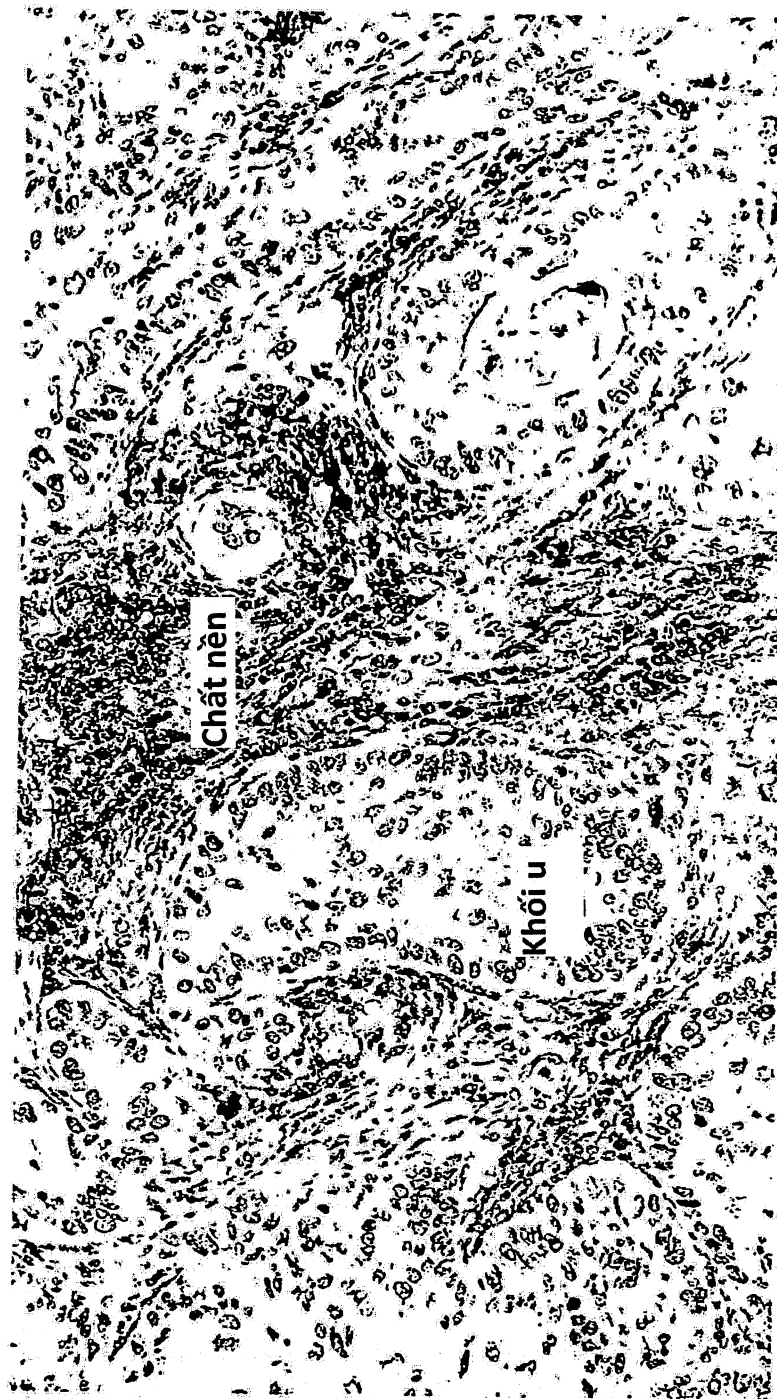


Fig. 39