



(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)



1-0037002

(51)⁸ C07K 16/28; A61P 37/06

(13) B

(21) 1-2018-01065

(22) 16/09/2016

(86) PCT/US2016/052040 16/09/2016

(87) WO2017/049024 23/03/2017

(30) 62/220,442 18/09/2015 US

(45) 25/09/2023 426

(43) 27/08/2018 365A

(73) Cephalon LLC (US)

145 Brandywine Parkway, West Chester, PA 19380, United States of America

(72) POULTON, Lynn, Dorothy (AU); POLLARD, Matthew (AU); DOYLE, Anthony, G. (AU); COOKSEY, Bridget, Ann (US); PANDE, Vanya (IN); CLARKE, Adam, William (AU).

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

(54) KHÁNG THỂ LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI PHỐI TỬ TƯƠNG TỰ YẾU TỐ HOẠI TỬ KHỐI U 1A VÀ CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể tái tổ hợp, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.21, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.17, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.18, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.19, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22, trong đó trong đó kháng thể này liên kết đặc hiệu với phối tử tương tự TNF 1A (TL1A). Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa kháng thể này, tế bào vật chủ, phương pháp sản xuất kháng thể này, phương pháp phát hiện TL1A *in vitro* trong mẫu thu được từ đối tượng, và polynucleotit.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể biến đổi liên kết đặc hiệu với TL1A, và ức chế sự tương tác giữa TL1A và thụ thể gây chết 3 (DR3). Theo một số khía cạnh, các kháng thể này còn ức chế sự tương tác giữa TL1A và thụ thể gây chết 3 (DcR3). Các kháng thể này có hiệu lực được cải thiện so với kháng thể gốc mà từ đó thu được các biến thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nhiều công bố khác nhau, bao gồm các bằng sáng chế, các đơn đã công bố, các số truy cập, các tài liệu kỹ thuật và các tài liệu học thuật được trích dẫn trong toàn bộ phần mô tả này. Mỗi tài liệu trong số các công bố được trích dẫn này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, toàn bộ và cho tất cả các mục đích, trong tài liệu này.

Phối tử tương tự TNF 1A (TL1A, còn được gọi là protein thuộc siêu họ TNF 15 (TNFSF15); TL1 và VEGI) là protein thuộc siêu họ yếu tố hoại tử khối u, mà được biểu hiện bởi các tế bào trình diện kháng nguyên (bao gồm các tế bào tua, các tế bào B và các đại thực bào), các tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ và các tế bào nội mô. TL1A có thể được biểu hiện trên bề mặt tế bào hoặc được tiết ra dưới dạng xytokin hòa tan. Thụ thể của TL1A, Thụ thể gây chết 3 (DR3) được trình diện bởi nhiều loại tế bào khác nhau, bao gồm các tế bào T CD4⁺ và CD8⁺, các tế bào NK, các tế bào NKT và các tế bào T điều hòa FOXP3⁺ (Treg) và các tế bào lympho bẩm sinh typ 2 và typ 3 (ILC2 và ILC3).

TL1A cũng có thể liên kết với thụ thể gây chết (DcR3), mà là chất ức chế cạnh tranh của DR3. DcR3 còn hoạt động như là một thụ thể gây chết của phối tử Fas (Fas-L) và protein cảm ứng được tương tự độc tố lympho mà cạnh tranh với glycoprotein D để liên kết với thụ thể gây ra sự nhiễm virus herpes trên các tế bào T (LIGHT). Do đó, DcR3 là chất điều hòa quan trọng của một số con đường truyền tín hiệu.

Con đường truyền tín hiệu TL1A/DR3 có liên quan đến một số hệ thống sinh học, đi kèm theo các bệnh ở người. Ví dụ, TL1A đã được chỉ ra là đóng vai trò trong sự miễn dịch, tạo mạch, và nội cân bằng của các mô hàng rào. Việc ức chế tương tác TL1A với DR3 cũng được chỉ ra là tăng cường lợi ích điều trị trong một số bệnh qua trung gian miễn dịch, như bệnh viêm não tủy tự miễn thí nghiệm (EAE; mô hình của bệnh đa xơ

cứng), bệnh viêm đại tràng, bệnh viêm loét đại tràng, bệnh Crohn, bệnh viêm đường ruột, bệnh ngoài da, bệnh hen và bệnh viêm khớp.

Do đó, các hợp chất ức chế hoạt tính TL1A được mong muốn, ví dụ, để sử dụng trong việc điều trị, phòng ngừa, chẩn đoán và tiên lượng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể tái tổ hợp chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.28, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.17, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.29, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.19, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.30, với điều kiện là khi vùng biến đổi chuỗi nặng này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, vùng biến đổi chuỗi nhẹ này không chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2.

Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.21, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.20. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.23, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.24, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.25, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16, vùng biến đổi

chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.26, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.21 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.21, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.24, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.21, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.25, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.21, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.26, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.21, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.27.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể tái tổ hợp chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.14, với điều kiện là khi vùng biến đổi chuỗi nặng này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, vùng biến đổi chuỗi nhẹ này không chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu

trong SEQ ID NO.1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.60. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.61. Theo một số khía cạnh, kháng thể này chứa chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.60 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.61.

Các kháng thể tái tổ hợp này tốt hơn nếu có chiều dài đầy đủ, và tốt hơn nếu là đơn dòng. Các kháng thể tái tổ hợp này liên kết với TL1A với ái lực tăng so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Các kháng thể tái tổ hợp này có hiệu lực tăng so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Hiệu lực được gia tăng này có thể là hiệu lực lớn hơn ít nhất khoảng 10 lần so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Hiệu lực được gia tăng này có thể là hiệu lực lớn hơn ít nhất khoảng 12 lần so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong

SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Hiệu lực được gia tăng này có thể là hiệu lực lớn hơn ít nhất khoảng 13 lần so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Hiệu lực được gia tăng này có thể là hiệu lực lớn hơn ít nhất khoảng 15 lần so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Hiệu lực được gia tăng này có thể là hiệu lực lớn hơn ít nhất khoảng 20 lần so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Hiệu lực được gia tăng này có thể là hiệu lực lớn hơn ít nhất khoảng 25 lần so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Hiệu lực được gia tăng này có thể là hiệu lực lớn hơn ít nhất khoảng 27 lần so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Hiệu lực được gia tăng này có thể là hiệu lực lớn hơn ít nhất khoảng 40 lần so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Số lần tăng hiệu lực có thể được xác định theo thử nghiệm hiệu lực caspaza được cảm ứng bởi TL1A trong tế bào TF-1.

Các kháng thể tái tổ hợp này có thể chứa vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 của người, vùng hằng định chuỗi nặng IgG2 của người, hoặc vùng hằng định chuỗi nặng IgG4 người, hoặc allotyp bất kỳ của chúng. Vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 của người có thể chứa SEQ ID NO.42, hoặc SEQ ID NO.43 (IgG1 của người Δ K), hoặc SEQ ID NO.44 (IgG1 của người với YTE), hoặc SEQ ID NO.64 (IgG1 của người với YTE và Δ K), hoặc SEQ ID NO.63 (IgG1 của người với L234A, L235A, G237A) hoặc SEQ ID NO.62 (IgG1 của người với L234A, L235A, G237A và Δ K), hoặc SEQ ID NO.65 (IgG1 của người với L235A và G237A) hoặc SEQ ID NO.66 (IgG1 của người với L235A, G237A và Δ K). Vùng hằng định chuỗi nặng IgG2 của người có thể chứa SEQ ID NO.67, hoặc SEQ ID NO.70 (IgG2 của người Δ K), hoặc SEQ ID NO.71 (IgG2 của người với A330S, P331S), hoặc SEQ ID NO.68 (IgG2 của người với A330S, P331S và Δ K). Vùng hằng định IgG4 chuỗi nặng IgG4 người có thể chứa SEQ ID NO.45, hoặc SEQ ID NO.46

(IgG4 người với S228P và Δ K), hoặc SEQ ID NO.47 (IgG4 người với S228P và YTE), hoặc SEQ ID NO.69 (IgG4 người với S228P, YTE và Δ K). Sẽ được hiểu là chuỗi nặng IgG4 có thể được sử dụng mà không đột biến thể ổn định S228P (ví dụ, IgG4 với một mình YTE, hoặc IgG4 với YTE và Δ K, hoặc IgG4 với một mình Δ K).

Các kháng thể tái tổ hợp có thể chứa vùng hằng định chuỗi nhẹ lambda của người hoặc allotyp của chúng. Vùng hằng định lambda chuỗi nhẹ của người có thể chứa SEQ ID NO.48.

Các kháng thể tái tổ hợp này liên kết với TL1A người, và có thể liên kết với TL1A của động vật linh trưởng không phải là người, hoặc TL1A của động vật có vú không phải là người như chuột nhắt, chuột cống, chuột lang, mèo, chó, thỏ hoặc lợn.

Các kháng thể tái tổ hợp này có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh đường hô hấp, phương pháp điều trị bệnh đường tiêu hóa, phương pháp điều trị bệnh ngoài da, hoặc phương pháp điều trị bệnh viêm khớp, hoặc có thể được sử dụng để điều trị bệnh đường hô hấp, bệnh đường tiêu hóa, bệnh ngoài da, hoặc bệnh viêm khớp, hoặc có thể được sử dụng để sản xuất thuốc để điều trị bệnh đường hô hấp, bệnh đường tiêu hóa, bệnh ngoài da, hoặc bệnh viêm khớp. Bệnh đường hô hấp này có thể bao gồm một hoặc nhiều trong số bệnh hen, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh xơ hóa phổi, bệnh sarcoid phổi, bệnh viêm mũi dị ứng, hoặc bệnh xơ hóa nang. Bệnh đường tiêu hóa này có thể bao gồm một hoặc nhiều trong số bệnh viêm đường ruột, bệnh Crohn, bệnh viêm đại tràng, bệnh viêm loét đại tràng, bệnh viêm thực quản tăng bạch cầu ưa eosin, hoặc hội chứng ruột kích thích, hoặc bệnh đường tiêu hóa hoặc tình trạng bị gây ra bởi bệnh xơ hóa nang. Bệnh viêm khớp có thể bao gồm bệnh viêm khớp dạng thấp. Bệnh ngoài da có thể bao gồm một hoặc nhiều trong số bệnh viêm da cơ địa, eczema, và bệnh xơ cứng bì.

Các đối tượng là người, đối tượng là động vật linh trưởng không phải là người, hoặc đối tượng là động vật có vú không phải là người cần được điều trị có thể được điều trị bằng các kháng thể hoặc chế phẩm chứa các kháng thể này, ví dụ, bằng cách sử dụng các kháng thể hoặc chế phẩm của chúng cho đối tượng này. Việc sử dụng có thể là ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, dưới da và/hoặc trong tĩnh mạch.

Các kháng thể tái tổ hợp này có thể được sử dụng trong phương pháp phát hiện TL1A trên bề mặt tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC). Phương pháp này bao gồm cho

kháng thể liên kết với TL1A như được mô tả hoặc lấy ví dụ ở đây tiếp xúc với PBMC thu được từ đối tượng, và phát hiện kháng thể đã liên kết với TL1A trên bề mặt của PBMC. Phương pháp này có thể bao gồm thêm bước định lượng lượng TL1A trên các PBMC. Phương pháp này có thể bao gồm thêm bước thu các PBMC từ đối tượng này.

Các kháng thể tái tổ hợp này có thể được sử dụng trong phương pháp phát hiện TL1A trong huyết thanh máu. Phương pháp này bao gồm cho kháng thể liên kết với TL1A như được mô tả hoặc lấy ví dụ ở đây tiếp xúc với huyết thanh máu thu được từ đối tượng, và phát hiện kháng thể đã liên kết với TL1A trong huyết thanh. Phương pháp này có thể bao gồm thêm bước định lượng lượng TL1A trong huyết thanh máu. Phương pháp này có thể bao gồm thêm bước thu huyết thanh từ máu thu được từ đối tượng này. Phương pháp này có thể bao gồm thêm bước lấy máu từ đối tượng này.

Các polynucleotit mã hóa một hoặc nhiều vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể này được đề cập đến. Các polynucleotit này có thể mã hóa thêm vùng hằng định chuỗi nặng và/hoặc vùng hằng định chuỗi nhẹ.

Theo một số khía cạnh, polynucleotit chứa trình tự axit amin mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, ví dụ, trình tự axit nucleic chứa SEQ ID NO.51 hoặc SEQ ID NO.58. Theo một số khía cạnh, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2, ví dụ, trình tự axit nucleic chứa SEQ ID NO.50. Theo một số khía cạnh, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4, ví dụ, trình tự axit nucleic chứa SEQ ID NO.52 hoặc SEQ ID NO.59. Theo một số khía cạnh, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6, ví dụ, trình tự axit nucleic chứa SEQ ID NO.54. Theo một số khía cạnh, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7, ví dụ, trình tự axit nucleic chứa SEQ ID NO.55. Theo một số khía cạnh, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8, ví dụ, trình tự axit nucleic chứa SEQ ID NO.56. Theo một số khía cạnh, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có

trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10, ví dụ, trình tự axit nucleic chứa SEQ ID NO.57.

Theo một số khía cạnh, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, ví dụ, trình tự axit nucleic chứa SEQ ID NO.49. Theo một số khía cạnh, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4, ví dụ, trình tự axit nucleic chứa SEQ ID NO.52. Theo một số khía cạnh, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5, ví dụ, trình tự axit nucleic chứa SEQ ID NO.53. Theo một số khía cạnh, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6, ví dụ, trình tự axit nucleic chứa SEQ ID NO.54. Theo một số khía cạnh, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7, ví dụ, trình tự axit nucleic chứa SEQ ID NO.55. Theo một số khía cạnh, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8, ví dụ, trình tự axit nucleic chứa SEQ ID NO.56.

Vector chứa một hoặc nhiều polynucleotit này được đề cập đến. Các tế bào được biến nạp với một hoặc nhiều polynucleotit hoặc vector này được đề cập đến. Các tế bào được biến nạp có thể là tế bào của động vật có vú, và tốt hơn nếu là tế bào chủ biểu hiện của động vật có vú như các tế bào CHO, tế bào NS0, hoặc tế bào HEK293.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện các vị trí và các đặc điểm nhận biết của mỗi đột biến thể axit amin đơn được tạo ra cho vùng CDR1 hoặc CDR2 hoặc cho các gốc axit amin đã chọn liên kề với CDR2 của chuỗi nặng biến đổi kháng thể gốc (320-179). Các vùng được đóng khung thể hiện các CDR theo hệ đánh số AbM.

Fig.2 thể hiện các vị trí và đặc điểm nhận biết của mỗi đột biến thể axit amin đơn được tạo ra cho vùng CDR1 hoặc CDR3 của chuỗi nhẹ biến đổi kháng thể gốc (320-179). Các vùng được đóng khung thể hiện các CDR theo hệ đánh số AbM.

Fig.3 thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng các chuỗi nặng kháng thể kháng TL1A biến đổi.

Fig.4 thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng chuỗi nhẹ kháng thể liên kết kháng TL1A biến đổi.

Fig.5 thể hiện sự so sánh pha phân ly TL1A của các kháng thể kháng TL1A biến đổi, như được đo bởi SPR.

Fig.6 thể hiện kết quả của các thử nghiệm về hiệu lực caspaza tế bào TF-1 với các kháng thể TL1A biến đổi.

Fig.7 thể hiện kết quả của các thử nghiệm về hiệu lực caspaza tế bào TF-1 sử dụng nhiều kháng thể TL1A khác nhau so với kháng thể gốc, 320-179.

Fig.8 chỉ ra là kháng thể 320-587 có hiệu lực TL1A mạnh hơn trong thử nghiệm về hiệu lực caspaza tế bào TF-1, so với các kháng thể kháng TL1A đã được công bố khác qua một số thử nghiệm khác nhau.

Fig.9 chỉ ra nhiều kháng thể kháng TL1A khác nhau ức chế sự liên kết TL1A với DR3, so với đối chứng isotyp như được đo trong thử nghiệm ELISA.

Fig.10 chỉ ra là kháng thể gốc, 320-179, không ức chế sự liên kết TL1A với DcR3 trong khi các kháng thể kháng TL1A biến đổi lại ức chế sự tương tác TL1A-DcR3.

Fig.11 chỉ ra là kháng thể 320-587 phản ứng chéo với và liên kết với TL1A của nhiều loài khác nhau; kháng thể này liên kết với TL1A của tất cả các loài được thử nghiệm.

Fig.12 thể hiện kết quả của việc sử dụng kháng thể 320-587 ở mô hình chuột mắc bệnh viêm đại tràng do TNBS, chứng minh là kháng thể này làm giảm đáng kể các triệu chứng của bệnh viêm đại tràng

Fig.13 chỉ ra là kháng thể 320-587 phát hiện được TL1A người được tiết ra từ PBMC người được kích thích bằng các phức hợp miễn dịch, trong thử nghiệm ELISA.

Fig.14 chỉ ra là kháng thể 320-587 phát hiện được quần thể PBMC người mà biểu hiện TL1A màng trên bề mặt của chúng, trong thử nghiệm đo tế bào theo dòng.

Fig.15 chỉ ra là chuột mắc bệnh hen do OVA cấp tính được điều trị bằng kháng thể 320-587 có bạch cầu ưa eosin giảm đáng kể trong dịch súc rửa phế quản phế nang (BALF).

Fig.16A đến 16D thể hiện việc điều trị cho chuột lang mắc bệnh hen do OVA cấp tính được điều trị bằng kháng thể 320-587 có sự cải thiện về bạch cầu ưa eosin BALF (Fig.16A), đại thực bào BALF (Fig.16B), tăng đáp ứng đường thở (Fig.16C) sau phản ứng hen sớm, và mức độ nghiêm trọng của phản ứng hen sớm (Fig.16D).

Fig.17A đến 17E thể hiện việc điều trị cho chuột mắc bệnh hen do OVA mãn tính được điều trị bằng kháng thể 320-587 có các cải thiện về bạch cầu ưa eosin BALF (Fig.17A), đại thực bào BALF (Fig.17B), IL-13 BALF (Fig.17C), sự tăng sinh tế bào hình ly tiết như được đánh giá bằng khả năng phản ứng PAS (Fig.17D), và sự dày niêm mạc như được đánh giá từ các phản nhuộm H&E (Fig.17E).

Fig.18 thể hiện liều ovalbumin cần thiết để tăng gấp đôi sự tắc nghẽn khí quản.

Fig.19 thể hiện việc điều trị cho chuột mắc bệnh viêm đại tràng do TNBS được điều trị bằng kháng thể 320-587 có sự cải thiện về xơ hóa vùng loét.

Fig.20A đến 20E thể hiện việc so sánh các con chuột mắc bệnh viêm đại tràng do TNBS với bệnh viêm đại tràng do DNBS, được điều trị bằng kháng thể 320-587 và các tác dụng ở ngày 7 và 14, trên tỉ lệ khối lượng/độ dài đại tràng (Fig.20A), chứng xơ hóa đại tràng (Fig.20B), sự thâm nhiễm đại tràng (Fig.20C), và tổn thương đại tràng (Fig.20D). Fig.20E thể hiện các phần đại diện của vùng loét vào ngày 7 và 14.

Fig.21A đến 21C thể hiện việc điều trị cho chuột mắc bệnh viêm đại tràng do DSS được điều trị bằng kháng thể 320-587 có sự cải thiện về sự thay đổi khối lượng trong quá trình sử dụng DSS (Fig.21A), chấm điểm lâm sàng trong quá trình sử dụng DSS (Fig.21B), và tỉ lệ khối lượng/độ dài đại tràng (Fig.21C).

Fig.22 thể hiện sự thay đổi về các xytokin trong màng bụng được cảm ứng bởi TL1A đáp ứng với việc điều trị bằng 320-587.

Mô tả chi tiết sáng chế

Nhiều thuật ngữ khác nhau liên quan đến các khía cạnh của phân mô tả được sử dụng trong toàn bộ bản mô tả và yêu cầu bảo hộ. Các thuật ngữ này có ý nghĩa thông

thường trong lĩnh vực này, trừ khi có quy định khác. Các thuật ngữ được xác định cụ thể khác được hiểu theo cách phù hợp với định nghĩa được đưa ra ở đây.

Thuật ngữ “đối tượng” và “đối tượng bị bệnh” được sử dụng thay thế cho nhau và bao gồm động vật bất kỳ. Các động vật có vú được ưu tiên hơn, bao gồm động vật nuôi (ví dụ, mèo, chó) và gia súc là động vật có vú (ví dụ, lợn, ngựa, bò), cũng như động vật gặm nhấm, bao gồm chuột nhắt, thỏ và chuột, chuột lang và các động vật gặm nhấm khác. Động vật linh trưởng không phải là người, như khỉ đuôi dài, được ưu tiên hơn, và người là được ưu tiên cao nhất.

Phân tử như kháng thể được “phân lập” nếu nó được biến đổi và/hoặc được lấy ra khỏi môi trường tự nhiên của nó bởi bàn tay con người.

Như được sử dụng ở đây, dạng số ít “một” (“a” và “an” và “the”) bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi có quy định khác.

“Độ đặc hiệu” trong ngữ cảnh các tương tác kháng thể-kháng nguyên không nhất thiết là khái niệm tuyệt đối mà có thể tạo thành thuật ngữ tương đối thể hiện mức độ chọn lọc của kháng thể đối với tế bào dương tính với kháng nguyên so với tế bào âm tính với kháng nguyên. Độ đặc hiệu của kháng thể đối với tế bào dương tính với kháng nguyên được gây ra bởi các vùng biến đổi của kháng thể này, và thường bởi các vùng quyết định bổ sung (CDRs) của kháng thể này. Một cấu trúc có thể có độ đặc hiệu từ khoảng 100 đến 1000 lần đối với tế bào dương tính với kháng nguyên so với các tế bào âm tính với kháng nguyên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tái tổ hợp” bao gồm sự biểu hiện từ gen được tạo ra bởi thao tác di truyền hoặc kỹ thuật khác bằng thao tác trong phòng thí nghiệm.

Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng TL1A biến đổi chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ được biến đổi tái tổ hợp của kháng thể 320-179, các kháng thể biến đổi này liên kết đặc hiệu với TL1A. Các kháng thể biến đổi 320-179 ức chế khả năng tương tác với DR3 và, theo một số khía cạnh, cả khả năng tương tác với DcR3 của TL1A và, ức chế thêm sự truyền tín hiệu được cảm ứng bởi tương tác của TL1A với DR3. Các kháng thể này có hiệu lực gia tăng so với kháng thể 320-179. Các kháng thể này có ái lực gia tăng đối với TL1A so với kháng thể 320-179.

Hiệu lực được gia tăng này có thể là hiệu lực lớn hơn ít nhất khoảng 10 lần so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Hiệu lực được gia tăng này có thể là hiệu lực lớn hơn ít nhất khoảng 12 lần so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Hiệu lực được gia tăng này có thể là hiệu lực lớn hơn ít nhất khoảng 13 lần so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Hiệu lực được gia tăng này có thể là hiệu lực lớn hơn ít nhất khoảng 15 lần so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Hiệu lực được gia tăng này có thể là hiệu lực lớn hơn ít nhất khoảng 20 lần so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Hiệu lực được gia tăng này có thể là hiệu lực lớn hơn ít nhất khoảng 25 lần so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Hiệu lực được gia tăng này có thể là hiệu lực lớn hơn ít nhất khoảng 27 lần so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Hiệu lực được gia tăng này có thể là hiệu lực lớn hơn ít nhất khoảng 40 lần so với kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Số lần tăng hiệu lực có thể được xác định, ví dụ, bằng cách đo sự giải phóng caspaza trong sự chết tế bào theo chương trình được cảm ứng bởi TL1A trong thử nghiệm tế bào TF-1.

Các kháng thể biến đổi 320-179 được biểu hiện tái tổ hợp, và liên kết đặc hiệu với TL1A. Kháng thể gốc, 320-179, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Theo một số khía cạnh, kháng thể biến đổi 320-179 chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 hoặc SEQ ID NO.3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.14, với điều kiện là khi vùng biến đổi chuỗi nặng này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID

NO.1, vùng biến đổi chuỗi nhẹ này không chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Kháng thể biến đổi 320-179 có khả năng ức chế tương tác của TL1A với DR3. Kháng thể biến đổi 320-179 có hiệu lực tăng cường so với kháng thể 320-179 và/hoặc có ái lực tăng cường với TL1A so với kháng thể 320-179.

Theo một số khía cạnh, vùng biến đổi chuỗi nặng này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4. Theo một số khía cạnh, vùng biến đổi chuỗi nặng này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Theo một số khía cạnh, vùng biến đổi chuỗi nặng này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5. Theo một số khía cạnh, vùng biến đổi chuỗi nặng này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6. Theo một số khía cạnh, vùng biến đổi chuỗi nặng này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7. Theo một số khía cạnh, vùng biến đổi chuỗi nặng này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8. Theo một số khía cạnh được ưu tiên cao, vùng biến đổi chuỗi nặng này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4. Theo một số khía cạnh, vùng biến đổi chuỗi nặng này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6. Theo một số khía cạnh, vùng biến đổi chuỗi nặng này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7. Theo một số khía cạnh, vùng biến đổi chuỗi nặng này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8. Theo một số khía cạnh, vùng biến đổi chuỗi nặng này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10.

Theo các khía cạnh ưu tiên, kháng thể biến đổi 320-179 chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có

trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4, và liên kết đặc hiệu với TL1A. Theo một số khía cạnh, vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO.3 được nối với vùng hằng định chuỗi nặng IgG1(Δ K) người (ví dụ, SEQ ID NO.43) sao cho chuỗi nặng này chứa SEQ ID NO.60. Theo một số khía cạnh, vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO.4 được nối với vùng hằng định chuỗi nhẹ lambda của người (ví dụ, SEQ ID NO.48) sao cho chuỗi nhẹ này chứa SEQ ID NO.61. Kháng thể biến đổi 320-179 có khả năng ức chế tương tác của TL1A với DR3. Kháng thể biến đổi này có hiệu lực tăng cường so với kháng thể 320-179 và/hoặc có ái lực tăng cường với TL1A so với kháng thể 320-179.

Theo một số khía cạnh, các kháng thể biến đổi 320-179 được biểu hiện tái tổ hợp và liên kết đặc hiệu với TL1A, và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.28, và vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.17. Các kháng thể này có thể chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.29, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.19, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.30. Theo các khía cạnh, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1, vùng biến đổi chuỗi nhẹ tốt hơn nếu không chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Các kháng thể biến đổi 320-179 này có khả năng ức chế tương tác của TL1A với DR3. Các kháng thể biến đổi 320-179 có hiệu lực tăng cường so với kháng thể 320-179 và/hoặc có ái lực tăng cường với TL1A so với kháng thể 320-179.

Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.17, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.18, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.19, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22.

Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16,

vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.17, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.23, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.19, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22.

Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.17, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.24, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.19, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22.

Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.17, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.25, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.19, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22.

Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.21, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.17, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.18, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.19, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.20.

Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.17, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.26, vùng

biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.19, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22.

Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.21, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.17, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.18, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.19, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22.

Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.21, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.17, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.24, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.19, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22.

Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.21, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.17, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.25, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.19, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22.

Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.21, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.17, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.26, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.19, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22.

Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.21, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.17, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.18, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.19, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.27.

Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A, và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, với điều kiện là vùng biến đổi chuỗi nhẹ này không chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A, và chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nhẹ. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ này có thể chứa thêm vùng hằng định lambda.

Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A, và chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 và vùng biến đổi chuỗi nặng, với điều kiện là vùng biến đổi chuỗi nặng này không chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1. Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A, và chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4 và vùng biến đổi chuỗi nặng. Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A, và chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5 và vùng biến đổi chuỗi nặng. Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A, và chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6 và vùng biến đổi chuỗi nặng. Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A, và chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7 và vùng biến đổi chuỗi nặng. Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A, và chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8 và vùng biến đổi chuỗi nặng. Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A, và chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.9 và vùng biến đổi chuỗi nặng. Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A, và chứa vùng biến đổi chuỗi

nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10 và vùng biến đổi chuỗi nặng. Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A, và chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.11 và vùng biến đổi chuỗi nặng. Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A, và chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.12 và vùng biến đổi chuỗi nặng. Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A, và chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13 và vùng biến đổi chuỗi nặng. Theo một số khía cạnh, các kháng thể này liên kết đặc hiệu với TL1A, và chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.14 và vùng biến đổi chuỗi nặng, với điều kiện là nếu vùng biến đổi chuỗi nhẹ này chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2, vùng biến đổi chuỗi nặng này không chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1. Vùng biến đổi chuỗi nặng này có thể chứa thêm vùng hằng định chuỗi nặng, bao gồm trình tự axit amin vùng hằng định chuỗi nặng IgG1, IgG2, hoặc IgG4 bất kỳ đã được mô tả hoặc lấy ví dụ ở đây.

Các kháng thể biến đổi 320-179 liên kết đặc hiệu với TL1A. Các kháng thể này liên kết với TL1A người, và có thể liên kết với một hoặc nhiều trong số TL1A khỉ đuôi dài, TL1A chuột nhắt, TL1A chuột, TL1A chuột lang, TL1A mèo, TL1A chó, TL1A lợn, hoặc TL1A thỏ. Theo một số khía cạnh, các kháng thể này có thể liên kết với TL1A của nhiều loài khác nhau, ví dụ, nếu epitop này được dùng chung. Theo một số khía cạnh, TL1A người chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32, hoặc SEQ ID NO.33. Theo một số khía cạnh, TL1A khỉ đuôi dài chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.34. Theo một số khía cạnh, TL1A chuột nhắt chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.35. Theo một số khía cạnh, TL1A chuột chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.36. Theo một số khía cạnh, TL1A chuột lang chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.37. Theo một số khía cạnh, TL1A mèo chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.38. Theo một số khía cạnh, TL1A lợn chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.39. Theo một số khía cạnh, TL1A thỏ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.40. Theo một số khía cạnh, TL1A chó chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.41.

Các kháng thể biến đổi 320-179 có ái lực liên kết với epitop trên TL1A mà bao gồm hằng số phân ly cân bằng (K_D), có thể đo được theo thử nghiệm loại trừ động học, như thử nghiệm KINEXA® (Sapidyne Instruments Inc., Boise, ID).

Tốt hơn nếu K_D cho liên kết TL1A được xác định từ thử nghiệm loại trừ động học nhỏ hơn khoảng 1000 pM. Theo một số khía cạnh, K_D cho liên kết TL1A được xác định từ thử nghiệm loại trừ động học là nhỏ hơn khoảng 500 pM, hoặc nhỏ hơn khoảng 400 pM, hoặc nhỏ hơn khoảng 300 pM, hoặc nhỏ hơn khoảng 200 pM. Theo một số khía cạnh được ưu tiên hơn, K_D cho liên kết TL1A được xác định từ thử nghiệm loại trừ động học là nhỏ hơn khoảng 100 pM.

K_D cho liên kết TL1A được xác định từ thử nghiệm loại trừ động học có thể nằm trong khoảng từ 10 pM đến 100 pM. K_D cho liên kết TL1A được xác định từ thử nghiệm loại trừ động học có thể nằm trong khoảng từ 25 pM đến 75 pM. K_D cho liên kết TL1A được xác định từ thử nghiệm loại trừ động học có thể nằm trong khoảng từ 30 pM đến 60 pM. K_D cho liên kết TL1A được xác định từ thử nghiệm loại trừ động học có thể nằm trong khoảng từ 30 pM đến 50 pM. K_D cho liên kết TL1A được xác định từ thử nghiệm loại trừ động học có thể nằm trong khoảng từ 35 pM đến 50 pM. K_D cho liên kết TL1A được xác định từ thử nghiệm loại trừ động học có thể nằm trong khoảng từ 36 pM đến 46 pM. K_D cho liên kết TL1A được xác định từ thử nghiệm loại trừ động học có thể nằm trong khoảng từ 38 pM đến 44 pM. K_D cho liên kết TL1A được xác định từ thử nghiệm loại trừ động học có thể nằm trong khoảng từ 39 pM đến 43 pM. K_D cho liên kết TL1A được xác định từ thử nghiệm loại trừ động học có thể nằm trong khoảng từ 40 pM đến 45 pM. K_D cho liên kết TL1A được xác định từ thử nghiệm loại trừ động học có thể nằm trong khoảng từ 35 pM đến 42 pM. K_D cho liên kết TL1A được xác định từ thử nghiệm loại trừ động học có thể là khoảng 40 pM. K_D cho liên kết TL1A được xác định từ thử nghiệm loại trừ động học có thể là khoảng 41 pM. K_D cho liên kết TL1A được xác định từ thử nghiệm loại trừ động học có thể là khoảng 42 pM. Thử nghiệm loại trừ động học có thể sử dụng phân tử kháng thể hoặc phân tử TL1A làm đối tác liên kết hằng định, và phân tử còn lại làm chất chuẩn.

Các kháng thể kháng TL1A biến đổi 320-179 tốt hơn nếu có khả năng liên kết với các tế bào dương tính với TL1A. Kháng thể này có thể liên kết với tế bào dương tính với TL1A với giá trị EC_{50} nhỏ hơn khoảng 100 nM. Kháng thể này có thể liên kết với tế bào

dương tính với TL1A với giá trị EC_{50} nhỏ hơn khoảng 75 nM. Kháng thể này có thể liên kết với tế bào dương tính với TL1A với giá trị EC_{50} nhỏ hơn khoảng 50 nM. Kháng thể này có thể liên kết với tế bào dương tính với TL1A với giá trị EC_{50} nhỏ hơn khoảng 30 nM. Kháng thể này có thể liên kết với tế bào dương tính với TL1A với giá trị EC_{50} nhỏ hơn khoảng 25 nM. Kháng thể này có thể liên kết với tế bào dương tính với TL1A với giá trị EC_{50} nhỏ hơn khoảng 20 nM. Kháng thể này có thể liên kết với tế bào dương tính với TL1A với giá trị EC_{50} nhỏ hơn khoảng 18 nM. Kháng thể này có thể liên kết với tế bào dương tính với TL1A với giá trị EC_{50} nhỏ hơn khoảng 15 nM. Kháng thể này có thể liên kết với tế bào dương tính với TL1A với giá trị EC_{50} nhỏ hơn khoảng 13 nM. Kháng thể này có thể liên kết với tế bào dương tính với TL1A với giá trị EC_{50} nhỏ hơn khoảng 10 nM.

Các kháng thể biến đổi 320-179 tốt hơn nếu là đơn dòng, và tốt hơn nữa, nếu là các kháng thể có độ dài đầy đủ chứa hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ. Theo một số khía cạnh, các kháng thể bao gồm các dẫn xuất hoặc các đoạn hoặc các phần của các kháng thể mà vẫn giữ được độ đặc hiệu liên kết kháng nguyên, và còn tốt hơn nếu giữ được hầu hết hoặc toàn bộ ái lực, của phân tử kháng thể gốc 320-179 (ví dụ, đối với TL1A). Ví dụ, các dẫn xuất có thể chứa ít nhất một vùng biến đổi (vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ). Các ví dụ khác về các dẫn xuất và các đoạn kháng thể thích hợp bao gồm, không giới hạn ở, các kháng thể có độ đặc hiệu polyepitop, các kháng thể đặc hiệu kép, các kháng thể đa đặc hiệu, các dime của globulin miễn dịch, các phân tử chuỗi đơn, cũng như các phân tử FAb, F(Ab')₂, Fd, Fabc, và Fv, các kháng thể chuỗi đơn (Sc), các kháng thể Fv chuỗi đơn (scFv), các chuỗi nhẹ kháng thể đơn lẻ, các chuỗi nặng kháng thể đơn lẻ, thể dung hợp giữa các chuỗi kháng thể và các phân tử khác, các monome hoặc dime chuỗi nặng, các monome hoặc dime chuỗi nhẹ, các dime chứa một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ, và các multime khác. Các kháng thể Fv chuỗi đơn có thể là đa giá. Tất cả các isotyp kháng thể có thể được sử dụng để tạo ra các dẫn xuất, đoạn và phần kháng thể. Các dẫn xuất, đoạn và/hoặc phần kháng thể có thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp và được biểu hiện bởi loại tế bào bất kỳ, tiền nhân hoặc nhân chuẩn.

Trong kháng thể có độ dài đầy đủ, mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (được viết tắt ở đây là HCVR hoặc VH) và vùng hằng định chuỗi nặng. Vùng hằng định chuỗi nặng bao gồm ba vùng chức năng, CH1, CH2 và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ bao

gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (được viết tắt ở đây là LCVR hoặc VL) và vùng hằng định chuỗi nhẹ. Vùng hằng định chuỗi nhẹ bao gồm một vùng chức năng, CL. Các vùng VH và VL có thể được chia nhỏ hơn thành các vùng siêu biến, được gọi là các vùng quyết định bổ sung (CDR), được đặt xen kẽ với các vùng được bảo tồn nhiều hơn, được gọi là các vùng khung (FR). Mỗi VH và VL bao gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxy theo trật tự sau đây: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Thông thường, các đặc điểm liên kết kháng nguyên của một kháng thể ít có khả năng bị ảnh hưởng bởi các thay đổi ở trình tự FR so với các thay đổi ở các trình tự CDR. Các phân tử globulin miễn dịch có thể thuộc typ (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA và IgY), lớp (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2) hoặc phân lớp bất kỳ.

Các kháng thể biến đổi 320-179 hoàn toàn là của người. Các kháng thể người hoàn toàn là các kháng thể, trong đó toàn bộ phân tử là của người hoặc có nguồn gốc từ người, hoặc bao gồm trình tự axit amin giống với dạng người của kháng thể này. Các kháng thể người hoàn toàn bao gồm các kháng thể thu được từ thư viện gen V người, ví dụ, trong đó các gen người mã hóa các vùng biến đổi của các kháng thể được biểu hiện tái tổ hợp. Các kháng thể người hoàn toàn có thể được biểu hiện ở các sinh vật khác (ví dụ, công nghệ chuột nhắt và ngoài chuột nhắt) hoặc các tế bào từ các sinh vật khác đã được biến nạp với các gen mã hóa các kháng thể người. Tuy nhiên, các kháng thể người hoàn toàn có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi các trình tự người, ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng các kỹ thuật gây đột biến ngẫu nhiên hoặc gây đột biến điểm định hướng.

Theo một số khía cạnh, các kháng thể biến đổi 320-179 có thể chứa các khung protein không có nguồn gốc từ globulin miễn dịch. Ví dụ, có thể tham khảo (Ku & Schutz, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6552-6556) mô tả protein xytocrom bốn bó xoắn b562 có hai vòng được ngẫu nhiên hóa để tạo ra các CDR, mà đã được lựa chọn để liên kết kháng nguyên.

Các kháng thể biến đổi 320-179 có thể chứa các biến đổi sau dịch mã hoặc các gốc, mà có thể ảnh hưởng đến hoạt tính hoặc độ ổn định của kháng thể. Các biến đổi hoặc các gốc này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các gốc được metyl hóa, axetyl hóa, glycosyl hóa, sulfat hóa, phosphoryl hóa, carboxyl hóa, và amit hóa và các gốc khác đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Các gốc bao gồm nhóm hóa học bất kỳ hoặc các tổ hợp

của các nhóm thường được tìm thấy trên các phân tử globulin miễn dịch trong tự nhiên hoặc được bổ sung vào các kháng thể bằng các hệ biểu hiện tái tổ hợp, bao gồm các hệ biểu hiện tiền nhân hoặc nhân chuẩn.

Ví dụ về các biến đổi chuỗi bên được đề cập đến bởi sáng chế bao gồm các biến đổi của các nhóm amino như bằng phản ứng alkyl hóa khử bằng phản ứng với aldehyt sau đó khử bằng NaBH_4 ; amidin hóa bằng metylaxetimidat; phản ứng axyl hóa với anhydrit axetic; carbamoyl hóa các nhóm amino bằng xyanat; trinitrobenzyl hóa các nhóm amino bằng axit 2, 4, 6-trinitrobenzen sulphonic (TNBS); axyl hóa các nhóm amino bằng anhydrit succinic và anhydrit tetrahydrophtalic; và pyridoxyl hóa lysin bằng pyridoxal-5-phosphat sau đó khử bằng NaBH_4 .

Nhóm guanidin của các gốc arginin có thể được biến đổi bằng cách tạo ra các sản phẩm ngưng tụ dị vòng với các chất phản ứng như 2,3-butandion, phenylglyoxal và glyoxal. Nhóm carboxyl có thể được biến đổi bằng cách hoạt hóa carbodiimit nhờ sự tạo thành O-axylisourea sau đó tạo dẫn xuất tiếp, ví dụ, thành amit tương ứng. Các nhóm sulfydryl có thể được biến đổi bằng các phương pháp như carboxymetyl hóa với axit iodoaxetic hoặc iodoaxetamit; oxy hóa axit performic thành axit cysteic; tạo ra các disulfua hỗn hợp với các hợp chất thiol khác; phản ứng với maleimit, anhydrit maleic hoặc maleimit được thế khác; tạo ra các dẫn xuất thủy ngân bằng cách sử dụng 4-cloromercuribenzoat, axit 4-cloromercuriphenylsulfonic, phenylmercury clorua, 2-cloromercuri-4-nitrophenol và các dẫn xuất thủy ngân khác; carbamoyl hóa với xyanat ở độ pH kiềm. Các gốc tryptophan có thể được biến đổi bằng, ví dụ, phản ứng oxy hóa với N-bromosuccinimit hoặc alkyl hóa vòng indol bằng 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromua hoặc sulfenyl halogenua. Các gốc tyrosin, mặt khác, có thể được biến đổi bằng phản ứng nitrat hóa với tetranitrometan để tạo ra dẫn xuất 3-nitrotyrosin. Biến đổi vòng imidazol của gốc histidin có thể được thực hiện bằng phản ứng alkyl hóa với các dẫn xuất axit iodoaxetic hoặc N-carbethoxyl hóa với diethylpyrocacbonat.

Các kháng thể biến đổi 320-179 có thể bao gồm các biến đổi điều biến thời gian bán thải trong huyết thanh và sự phân bố sinh học, bao gồm, không giới hạn ở, các biến đổi điều biến tương tác của kháng thể này với thụ thể Fc sơ sinh (FcRn), thụ thể có vai trò chính trong việc bảo vệ IgG khỏi quá trình dị hóa, và duy trì nồng độ kháng thể trong huyết thanh cao. Các biến đổi điều biến thời gian bán thải trong huyết thanh có thể xuất

hiện ở vùng Fc của IgG1, IgG2, hoặc IgG4, bao gồm đột biến thể bộ ba của M252Y/S254T/T256E (các đột biến thể “YTE”, với cách đánh số theo hệ thống đánh thứ tự EU (Edelman, G.M. *et al.* (1969) Proc. Natl. Acad. USA 63, 78-85)), như được mô tả trong Patent Mỹ số 7,083,784. Các đột biến thể khác có thể xuất hiện ở các vị trí 250 và 428, xem, ví dụ, Patent Mỹ số 7,217,797, cũng như ở các vị trí 307, 380 và 434, xem, ví dụ Công bố PCT số WO 00/042072. Ví dụ về các đột biến thể axit amin vùng chức năng hằng định mà điều biến sự liên kết với các thụ thể Fc và chức năng sau đó được gây ra bởi các thụ thể này, bao gồm sự liên kết FcRn và thời gian bán thải trong huyết thanh, được mô tả trong Công bố đơn Mỹ số 2009/0142340, 2009/0068175, và 2009/0092599. Các kháng thể thuộc lớp bất kỳ có thể có lysin đầu cùng C chuỗi nặng bị mất hoặc bỏ đi để làm giảm tính không đồng nhất (Δ K). Đột biến thể S228P (đánh số EU) trong IgG4 người có thể làm ổn định sự trao đổi nhánh Fab kháng thể trên *in vivo* (Labrin *et al.* (2009) Nature Biotechnology 27:8; 767-773), và đột biến thể này có thể xuất hiện tại cùng một thời điểm với các biến đổi YTE và/hoặc Δ K.

Các kháng thể biến đổi 320-179 chứa vùng chức năng hằng định người. Các vùng chức năng hằng định chuỗi nặng tốt hơn nếu là các vùng chức năng hằng định IgG1, IgG2, hoặc IgG4 người. Vùng chức năng hằng định chuỗi nhẹ tốt hơn nếu là vùng chức năng hằng định lambda của người. Vùng chức năng lambda của người thích hợp chứa SEQ ID NO.48.

Vùng hằng định IgG1 chuỗi nặng người mà có thể được sử dụng với các kháng thể biến đổi 320-179 có thể được chọn từ IgG1 của người (SEQ ID NO.42), IgG1 của người (Δ K) (SEQ ID NO.43), IgG1 của người 252Y/254T/256E (SEQ ID NO.44), IgG1 của người 252Y/254T/256E (Δ K) (SEQ ID NO.64), IgG1 của người L234A/L235A/G237A (SEQ ID NO.63), IgG1 của người L234A/L235A/G237A (Δ K) (SEQ ID NO.62), IgG1 của người L235A/G237A (SEQ ID NO.65), và IgG1 của người L235A/G237A (Δ K) (SEQ ID NO.66). Các vùng hằng định IgG2 chuỗi nặng người mà có thể được sử dụng với các kháng thể biến đổi 320-179 có thể được lựa chọn trong số IgG2 của người với không cùng với Δ K (SEQ ID NO.67 và SEQ ID NO.70) và IgG2 của người A330S/P331S với hoặc không cùng với (Δ K) (SEQ ID NO.71 và SEQ ID NO.68). Các vùng hằng định IgG4 chuỗi nặng người mà có thể được sử dụng với các kháng thể biến đổi 320-179 có thể được chọn trong số IgG4 người S228P (SEQ ID NO.45), IgG4 người

S228P (Δ K) (SEQ ID NO.46), IgG4 người 228P/252Y/254T/256E (SEQ ID NO.47), và IgG4 người 228P/252Y/254T/256E (Δ K) (SEQ ID NO.69).

Các kháng thể biến đổi 320-179 có thể được đánh dấu, liên kết, hoặc liên hợp với các gốc hóa học hoặc sinh học phân tử bất kỳ. Các kháng thể được đánh dấu có thể được sử dụng trong các ứng dụng điều trị, chẩn đoán hoặc nghiên cứu cơ bản. Các nhãn/thể liên hợp này có thể được phát hiện, như các chất gây huỳnh quang, các đoạn dò điện hóa phát quang, chấm lượng tử, nhãn phóng xạ, enzym, protein huỳnh quang, protein phát quang và biotin. Nhãn/thể liên hợp có thể là các chất hóa trị liệu, các độc tố, đồng vị phóng xạ, và các chất khác được sử dụng để điều trị bệnh như diệt tế bào ung thư. Các chất hóa trị liệu có thể là các chất bất kỳ thích hợp cho mục đích sử dụng kháng thể.

Các kháng thể này có thể được tạo dẫn xuất bằng các nhóm bảo vệ/phong bế đã biết để ngăn cản sự cắt phân giải protein hoặc để tăng cường hoạt tính hoặc độ ổn định.

Các trình tự polynucleotit mã hóa các kháng thể và các vùng chức năng phụ của chúng (ví dụ, các FR và CDR) được mô tả trong phần mô tả này. Các polynucleotit bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ARN, ADN, cADN, thể lai của ARN và ADN, và các chuỗi sợi đơn, sợi kép hoặc ba sợi của ARN, ADN, hoặc các thể lai của chúng. Các polynucleotit có thể chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể biến đổi 320-179 như được mô tả hoặc lấy ví dụ ở đây. Các sợi bổ sung của các trình tự polynucleotit này cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Polynucleotit có thể chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.51.

Polynucleotit có thể chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.49.

Polynucleotit có thể chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Polynucleotit mã hóa trình

tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.50.

Polynucleotit có thể chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.52.

Polynucleotit có thể chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.53.

Polynucleotit có thể chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.54.

Polynucleotit có thể chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.55.

Polynucleotit có thể chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.56.

Polynucleotit có thể chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.57.

Theo một số khía cạnh, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể. Trình tự axit nucleic thứ nhất có thể mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 và vùng biến đổi chuỗi

nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.51 và polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.2 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.50.

Trình tự axit nucleic thứ nhất có thể mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.51 và polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.52.

Trình tự axit nucleic thứ nhất có thể mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.51 và polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.54.

Trình tự axit nucleic thứ nhất có thể mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.51 và polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.55.

Trình tự axit nucleic thứ nhất có thể mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.51 và polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.56.

Trình tự axit nucleic thứ nhất có thể mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu

trong SEQ ID NO.3 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.51 và polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.10 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.57.

Trình tự axit nucleic thứ nhất có thể mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.49 và polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.52.

Trình tự axit nucleic thứ nhất có thể mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.49 và polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.5 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.53.

Trình tự axit nucleic thứ nhất có thể mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.49 và polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.54.

Trình tự axit nucleic thứ nhất có thể mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.49 và polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.7 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.55.

Trình tự axit nucleic thứ nhất có thể mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8. Polynucleotit mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.1 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.49 và polynucleotit

mã hóa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.8 có thể chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.56.

Theo một số khía cạnh, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa vùng hằng định chuỗi nặng. Theo các khía cạnh được ưu tiên, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa vùng hằng định chuỗi nặng IgG1(Δ K) của SEQ ID NO.43, ví dụ, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.58.

Theo một số khía cạnh, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa vùng hằng định chuỗi nhẹ. Theo các khía cạnh được ưu tiên, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4 và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa vùng hằng định chuỗi nhẹ lambda của SEQ ID NO.48, ví dụ, polynucleotit chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO.59.

Bất kỳ trong số các polynucleotit được mô tả hoặc lấy ví dụ ở đây có thể được chứa trong vector. Do đó, các vector chứa polynucleotit được đề cập đến như một phần của sáng chế. Các vector này có thể là vector biểu hiện. Do đó các vector biểu hiện tái tổ hợp chứa trình tự mã hóa polypeptit cần quan tâm được đề cập đến. Vector biểu hiện này có thể chứa một hoặc nhiều trình tự bổ sung, như, nhưng không giới hạn ở các trình tự điều hòa, các gen đánh dấu chọn lọc, nhãn tinh chế, hoặc tín hiệu polyadenyl hóa. Các yếu tố điều hòa này có thể bao gồm trình tự khởi động phiên mã, yếu tố tăng cường, vị trí liên kết mARN ribosom, hoặc các trình tự điều khiển sự kết thúc phiên mã và dịch mã.

Các vector biểu hiện, đặc biệt là các vector biểu hiện ở động vật có vú, có thể bao gồm một hoặc nhiều yếu tố không được phiên mã, như gốc sao chép, trình tự khởi động thích hợp và yếu tố tăng cường liên kết với gen cần được biểu hiện, các trình tự không được phiên mã nằm bên sườn 5' hoặc 3' khác, các trình tự không được dịch mã 5' hoặc 3' (như các vị trí liên kết ribosom cần thiết), vị trí polyadenyl hóa, các vị trí cho và nhận cắt nối, hoặc các trình tự kết thúc phiên mã. Gốc sao chép đề cập đến khả năng sao chép trong vật chủ cụ thể cũng có thể được đưa vào.

Các vector này có thể được sử dụng để biến nạp bất kỳ trong số một khoảng rộng tế bào chủ đã được biết rõ đối với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này, và tốt hơn nếu là tế bào chủ có khả năng biểu hiện các kháng thể. Các vector bao gồm, không giới hạn ở, plasmit, phagemid (plasmit gắn thêm một đoạn ADN của thể thực khuẩn), cosmid, bacmid, nhiễm sắc thể nhân tạo vi khuẩn (BAC), nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men (YAC), và baculovirus, cũng như các vector vi khuẩn, tế bào nhân chuẩn, nấm men, và virus khác. Các tế bào chủ thích hợp bao gồm, không giới hạn ở, các tế bào CHO, tế bào NS0, tế bào HEK293, hoặc dòng tế bào ổn định nhân chuẩn bất kỳ đã biết hoặc đã được tạo ra, và cũng bao gồm các tế bào vi khuẩn, nấm men, và côn trùng.

Các kháng thể này cũng có thể được sản sinh ra bởi các tế bào lai; các phương pháp tạo ra các tế bào lai đã được biết rõ và được xây dựng trong lĩnh vực này.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa các kháng thể biến đổi 320-179. Các chế phẩm này có thể chứa bất kỳ trong số các kháng thể đã được mô tả và/hoặc lấy ví dụ ở đây và chất mang được chấp nhận như chất mang dược dụng. Các chất mang thích hợp bao gồm môi trường bất kỳ mà không cản trở hoạt tính sinh học của kháng thể này và tốt hơn nếu là không độc với vật chủ mà nó được sử dụng cho. Các chế phẩm này có thể được bào chế để sử dụng cho đối tượng ở dạng liều thích hợp bất kỳ.

Các kháng thể biến đổi 320-179 có thể được sử dụng để điều trị bệnh đường hô hấp, bệnh đường tiêu hóa, bệnh viêm khớp, hoặc bệnh ngoài da ở đối tượng. Do đó, sáng chế mô tả các phương pháp điều trị. Nói chung, phương pháp này bao gồm bước sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh đường hô hấp, bệnh đường tiêu hóa, bệnh viêm khớp, hoặc bệnh ngoài da, sao cho bệnh đường hô hấp, bệnh đường tiêu hóa, bệnh viêm khớp, hoặc bệnh ngoài da này được điều trị. Kháng thể biến đổi 320-179 có thể chứa kháng thể bất kỳ được mô tả hoặc lấy ví dụ ở đây. Việc sử dụng có thể bao gồm sử dụng kháng thể này dưới da. Việc sử dụng có thể bao gồm việc sử dụng kháng thể này trong tĩnh mạch. Đối tượng này tốt hơn nếu là người. Đối tượng này có thể là động vật linh trưởng không phải là người như khỉ đuôi dài, hoặc có thể là động vật có vú như chuột nhắt, chuột, chuột lang, mèo, lợn, thỏ hoặc chó.

Theo các khía cạnh, trong đó bệnh đường hô hấp cần được điều trị, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng

cần được điều trị bệnh đường hô hấp. Bệnh đường hô hấp này có thể bao gồm một hoặc nhiều trong số bệnh hen, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh xơ hóa phổi, bệnh sarcoid phổi, bệnh viêm mũi dị ứng, hoặc bệnh xơ hóa nang. Do đó, ví dụ, theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh hen, sao cho bệnh hen được điều trị ở đối tượng này. Theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị COPD, sao cho bệnh COPD được điều trị ở đối tượng này. Theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh xơ hóa phổi, sao cho bệnh xơ hóa phổi được điều trị ở đối tượng này. Theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh sarcoid phổi, sao cho bệnh sarcoid phổi được điều trị ở đối tượng này. Theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh viêm mũi dị ứng, sao cho bệnh viêm mũi dị ứng được điều trị ở đối tượng này. Theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh xơ hóa nang, sao cho bệnh xơ hóa nang được điều trị ở đối tượng này.

Theo các khía cạnh, trong đó bệnh đường tiêu hóa cần được điều trị, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh đường tiêu hóa này. Bệnh đường tiêu hóa có thể bao gồm một hoặc nhiều trong số bệnh viêm đường ruột (IBD), bệnh Crohn, bệnh viêm đại tràng, bệnh viêm loét đại tràng, hội chứng ruột kích thích (IBS), bệnh viêm thực quản tăng bạch cầu ưa eosin, hoặc bệnh đường tiêu hóa hoặc tình trạng bị gây ra bởi xơ hóa nang. Do đó, ví dụ, theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị IBD, sao cho bệnh IBD được điều trị ở đối tượng này. Theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh Crohn, sao cho bệnh Crohn được điều trị ở đối tượng này. Theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh viêm đại tràng, sao cho bệnh viêm đại tràng được điều trị ở đối tượng này. Theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm sử dụng

kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh viêm loét đại tràng, sao cho bệnh viêm loét đại tràng được điều trị ở đối tượng này. Theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị IBS, sao cho bệnh IBS được điều trị ở đối tượng này. Theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh viêm thực quản tăng bạch cầu ưa eosin, sao cho bệnh viêm thực quản tăng bạch cầu ưa eosin được điều trị ở đối tượng này. Theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh đường tiêu hóa hoặc tình trạng bị gây ra bởi sự xơ hóa nang, sao cho bệnh đường tiêu hóa hoặc tình trạng bị gây ra bởi sự xơ hóa nang được điều trị ở đối tượng này.

Theo các khía cạnh, trong đó bệnh viêm khớp cần được điều trị, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh viêm khớp. Bệnh viêm khớp có thể bao gồm bệnh viêm khớp dạng thấp. Do đó, ví dụ, theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp, sao cho bệnh viêm khớp dạng thấp được điều trị ở đối tượng này.

Theo các khía cạnh, trong đó bệnh ngoài da cần được điều trị, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh ngoài da. Bệnh ngoài da có thể bao gồm một hoặc nhiều trong số bệnh viêm da cơ địa, eczema, hoặc bệnh xơ cứng bì. Do đó, ví dụ, theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh viêm da cơ địa, sao cho bệnh viêm da cơ địa được điều trị ở đối tượng này. Theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh eczema, sao cho bệnh eczema được điều trị ở đối tượng này. Theo một số khía cạnh, phương pháp này bao gồm sử dụng kháng thể biến đổi 320-179, hoặc chế phẩm chứa nó, cho đối tượng cần được điều trị bệnh xơ cứng bì, sao cho bệnh xơ cứng bì được điều trị ở đối tượng này.

Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để bào chế thuốc để điều trị bệnh đường hô hấp. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để bào chế thuốc để điều trị bệnh đường tiêu hóa. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để bào chế thuốc để điều trị bệnh viêm khớp. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để bào chế thuốc để điều trị bệnh ngoài da. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để bào chế thuốc để điều trị bất kỳ một trong số các bệnh hen, COPD, bệnh xơ hóa phổi, bệnh sarcoid phổi, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh xơ hóa nang, bệnh viêm đường ruột, bệnh Crohn, bệnh viêm đại tràng, bệnh viêm loét đại tràng, hội chứng ruột kích thích, bệnh viêm thực quản tăng bạch cầu ưa eosin, bệnh đường tiêu hóa hoặc tình trạng bị gây ra bởi sự xơ hóa nang, bệnh viêm khớp, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm da cơ địa, eczema, hoặc bệnh xơ cứng bì.

Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh đường hô hấp. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh đường tiêu hóa. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh hen. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh ngoài da. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh COPD. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh xơ hóa phổi. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh sarcoid phổi. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh viêm mũi dị ứng. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh xơ hóa nang. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh viêm đường ruột. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh Crohn. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh viêm đại tràng. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh viêm loét đại tràng. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh viêm đại tràng.

dụng để điều trị bệnh viêm thực quản tăng bạch cầu ưa eosin. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh đường tiêu hóa hoặc tình trạng bị gây ra bởi sự xơ hóa nang. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị hội chứng ruột kích thích. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh viêm khớp dạng thấp. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh viêm da cơ địa. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh eczema. Các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh xơ cứng bì.

Cũng được đề cập đến là phương pháp *in vitro* để phát hiện TL1A trong mẫu mô được phân lập từ đối tượng, bao gồm bước cho kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 19 tiếp xúc với mẫu mô được phân lập từ đối tượng để tạo ra phức hợp kháng thể-TL1A, và phát hiện phức hợp này trong mẫu mô.

Kháng thể biến đổi 320-179 có thể được sử dụng để phát hiện các tế bào dương tính với TL1A, ví dụ, trong mẫu mô thu được từ đối tượng. Các kháng thể có thể được sử dụng để phát hiện các tế bào đơn nhân máu ngoại vi dương tính với TL1A (PBMC), ví dụ, PBMC thu được từ đối tượng. Các kháng thể có thể được sử dụng để phát hiện TL1A trong huyết thanh máu. Các phương pháp này có thể được thực hiện *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*, hoặc tại chỗ. Nói chung, phương pháp này bao gồm cho bất kỳ trong số các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây tiếp xúc với mô hoặc các tế bào, ví dụ, các PBMC, được phân lập từ đối tượng để tạo ra phức hợp kháng thể-TL1A, và phát hiện phức hợp này trong mô hoặc trên tế bào. Kháng thể này có thể được đánh dấu bằng nhãn phát hiện được. Kháng thể này có thể được phát hiện bởi kháng thể thứ cấp mà được đánh dấu bằng nhãn phát hiện được. Mô này có thể bao gồm hoặc có thể là dịch sinh học như máu hoặc huyết thanh máu. Mô này có thể bao gồm hoặc có thể là mô đường hô hấp, như mô phổi, nước bọt, dịch rửa phế quản phế nang, dịch đường tiêu hóa, hoặc dịch rửa đường tiêu hóa. Mô này có thể bao gồm hoặc có thể là da hoặc mô da. Mô này có thể bao gồm hoặc có thể là mô khớp bất kỳ trong cơ thể. Phương pháp này có thể bao gồm thêm bước phân lập mô từ đối tượng. Các phương pháp này có thể là định lượng, ví dụ, bằng cách định lượng lượng TL1A trong mô, bằng cách định lượng lượng tế

bào dương tính với TL1A, hoặc bằng cách định lượng lượng TL1A trên các tế bào, hoặc bằng cách định lượng lượng TL1A trong huyết thanh.

Sáng chế cũng mô tả các kit chứa bất kỳ trong số các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả và được lấy ví dụ ở đây. Các kit này có thể được sử dụng để cung cấp các kháng thể và các hợp chất khác để sử dụng trong việc chẩn đoán, nghiên cứu cơ bản, hoặc các phương pháp điều trị, v.v... Theo một số khía cạnh, các kit này chứa một hoặc nhiều kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể biến đổi 320-179 được mô tả hoặc được lấy ví dụ ở đây và hướng dẫn sử dụng một hoặc nhiều kháng thể này trong phương pháp điều trị bệnh đường hô hấp, trong phương pháp điều trị bệnh đường tiêu hóa, hoặc trong phương pháp điều trị bệnh viêm khớp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau nhưng không chỉ giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1

Nguyên liệu và phương pháp

Các vị trí axit amin trong các ví dụ này được đánh số theo hệ thống đánh thứ tự Kabat. Các CDR được xác định theo phương pháp AbM của hệ thống định nghĩa CDR trong toàn bộ tài liệu này.

1.1. Tạo ra các cụm biến đổi. Các trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể 320-179 (SEQ ID NO.1 và 2 tương ứng) được sử dụng làm khuôn cho thiết kế của các đột biến điểm. 320-179 đã được mô tả trước đây trong Công bố đơn Mỹ số 2014/0255302 (VH là SEQ ID NO.186 và VL là SEQ ID NO.199 trong công bố đó) là 320-179 (còn được mô tả là C320-179). Kháng thể này có các đặc điểm sinh lý tốt hơn, là chất ức chế hiệu quả TL1A và có profin gây miễn dịch được dự đoán thấp.

Các biến thể kháng thể của 320-179 được tạo ra bằng cách thế một axit amin trong nhóm gồm chín axit amin đại diện - A, S, Q, D, H, K, L, W, Y - một axit amin một lần tại một trong mỗi vị trí axit amin CDR (như được xác định bởi danh pháp AbM) trong CDR1 chuỗi nhẹ (CDR-L1), CDR3 chuỗi nhẹ (CDR-L3), CDR1 chuỗi nặng (CDR-H1) và CDR2 chuỗi nặng (CDR-H2). Các biến thể của kháng thể, chứa A, S, Q, D, H, K, L,

W, Y, cũng được tạo ra ở vị trí 59 và 60 trong chuỗi nặng biến đổi và ở vị trí 79 trong chuỗi nhẹ biến đổi. Danh mục đầy đủ của tất cả các biến thể kháng thể được thể đơn đã tạo ra được thể hiện lần lượt trong Fig.1 (chuỗi nặng biến đổi) và 2 (chuỗi nhẹ biến đổi).

1.2.Cấu trúc của các vector biểu hiện các kháng thể. Các biến thể vùng biến đổi được tạo ra bằng cách dịch mã ngược các trình tự axit amin thành các trình tự ADN mà sau đó được tổng hợp từ đầu bằng cách lắp ráp các oligonucleotit tổng hợp. Các biến thể V_H được tách dòng phụ vào vector biểu hiện của động vật có vú chứa vùng hằng định người để tạo ra các chuỗi nặng kháng thể có độ dài đầy đủ (vùng chức năng C_{H1} chuỗi nặng IgG1 của người, vùng bản lề, vùng chức năng C_{H2} và C_{H3}) (ví dụ, UniProt No. P01857). Tương tự, các biến thể V_L được tách dòng phụ vào vector biểu hiện của động vật có vú chứa vùng hằng định chuỗi nhẹ lambda của người để tạo ra các chuỗi lambda kháng thể có độ dài đầy đủ (SwissProt số P0CG05.1). Trong một số trường hợp, chuỗi nặng có độ dài đầy đủ và, riêng biệt, chuỗi nhẹ, được dịch mã ngược thành các trình tự ADN và được tổng hợp tiếp từ đầu bằng cách lắp ráp các oligonucleotit tổng hợp.

1.3.Biểu hiện các biến thể kháng thể. Các kháng thể được tạo ra bằng cách đồng chuyển nhiễm các chuỗi nặng và nhẹ kháng thể vào các tế bào EXPI293® (Life Technologies, Carlsbad, CA). Vào ngày trước khi chuyển nhiễm, số lượng tế bào cần thiết cho thử nghiệm được xác định. Cho mỗi lần chuyển nhiễm 20 mL, cần $3,6 \times 10^7$ tế bào trong 20 mL môi trường biểu hiện EXPI293®. Vào ngày trước khi chuyển nhiễm, các tế bào được gieo ở mật độ $0,9 \times 10^6$ tế bào sống/mL và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C trong khí quyển được làm ẩm 8% CO_2 trong không khí trên máy lắc tròn quay ở tốc độ 200 vòng/phút. Vào ngày chuyển nhiễm, số lượng tế bào và khả năng sống sót được xác định bằng cách sử dụng máy đếm tế bào tự động. Chỉ các môi trường nuôi cấy có >98% tế bào sống sót được sử dụng. Đối với mỗi lần chuyển nhiễm 20 mL, các phức hợp lipid-ADN được bào chế bằng cách pha loãng 10µg ADN chuỗi nặng và 10µg ADN chuỗi nhẹ trong môi trường huyết thanh giảm (Cat. số 31985-062) OPTI-MEM® (Life Technologies, Carlsbad, CA) I đến tổng thể tích là 1,0 mL. 54µL chất phản ứng EXPIFECTAMINE® 293 (Life Technologies, Carlsbad, CA) được pha loãng trong môi trường OPTI-MEM® I đến tổng thể tích 1,0 mL. Cả hai lọ được trộn nhẹ nhàng và được ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi ủ, ADN đã pha loãng được trộn với chất phản ứng EXPIFECTAMINE® 293 đã pha loãng và hỗn hợp ADN-chất phản ứng

EXPIFECTAMINE® 293 được ủ thêm 20 phút ở nhiệt độ phòng để tạo thành phức hợp ADN-chất phản ứng EXPIFECTAMINE® 293. Sau khi ủ, 2 mL phức hợp ADN-chất phản ứng EXPIFECTAMINE® 293 được bổ sung vào mỗi ống phản ứng sinh học 50mL (TPP Techno Plastic Products AG). Đối với ống đối chứng âm, 2 mL môi trường OPTI-MEM® (Life Technologies, Carlsbad, CA) I được bổ sung vào thay cho phức hợp ADN-chất phản ứng EXPIFECTAMINE® 293. Các tế bào được ủ trong tủ áp 37°C với khí quyển được làm ẩm 8% CO₂ trong không khí trên máy lắc tròn quay ở 200 vòng/phút. Khoảng 16-18 giờ sau chuyển nhiễm, 100µL chất tăng cường chuyển nhiễm 1 EXPIFECTAMINE® 293 và 1,0mL chất tăng cường chuyển nhiễm 2 EXPIFECTAMINE® 293 được bổ sung vào mỗi ống phản ứng sinh học. Các kháng thể được thu hoạch ở khoảng 72 giờ sau khi chuyển nhiễm.

1.4. Tinh chế các biến thể kháng thể. Mỗi biến thể kháng thể được biểu hiện trong các tế bào EXPI293® trong 20 mL môi trường nuôi cấy tế bào. Các môi trường nuôi cấy được ly tâm trong các ống đựng đầu côn 50 mL ở tốc độ 3000 x g trong 20 phút, và dịch nổi được lọc bằng cách sử dụng thiết bị lọc 0,22µm (Corning). Các dịch nổi được tinh chế bằng cách sử dụng robot Gilson ASPEC GX274. Nói ngắn gọn, các cột SPE (Agilent, 12131014) đã được nạp 1,2 mL nhựa protein A MABSELECT SURE® (GE Healthcare Bio-Sciences AB Uppsala, Thụy Điển) được cân bằng sơ bộ với 3 thể tích cột là 1X PBS. 18 mL dịch nổi được chạy qua các cột sau đó là 4 ml dung dịch rửa 1X PBS. Mỗi cột được rửa giải sơ bộ với 0,9 mL axit xitric 0,1 M, độ pH=2,9. Các kháng thể đã tinh chế được rửa giải với 2 mL axit xitric 0,1 M, độ pH=2,9. Các kháng thể được khử muối vào Sørensen PBS (59,5 mM KH₂PO₄, 7,3mM Na₂HPO₄.2H₂O, 145,4mM NaCl (độ pH ~5,8)) bằng cách sử dụng các cột PD-10 (GE Healthcare).

1.5. Sự biểu hiện kháng thể và liên kết kháng nguyên như được xác định bằng SPR. Bằng cách sử dụng chip cảm biến CM5 (GE Healthcare) Protein A (Pierce) được tạo cặp với bề mặt chip này bằng cách sử dụng kit tạo cặp amin (GE Healthcare). Protein A được tạo cặp trên tế bào dòng chảy 1 và 2 (hoặc ngoài ra, 3 và 4) bằng cách sử dụng BIACORE® T200. Dịch nổi từ các tế bào EXPI-293® chứa kháng thể hoặc các kháng thể đã tinh chế khác (như được mô tả trong 1.4) được cho qua bề mặt của tế bào dòng chảy 2, trong khi dung dịch đệm (HBS-EP) được cho qua tế bào dòng chảy 1. Lượng dịch nổi hoặc protein đã tinh chế (cũng như nồng độ) được tiêm trong giai đoạn bắt giữ thay

đổi giữa các lần chạy và được xác định trong phần đầu của các Bảng 3-11. Kết thúc bước tiêm dịch nổi hoặc kháng thể đã tinh chế, sự thay đổi về các đơn vị đáp ứng được đo. Giá trị này được báo cáo là Mức bắt giữ trong Bảng 3-11. Để xác định kháng thể này có liên kết với TL1A hay không, sau đó TL1A được cho qua các tế bào dòng chảy 1 và 2 và các đơn vị đáp ứng được đo trước khi kết thúc bước tiêm TL1A (pha kết hợp). Giá trị này được ký hiệu là Mức liên kết TL1A (sớm) trong các Bảng 3-11. Các đơn vị đáp ứng được đo trước khi kết thúc pha phân ly. Giá trị này được ký hiệu là Mức liên kết TL1A (muộn) trong các Bảng 3-11 và là số đo lượng kháng thể đã bị mất từ bề mặt của chip này do sự phân ly của phức hợp TL1A - kháng thể. Đồ thị đáp ứng theo thời gian được tham chiếu kép (tế bào dòng chảy 2 được trừ đi từ tế bào dòng chảy 1 và khoảng trống đệm). Vì có một lượng lớn biến thể kháng thể cần phải sàng lọc, các biến thể kháng thể này được sàng lọc qua nhiều lần chạy khác nhau (Bảng 3-11). Trong mỗi trường hợp (ngoại trừ lần chạy 3) kháng thể gốc, 320-179 được bao gồm trong lần chạy, với mục đích so sánh. Tóm tắt các điều kiện được sử dụng trong mỗi lần chạy là dưới đây:

Bảng 1.

Lần chạy #	Dịch nổi	Protein	Mức bắt giữ gần đúng (RU)	Mẫu TL1A đặc (µg/mL)	Thời điểm của mức liên kết TL1A (sớm)	Thời điểm của mức liên kết TL1A (muộn)	Chú thích
1		x	400	10	59	590	Kháng thể được pha loãng đến nồng độ 2 µg/mL, thời gian bắt giữ thay đổi
2	x		1000	10	44	220	Dịch nổi được pha loãng vào đệm chạy, thời gian bắt giữ thay đổi
2		x	400	10	44	590	Kháng thể được pha loãng đến nồng độ 2 µg/mL, thời gian bắt giữ thay đổi
3	x		Thay đổi	10	59	590	Dịch nổi được pha loãng vào đệm chạy, thời gian bắt giữ 60 giây
4		x	500	5	44	220	Kháng thể được pha loãng đến nồng độ 2 µg/mL vào đệm chạy
5	x		100	5	44	220	Dịch nổi được pha loãng vào đệm chạy,
6		x	Thay đổi	5	44	170	Kháng thể được pha loãng đến nồng độ 2 µg/mL vào đệm chạy và được bắt giữ trong 45

							giấy
7*		x	400	5	44	220	Kháng thể được pha loãng đến nồng độ khoảng 2 ug/mL
8		x	400	5	44	590	Kháng thể được pha loãng đến nồng độ 2 ug/mL, thời gian bắt giữ thay đổi
9		x	400	5	44	590	Kháng thể được pha loãng đến nồng độ 2 ug/mL, thời gian bắt giữ thay đổi

* Lần chạy này được thực hiện trên Biacore® A100

Sự liên kết của kháng thể kháng TL1A với TL1A của các loài khác nhau cũng được xác định bằng cách sử dụng SPR. Kháng thể kháng TL1A bị bắt giữ trên bề mặt của Protein A. TL1A của người, chuột, chuột nhắt, thỏ, chuột lang, lợn, chó, mèo hoặc khỉ đuôi dài được cho chảy qua bề mặt này và các đơn vị đáp ứng này được đo.

1.6.Sản sinh TL1A. TL1A người được sản sinh trong hệ biểu hiện EXPI293® của động vật có vú, sử dụng cấu trúc biểu hiện ADN mã hóa vùng chức năng ngoại bào (ECD) của TL1A người với HIS và đuôi FLAG nằm ở đầu cùng N. Các dạng TL1A của loài khác được tạo ra dựa trên danh mục trình tự trên cơ sở dữ liệu được liệt kê công khai. Các dạng này được tóm tắt dưới đây:

Bảng 2.

TL1A loài	Tham khảo cơ sở dữ liệu công khai	SEQ ID NO.
Người	UniProt: O95150	31
Khỉ đuôi dài	SEQ ID NO.125 từ Công bố đơn Mỹ số 2014/0255302	34
Chuột nhắt	UniProt: Q5UBV8	35
Chuột	UniProt: Q8K3Y7	36
Chuột lang	UniProt: H0VFN8	37
Mèo	NCBI: XP_003995828.1	38
Lợn	UniProt: I3LL00	39
Thỏ	UniProt: G1T1T1	40
Chó	UniProt: J9P221	41

Dịch nổi nuôi cấy chứa protein TL1A đã tiết ra được thu hoạch bằng cách ly tâm ở tốc độ 2000 x g trong 10 phút để loại bỏ các tế bào. Protein TL1A được tinh chế từ dịch nổi bằng cách sử dụng cột HP HISTRAP® (GE Healthcare). Protein đã rửa giải được trao đổi đệm vào PBS bằng cách sử dụng cột loại điều chế HILOAD® 16/60 Superdex 200

(GE Healthcare) và phân đoạn ~70 kDa được tách bằng cách lọc gel trên cột loại điều chế HILOAD® 26/60 SUPERDEX® 200 (GE Healthcare).

1.7. Thử nghiệm hiệu lực dòng tế bào TF-1. Để xác định các kháng thể kháng TL1A có vô hiệu hóa về mặt chức năng hoạt tính sinh học của TL1A hay không, các kháng thể này được thử nghiệm về khả năng làm mất tác dụng gây chết tế bào theo chương trình do TL1A trong dòng tế bào TF-1. Dòng tế bào bị tăng hồng-bạch cầu người TF-1 (ATCC: CRL-2003) được nuôi trong môi trường nuôi cấy trong các điều kiện chuẩn. Các tế bào TF-1 ($7,5 \times 10^4$ /giếng) được ủ trong các đĩa 96 giếng có các mặt màu đen (Greiner) với TL1A người 100 ng/ml và cycloheximide 10 μ g/ml để gây chết tế bào theo chương trình. Các kháng thể thử nghiệm ở nồng độ 10 μ g/mL (66,7 nM) hoặc thấp hơn được bổ sung vào các đĩa và được ủ trong 4 đến 5 giờ. Sau đó tác dụng gây chết tế bào theo chương trình được đánh giá bằng cách sử dụng Kit caspaza đồng nhất (Roche) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Số liệu được chuẩn hóa bằng cách thể hiện dưới dạng tỉ lệ phần trăm chết tế bào theo chương trình tối đa (mức độ chết tế bào theo chương trình đạt được bởi TL1A người cộng với cycloheximide khi không có mặt kháng thể kháng TL1A).

1.8. Tính chọn lọc thụ thể của các kháng thể dẫn. TL1A liên kết với cả thụ thể truyền tín hiệu cùng họ của nó, DR3, và với thụ thể gây chết, DcR3, mà cũng đóng vai trò là thụ thể gây chết cho các thành viên họ TNF Fas-L và LIGHT. Các kháng thể được đánh giá về khả năng của chúng trong việc ức chế sự liên kết của TL1A với các thụ thể của nó trong ELISA cạnh tranh. Thụ thể DR3/Fc (R&D Systems) hoặc thụ thể DcR3/Fc (R&D Systems) được phủ lên đĩa 96 giếng (Maxisorp, Nunc) ở nồng độ 2 μ g/ml. Các kháng thể thử nghiệm đã được pha loãng tuần tự được ủ sơ bộ với TL1A người được biotinyl hóa một vị trí duy nhất 1 μ g/ml trong 30 phút sau đó được bổ sung vào các giếng đã phủ DR3/Fc hoặc DcR3/Fc. TL1A đã liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng streptavidin-peroxidaza cây cải ngựa 1:2000 (BD Pharmingen). Số liệu được chuẩn hóa bằng cách thể hiện dưới dạng tỉ lệ phần trăm của liên kết tối đa của TL1A với thụ thể khi vắng mặt kháng thể kháng TL1A.

1.9. Thử nghiệm loại trừ động học. Thử nghiệm này đo nồng độ tự do của một trong các đối tác liên kết mà không làm ảnh hưởng đến sự cân bằng. Các dung dịch có thể được điều chế ngoại tuyến, sử dụng các protein chưa được biến đổi trong dung dịch, và

các số đo ái lực có thể được đọc vài ngày sau khi trộn để đảm bảo là đã đạt được sự cân bằng. Trong thử nghiệm loại trừ động học, một chất tương tác (được gọi là đối tác liên kết hằng định, hoặc CBP) được giữ ở nồng độ hằng định, trong khi chất còn lại (được gọi là dung dịch chuẩn) được pha loãng tuần tự. Thử nghiệm loại trừ động học có thể được sử dụng để xác định hằng số phân ly (K_D) và ái lực của tương tác kháng thể-kháng nguyên. Trong thử nghiệm loại trừ động học điển hình, dung dịch chuẩn được cố định vào các hạt (ví dụ, hạt Sepharose hoặc PMMA) và được sử dụng để bắt giữ CBP tự do trong dung dịch. Sau đó mẫu dò được đánh dấu thứ hai được sử dụng để định lượng lượng CBP đã bị bắt giữ. Thử nghiệm loại trừ động học được xem lại trong Darling, RK *et al.* (2004) ASSAY và Drug Development Technol. 2(6):647-57.

Các thành phần được kết hợp và được cho phép đạt tới trạng thái cân bằng. Sau đó thử nghiệm loại trừ động học được sử dụng để đo phân đoạn tự do của CBP. Các đường cong cân bằng với nhiều nồng độ CBP được phân tích bằng cách sử dụng công cụ phân tích n-đường cong trong phần mềm KinExA® Pro (Phiên bản 4.1.11, Sapidyne) để thu được các quyết định K_D tăng cường. Tương tác của 320-587 với TL1A người được kiểm tra bằng cách sử dụng hai hướng: (1) CBP là 320-587, dung dịch chuẩn là TL1A, và (2) CBP là TL1A, dung dịch chuẩn là 320-587.

Ví dụ 2

Các kết quả thử nghiệm

2.1. Lựa chọn các biến thể liên kết TL1A với tốc độ phân ly tương đương hoặc được cải thiện so với C320-179. Các biến thể của kháng thể 320-179 được cấu trúc và được biểu hiện như đã mô tả trên đây. Các dịch nổi EXPI293® (Life Technologies Corp.) của mỗi biến thể được đánh giá bằng BIACORE® (GE Healthcare) và số liệu thu được được so sánh với số liệu của kháng thể gốc 320-179. Trong một số thử nghiệm, các kháng thể được tinh chế bằng cách sử dụng sắc ký Protein A (Xem 1.4) và các kháng thể đã tinh chế được sử dụng trong các thử nghiệm BIACORE® (GE Healthcare). Bảng 3-11 thể hiện mức độ biểu hiện của mỗi biến thể, cùng với sự liên kết của nó với TL1A ở thời điểm sớm và muộn. Trong các lần chạy sau (Bảng 10 và 11) các biến thể kháng thể chứa nhiều hơn một đột biến axit amin được thử nghiệm.

Bảng 3. Thử nghiệm SPR - Chạy lần 1 - Các kháng thể kháng TL1A liên kết với TL1A. * thể hiện các kháng thể được lựa chọn để thử nghiệm trong thử nghiệm về hiệu lực.

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
				Kháng thể đã tinh chế	
320-179	Không	Không	410	140	117
320-184*	Không	L79A	414	141	118
320-185*	Không	L79S	401	137	114
320-186*	Không	L79Q	398	136	113
320-187*	Không	L79D	388	134	112
320-188*	Không	L79H	397	136	113
320-189*	Không	L79K	393	130	107
320-190*	Không	L79W	395	136	113
320-191*	Không	L79Y	408	140	117

Bảng 4. Thử nghiệm SPR - Chạy lần 2 - Các kháng thể kháng TL1A liên kết với TL1A. * thể hiện các kháng thể được lựa chọn để thử nghiệm trong thử nghiệm về hiệu lực.

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
				Dịch nổi			Kháng thể đã tinh chế	
320-179	Không	Không	1133	287	261	410	140	117
320-192	Không	T24A	960	238	218	-	-	-
320-193	Không	T24S	990	249	227	409	103	91
320-194	Không	T24Q	974	247	226	398	76	64
320-195	Không	T24D	992	249	227	-	-	-
320-196	Không	T24H	995	250	228	-	-	-
320-197	Không	T24K	1017	255	232	401	105	94
320-	Không	T24L	1023	262	241	-	-	-
320-199	Không	T24W	1050	251	233	404	97	85
320-200	Không	T24Y	1027	251	231			
320-	Không	S25A	990	274	252	393	73	57
320-	Không	S25Q	1034	234	214	-	-	-
320-203	Không	S25D	977	61	24	407	65	35
320-204	Không	S25H	1003	193	155	-	-	-
320-	Không	S25K	1025	290	271	401	70	51
320-206	Không	S25L	1000	257	235	-	-	-
320-	Không	S25W	1022	268	243	-	-	-
320-208	Không	S25Y	1034	222	199	-	-	-
320-	Không	S26A	1007	222	200	-	-	-
320-210	Không	S26Q	1033	225	202	-	-	-
320-	Không	S26D	1025	206	164	392	80	64
320-212	Không	S26H	1013	226	205	-	-	-

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
			Dịch nổi			Kháng thể đã tinh chế		
320-	Không	S26K	1052	218	194	422	79	65
320-214	Không	S26L	1038	221	196	-	-	-
320-215	Không	S26W	1021	220	199	-	-	-
320-216	Không	S26Y	1010	171	147	-	-	-
320-217	Không	S27A	1076	258	235	-	-	-
320-218	Không	S27Q	1081	239	218	412	92	80
320-	Không	S27D	1061	243	220	-	-	-
320-220	Không	S27H	1049	253	230	-	-	-
320-221	Không	S27K	1063	225	207	413	99	89
320-222	Không	S27L	1037	156	96	-	-	-
320-223	Không	S27W	1061	143	66	-	-	-
320-224	Không	S27Y	1055	198	153	-	-	-
320-225	Không	S27aA	1066	267	243	-	-	-
320-	Không	S27aQ	1035	250	228	-	-	-
320-227	Không	S27aD	1022	242	218	-	-	-
320-228	Không	S27aH	1072	259	235	-	-	-
320-	Không	S27aK	1057	268	251	-	-	-
320-230	Không	S27aL	1087	245	223	-	-	-
320-231	Không	S27aW	1078	271	243	-	-	-
320-232	Không	S27aY	1051	261	235	-	-	-
320-233	Không	D27bA	1118	255	235	409	48	16
320-234	Không	D27bS	1089	262	239	-	-	-
320-235	Không	D27bQ	1110	256	236	-	-	-
320-236	Không	D27bH	1085	254	232	415	5	6
320-237	Không	D27bK	1073	240	221	398	10	8
320-238	Không	D27bL	1106	221	191	-	-	-
320-239	Không	D27bW	1079	212	163	-	-	-
320-240	Không	D27bY	1089	230	196	-	-	-
320-	Không	I27cA	1092	179	122	-	-	-
320-242	Không	I27cS	1076	124	49	-	-	-
320-243	Không	I27cQ	1065	71	26	-	-	-
320-	Không	I27cD	1083	21	20	-	-	-
320-	Không	I27cH	1084	59	26	-	-	-
320-246	Không	I27cK	1089	32	23	-	-	-
320-247	Không	I27cL	1078	205	162	-	-	-
320-248	Không	I27cW	1110	96	30	-	-	-
320-249	Không	I27cY	1096	77	28	-	-	-
320-250	Không	G28A	1104	180	115	-	-	-
320-251	Không	G28S	1085	134	50	-	-	-

Bảng 5. Thử nghiệm SPR - Chạy lần 3 - Các kháng thể kháng TL1A liên kết với TL1A. * thể hiện các kháng thể được lựa chọn để thử nghiệm trong thử nghiệm về hiệu lực.

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
				Dịch nối	
320-252	Không	G28Q	996	20	9
320-253	Không	G28D	1073	6	6
320-254	Không	G28H	1021	17	8
320-255	Không	G28K	842	24	8
320-256	Không	G28L	1055	30	10
320-257	Không	G28W	981	83	18
320-258	Không	G28Y	823	9	6
320-259	Không	A29S	824	194	179
320-260	Không	A29Q	836	182	165
320-261	Không	A29D	956	86	29
320-262	Không	A29H	891	209	190
320-263*	Không	A29K	848	121	123
320-264	Không	A29L	831	199	184
320-265	Không	A29W	1057	168	69
320-266	Không	A29Y	934	218	192
320-267*	Không	G30A	1148	299	297
320-268	Không	G30S	392	28	7
320-269	Không	G30Q	764	126	93
320-270	Không	G30D	511	9	5
320-271	Không	G30H	1067	106	30
320-272	Không	G30K	935	5	5
320-273	Không	G30L	710	4	4
320-274	Không	G30W	796	12	7
320-275	Không	G30Y	751	44	10
320-276	Không	L31A	1273	244	215
320-277*	Không	L31S	1741	387	361
320-278*	Không	L31Q	1696	389	374
320-279	Không	L31D	561	144	128
320-280*	Không	L31H	881	228	211
320-281	Không	L31K	321	22	6
320-282	Không	L31W	811	75	16
320-283	Không	L31Y	317	2	3
320-284	Không	G32A	374	1	2
320-285	Không	G32S	400	1	2
320-286	Không	G32Q	576	1	4
320-287	Không	G32D	339	0	2
320-288	Không	G32H	422	1	3
320-289	Không	G32K	463	1	3
320-290	Không	G32L	361	1	2
320-291	Không	G32W	414	2	3

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
				Dịch nối	
320-292	Không	G32Y	423	111	94
320-293	Không	V33A	421	104	86
320-294	Không	V33S	419	79	61
320-295	Không	V33Q	414	109	94
320-296	Không	V33D	428	118	104
320-297*	Không	V33H	420	95	77
320-298	Không	V33K	416	114	100
320-299	Không	V33L	420	51	13
320-300	Không	H34W	417	111	95
320-301	Không	H34Y	456	108	96
320-302*	Không	H34A	423	99	74
320-303	Không	H34S	408	71	32
320-304	Không	H34Q	401	103	82
320-305	Không	H34D	424	34	10
320-306	Không	H34K	452	147	133
320-307*	Không	H34L	873	216	200
320-308	Không	H34W	458	106	73
320-309	Không	H34Y	255	47	40
320-310	Không	Q89A	348	70	62
320-311	Không	Q89S	0	0	0

Bảng 6. Thử nghiệm SPR - Chạy lần 4 - Các kháng thể kháng TL1A liên kết với TL1A. * thể hiện các kháng thể được lựa chọn để thử nghiệm trong thử nghiệm về hiệu lực.

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
				Kháng thể đã tinh chế	
320-179	Không	Không	616	177	163
320-312	Không	Q89D	529	10	10
320-313*	Không	Q89H	502	141	132
320-314*	Không	Q89K	598	165	158
320-315	Không	Q89L	515	85	82
320-316	Không	Q89W	535	65	62
320-317	Không	Q89Y	570	86	83
320-318*	Không	S90A	578	160	149
320-319	Không	S90Q	523	18	14
320-320	Không	S90D	534	31	17
320-321	Không	S90H	491	16	13
320-322	Không	S90K	450	17	14

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
				Kháng thể đã tinh chế	
320-323	Không	S90W	490	14	13
320-324	Không	S90Y	528	13	12
320-325	Không	Y91A	491	95	83
320-326*	Không	Y91S	550	126	120
320-327	Không	Y91Q	493	130	119
320-328*	Không	Y91H	542	155	146
320-329	Không	Y91K	600	9	11
320-330	Không	Y91L	600	139	119
320-331*	Không	Y91W	615	173	176
320-332	Không	D92A	531	66	44
320-333	Không	D92S	559	95	67
320-334	Không	D92Q	543	15	14
320-335	Không	D92H	581	15	14
320-336	Không	D92K	484	11	11
320-337	Không	D92L	475	21	15
320-338	Không	D92W	548	9	11
320-339	Không	D92Y	509	10	11
320-340	Không	G93A	548	145	132
320-341	Không	G93S	560	149	135
320-342	Không	G93Q	560	152	139
320-343	Không	G93D	545	121	90
320-344	Không	G93H	529	117	87
320-345*	Không	G93K	637	163	154
320-346	Không	G93L	526	126	107
320-347	Không	G93W	560	149	130
320-348	Không	G93Y	541	144	127
320-349	Không	T94A	556	112	88
320-350	Không	T94S	502	130	118
320-351	Không	T94Q	553	112	83
320-352	Không	T94D	568	101	63
320-353	Không	T94H	558	97	73
320-354	Không	T94K	536	53	30
320-355	Không	T94L	526	102	76
320-356	Không	T94W	486	109	86
320-357	Không	T94Y	563	119	91
320-358	Không	L95A	501	82	50
320-359	Không	L95S	503	57	27
320-360	Không	L95Q	554	86	53
320-361*	Không	L95D	477	12	11
320-362	Không	L95H	522	8	9

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
				Kháng thể đã tinh chế	
320-363	Không	L95Y	566	17	16
320-364	Không	S95aA	516	124	109
320-365	Không	S95aQ	536	141	128
320-366	Không	S95aD	487	62	31
320-367	Không	S95aH	595	119	116
320-368	Không	S95aK	602	50	26
320-369	Không	S95aL	503	89	60
320-370	Không	S95aW	570	66	39
320-371	Không	S95aY	576	92	70

Bảng 7. Thử nghiệm SPR - Chạy lần 5 - Các kháng thể kháng TL1A liên kết với TL1A.

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
				Dịch nổi	
320-179	Không	Không	83	11	10
320-372	Không	A96S	106	1	0
320-373	Không	A96Q	99	-1	-1
320-374	Không	A96D	98	1	0
320-375	Không	A96H	108	-2	-1
320-376	Không	A96K	98	3	1
320-377	Không	A96L	101	-1	-1
320-378	Không	A96W	105	-1	-1
320-379	Không	A96Y	105	3	1
320-380	Không	L97A	104	1	1
320-381	Không	L97S	97	3	1
320-382	Không	L97Q	106	0	0
320-383	Không	L97D	102	3	1
320-384	Không	L97H	98	3	2
320-385	Không	L97K	108	1	1
320-386	Không	L97W	104	1	0
320-387	Không	L97Y	97	11	10
320-388	G26A	Không	110	14	13
320-389	G26S	Không	105	12	11
320-390	G26Q	Không	100	12	11
320-391	G26D	Không	106	14	13
320-392	G26H	Không	109	12	11
320-393	G26K	Không	100	12	11
320-394	G26L	Không	106	13	12

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sớm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
				Dịch nối	
320-395	G26W	Không	104	13	12
320-396	G26Y	Không	104	12	11
320-397	Y27A	Không	109	12	12
320-398	Y27S	Không	110	12	11
320-399	Y27Q	Không	105	10	10
320-400	Y27D	Không	106	11	11
320-401	Y27H	Không	100	11	10
320-402	Y27L	Không	98	11	10
320-403	Y27W	Không	84	11	10
320-404	T28A	Không	84	11	10
320-405	T28S	Không	79	10	9
320-406	T28Q	Không	82	8	7
320-407	T28D	Không	88	12	11
320-408	T28H	Không	81	13	12
320-409	T28K	Không	83	10	10
320-410	T28L	Không	86	11	10
320-411	T28W	Không	82	10	9
320-412	T28Y	Không	89	10	9
320-413	F29A	Không	89	9	8
320-414	F29S	Không	78	7	7
320-415	F29Q	Không	85	5	4
320-416	F29D	Không	81	9	8
320-417	F29H	Không	85	9	8
320-418	F29K	Không	85	10	9
320-419	F29L	Không	83	11	9
320-420	F29W	Không	85	11	10
320-421	F28Y	Không	81	9	8
320-422	T30A	Không	80	10	9
320-423	T30S	Không	86	10	10
320-424	T30Q	Không	86	11	10
320-425	T30D	Không	89	14	12
320-426	T30H	Không	84	10	9
320-427	T30K	Không	88	11	10
320-428	T30L	Không	88	11	10
320-429	T30W	Không	90	12	11
320-430	T30Y	Không	85	6	6
320-431	S31A	Không	85	6	6

Bảng 8. Thử nghiệm SPR - Chạy lần 6 - Các kháng thể kháng TL1A liên kết với TL1A. * thể hiện các kháng thể được lựa chọn để thử nghiệm trong thử nghiệm về hiệu lực.

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
				Kháng thể đã tinh chế	
320-179	Không	Không	449	111	102
320-432	S31Q	Không	466	116	106
320-433	S31D	Không	412	90	83
320-434	S31K	Không	473	125	113
320-435	S31L	Không	384	92	83
320-436	S31W	Không	525	129	118
320-437	S31Y	Không	501	119	109
320-438	Y32A	Không	468	126	116
320-439	Y32S	Không	464	119	108
320-440	Y32Q	Không	408	108	97
320-441	Y32D	Không	388	80	67
320-442	Y32H	Không	490	124	113
320-443*	Y32K	Không	438	114	103
320-444	Y32L	Không	458	107	95
320-445*	Y32W	Không	442	116	106
320-446	D33A	Không	469	18	8
320-447	D33S	Không	503	37	13
320-448	D33Q	Không	482	7	6
320-449	D33H	Không	483	76	59
320-450	D33K	Không	536	1	3
320-451	D33L	Không	497	19	8
320-452	D33W	Không	445	84	78
320-453	D33Y	Không	449	111	104
320-454	I34A	Không	189	43	37
320-455	I34S	Không	144	27	23
320-456	I34Q	Không	214	52	46
320-457	I34D	Không	55	6	4
320-458	I34H	Không	239	59	53
320-459	I34K	Không	93	20	17
320-460	I34L	Không	441	114	105
320-461	I34W	Không	465	87	82
320-462	I34Y	Không	373	58	52
320-463*	N35A	Không	462	102	101
320-464*	N35S	Không	600	130	124
320-465	N35Q	Không	476	92	78
320-466	N35D	Không	360	93	86

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
				Kháng thể đã tinh chế	
320-467	N35H	Không	350	44	24
320-468	N35K	Không	200	2	2
320-469	N35L	Không	315	69	61
320-470	N35W	Không	329	2	3
320-471	N35Y	Không	312	3	4
320-472	Không	S90L	467	23	10
320-473	Không	Y91D	453	69	55
320-474	Không	L95K	596	2	4
320-475	Không	L95W	727	8	8
320-476	Y27K	Không	560	128	118
320-477*	S31H	Không	576	148	136
320-478	A60L	Không	379	85	77
320-479	A60W	Không	277	61	54
320-480	A60Y	Không	319	79	73
320-483	W50A	Không	492	4	6
320-484	W50S	Không	555	3	6
320-485	W50Q	Không	460	3	5
320-486	W50D	Không	178	1	2
320-487	W50H	Không	237	2	3
320-488	W50K	Không	293	1	2
320-489	W50L	Không	337	4	5
320-490	W50Y	Không	393	14	8
320-491	L51S	Không	356	85	76

Bảng 9. Thử nghiệm SPR - Chạy lần 7 - Các kháng thể kháng TL1A liên kết với TL1A. * thể hiện các kháng thể được lựa chọn để thử nghiệm trong thử nghiệm về hiệu lực.

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
				Kháng thể đã tinh chế	
320-179	Không	Không	301	61	56
320-492	L51Q	Không	439	89	82
320-493	L51D	Không	242	48	46
320-494	L51H	Không	811	150	138
320-495	L51K	Không	466	84	77
320-496	L51W	Không	581	93	87
320-497	N52A	Không	727	135	125

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
				Kháng thể đã tinh chế	
320-498	N52S	Không	485	90	82
320-499	N52Q	Không	551	122	113
320-500	N52D	Không	472	69	53
320-501	N52H	Không	533	118	108
320-502	N52K	Không	659	88	59
320-503	N52W	Không	484	41	6
320-504	N52Y	Không	500	88	65
320-505	P52aA	Không	570	118	110
320-506	P52aS	Không	444	97	89
320-507	P52aQ	Không	181	27	24
320-508	P52aD	Không	203	19	12
320-509	P52aH	Không	290	52	47
320-510	P52aK	Không	289	44	33
320-511	P52aL	Không	581	106	98
320-512	P52aW	Không	746	126	118
320-513	P52aY	Không	585	99	90
320-514	N53A	Không	516	96	88
320-515	N53S	Không	375	73	67
320-516	N53Q	Không	461	92	86
320-517	N53D	Không	493	55	50
320-518	N53H	Không	882	169	153
320-519	N53K	Không	993	217	196
320-520	N53L	Không	1016	174	162
320-521	N53W	Không	830	166	152
320-522	N53Y	Không	693	141	129
320-523	S54A	Không	476	88	82
320-524	S54Q	Không	292	55	49
320-525	S54D	Không	437	33	17
320-526	S54H	Không	672	134	124
320-527	S54K	Không	578	146	136
320-528	S54L	Không	829	121	108
320-529	S54W	Không	605	94	83
320-530	S54Y	Không	425	77	67
320-531	G55A	Không	331	66	61
320-532	G55S	Không	648	10	7
320-533	G55Q	Không	441	93	86
320-534	G55D	Không	647	109	102
320-535	G55H	Không	637	126	115
320-536	G55K	Không	553	115	105
320-537	G55L	Không	717	133	123

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
			Kháng thể đã tinh chế		
320-538	G55W	Không	318	54	49
320-539	N56A	Không	859	172	159
320-540	N56S	Không	500	100	92
320-541	N56Q	Không	504	94	84
320-542	N56D	Không	839	97	86
320-543	N56H	Không	597	138	126
320-544	N56K	Không	690	120	112
320-545	N56L	Không	518	109	100
320-546	N56W	Không	341	67	61
320-547*	N56Y	Không	318	77	75
320-548	T57A	Không	335	74	68
320-549	T57S	Không	269	50	45
320-550	T57Q	Không	635	112	103
320-551	T57D	Không	280	44	36
320-552	T57H	Không	595	104	97
320-553	T57K	Không	494	84	78
320-554	T57L	Không	506	66	51
320-555	T57W	Không	674	62	30
320-556	T57Y	Không	634	100	90
320-557	G58A	Không	378	26	6
320-558	G58S	Không	463	3	2
320-559	G58Q	Không	535	9	5
320-560	G58D	Không	907	36	9
320-561	G58H	Không	539	14	6
320-562	G58K	Không	326	2	1
320-563	G58L	Không	258	2	2
320-564	G58W	Không	345	72	67
320-565	G58Y	Không	545	43	12
320-566	Y59A	Không	720	120	110
320-567	Y59S	Không	590	96	86
320-568	Y59Q	Không	688	115	107
320-569	Y59D	Không	408	79	73
320-570	Y59H	Không	435	79	72
320-571	Y59K	Không	394	78	72
320-572	A60S	Không	459	98	90
320-573	A60Q	Không	338	67	62
320-574	A60D	Không	693	140	130
320-575	A60H	Không	581	121	110
320-576	A60K	Không	479	90	83
320-577	L51A	Không	479	98	90

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
				Kháng thể đã tinh chế	
320-578	L51Y	Không	415	83	77
320-579	N52L	Không	214	46	41
320-580	G55Y	Không	261	51	47
320-581	Y59L	Không	337	70	65
320-582	Y59W	Không	453	67	52

Bảng 10. Thử nghiệm SPR - Chạy lần 8 - Các kháng thể kháng TL1A liên kết với TL1A. * thể hiện các kháng thể được lựa chọn để thử nghiệm trong thử nghiệm về hiệu lực.

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
				Kháng thể đã tinh chế	
320-179	Không	Không	402	98	86
320-583*	Không	G30A, Y91W	404	108	103
320-584*	Không	L31S, Y91W	399	103	98
320-585*	Không	L31Q, Y91W	406	116	109
320-586*	Không	H34L, Y91W	405	108	103
320-587*	N56Y	Y91W	402	123	122
320-588*	N56Y	G30A	409	128	123
320-589*	N56Y	L31S	399	120	109
320-590*	N56Y	L31Q	405	130	121
320-591*	N56Y	H34L	399	132	124
320-592*	N56Y	G30A, Y91W	408	128	129
320-593*	N56Y	L31S, Y91W	405	126	124
320-594*	N56Y	L31Q, Y91W	407	134	132
320-595*	N56Y	H34L, Y91W	403	129	128

Bảng 11. Thử nghiệm SPR - Chạy lần 9 - Các kháng thể kháng TL1A liên kết với TL1A. * thể hiện các kháng thể được lựa chọn để thử nghiệm trong thử nghiệm về hiệu lực.

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sóm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
				Kháng thể đã tinh chế	
320-179	Không	Không	402	108	98
320-596	Không	Y91F	405	95	85
320-597	Không	L31Q, Y91F	401	115	105
320-598	Không	H34L, Y91F	403	112	101
320-599	Không	L31S, Y91F	411	113	103

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	Mức bắt giữ	Mức độ liên kết TL1A (Sớm)	Mức độ liên kết TL1A (Muộn)
			Kháng thể đã tinh chế		
320-600	Không	G30A, Y91F	399	111	104
320-601*	N56Y	Y91F	409	121	120
320-602	N56Y	L31Q, Y91F	399	131	125
320-603	N56Y	H34L, Y91F	394	126	118
320-605	N56Y	G30A, Y91F	399	125	120
320-611*	N56Y	Y91W, G93K	397	125	127
320-612	Không	Y91W, G93Y	400	126	120
320-613*	N56Y	Y91W, G93Y	408	135	131
320-614	N56Y	G93K	401	122	111
320-615	N56Y	G93Y	393	113	108
320-616	N56Y	G93A	396	120	112

Các kháng thể có mức độ bắt giữ tương tự hoặc tốt hơn so với 320-179 cũng như các giá trị mức độ liên kết TL1A (Sớm) và mức độ liên kết TL1A (Muộn) nằm trong khoảng tương tự được đưa thẳng vào các thử nghiệm về hiệu lực. Các biến thể được chỉ ra bằng cách tô đậm trong các Bảng 3-11. So sánh tốc độ phân ly như được đo bởi SPR cho một số kháng thể được thể hiện trong Fig.5. Một số kháng thể trong số các kháng thể này phân ly ở tốc độ chậm hơn so với tốc độ của kháng thể gốc 320-179.

2.2 Các kháng thể kháng TL1A có hiệu lực cải thiện trong thử nghiệm dựa trên tế bào. Để đánh giá tốc độ phân ly được cải thiện có tương quan với hiệu lực tăng cường của kháng thể đã tinh chế hay không, các biến thể được chạy trong thử nghiệm hoạt tính caspaza được cảm ứng bởi TL1A trong các tế bào TF-1. Các kháng thể có hiệu lực hoạt động bằng cách liên kết với TL1A và ức chế sự hoạt hóa TL1A của thụ thể DR3. Thụ thể này khởi động con đường gây chết tế bào theo chương trình trong đó các caspaza được hoạt hóa và có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các chất phản ứng thương mại. Trong mỗi thử nghiệm, biến thể kháng thể được so sánh với 320-179 về số lần cải thiện hiệu lực. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 12.

Bảng 12. Thử nghiệm về hiệu lực caspaza được cảm ứng bởi TL1A trong tế bào TF-1: Tác dụng ức chế bởi các kháng thể kháng TL1A.

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	IC ₅₀ kháng thể (µg/mL)	IC ₅₀ 320-179 (µg/mL)	Số lần cải thiện
320-184	Không	L79A	0,010	0,030	3

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	IC ₅₀ kháng thể (µg/mL)	IC ₅₀ 320- 179 (µg/mL)	Số lần cải thiện
320-185	Không	L79S	0,020	0,030	2
320-186	Không	L79Q	0,030	0,030	1
320-187	Không	L79D	0,020	0,040	2
320-188	Không	L79H	0,010	0,040	4
320-189	Không	L79K	0,110	0,040	0
320-190	Không	L79W	0,020	0,040	2
320-191	Không	L79Y	0,020	0,040	2
320-198	Không	T24L	0,010	0,010	1
320-201	Không	S25A	0,005	0,010	2
320-202	Không	S25Q	0,010	0,010	1
320-205	Không	S25K	0,020	0,030	2
320-207	Không	S25W	0,007	0,020	3
320-209	Không	S26A	0,040	0,020	1
320-211	Không	S26D	0,010	0,030	3
320-213	Không	S26K	0,070	0,030	0
320-219	Không	S27D	0,020	0,030	2
320-226	Không	S27aQ	0,030	0,020	1
320-229	Không	S27aK	0,040	0,060	2
320-241	Không	I27cA	0,020	0,010	1
320-244	Không	I27cD	5,030	0,010	0
320-245	Không	I27cH	0,540	0,010	0
320-263	Không	A29K	0,003	0,010	3
320-267	Không	G30A	0,010	0,040	4
320-277	Không	L31S	0,003	0,010	3
320-278	Không	L31Q	0,010	0,020	2
320-280	Không	L31H	0,006	0,020	3
320-297	Không	V33H	0,005	0,020	4
320-302	Không	H34A	0,010	0,020	2
320-307	Không	H34L	0,010	0,040	4
320-313	Không	Q89H	0,020	0,030	2
320-314	Không	Q89K	0,020	0,030	2
320-318	Không	S90A	0,020	0,050	3
320-326	Không	Y91S	0,030	0,050	2
320-328	Không	Y91H	0,020	0,020	1
320-331	Không	Y91W	0,002	0,020	10
320-345	Không	G93K	0,020	0,010	1
320-361	Không	L95D	0,010	0,010	1
320-443	Y32K	Không	0,060	0,060	1
320-445	Y32W	Không	0,030	0,060	2
320-463	N35A	Không	0,020	0,050	3
320-464	N35S	Không	0,030	0,050	2
320-477	S31H	Không	0,030	0,040	1
320-547	N56Y	Không	0,004	0,040	10
320-583	Không	G30A, Y91W	0,003	0,080	27
320-584	Không	L31S, Y91W	0,008	0,080	10
320-585	Không	L31Q, Y91W	0,003	0,040	13
320-586	Không	H34L, Y91W	0,002	0,050	25

Kháng thể	Đột biến thể VH so với 320-179	Đột biến thể VL so với 320-179	IC ₅₀ kháng thể (μ g/mL)	IC ₅₀ 320- 179 (μ g/mL)	Số lần cải thiện
320-587	N56Y	Y91W	0,001	0,040	40
320-588	N56Y	G30A	0,004	0,020	5
320-589	N56Y	L31S	0,020	0,020	1
320-590	N56Y	L31Q	0,006	0,020	3
320-591	N56Y	H34L	0,002	0,020	10
320-592	N56Y	G30A, Y91W	0,003	0,020	7
320-593	N56Y	L31S, Y91W	0,004	0,060	15
320-594	N56Y	L31Q, Y91W	0,005	0,060	12
320-595	N56Y	H34L, Y91W	0,003	0,060	20
320-601	N56Y	Y91F	0,002	0,020	10
320-611	N56Y	Y91W, G93K	0,005	0,040	8
320-613	N56Y	Y91W, G93Y	0,010	0,040	4

** Một số kháng thể có sự cải thiện hiệu lực cao hơn 10 lần được chạy trong tối đa $n=7$ thử nghiệm. Các kết quả phù hợp với số liệu được thể hiện trong bảng này. Fig.7 thể hiện $n=4$ bản sao của một số kháng thể có hiệu lực cải thiện so với 320-179.

Như đã thể hiện trong Bảng 12 và Fig.6, một số kháng thể có một đột biến thể duy nhất đã thử nghiệm có hiệu lực tốt hơn so với 320-179. Trong số tất cả các biến thể kháng thể có một đột biến thể duy nhất đã thử nghiệm, hai biến thể có số lần cải thiện về hiệu lực lớn hơn 10 lần so với 320-179. Các biến thể này là 320-331 (chứa đột biến thể Y91W trong chuỗi nhẹ biến đổi) và 320-547 (chứa đột biến thể N56Y trong chuỗi nặng biến đổi) (Fig.6). Kết quả này là ngoài mong đợi, cụ thể là CDR3 của VH kháng thể liên quan chủ yếu đến sự liên kết kháng thể, trong khi đó ngược lại, đột biến thể N56Y đã được xác định có ảnh hưởng đáng kể trên khả năng liên kết nằm trong CDR2 của VH kháng thể. Khi các biến thể được tạo ra chứa Y91W từ VL hoặc riêng N56Y trong VH có các đột biến khác mà cải thiện hiệu lực, thu được các kháng thể có hiệu lực cao. Khi đột biến thể Y91W VL được kết hợp với đột biến thể N56Y VH vào một kháng thể, 320-587, số lần cải thiện về hiệu lực so với 320-179 là 40. Fig.7 thể hiện bốn thử nghiệm lặp lại khác nhau chứng minh sự tăng hiệu lực của bốn kháng thể 320-587, 320-591, 320-592, và 320-601 so với 320-179. Trình tự của các kháng thể có hiệu lực được cải thiện so với 320-179 được thể hiện hiện trong Fig.3 (chuỗi nặng biến đổi) và Fig.4 (chuỗi nhẹ biến đổi).

Việc so sánh hiệu lực của 320-587 so với các kháng thể kháng TL1A đã mô tả trước đây khác được thực hiện. Các kháng thể đã mô tả trước đây này bao gồm kháng thể 1681N được mô tả trong patent Mỹ số 8,642,741 (VH là SEQ ID NO.18; VL là SEQ ID

NO.26), kháng thể VH5/VL1 từ Công bố đơn Mỹ số 2014/0308271 (VH là SEQ ID NO.24; VL là SEQ ID NO.17), 1B4 được làm tương thích với người như được mô tả trong patent Mỹ số 8,263,743 (VH là SEQ ID NO.74; VL là SEQ ID NO.75) và 320-168 (còn được gọi là C320-168) như được mô tả trong Công bố đơn Mỹ số 2014/0255302A1 (VH là SEQ ID NO.181; VL là SEQ ID NO.194). Fig.8 thể hiện là 320.587 có hiệu lực cao hơn trong thử nghiệm dựa trên tế bào so với các kháng thể đã mô tả trước đây, làm cho nó trở thành kháng thể kháng TL1A có hiệu lực nhất đã được mô tả.

2.3.Các thử nghiệm cạnh tranh thụ thể DR3 và DcR3. Các kháng thể thể hiện hiệu lực tăng cường so với 320-179 được sàng lọc về khả năng ức chế sự liên kết TL1A với thụ thể truyền tín hiệu cùng họ của nó, DR3, hoặc thụ thể gây chết, DcR3. Tất cả các kháng thể kháng TL1A đã được thử nghiệm đều thể hiện tác dụng ức chế sự liên kết TL1A với DR3, so với đối chứng isotyp (Fig.9). Điều này xác nhận là các kháng thể này ức chế hoạt tính TL1A bằng cách phong bế tương tác TL1A - DR3.

Trong các thử nghiệm trước đây được mô tả trong Công bố đơn Mỹ số 2014/0255302A1 (ví dụ 4), kháng thể 320-179 (320-179) được thử nghiệm trong thử nghiệm cạnh tranh thụ thể và được chỉ ra là ức chế chọn lọc sự liên kết của TL1A với DR3 mà không ức chế sự liên kết với DcR3 (Fig.10). Trong các thử nghiệm được trình bày ở đây trong Fig.10, lại được chỉ ra là 320-179 không ức chế sự tương tác TL1A-DcR3. Điều này trái ngược với các kháng thể kháng TL1A được cải thiện đã được thử nghiệm. Các kháng thể có hiệu lực được cải thiện trong thử nghiệm tế bào TF-1 (như được mô tả trong Phần 2.2), bao gồm kháng thể 320-587, ức chế hằng định sự tương tác TL1A-DcR3.

Tóm lại, kháng thể gốc 320-179 có khả năng ức chế tương tác TL1A-DR3 nhưng không ức chế tương tác TL1A-DcR3. Một số kháng thể có hiệu lực cải thiện như 320-267 (VH là SEQ ID NO.1; VL là SEQ ID NO.11), 320-277 (VH là SEQ ID NO.1, VL là SEQ ID NO 12), 320-278 (VH là SEQ ID NO 1; VL là SEQ ID NO 13) và 320-591 (VH là SEQ ID NO.3, VL là SEQ ID NO 9) ức chế tương tác TL1a-DR3 nhưng không ức chế tương tác TL1A-DcR3. Một số kháng thể có hiệu lực cải thiện như 320-331, 320-547, 320-583, 320-584, 320-585, 320-586, 320-587 và các biến thể của các kháng thể này, có khả năng ức chế cả tương tác TL1A-DR3 và TL1A-DcR3.

2.4. Phản ứng chéo loài của 320-587 được thử nghiệm về khả năng của nó trong việc liên kết với TL1A được sản sinh tái tổ hợp từ các loài khác nhau. Kháng thể này liên kết với TL1A từ tất cả các loài được thử nghiệm (Fig.11). Sự liên kết của 320-587 với TL1A người, chuột, chuột lang, chó, mèo, khỉ đuôi dài có tốc độ phân ly chậm, thể hiện sự tương tác với ái lực cao. Kháng thể này liên kết với TL1A chuột nhắt và thỏ và có tốc độ phân ly nhanh.

2.5. Các mô hình tác dụng tiền lâm sàng để thử nghiệm các kháng thể kháng TL1A trong các mô hình bệnh ở động vật sau đây:

Bệnh hen: động vật gặm nhấm (chuột nhắt, chuột hoặc chuột lang) mắc bệnh hen do dị ứng nguyên được làm cho nhạy cảm bằng cách tiêm trong da albumin trứng (OVA), cụ thể là OVA thu được từ trứng gà, cộng với phèn và sau đó được thử ít nhất 2 tuần sau bằng OVA phun hoặc được son khí hóa, gây ra các triệu chứng tương tự bệnh hen bao gồm phản ứng quá mức của đường thở, tràn bạch cầu ái toan và tăng sản sinh xytokin (ví dụ, Hylkema *et al.*, 2002, Clin. Exp. Immunol. 129:390-96). Mô hình này có thể được thay đổi bằng cách thử lặp lại để thể hiện profin bệnh mãn tính hơn với sự tổ chức lại đường hô hấp tăng và sự cảm ứng xơ hóa tăng (ví dụ, Bos *et al.*, 2007, Eur. Respir. J. 30:653-661). Các dị ứng nguyên khác, như mạt bụi nhà, cũng có thể được sử dụng (ví dụ, Lambert *et al.*, 1998, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157:1991-9). Ngoài ra, động vật linh trưởng không phải là người (ví dụ, khỉ đuôi dài cynomolgus macaque) có thể được làm cho nhạy cảm và được thử với kháng nguyên môi trường như *Ascaris suum*, dẫn đến phản ứng quá mức của đường thở, tràn bạch cầu ái toan và tăng sản sinh xytokin (ví dụ, Wegner *et al.*, 1991, J. Allergy Clin. Immunol. 87:835-41).

COPD: Động vật gặm nhấm (chuột nhắt, chuột hoặc chuột lang) mắc bệnh viêm đường hô hấp do hít khói sẽ được tiếp xúc với khói thuốc lá 3-7 lần một tuần trong ít nhất 4 tuần gây ra bệnh phổi tương tự COPD, đặc trưng bởi sự tích tụ bạch cầu trung tính ở phổi, tăng sản sinh xytokin viêm, xơ hóa phổi và tăng huyết áp động mạch phổi (ví dụ, Davis *et al.* (2012) PLoS One 7:e33304). Dạng bệnh nặng hơn có thể được gây ra bằng cách gây nhiễm vi khuẩn hoặc virus lặp lại vào trong phổi trong quá trình tiếp xúc với khói thuốc (ví dụ, Li *et al.* (2012) Biol. Pharm. Bull. 35:1752-60). Các động vật gặm nhấm mắc COPD do khói sẽ được điều trị bằng các kháng thể kháng TL1A và được kiểm tra về tác dụng điều trị.

Bệnh xơ hóa phổi: Động vật gặm nhấm (chuột nhắt, chuột hoặc chuột lang) mắc bệnh xơ hóa phổi do bleomycin sẽ được xử lý với bleomycin bằng cách nhỏ giọt vào khí quản/mũi hoặc tiêm trong tĩnh mạch một lần hoặc hai lần mỗi tuần trong ít nhất 3 tuần. Việc xử lý này gây ra bệnh xơ hóa phổi nặng và ổn định (ví dụ, Pinart *et al.* (2009) *Resp. Physiol. Neurobiol.* 166:41-46). Các động vật gặm nhấm mắc bệnh xơ hóa phổi do bleomycin sẽ được điều trị bằng các kháng thể kháng TL1A và được kiểm tra về tác dụng điều trị.

Bệnh xơ hóa nang: Mô hình chồn sương (ferret) bất hoạt CFTR - các con chồn sương đồng hợp tử đối với gen bất hoạt, hoặc các đột biến liên quan đến bệnh đã biết, của CFTR (gen gây bệnh trong bệnh xơ hóa nang) phát triển tự phát bệnh tương tự bệnh xơ hóa nang được đặc trưng bởi sự tắc nghẽn đường hô hấp do dịch nhầy, chứng xẹp phổi, bệnh viêm phổi mô kẽ và bệnh viêm phổi tái phát với sự xâm nhập và định cư của vi khuẩn trong phổi tăng dần (ví dụ, Sun *et al.* (2014) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 50:502-12). Chồn sương CFTR^{-/-} sẽ được điều trị bằng các kháng thể kháng TL1a và được kiểm tra về tác dụng điều trị.

Hội chứng ruột kích thích: Nội tạng nhạy cảm quá mức do stress - Stress sẽ được gây ra ở chuột bằng cách tách riêng con non-mẹ (ví dụ, Coutinho *et al.* (2002) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282:G307-16) hoặc giam giữ chuột trưởng thành (ví dụ, Shen *et al.* (2010) *J. Neurogastroenterol. Motil.* 16:281-90). Mô hình này được mong đợi là gây ra sự chuyển động đại tràng và nội tạng quá mẫn tương tự như được quan sát thấy ở đối tượng bị bệnh IBS. Các con chuột bị stress sẽ được điều trị bằng các kháng thể kháng TL1A và được kiểm tra về tác dụng điều trị.

Bệnh viêm khớp dạng thấp: Động vật gặm nhấm (chuột nhắt, chuột hoặc chuột lang) mắc bệnh viêm khớp do collagen sẽ được gây miễn dịch và được gây miễn dịch nhắc lại với collagen trong tá dược. Các động vật bị sưng chân hai bên và ban đỏ, viêm thâm nhiễm vào vùng khớp và tổn thương khớp (ví dụ, Bendele *et al.* (1999) *Toxicol. Pathol.* 27:134-42). Các động vật gặm nhấm mắc bệnh viêm khớp do collagen sẽ được điều trị bằng các kháng thể kháng TL1A và được kiểm tra về tác dụng điều trị.

Bệnh viêm thực quản tăng bạch cầu ưa eosin: Bệnh viêm thực quản tăng bạch cầu ưa eosin do *Aspergillus fumigatus* trong mũi. Chuột được nhỏ giọt *A. fumigatis* vào mũi lặp đi lặp lại phát triển chứng tăng bạch cầu ưa eosin thực quản, loạn sản và tăng sản biểu

mô, và các hạt ưa eosin tự do (ví dụ, Mishra *et al.* (2001) J. Clin. Invest. 107:83-90). Tương tự, việc phơi nhiễm sol khí lặp lại với albumin trứng trong thời gian hai tuần ở chuột lang đã được làm cho nhạy cảm gây ra chứng tăng bạch cầu ưa eosin thực quản với sự thâm nhiễm của cả bạch cầu ưa eosin và các tế bào mast trong lớp biểu mô (ví dụ, Liu *et al.* (2015) Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 308:G482-488). Chuột nhắt hoặc chuột lang mắc bệnh viêm thực quản tăng bạch cầu ưa eosin sẽ được điều trị bằng các kháng thể kháng TL1A và được kiểm tra về tác dụng điều trị.

2.6. Ứng dụng của kháng thể TL1A trong việc phát hiện các mẫu chứa kháng thể TL1A theo sáng chế có thể được sử dụng để phát hiện TL1A trong các mẫu của người. 320-587 được sử dụng để phát hiện TL1A người được tiết ra từ các PBMC người đã được kích thích bằng các phức hợp miễn dịch (Fig.13) trong thử nghiệm ELISA. 320-587 cũng được sử dụng để phát hiện quần thể PBMC người biểu hiện TL1A màng trên bề mặt của chúng trong các thử nghiệm đo tế bào theo dòng chảy (Fig.14).

2.7. Các phép đo ái lực của sự liên kết kháng thể kháng TL1A với TL1A người bằng thử nghiệm loại trừ động học. Thời gian đạt tới sự cân bằng với 320-587 là CBP: Trước hết, tốc độ K_{on} cho tương tác 320-587/TL1A được đo. Nói ngắn gọn, dung dịch được điều chế bằng cách trộn 320-587 và TL1A, và các phân phân ước được lấy ra ở các thời điểm khác nhau trong 3 giờ. 320-587 tự do được bắt giữ bằng cách cho dung dịch này đi qua cột được nạp bằng các hạt Sepharose được phủ bằng 20 $\mu\text{g/mL}$ TL1A. 320-587 đã bị bắt giữ được phát hiện bằng kháng thể kháng người liên hợp Alexa Fluor® 647 (0,5 $\mu\text{g/mL}$). Thử nghiệm này được lặp lại hai lần tạo ra các tốc độ K_{on} là $8,35 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$ và $7,45 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$, với tốc độ K_{on} trung bình là $7,90 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$. Sau đó tốc độ K_{on} được sử dụng để đánh giá thời gian cần thiết để đạt tới sự cân bằng ở nhiều nồng độ khác nhau của 320-587 bằng cách sử dụng công cụ đường cong liên kết lý thuyết được cung cấp trên trang web Sapidyme (www.Sapidyme.com).

Xác định KD với 320-587 là CBP. CBP này, 320-587, được pha loãng trong đệm thử nghiệm (DPBS được bổ sung bằng 1 mg/ml BSA) đến nồng độ cuối cùng là 15, 50 và 150 pM. Dung dịch chuẩn, TL1A người được pha loãng trong đệm thử nghiệm để tạo ra dãy nồng độ là 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 và 3000 pM. Bằng cách sử dụng thời gian đạt đến sự cân bằng đã xác định trên đây, các đường cong chứa 50 hoặc 150 pM 320-587 được cho phép đạt tới sự cân bằng trong tủ áp 25°C trong hai ngày. Các đường

cong chứa 15 pM 320-587 được cho phép đạt tới sự cân bằng trong tủ áp 25°C trong 3 ngày. Sau giai đoạn cân bằng, phân đoạn tự do của 320-587 trong mỗi phản ứng được định lượng như được mô tả trên đây. Các giá trị K_D được xác định bằng cách sử dụng phân tích n-đường cong của các đường cong cân bằng được tạo ra với 15, 50 và 150 pM 320-587.

Thời gian đạt tới sự cân bằng với TL1A là CBP: Thời gian đạt tới sự cân bằng theo hướng này được đánh giá bằng cách sử dụng K_{on} cho tương tác 320-587/TL1A, được xác định như được mô tả trong mục 2.8 trên đây. Trong thử nghiệm này, phân đoạn tự do của TL1A bị bắt giữ bằng cách cho dung dịch này đi qua cột được nạp bằng các hạt PMMA được phủ bằng 30 µg/mL 320-587. TL1A đã bị bắt giữ được phát hiện bằng kháng thể kháng 6x-his DyLight 650 (0,75 µg/mL). Thử nghiệm này được lặp lại hai lần tạo ra các tốc độ K_{on} là $6,11 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$ và $5,74 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$, với tốc độ K_{on} trung bình là $5,93 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$.

Xác định K_D với TL1A là CBP: CBP này, TL1A người, được pha loãng trong đệm thử nghiệm đến các nồng độ cuối cùng là 30, 100 và 300 pM. Dung dịch chuẩn, 320-587, được pha loãng trong đệm thử nghiệm để tạo ra dãy nồng độ là 0,05, 0,15, 0,5, 1,5, 5, 15, 50, 150, 500, 1500 và 5000 pM.

Bằng cách sử dụng thời gian đạt tới sự cân bằng đã xác định trên đây, tất cả các đường cong được cho phép đạt tới sự cân bằng trong tủ áp 25°C trong 3 ngày. Sau giai đoạn cân bằng, phân đoạn tự do của TL1A trong mỗi phản ứng được định lượng như đã mô tả trên đây. Các giá trị K_D được xác định bằng cách sử dụng phân tích n-đường cong của các đường cong cân bằng được tạo ra với 30, 100 và 300 pM TL1A.

Sự phù hợp hoàn toàn được quan sát thấy giữa hai phương pháp KinExA cũng như % sai số tương đối thấp. Giá trị K_D cho tương tác của TL1A với 320-587 đã được xác định bằng cách sử dụng 320-587 làm CBP là $40,97 \pm 8,33 \text{ pM}$ (Bảng 13), trong khi K_D thu được sử dụng TL1A làm CBP là $41,52 \pm 13,5 \text{ pM}$ (Bảng 14).

Bảng 13. Ái lực: Các hạt Sepharose được phủ với TL1A; 320-587 là CBP.

Thử nghiệm số	K_D (pM)	% Sai số
1	40,43	4,57
2	52,03	5,61
3	46,31	4,76
4	32,42	3,74

5	33,66	3,9
Trung bình	40,97	
SD	8,33	
%CV	20	

Bảng 14. Ái lực: Các hạt PMMA được phủ bằng 320-587; TL1A là CBP.

Thử nghiệm số	K _D (pM)	% Sai số
1	33,39	5,33
2	57,1	5,51
3	34,07	3,9
Trung bình	41,52	
SD	13,5	
%CV	33	

3.0. Các mô hình tác dụng tiền lâm sàng để thử nghiệm các kháng thể kháng TL1a.

3.0.1. Bệnh hen.

Bệnh hen do albumin trứng cấp tính ở chuột. Chuột nâu Na Uy được làm cho nhạy cảm với OVA bằng cách tiêm trong màng bụng vào ngày 0 sau đó được thử bằng sol khí OVA hàng ngày vào các ngày 35-42. Chuột được điều trị bằng kháng thể 320-587 hoặc tá được lỏng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch vào các ngày 14, 21, 28 và 35. Dịch rửa phế quản phế nang (BALF) được đánh giá về tổng số tế bào và các tế bào biệt hóa vào ngày 43. Việc điều trị được phát hiện ra là làm giảm đáng kể bạch cầu ưa eosin BALF (Fig.15).

Bệnh hen do albumin trứng mãn tính ở chuột. Chuột được làm cho nhạy cảm với OVA cộng với phèn bằng cách tiêm trong màng bụng vào các ngày 0 và 7, và sau đó được thử với sol khí OVA hai lần mỗi tuần trong 3 tuần bắt đầu vào ngày 14 đến ngày 31, và vào 5 ngày liên tiếp từ ngày 37 đến ngày 42. Các động vật được điều trị bằng kháng thể 320-587 hoặc tá được lỏng trong tĩnh mạch vào các ngày 24, 29, 34 và 39. BALF được đánh giá về tổng số tế bào và các tế bào biệt hóa, và panen xytokin vào ngày 43. Các lát cắt phổi được nhuộm bằng hematoxylin và eosin (H&E), và Schiff axit định kỳ (PAS), và được đánh giá về nhiều bệnh lý. Việc điều trị bằng 320-587 làm giảm đáng kể bạch cầu ưa eosin BALF và các đại thực bào (Fig.17A và 17B), BALF IL-4 và IL-13

(Fig.17C), tăng sản tế bào hình đài (Fig.17D) và độ dày của lớp biểu mô phế quản (Fig.17E), so với tá dược lỏng.

Bệnh hen do albumin trứng cấp tính ở chuột lang. Chuột lang đực Dunkin Hartley được làm cho nhạy cảm với albumin trứng và sau đó được phẫu thuật để lắp bóng nong để đo chức năng phổi và các phản ứng hen sớm và muộn. Vào ngày 16, 20, 24 và 28, các động vật được điều trị trong màng bụng với các kháng thể 320-587 hoặc tá dược lỏng. Việc thử với sol khí albumin trứng (0,05-0,1%) được thực hiện 30 phút sau khi điều trị lần cuối cùng. Sự tăng đáp ứng đường thở (AHR) với histamin được đo 24 giờ trước khi thử, 6 giờ sau khi thử (trực tiếp sau phản ứng hen sớm) và 24 giờ sau khi thử (trực tiếp sau phản ứng hen muộn). Bản chất và mức độ của phản ứng hen sớm và muộn cũng được ghi lại bằng cách ghi trực tuyến chức năng phổi trong toàn bộ 24 giờ. Các động vật được gây chết 25 giờ sau khi thử và việc rửa phế quản phế nang được thực hiện. BALF được đánh giá về tổng số tế bào và các tế bào biệt hóa. Việc điều trị bằng 320-587 làm giảm đáng kể cả bạch cầu ưa eosin và đại thực bào trong BALF (Fig.16A và 16B) cũng như cải thiện AHR sau phản ứng hen sớm (Fig.16C) và mức độ nghiêm trọng chung của phản ứng hen sớm (Fig.16D), so với tá dược lỏng.

Bệnh hen do albumin trứng mãn tính ở chuột lang. Chuột lang đực Dunkin Hartley được làm cho nhạy cảm với albumin trứng, và 4 tuần sau đó được thử với albumin trứng hàng tuần trong 12 tuần. Việc thử albumin trứng (0,05-0,5%) được thực hiện bằng cách hít dung dịch đã được tạo sol khí đến khi sự tắc đường thở được quan sát thấy. Động vật được điều trị bằng kháng thể 320-587 hoặc tá dược lỏng qua màng bụng mỗi 5 ngày bắt đầu từ tuần 8 của việc thử albumin trứng. Chức năng đường thở, gián tiếp qua đáp ứng đường thở với histamin, được đo trước khi thử lần đầu tiên, 24 giờ trước khi thử lần cuối cùng và 6 giờ sau khi thử lần cuối cùng. Mặc dù không quan sát thấy tác động nào trên AHR bị gây ra bởi việc thử histamin, kháng thể 320-587 làm giảm đáng kể phản ứng dị ứng với OVA, do đó các liều tăng dần của OVA là cần thiết để gây ra sự tắc nghẽn đường thở (Fig.18).

Sự khác biệt về tác dụng điều trị của kháng thể được quan sát thấy trong các mô hình bệnh hen cấp tính và mãn tính ở chuột lang được cho là chức năng của chính mô hình này. Được cho là trong mô hình mãn tính, mức độ AHR giảm theo thời gian, và tương ứng, trở nên đáp ứng ít hơn với việc điều trị. Trong lĩnh vực này, mô hình cấp tính

thường được sử dụng để quan sát các tác dụng của hợp chất trên đáp ứng đường thở, và mô hình mãn tính thường được sử dụng để quan sát các tác dụng của hợp chất trên sự tái cấu trúc đường thở. Việc đánh giá sự tái cấu trúc được tiếp tục. Tuy nhiên, ngạc nhiên khi quan sát thấy các kháng thể này có tác động trên phản ứng với dị ứng nguyên - mặc dù kháng thể này không gây ảnh hưởng đáng kể đến AHR tuyệt đối (phản ứng với histamin) ở giai đoạn này, nó làm giảm đáng kể phản ứng dị ứng trực tiếp với kháng nguyên.

3.0.2. Bệnh viêm đường ruột

Bệnh viêm đại tràng do TNBS ở chuột: Chuột được xử lý bằng một liều duy nhất của axit tri-nitrobenzensulfonic trong etanol bằng cách truyền vào trực tràng. Động vật đối chứng nhận được thể tích tương đương của etanol. Trong khoảng thời gian 7 ngày, các động vật phát triển bệnh viêm đại tràng ổ được đặc trưng bởi sự loét đại tràng với sự thâm nhiễm viêm và mức độ xơ hóa thay đổi (ví dụ, Wirtz *et al.* (2007) Nat. Protoc. 2:541-546). Việc sử dụng 320-587 làm giảm đáng kể nhiều dấu hiệu bệnh bao gồm dày đại tràng (Fig.12A), số lượng và mức độ nghiêm trọng của sự dính (Fig.12B), và số lượng và mức độ nghiêm trọng của sự hẹp (Fig.12C) dẫn đến làm giảm đáng kể bệnh so với các động vật được điều trị bằng tá dược lỏng hoặc kháng thể không liên quan phù hợp isotyp (Fig.12D). Sự xơ hóa đại tràng giảm (Fig.19) cũng được quan sát thấy ở động vật được điều trị bằng 320.587.

So sánh bệnh sau 7 ngày và 14 ngày ở bệnh viêm đại tràng do DNBS ở chuột. Bệnh viêm đại tràng bị gây ra như đã mô tả trên đây bằng cách sử dụng axit dinitrobenzensulfonic (DNBS) thay cho TNBS, và chuột được sử dụng trong các thử nghiệm DNBS là chuột Wistar. Các động vật được điều trị bằng kháng thể 320-587 hoặc tá dược lỏng qua đường tĩnh mạch vào các ngày 1 và 8. Các nhóm được đánh giá về bệnh viêm đại tràng 7 và 14 ngày sau DNBS và mức độ nghiêm trọng của bệnh được so sánh giữa hai thời điểm. Việc điều trị bằng kháng thể 320-587 có tác dụng hạn chế vào ngày 7, nhưng vào ngày 14, các động vật đã điều trị bằng kháng thể 320-587 thể hiện sự cải thiện đáng kể về độ dài và khối lượng đại tràng (Fig.20A), sự xơ hóa (Fig.20B), thâm nhiễm viêm (Fig.20C) và tổn thương đại tràng (Fig.20D). Các lát cắt đại diện của vùng loét đại tràng (Fig.20E) thể hiện mức độ phục hồi tổn thương và giảm xơ hóa ở ngày 14. Ở cả ngày 7 và 14, động vật được điều trị bằng tá dược lỏng thể hiện sự thâm nhiễm viêm mở rộng và sự xơ hóa với mức độ mất đáng kể cấu trúc ruột. Ngược lại, các động vật được

điều trị bằng 320-587 thể hiện sự thâm nhiễm viêm đáng kể, sự xơ hóa và mất cấu trúc ruột vào ngày 7 nhưng các tác dụng này được đảo ngược mạnh trước 14 ngày.

Các khác biệt được quan sát thấy ở các tác dụng điều trị của kháng thể được quan sát thấy trong các mô hình TNBS và DNBS được cho là xuất phát từ việc sử dụng các giống chuột khác nhau (Sprague-Dawley cho TNBS so với Wistar cho DNBS). Mỗi giống chuột có các khác biệt về phản ứng của chúng đối với việc thử miễn dịch sao cho động học phản ứng của chúng trong các mô hình này được cho là khác nhau. Tương tự, TNBS và DNBS là khác nhau về cấu trúc, và được cho là gây ra các thay đổi về tình trạng bệnh.

Bệnh viêm đại tràng do DSS mãn tính (21 ngày) ở chuột. Chuột được sử dụng dextran sulfat natri (DSS) ở nồng độ 5% khối lượng/thể tích trong nước uống trong 7 ngày, sau đó 2% khối lượng/thể tích trong nước uống trong 14 ngày nữa. Các động vật bị đi ngoài, viêm đại tràng rải rác, tăng sản tế bào hình đài, và tổn thương biểu mô khe và loét (ví dụ Randhawa *et al.* (2014) Korean J. Physiol. Pharmacol. 18:279-88). Chuột được điều trị bằng kháng thể 320-587 hoặc tá dược lỏng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch vào các ngày 5, 12 và 19. Các động vật được cân và được đánh giá về bệnh lâm sàng (đi ngoài và máu ẩn) hàng ngày, và khối lượng và độ dài đại tràng được đánh giá vào ngày 21. Việc điều trị bằng kháng thể 320-587 đảo ngược đáng kể sự chậm tăng cân do DSS (Fig.21A), các triệu chứng lâm sàng của bệnh được cải thiện (Fig.21B) và độ dài và khối lượng đại tràng được cải thiện (Fig.21C).

Cảm ứng các xytokin trong màng bụng bằng TL1A người tái tổ hợp. Việc tiêm trong màng bụng TL1A chuột nhất tái tổ hợp có thể gây ra sự sản sinh các xytokin viêm như IL-5. Trong thử nghiệm này, chuột nhất nhận được một liều duy nhất kháng thể 320-587 hoặc tá dược lỏng sau đó một giờ sau được xử lý bằng TL1A người tái tổ hợp (rhTL1A) 40 µg/chuột. Sáu giờ sau liều rhTL1A, việc rửa màng bụng được thực hiện và dịch màng bụng được đánh giá về xytokin và chemokin bằng thử nghiệm đa thành phần. Việc điều trị bằng kháng thể 320-587 làm giảm đáng kể nồng độ trong màng bụng của các xytokin G-CSF, IL-1b, IL-5, IL-6, IL-17, và các chemokin IP-10, KC, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, MIP-2 (Fig.22).

Phần mô tả này không bị giới hạn vào các phương án đã mô tả và được lấy ví dụ trên đây, mà có thể thay đổi và cải biến trong phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể tái tổ hợp, chứa vùng biến đổi chuỗi nặng CDR1 chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.15, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR2 chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.21, vùng biến đổi chuỗi nặng CDR3 chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.17, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR1 chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.18, vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR2 chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.19, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ CDR3 chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.22, trong đó trong đó kháng thể này liên kết đặc hiệu với phối tử tương tự yếu tố hoại tử khối u 1A (Tumor necrosis factor-like ligand 1A -TL1A).
2. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó trong đó kháng thể này có khả năng ức chế tương tác của TL1A với thụ thể chết 3 (DR3).
3. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng.
4. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3.
5. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4.
6. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4.
7. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.60.
8. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa a light chain chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.61.
9. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 5, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.60.
10. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 4, trong đó kháng thể này chứa a light chain chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.61.

11. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.60 và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.61.
12. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.43.
13. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.48.
14. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định chuỗi nhẹ IgG1 của người và vùng hằng định lambda chuỗi nhẹ của người.
15. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 5, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.43.
16. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 10, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.43.
17. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 4, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.48.
18. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 7, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.48.
19. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 của người.
20. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 19, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 của người chứa SEQ ID NO.42, SEQ ID NO.43, SEQ ID NO.44, SEQ ID NO.62, SEQ ID NO.63, SEQ ID NO.64, SEQ ID NO.65, hoặc SEQ ID NO.66.
21. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định chuỗi nặng IgG4 của người.
22. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 21, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng IgG4 của người chứa SEQ ID NO.45, SEQ ID NO.46, SEQ ID NO.47, hoặc SEQ ID NO.69.
23. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định chuỗi nặng IgG2 của người.

24. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 23, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng IgG2 của người chứa SEQ ID NO.67, SEQ ID NO.68, SEQ ID NO.70, hoặc SEQ ID NO.71.
25. Kháng thể tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định lambda chuỗi nhẹ của người.
26. Chế phẩm, chứa kháng thể tái tổ hợp theo điểm 1 và chất mang dược dụng, trong đó chế phẩm này được bào chế để sử dụng cho người.
27. Tế bào vật chủ biến nạp chứa polynucleotit mã hóa kháng thể theo điểm 1 và biểu hiện kháng thể này.
28. Phương pháp sản xuất kháng thể bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ theo điểm 27.
29. Phương pháp phát hiện TL1A *in vitro* trong mẫu thu được từ đối tượng bao gồm bước cho mẫu tiếp xúc với kháng thể theo điểm 1 và phát hiện kháng thể liên kết với TL1A trong mẫu.
30. Polynucleotit chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.3.
31. Tế bào vật chủ chứa vector chứa polynucleotit theo điểm 30.
32. Polynucleotit chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4.
33. Tế bào vật chủ chứa vector chứa polynucleotit theo điểm 32.
34. Tế bào vật chủ theo điểm 33, trong đó tế bào vật chủ này còn chứa polynucleotit chứa trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.4.

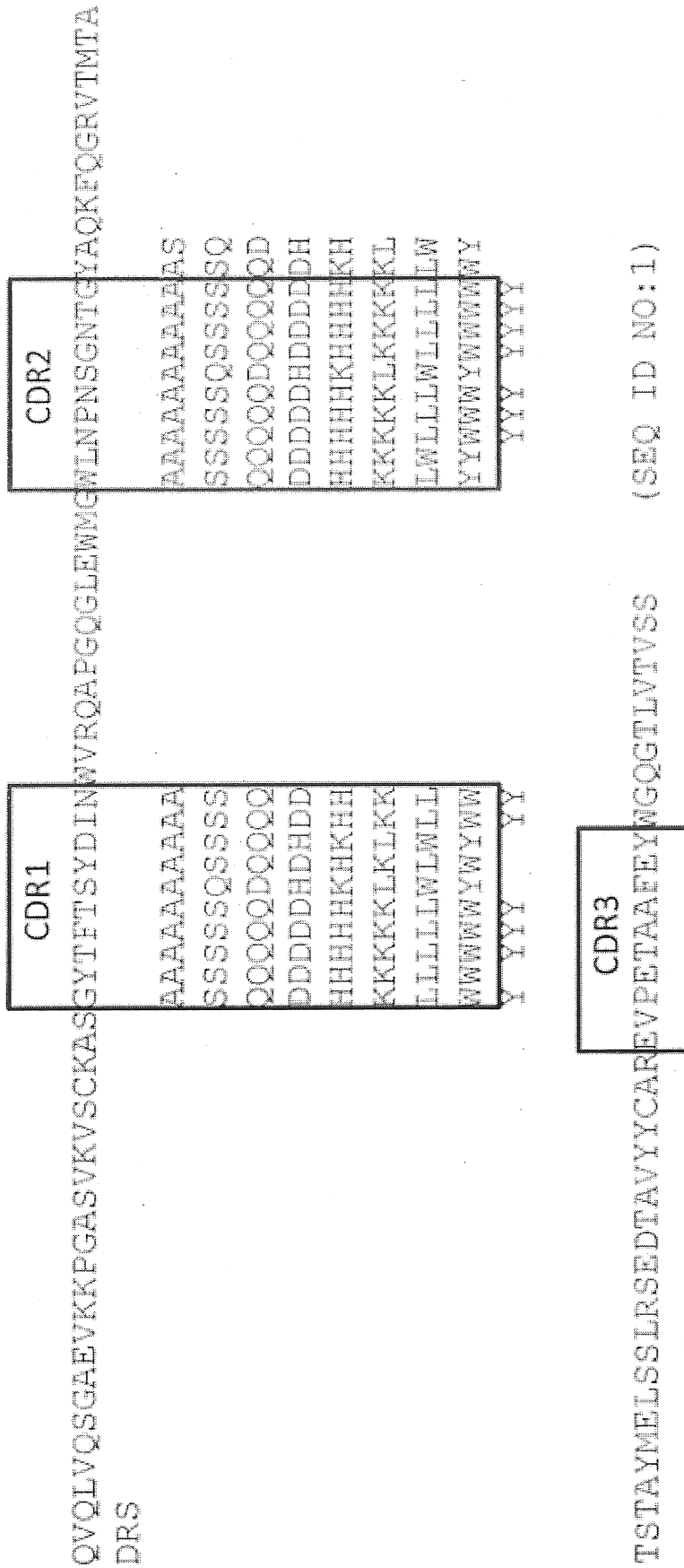


Fig.1

2/22

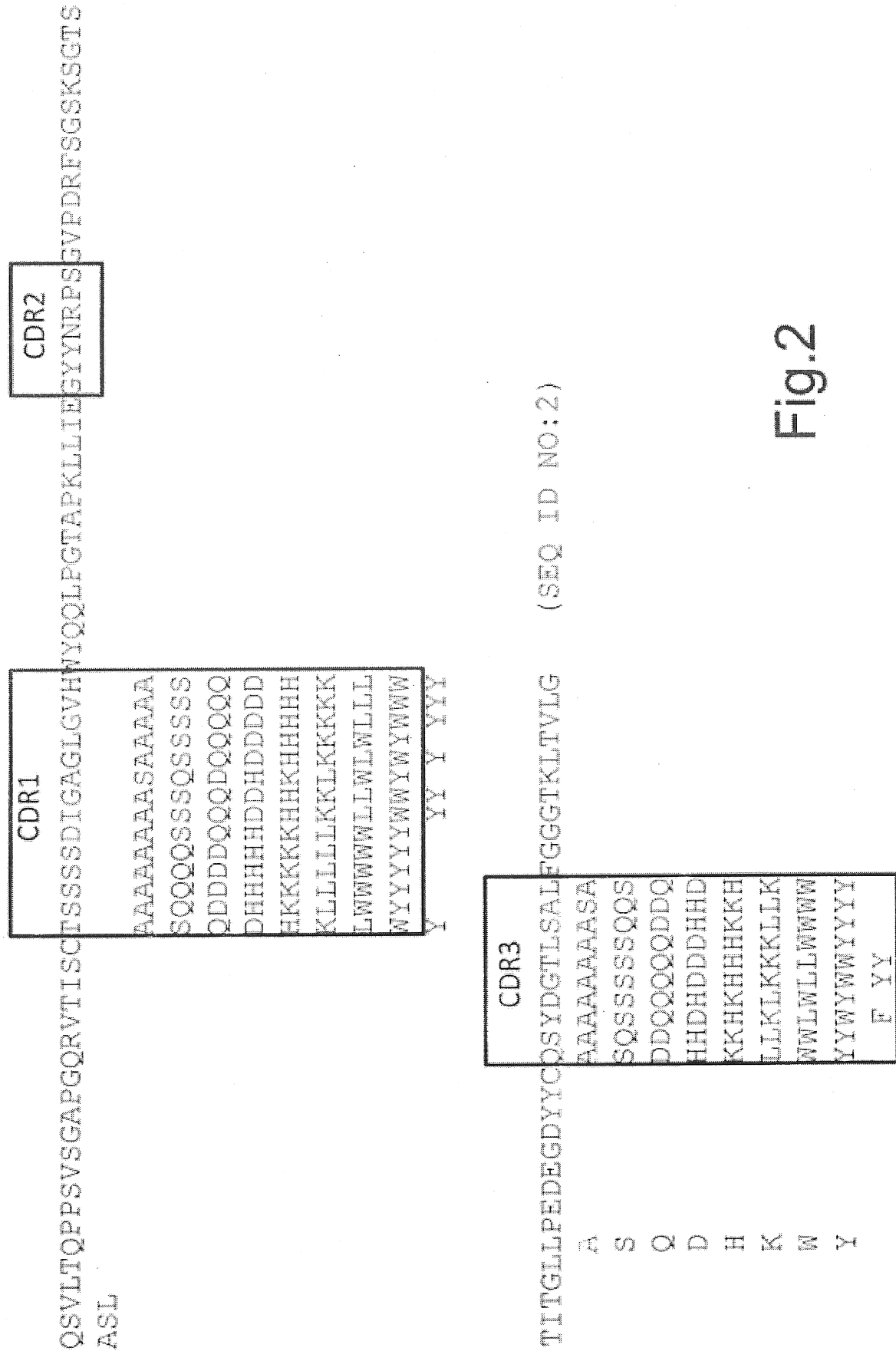


Fig.2

3/22

	10	20	30	40	50	60	
179VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWMGWLNPNSGNTGYAQKFQGRVT						
267VH							
277VH							
278VH							
307VH							
331VH							
547VH					Y		
583VH							
584VH							
585VH							
586VH							
587VH					Y		
591VH					Y		
592VH					Y		
593VH					Y		
594VH					Y		
595VH					Y		
601VH					Y		
	70	80	90	100	110		
179VH	MTADRSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREVPETAAFEYWGQGTILVTVSS					SEQ ID NO:1	
267VH						SEQ ID NO:1	
277VH						SEQ ID NO:1	
278VH						SEQ ID NO:1	
307VH						SEQ ID NO:1	
331VH						SEQ ID NO:1	
547VH						SEQ ID NO:3	
583VH						SEQ ID NO:1	
584VH						SEQ ID NO:1	
585VH						SEQ ID NO:1	
586VH						SEQ ID NO:1	
587VH						SEQ ID NO:3	
591VH						SEQ ID NO:3	
592VH						SEQ ID NO:3	
593VH						SEQ ID NO:3	
594VH						SEQ ID NO:3	
595VH						SEQ ID NO:3	
601VH						SEQ ID NO:3	

Fig.3

4/22

	10	20	30	40	50	60	
179VL	QSVLTQPPSVSGAPGQ	RVTISCTSSSSDIGAGL	GVHWYQQLPGTAPKLL	IEGYNNRPSGV	PDRFS		
267VL			A				
277VL			S				
278VL			Q				
307VL			L				
331VL							
547VL							
583VL			A				
584VL			S				
585VL			Q				
586VL			L				
587VL							
591VL			L				
592VL			A				
593VL			S				
594VL			Q				
595VL			L				
601VL							

	70	80	90	100	110	
179VL	GTSASLTITGLLP	DEGDYQCQSYDGTLS	ALFGGGTKLTVLG			SEQ ID NO:2
267VL						SEQ ID NO:11
277VL						SEQ ID NO:12
278VL						SEQ ID NO:13
307VL						SEQ ID NO:9
331VL			W			SEQ ID NO:4
547VL						SEQ ID NO:2
583VL			W			SEQ ID NO:5
584VL			W			SEQ ID NO:6
585VL			W			SEQ ID NO:7
586VL			W			SEQ ID NO:8
587VL			W			SEQ ID NO:4
591VL						SEQ ID NO:9
592VL			W			SEQ ID NO:5
593VL			W			SEQ ID NO:6
594VL			W			SEQ ID NO:7
595VL			W			SEQ ID NO:8
601VL			F			SEQ ID NO:10

Fig.4

5/22

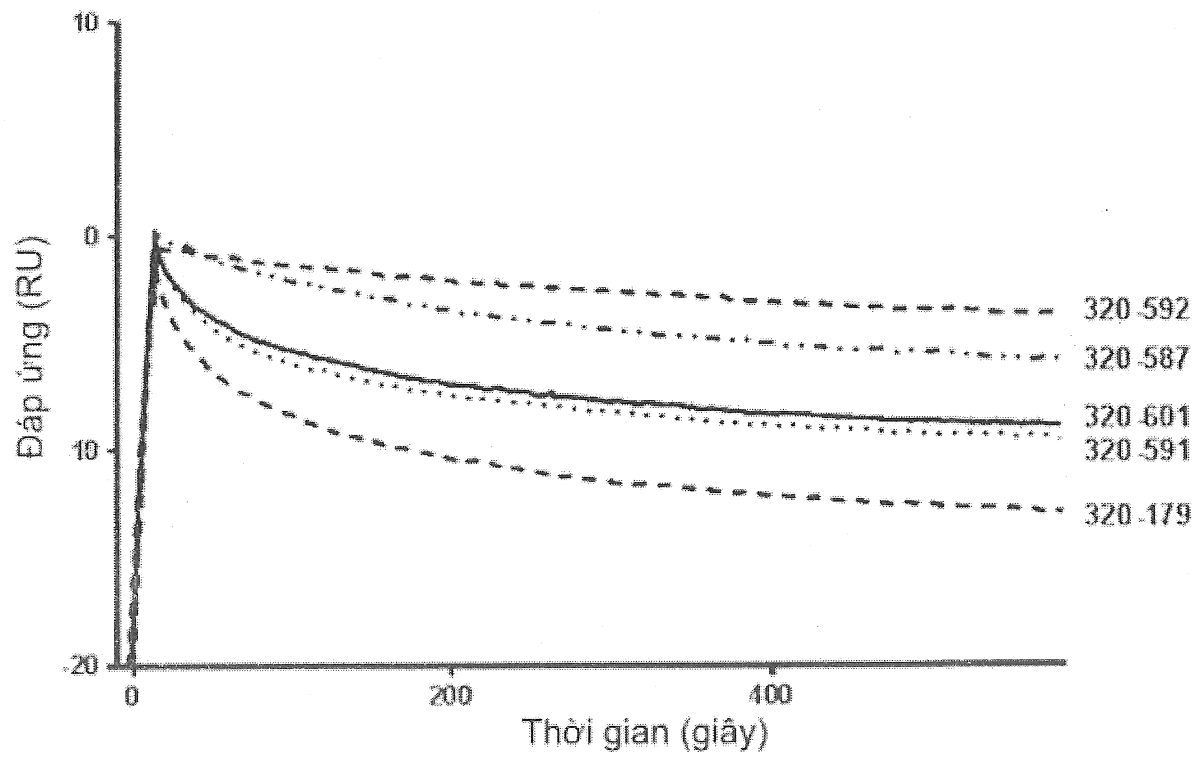
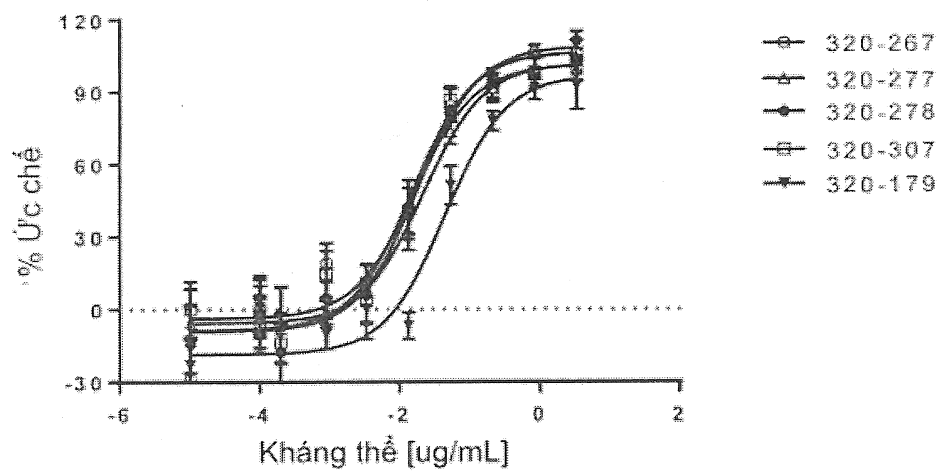


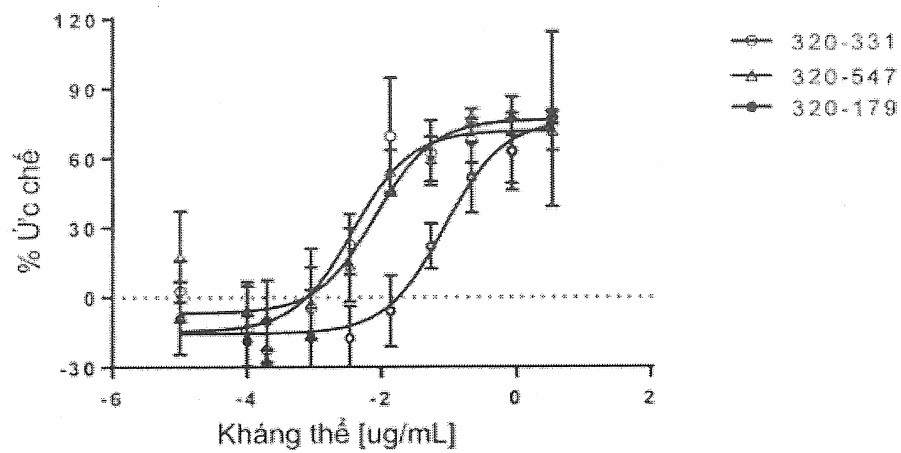
Fig.5

6/22

Thử nghiệm caspaza tế bào TF-1



Thử nghiệm caspaza tế bào TF-1



Thử nghiệm caspaza tế bào TF-1

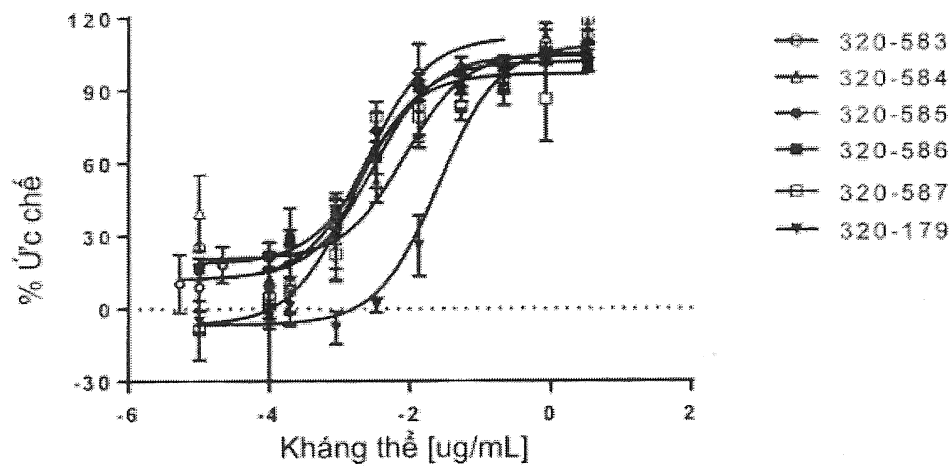


Fig.6

7/22

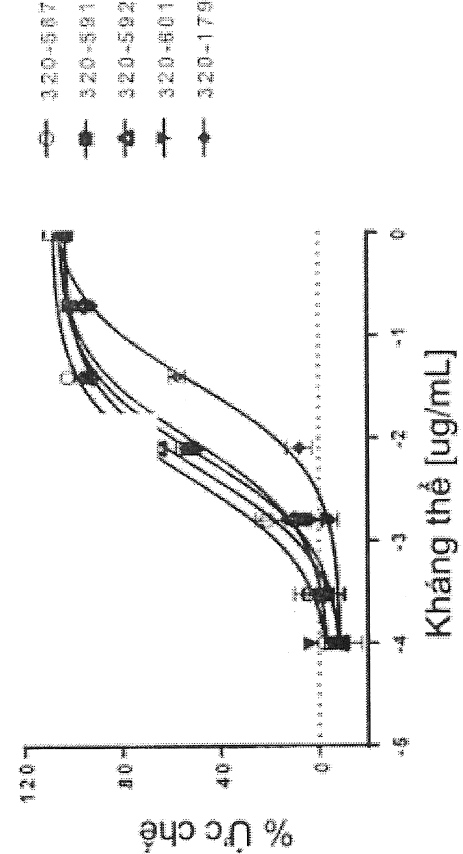
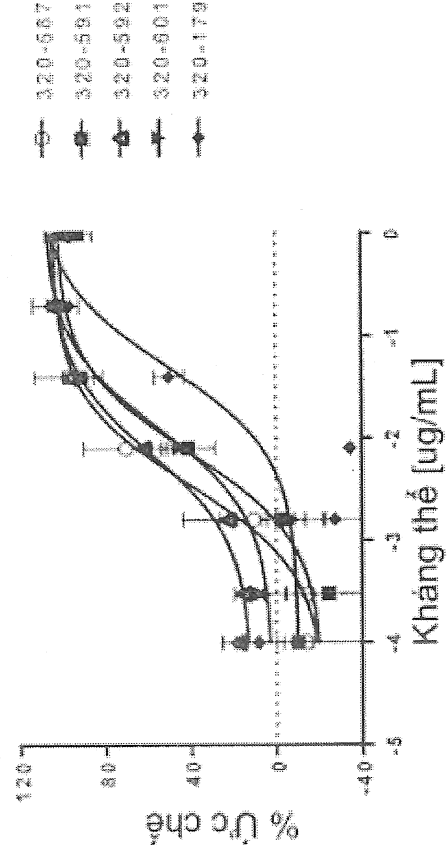
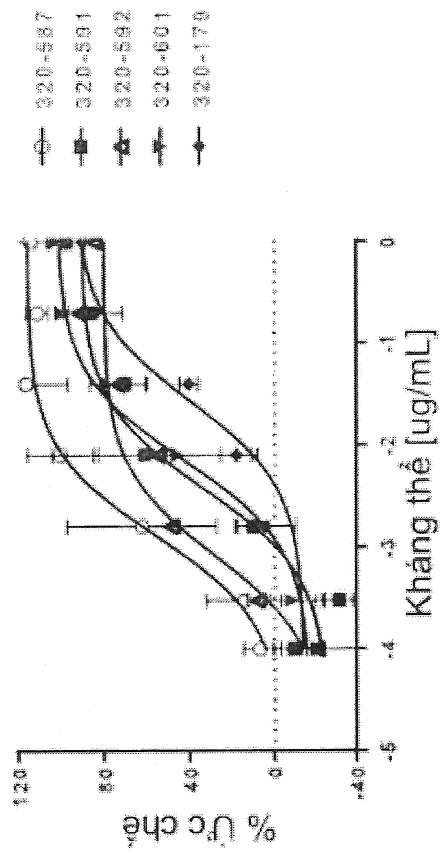
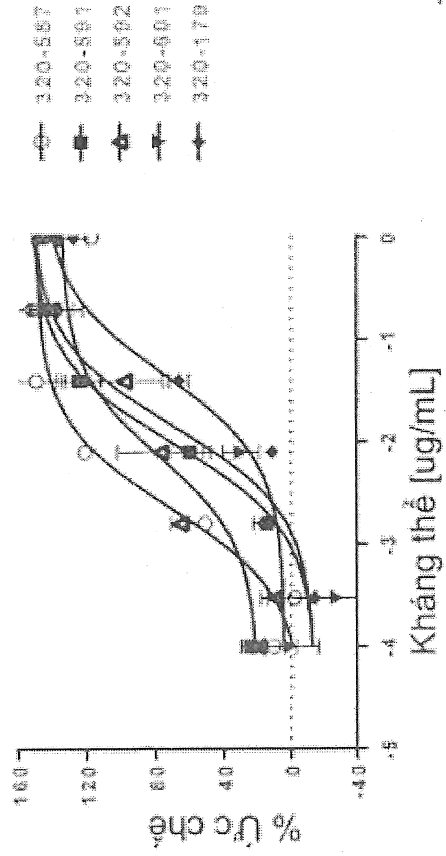
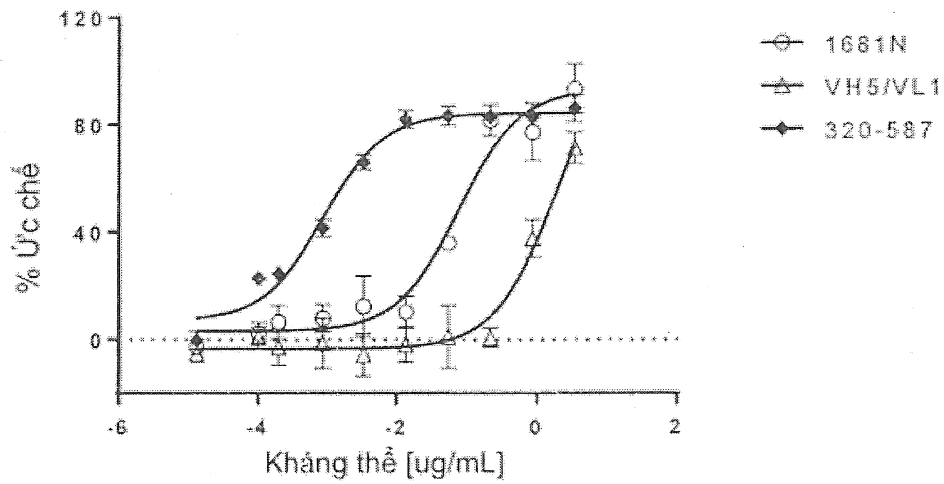
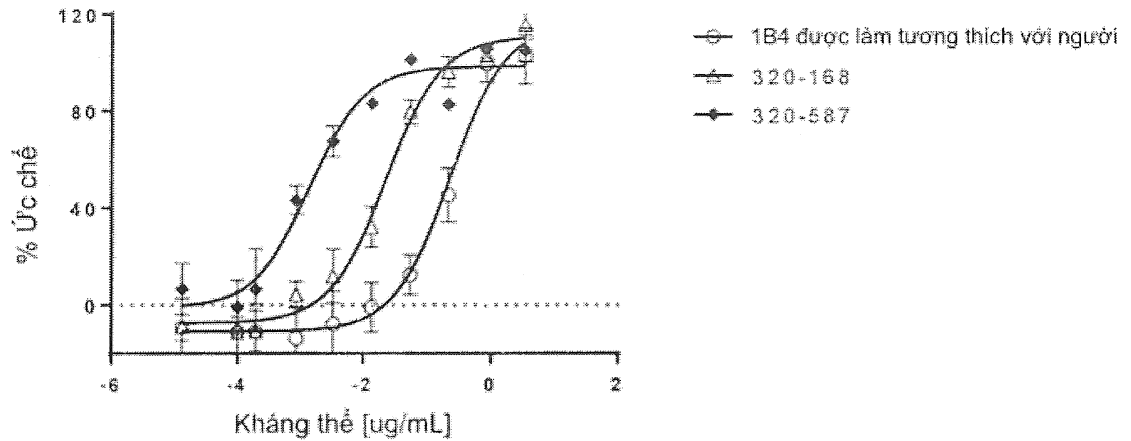


Fig.7

8/22



Kháng thể	IC-50 (ug/mL)	Số lần cải thiện là 320-587
320-587	0,00091	
1681N	0,077	85
VH5/VL1	1,876	2062

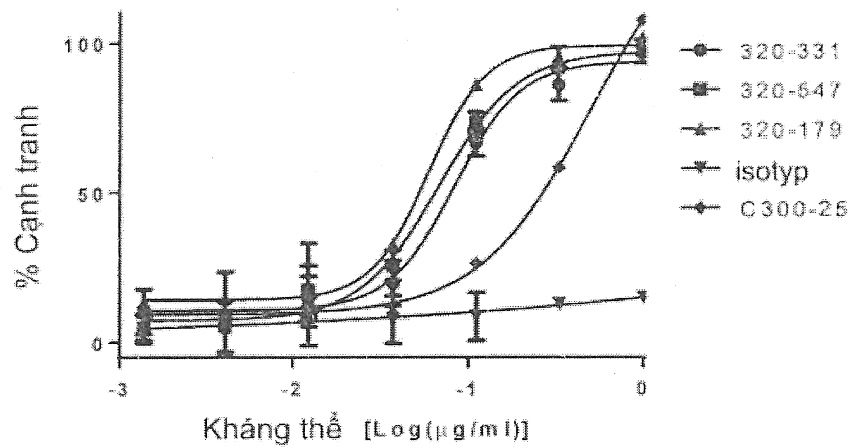


Kháng thể	IC-50 (ug/mL)	Số lần cải thiện là 320-587
320-587	0,0015	
320-168	0,023	15,3
VH5/VL1	0,23	153

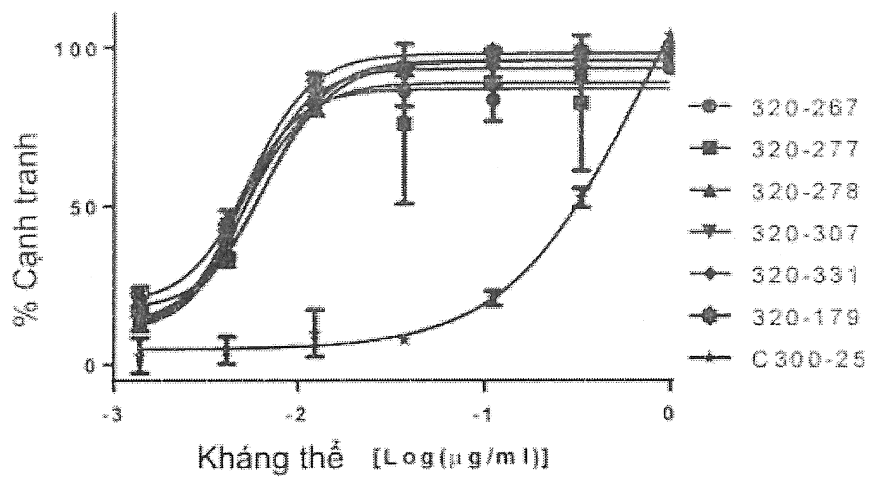
Fig.8

9/22

Cạnh tranh để liên kết với TL1A: DR3



Cạnh tranh để liên kết với TL1A: DR3



Cạnh tranh để liên kết với TL1A: DR3

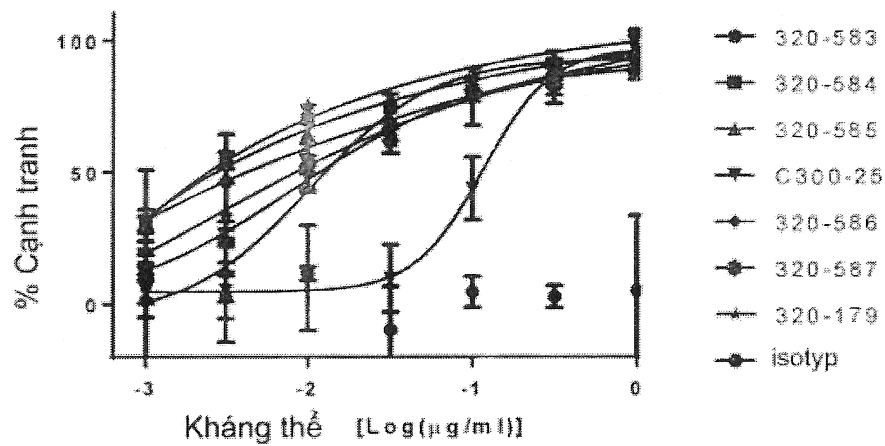
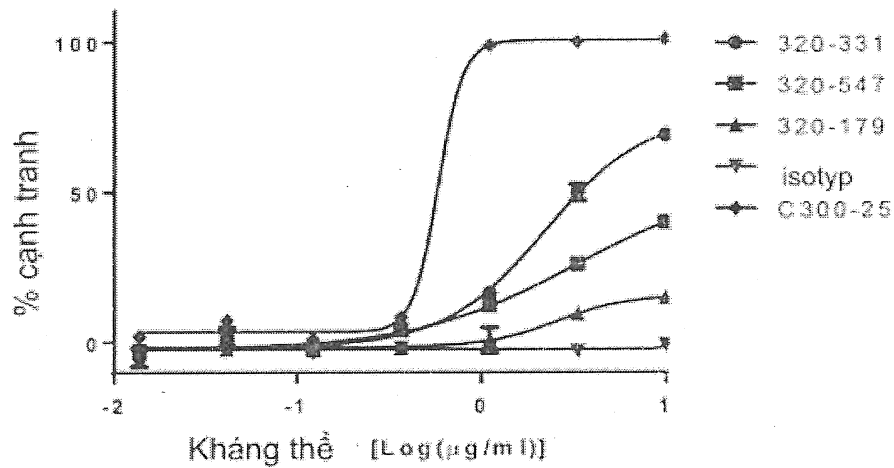


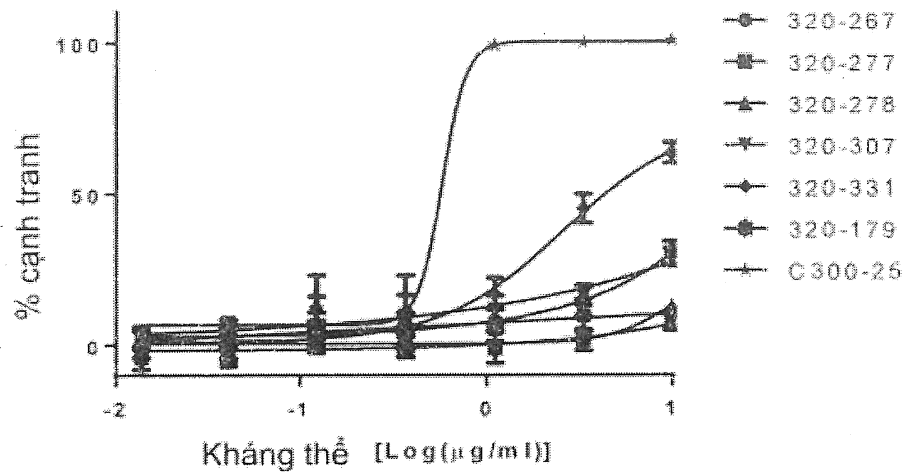
Fig.9

10/22

Cạnh tranh để liên kết với TL1A: DcR3



Cạnh tranh để liên kết với TL1A: DcR3



Cạnh tranh để liên kết với TL1A: DcR3

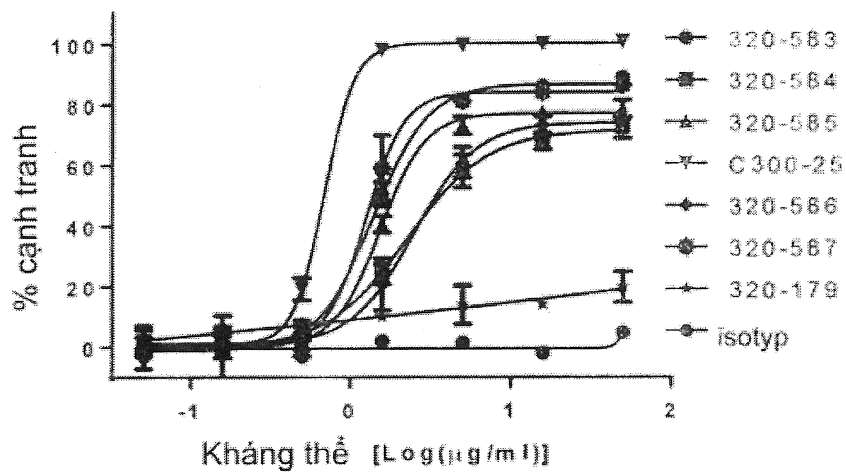


Fig.10

11/22

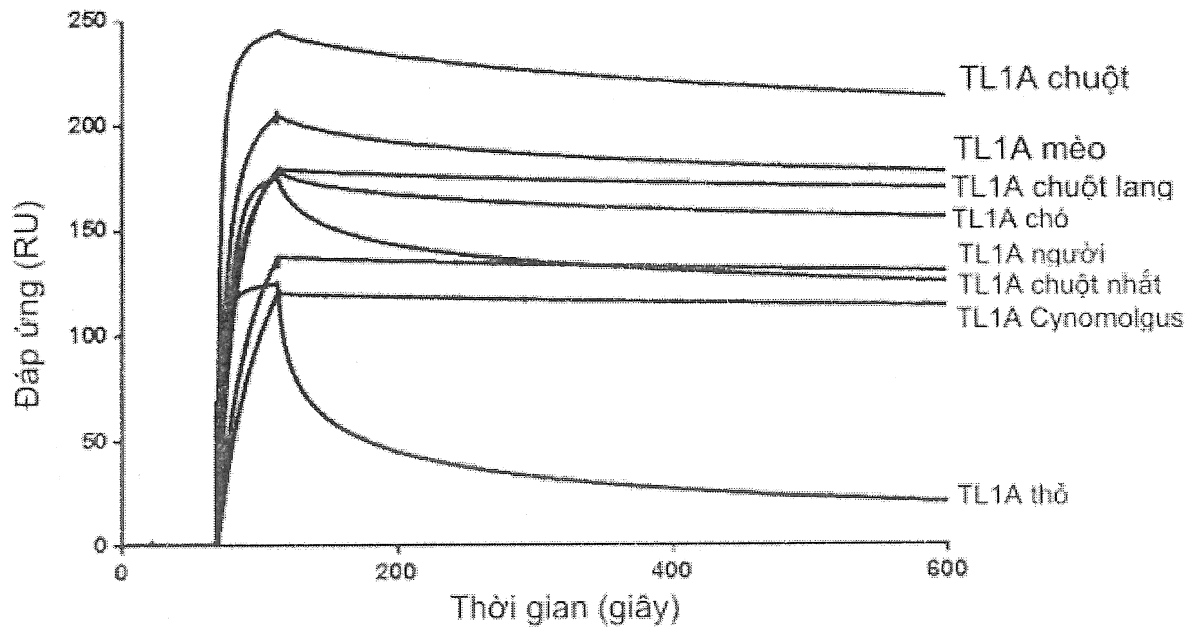


Fig.11

12/22

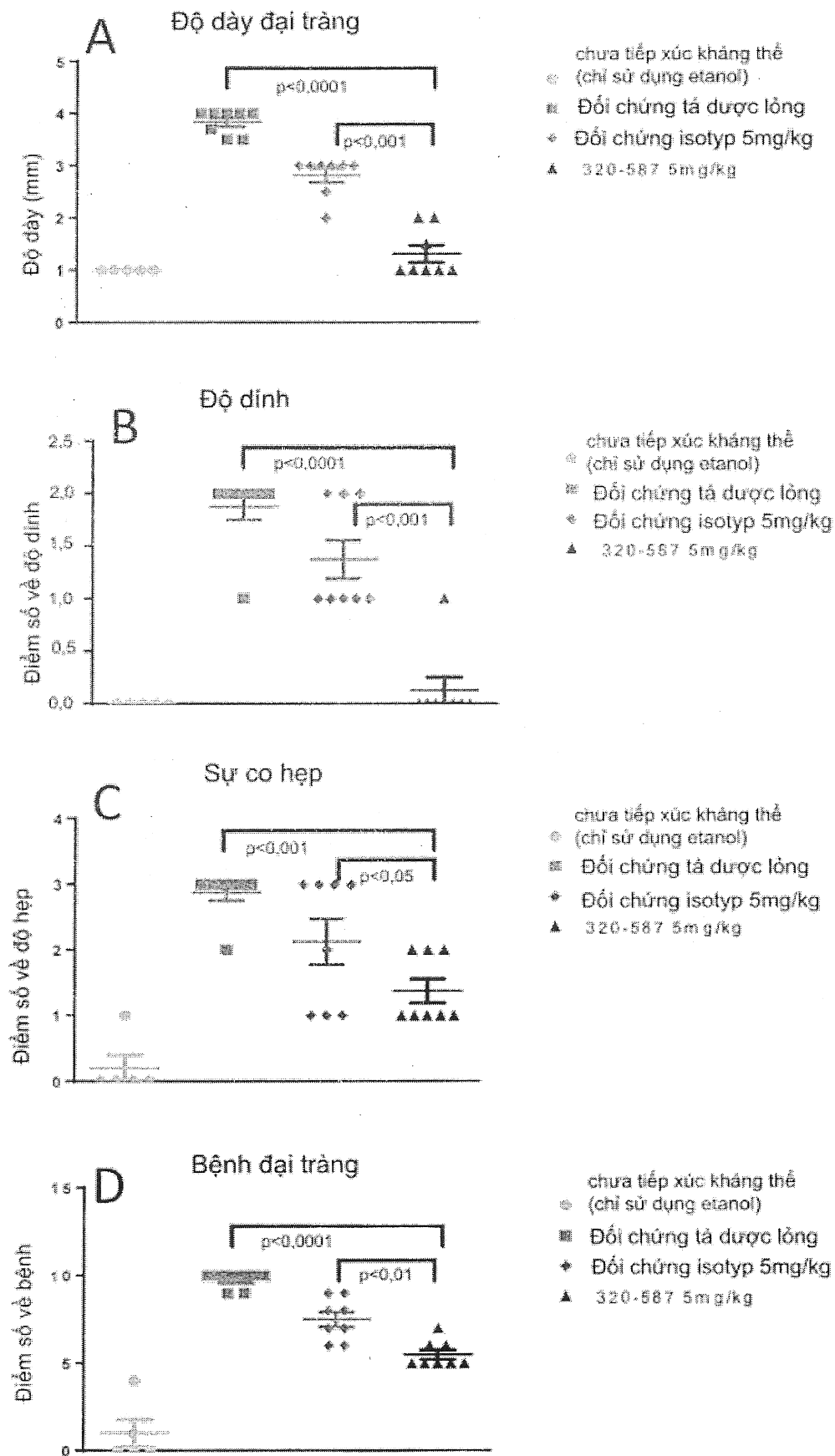


Fig.12

13/22

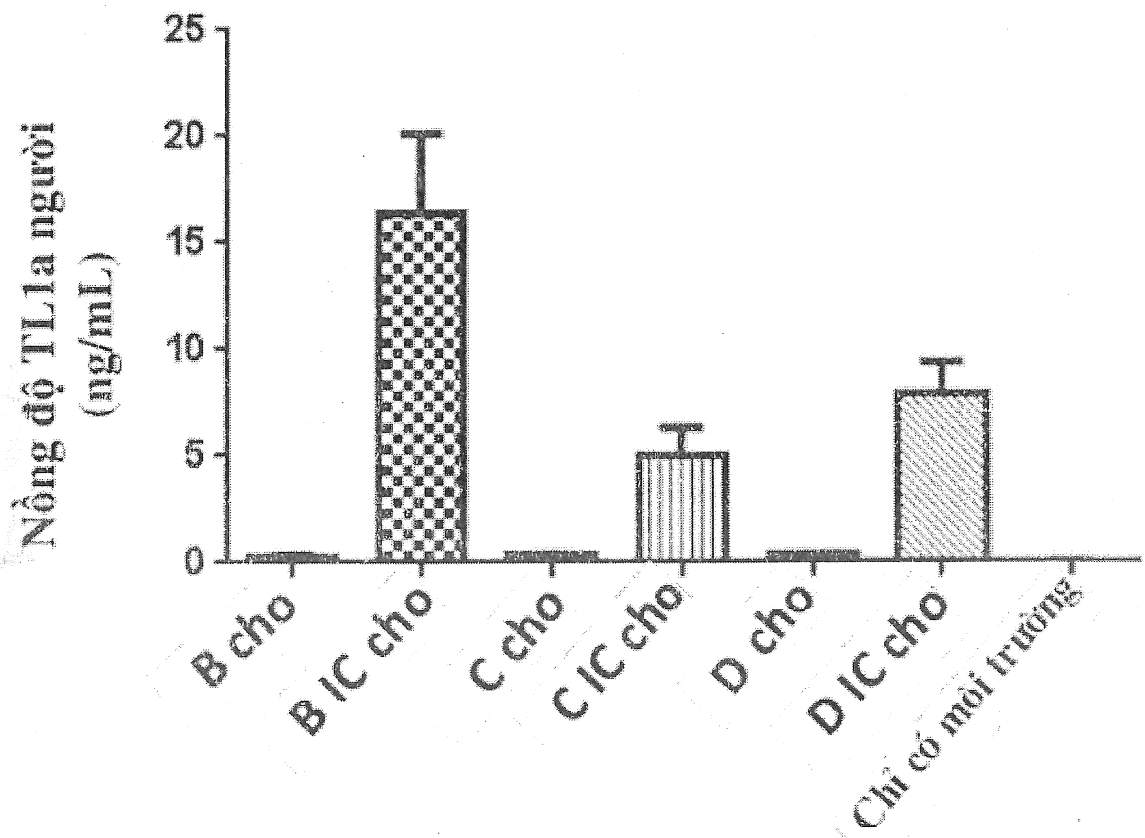


Fig.13

14/22

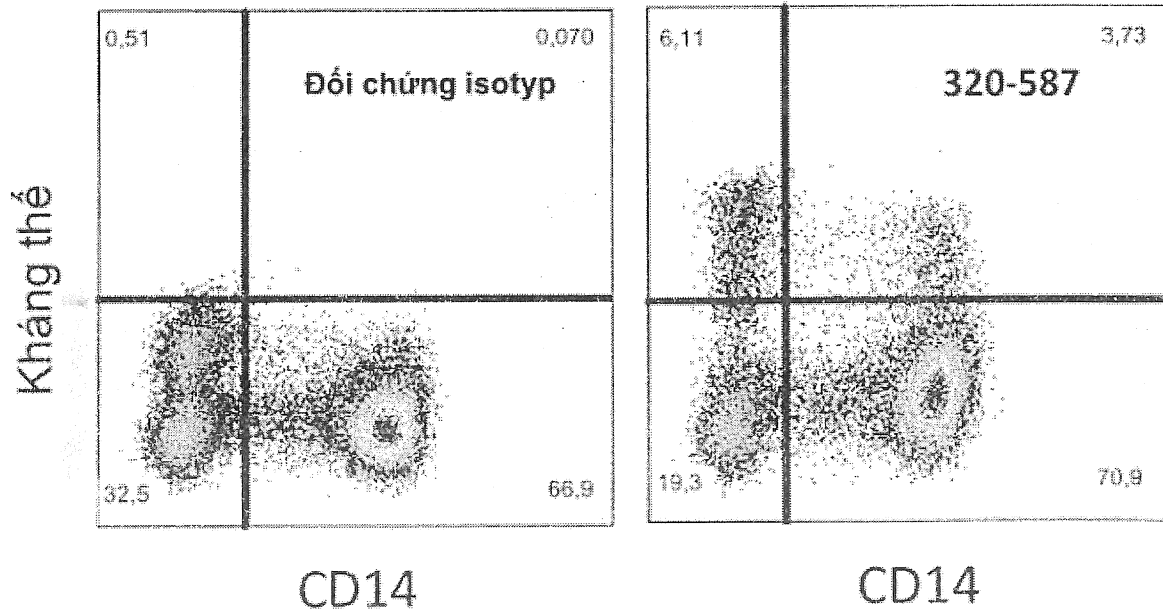


Fig.14

15/22

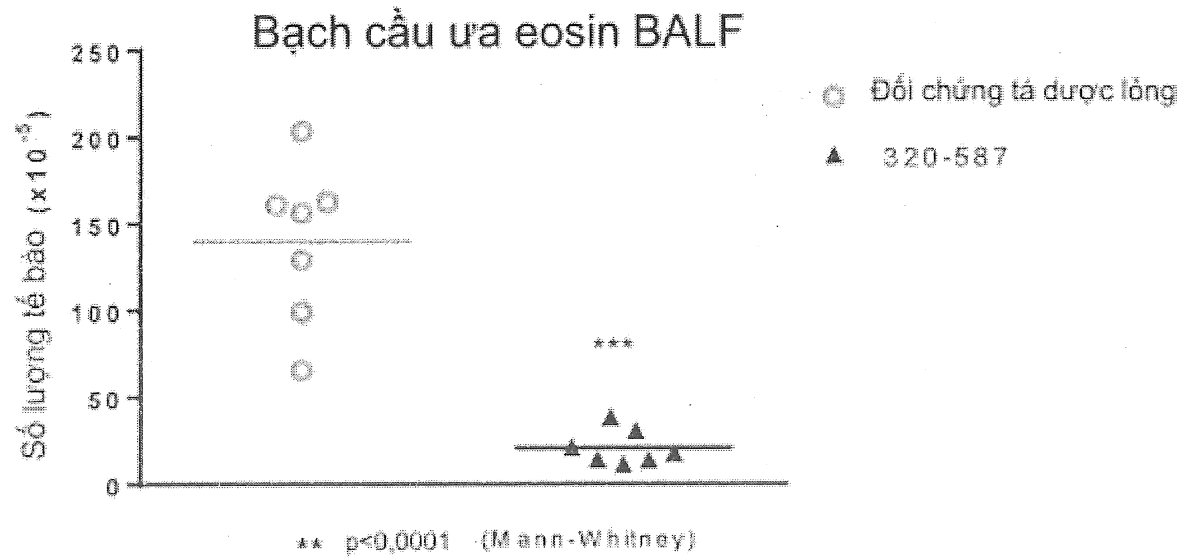


Fig.15

Fig.16A

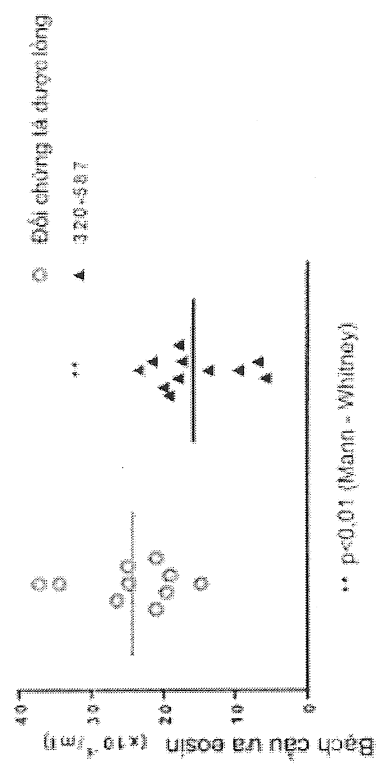


Fig.16B

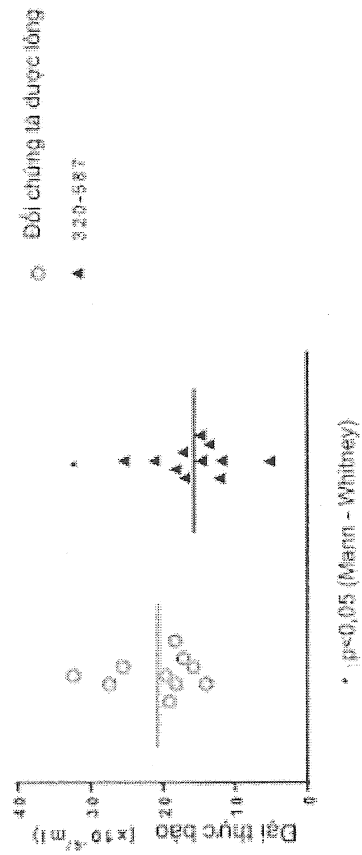


Fig.16C

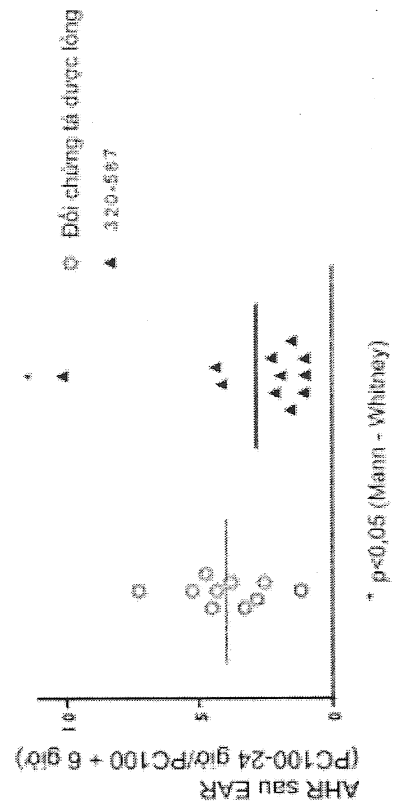
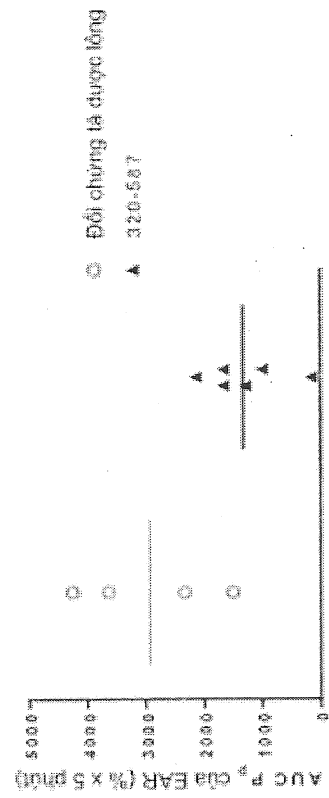


Fig.16D



17/22

Fig.17A

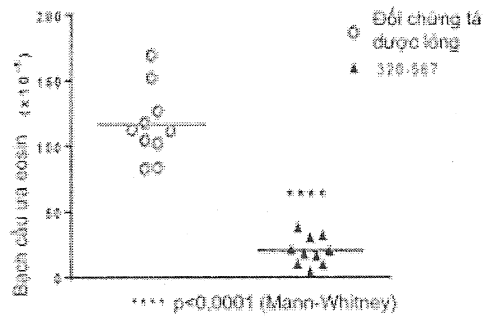


Fig.17B

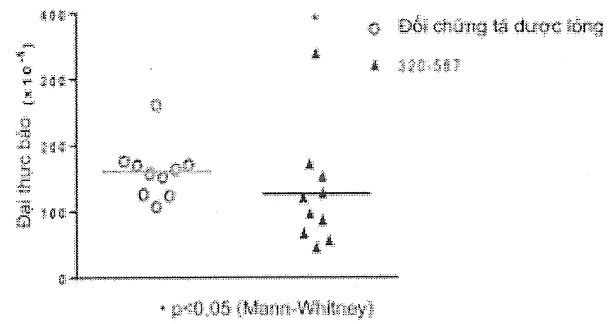


Fig.17C

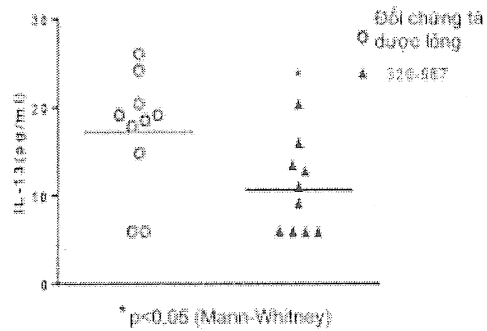


Fig.17D

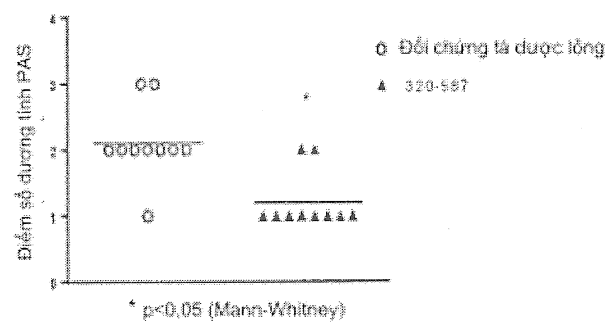
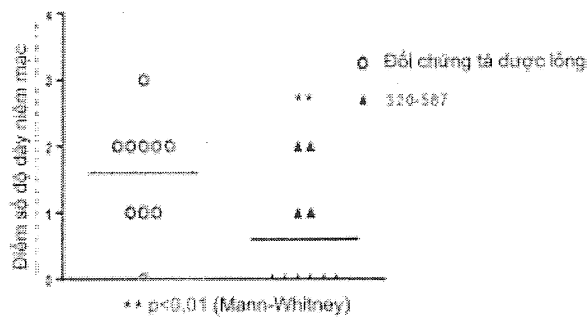


Fig.17E



18/22

Liều albumin trứng cần thiết để làm tăng 100%
sự tắc nghẽn đường thở

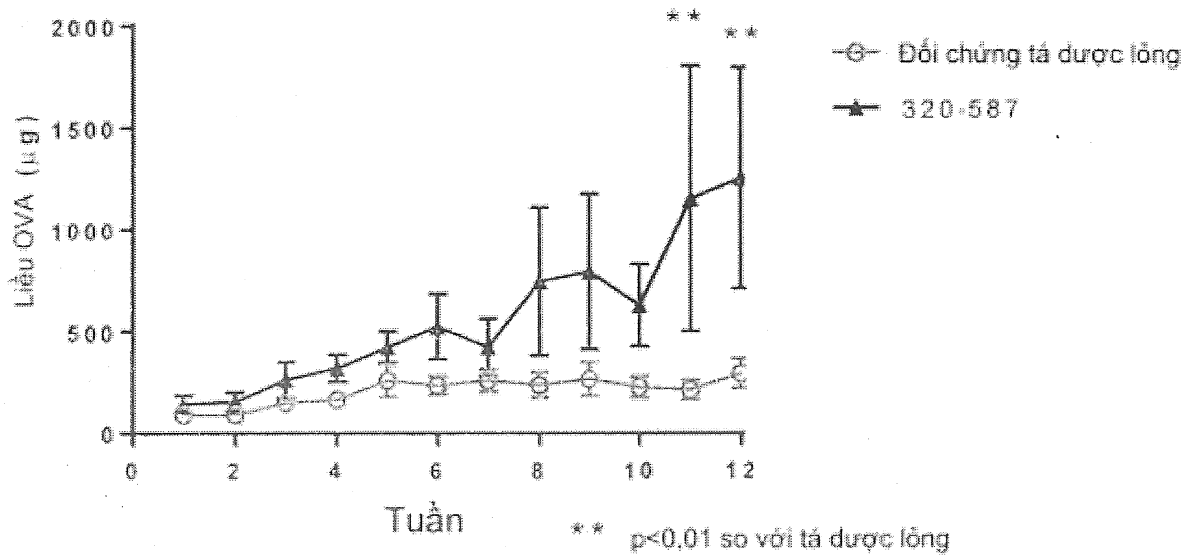
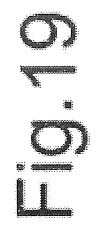


Fig.18



20/22

Fig.20A

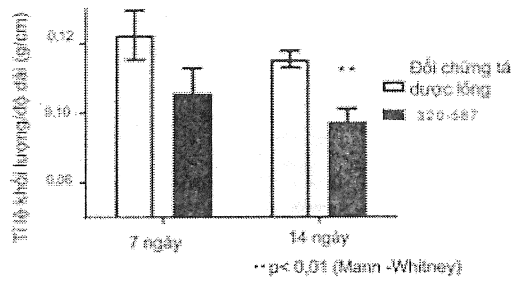


Fig.20B

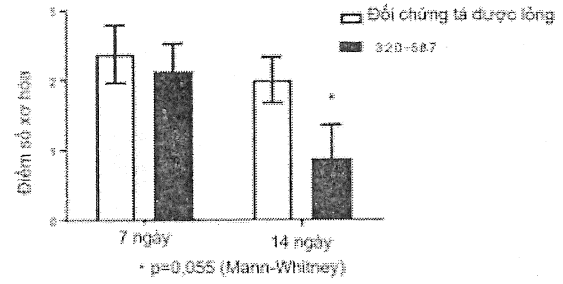


Fig.20C

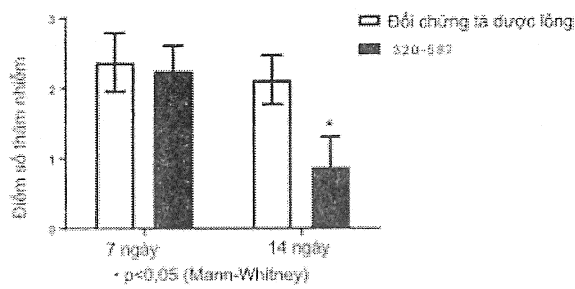


Fig.20D

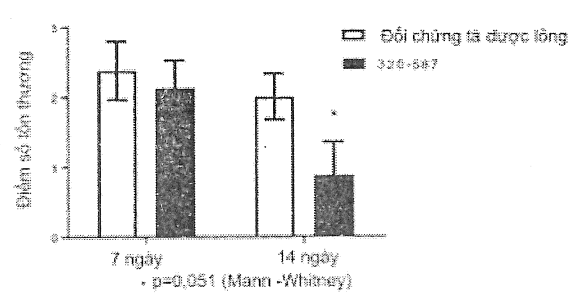


Fig.20E

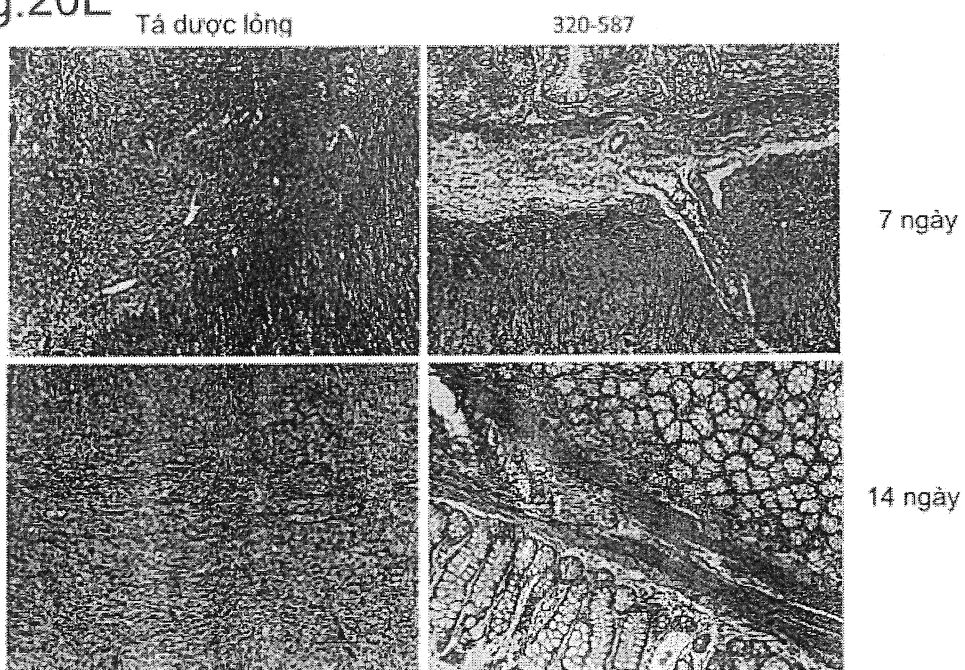


Fig.21A

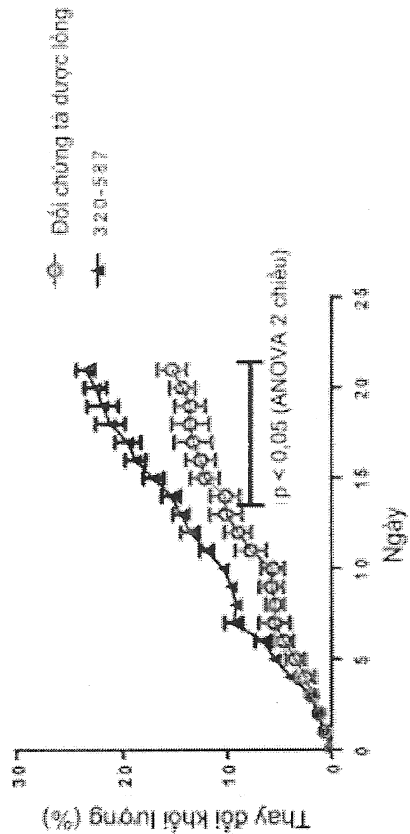


Fig.21B

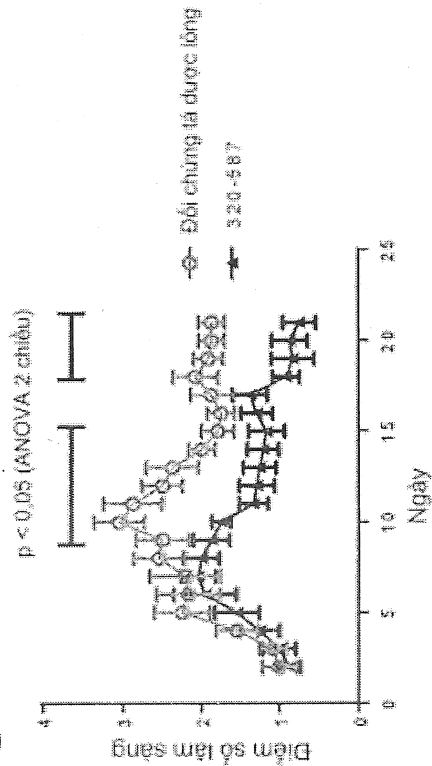
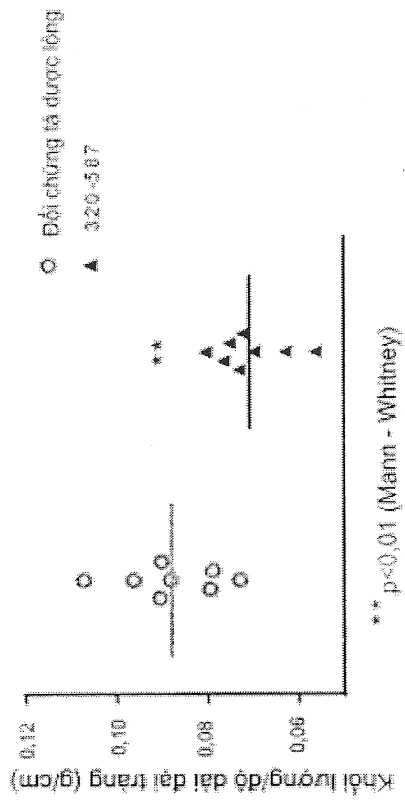


Fig.21C



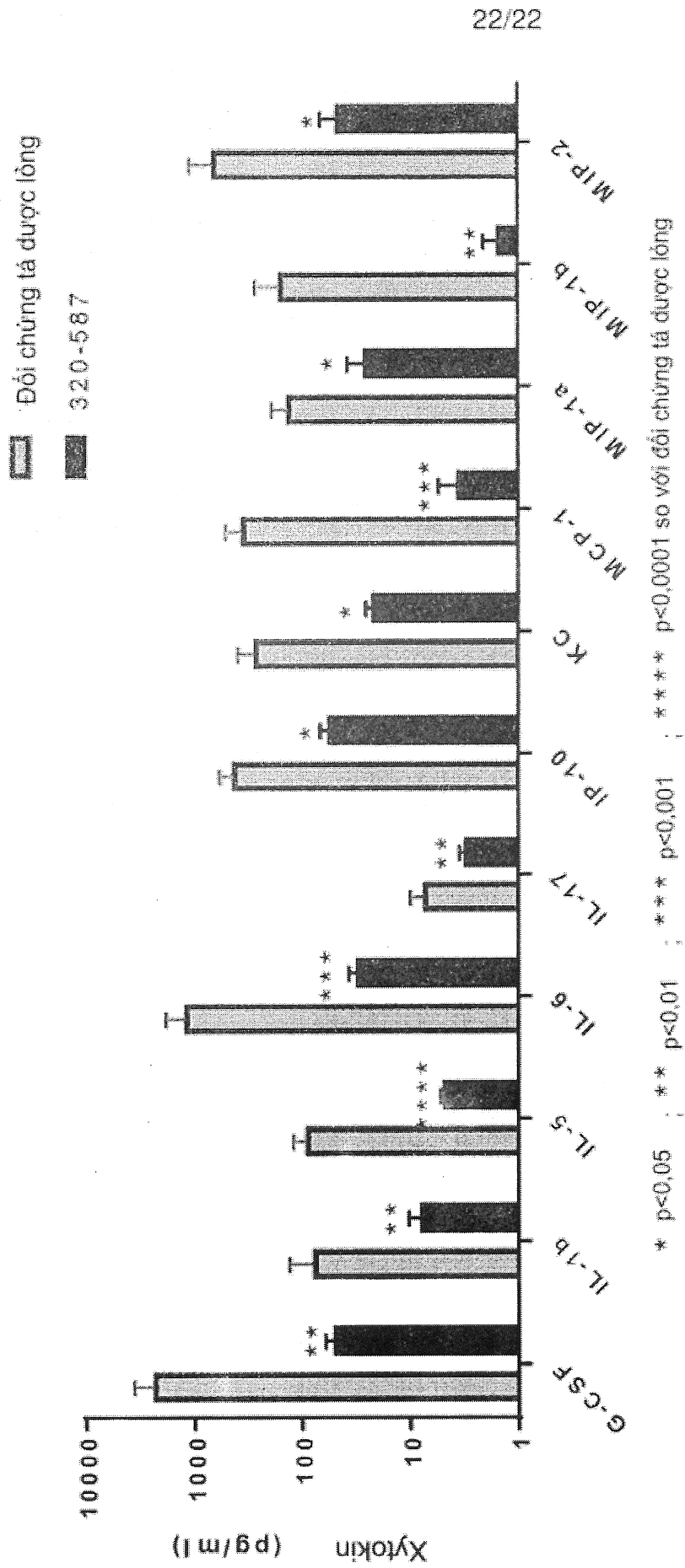


Fig.22

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CEPHALON, INC.
 <120> KHÁNG THỂ LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI PHỐI TỬ TUƠNG TỰ YẾU TỔ HOẠI TỬ KHỐI U
 1A VÀ CHẾ PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY
 <130> 185704-3019
 <160> 71
 <170> PatentIn phiên bản 3.5
 <210> 1
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 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 Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Arg 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 Glu Val Pro Glu Thr Ala Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 2
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Ser Ser Ser Ser Asp Ile Gly Ala Gly
 20 25 30
 Leu Gly Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Glu Gly Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Leu Pro Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Gly Thr
 85 90 95
 Leu Ser Ala Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 <210> 3
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 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 Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Arg 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 Glu Val Pro Glu Thr Ala Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 4
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

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

<210> 5
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

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

<210> 6
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

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

<210> 7
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

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

<210> 8
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

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

<210> 9
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

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

<210> 10
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

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

```

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

```

<210> 11

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

```

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

```

<210> 12

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

```

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

```

<210> 13

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

```

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

```

```

      50              55              60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Leu
65              70              75              80
Leu Pro Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Gly Thr
      85              90              95
Leu Ser Ala Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
      100              105              110

<210> 14
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> Xaa
<222> (32)..(32)
<223> G hoặc A
<220>
<221> Xaa
<222> (33)..(33)
<223> L hoặc S hoặc Q
<220>
<221> Xaa
<222> (36)..(36)
<223> H hoặc L
<220>
<221> Xaa
<222> (93)..(93)
<223> Y hoặc F hoặc W
<400> 14
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1              5              10              15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Ser Ser Ser Ser Asp Ile Gly Ala Xaa
      20              25              30
Xaa Gly Val Xaa Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
      35              40              45
Leu Ile Glu Gly Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50              55              60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Leu
65              70              75              80
Leu Pro Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Xaa Asp Gly Thr
      85              90              95
Leu Ser Ala Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
      100              105              110

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 15
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn
1              5              10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 16
Trp Leu Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly
1              5              10

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 17
Glu Val Pro Glu Thr Ala Ala Phe Glu Tyr
1              5              10

```

```

<210> 18
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 18
Thr Ser Ser Ser Ser Asp Ile Gly Ala Gly Leu Gly Val His
1          5          10
<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 19
Gly Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser
1          5
<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 20
Gln Ser Tyr Asp Gly Thr Leu Ser Ala Leu
1          5          10
<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 21
Trp Leu Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gly
1          5          10
<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 22
Gln Ser Trp Asp Gly Thr Leu Ser Ala Leu
1          5          10
<210> 23
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 23
Thr Ser Ser Ser Ser Asp Ile Gly Ala Ala Leu Gly Val His
1          5          10
<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 24
Thr Ser Ser Ser Ser Asp Ile Gly Ala Gly Ser Gly Val His
1          5          10
<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 25
Thr Ser Ser Ser Ser Asp Ile Gly Ala Gly Gln Gly Val His
1          5          10
<210> 26
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 26
Thr Ser Ser Ser Ser Asp Ile Gly Ala Gly Leu Gly Val Leu
1          5          10

```

```

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 27
Gln Ser Phe Asp Gly Thr Leu Ser Ala Leu
1          5          10
<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> Xaa
<222> (8)..(8)
<223> N hoặc Y
<400> 28
Trp Leu Asn Pro Asn Ser Gly Xaa Thr Gly
1          5          10
<210> 29
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> Xaa
<222> (10)..(10)
<223> G hoặc A
<220>
<221> Xaa
<222> (11)..(11)
<223> L hoặc S hoặc Q
<220>
<221> Xaa
<222> (14)..(14)
<223> H hoặc L
<400> 29
Thr Ser Ser Ser Ser Asp Ile Gly Ala Xaa Xaa Gly Val Xaa
1          5          10
<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<221> Xaa
<222> (3)..(3)
<223> Y hoặc W hoặc F
<400> 30
Gln Ser Xaa Asp Gly Thr Leu Ser Ala Leu
1          5          10
<210> 31
<211> 180
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 31
Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser His Gln Gln Val Tyr Ala Pro
1          5          10          15
Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg Ala His Leu Thr Val Val Arg
          20          25          30
Gln Thr Pro Thr Gln His Phe Lys Asn Gln Phe Pro Ala Leu His Trp
          35          40          45
Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr
          50          55          60
Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser
65          70          75          80

```

Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln
 85 90 95
 Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser Ile Thr Val Val Ile Thr Lys
 100 105 110
 Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys
 115 120 125
 Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly
 130 135 140
 Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp Lys Leu Met Val Asn Val Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly
 165 170 175
 Ala Phe Leu Leu
 180

<210> 32
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 32

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

<210> 33
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 33

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

```

      115              120              125
Arg  Pro Asn Lys Pro Asp Ser Ile Thr Val Val Ile Thr Lys Val Thr
      130              135              140
Asp  Ser Tyr Pro Glu Pro Thr Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys Ser Val
      145              150              155              160
Cys  Glu Val Gly Ser Asn Trp Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly Ala Met
      165              170              175
Phe  Ser Leu Gln Glu Gly Asp Lys Leu Met Val Asn Val Ser Asp Ile
      180              185              190
Ser  Leu Val Asp Tyr Thr Lys Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala Phe
      195              200              205
Leu  Leu
      210
<210> 34
<211> 180
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis
<400> 34
Leu Lys Gly Gln Glu Phe Ala Pro Ser His Gln Gln Val Tyr Ala Pro
1              5              10              15
Leu Arg Ala Asp Gly Asp Lys Pro Arg Ala His Leu Thr Val Val Arg
      20              25              30
Gln Thr Pro Thr Gln His Leu Lys Asn Gln Phe Pro Ala Leu His Trp
      35              40              45
Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr
      50              55              60
Asn Lys Phe Leu Leu Ile Pro Glu Ser Gly Asp Tyr Phe Val Tyr Ser
      65              70              75              80
Gln Val Thr Phe Arg Gly Met Thr Ser Glu Cys Ser Glu Ile Arg Gln
      85              90              95
Ala Gly Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser Ile Thr Val Val Ile Thr Lys
      100              105              110
Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys
      115              120              125
Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly
      130              135              140
Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp Lys Leu Met Val Asn Val Ser
      145              150              155              160
Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly
      165              170              175
Ala Phe Leu Leu
      180
<210> 35
<211> 180
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 35
Leu Arg Ala Ile Thr Glu Glu Arg Ser Glu Pro Ser Pro Gln Gln Val
1              5              10              15
Tyr Ser Pro Pro Arg Gly Lys Pro Arg Ala His Leu Thr Ile Lys Lys
      20              25              30
Gln Thr Pro Ala Pro His Leu Lys Asn Gln Leu Ser Ala Leu His Trp
      35              40              45
Glu His Asp Leu Gly Met Ala Phe Thr Lys Asn Gly Met Lys Tyr Ile
      50              55              60
Asn Lys Ser Leu Val Ile Pro Glu Ser Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser
      65              70              75              80
Gln Ile Thr Phe Arg Gly Thr Thr Ser Val Cys Gly Asp Ile Ser Arg
      85              90              95
Gly Arg Arg Pro Asn Lys Pro Asp Ser Ile Thr Met Val Ile Thr Lys
      100              105              110
Val Ala Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Ala Arg Leu Leu Thr Gly Ser Lys
      115              120              125

```

Ser Val Cys Glu Ile Ser Asn Asn Trp Phe Gln Ser Leu Tyr Leu Gly
 130 135 140
 Ala Thr Phe Ser Leu Glu Glu Gly Asp Arg Leu Met Val Asn Val Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly
 165 170 175
 Ala Phe Leu Leu
 180

<210> 36
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 <400> 36

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

<210> 37
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Chuột lang nhà Cavia porcellus
 <400> 37

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

Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly Ala
 165 170 175

Phe Leu Leu

<210> 38

<211> 180

<212> PRT

<213> Felis catus

<400> 38

Pro Lys Gly Arg Glu Phe Gly Pro Ser His Gln Arg Ala Tyr Thr Ser
 1 5 10 15

Pro Gly Ala Gly Asp Lys Pro Arg Ala His Leu Thr Val Val Arg
 20 25 30

Gln Thr Pro Thr Gln Pro Leu Lys Asn Gln Phe Pro Ala Leu His Trp
 35 40 45

Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Ile Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr
 50 55 60

Asn Lys Phe Leu Val Ile Pro Glu Ser Gly Asp Tyr Phe Val Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Val Thr Phe Arg Gly Thr Thr Ser Glu Cys Gly Glu Ile Arg Gln
 85 90 95

Gly Ser Arg Leu Asn Lys Pro Asp Ser Ile Ile Val Val Ile Thr Lys
 100 105 110

Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys
 115 120 125

Ser Val Cys Glu Val Gly Ser Asn Trp Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly
 130 135 140

Ala Met Phe Ser Leu Gln Glu Gly Asp Lys Leu Met Val Asn Val Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly
 165 170 175

Ala Phe Leu Leu
 180

<210> 39

<211> 180

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 39

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

Pro Gly Ala Gly Arg Asp Lys Pro Arg Ala His Leu Thr Val Val Arg
 20 25 30

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

Glu His Glu Leu Gly Leu Ala Phe Thr Lys Asn Arg Met Asn Tyr Thr
 50 55 60

Asn Lys Phe Leu Val Ile Pro Glu Ser Gly Asp Tyr Phe Ile Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Val Thr Phe Arg Gly Thr Thr Ser Glu Cys Gly Glu Ile Ser Gln
 85 90 95

Glu Arg Arg Leu Asn Lys Pro Asp Ser Ile Ile Val Val Ile Thr Lys
 100 105 110

Val Thr Asp Ser Tyr Pro Glu Pro Thr Gln Leu Leu Met Gly Thr Lys
 115 120 125

Ser Val Cys Glu Ile Gly Ser Asn Trp Phe Gln Pro Ile Tyr Leu Gly
 130 135 140

Ala Met Phe Ser Leu His Glu Gly Asp Lys Leu Met Val Asn Val Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ser Leu Val Asp Tyr Thr Lys Glu Asp Lys Thr Phe Phe Gly
 165 170 175

Ala Phe Leu Leu
 180

<210> 40

<211> 179

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 40

```

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

```

<210> 41

<211> 180

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 41

```

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

```

<210> 42

<211> 330

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 42

```

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

```

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

<210> 43

<211> 329

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

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

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

<210> 44

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 45

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

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

<210> 46

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

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

```

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

```

<210> 47

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

```

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

```

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

```
<210> 48
<211> 105
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 48
```

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

```
<210> 49
<211> 357
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 49
```

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggggcggag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctggata	caccttcacc	agttatgata	tcaactgggt	gcgacaggcc	120
cccgacaag	ggcttgagtg	gatgggatgg	ctgaacccta	acagtggtaa	cacaggctat	180
gcacagaagt	tccagggcag	agtcaccatg	accgcagatc	gttccaccag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctcaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gcagagaagtg	300
cctgagacgg	ccgcctttga	gtactggggc	cagggaaacc	tggtcaccgt	ctcctca	357

```
<210> 50
<211> 333
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 50
```

cagagcgtgc	tgacacagcc	tccatccgtg	tctggcgccc	ctggccagag	agtgaccatc	60
agctgcacca	gcagcagcag	cgacatcggg	gccggcctgg	gcgtgcactg	gtatcagcag	120
ctgcctggca	ccgcccccaa	gctgtgtatc	gagggctact	acaaccggcc	cagcggcgctg	180
cccgaccggt	ttagcggcag	caagagcgcc	accagcgcca	gcctgacact	caccggcctg	240
ctgcccgagg	acgagggcga	ctactactgc	caagactacg	acggcaccct	gagcgccttg	300

```

ttcggcgagg gcaccaagct gaccgtccta ggt 333
<210> 51
<211> 357
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 51
caggtgcagc tgggtgcagtc cggcgccgag gtgaagaaac cggcgccctc cgtgaagggtg 60
tcctgcaagg ccagcgggta caccttcacc tcctacgaca tcaactgggt gaggcaggcc 120
cccggccagg gcctggagtg gatgggctgg ctgaacccca actccggcta caccggctac 180
gcccagaagt tccagggcag ggtgaccatg accgcccaga ggtccacctc caccgcctac 240
atggagctgt ccagcctgag gtccgaggac accgcccgtg actattgcgc cagggagggtg 300
cccagagacc ctgccttcga gtactggggc cagggcaccc tgggtgaccgt gtccagc 357
<210> 52
<211> 333
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 52
cagagcgtgc tgacacagcc tccatccgtg tctggcgccc ctggccagag agtgaccatc 60
agctgcacca gcagcagcag cgacatcgga gccggcctgg gcgtgcaactg gtatcagcag 120
ctgcctggca ccgcccccaa gctgctgata gagggctact acaaccggcc cagcggcgtg 180
cccgaccggt ttagcggcag caagagcggc accagcgcca gcctgacaat caccggcctg 240
ctgcccagag acgagggcga ctactactgc cagagctggg acggcacctc gagcgccctg 300
ttcggcgagg gcaccaagct gaccgtccta ggt 333
<210> 53
<211> 333
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 53
cagagcgtgc tgacacagcc tccatccgtg tctggcgccc ctggccagag agtgaccatc 60
agctgcacca gcagcagcag cgacatcgga gccgctctgg gcgtgcaactg gtatcagcag 120
ctgcctggca ccgcccccaa gctgctgata gagggctact acaaccggcc cagcggcgtg 180
cccgaccggt ttagcggcag caagagcggc accagcgcca gcctgacaat caccggcctg 240
ctgcccagag acgagggcga ctactactgc cagagctggg acggcacctc gagcgccctg 300
ttcggcgagg gcaccaagct gaccgtccta ggt 333
<210> 54
<211> 333
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 54
cagagcgtgc tgacacagcc tccatccgtg tctggcgccc ctggccagag agtgaccatc 60
agctgcacca gcagcagcag cgacatcgga gccggcagcg gcgtgcaactg gtatcagcag 120
ctgcctggca ccgcccccaa gctgctgata gagggctact acaaccggcc cagcggcgtg 180
cccgaccggt ttagcggcag caagagcggc accagcgcca gcctgacaat caccggcctg 240
ctgcccagag acgagggcga ctactactgc cagagctggg acggcacctc gagcgccctg 300
ttcggcgagg gcaccaagct gaccgtccta ggt 333
<210> 55
<211> 333
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 55
cagagcgtgc tgacacagcc tccatccgtg tctggcgccc ctggccagag agtgaccatc 60
agctgcacca gcagcagcag cgacatcgga gccggccagg gcgtgcaactg gtatcagcag 120
ctgcctggca ccgcccccaa gctgctgata gagggctact acaaccggcc cagcggcgtg 180
cccgaccggt ttagcggcag caagagcggc accagcgcca gcctgacaat caccggcctg 240
ctgcccagag acgagggcga ctactactgc cagagctggg acggcacctc gagcgccctg 300
ttcggcgagg gcaccaagct gaccgtccta ggt 333
<210> 56
<211> 333
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 56
cagagcgtgc tgacacagcc tccatccgtg tctggcgccc ctggccagag agtgaccatc 60
agctgcacca gcagcagcag cgacatcgga gccggcctgg gcgtgctgtg gtatcagcag 120

```



```

ctgcctggca cgcggcccaa gctgctgac gagggctact acaaccggcc cagcggcgctg 180
cccgaccggt ttagcggcag caagagcggc accagcgcca gcctgacaat caccggcctg 240
ctgcccagg acgagggcga ctactactgc cagagctggg acggcaccct gagcgccctg 300
ttcggcggag gcaccaagct gaccgtccta ggt 333
<210> 57
<211> 333
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 57
cagagcgtgc tgacacagcc tccatccgtg tctggcgccc ctggccagag agtgaccatc 60
agctgcacca gcagcagcag cgacatcgga gccggcctgg gcgtgcaact gtatcagcag 120
ctgcctggca cgcggcccaa gctgctgac gagggctact acaaccggcc cagcggcgctg 180
cccgaccggt ttagcggcag caagagcggc accagcgcca gcctgacaat caccggcctg 240
ctgcccagg acgagggcga ctactactgc cagagctttg acggcaccct gagcgccctg 300
ttcggcggag gcaccaagct gaccgtccta ggt 333
<210> 58
<211> 1344
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 58
caggtgcagc tgggtgcagtc cggcgccgag gtgaagaaac ccggcgccctc cgtgaaggctg 60
tcctgcaagg ccagcggcta cacttcacc tcctacgaca tcaactgggt gaggcaggcc 120
cccggccagg gcctggagtg gatgggctgg ctgaaccca actccggcta caccggctac 180
gcccagaagt tccagggcag ggtgaccatg accgcgcaga ggtccacctc caccgcctac 240
atggagctgt ccagcctgag gtccgaggac accgcctgtg actattgcgc cagggaggtg 300
cccagaccg ctgccttcga gtactggggc cagggcacc tggtgaccgt gtccagcgcc 360
tccaccaagg gcccagcgt gtccccctg gcccagct ccaagtccac cagcggcgga 420
accgcgcctc tgggtgcct ggtgaaggac tacttcccc agcccgtgac cgtgagctgg 480
aactccggcg cctgacctc cggcgtgcac accttcccc cgtgctgca gtccagcggc 540
ctgtactccc tgagctccgt ggtcaccgtg ccctcctcta gcctgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaaccacaa gccctccaac accaagggtg aaaaaagggt ggagcccaag 660
tcctgcgaca agactcacac ctgtcctccc tgccccgccc ccgagctgct cggcggaccc 720
tcctgtttcc tgttcccacc caagcccagg gacacctga tgatctccag gacccccgag 780
gtgacctgcg tggctcgtgga cgtgtccac gaggacctg aggtgaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca caacgccaa accaagcca gggaggaaca gtacaactcc 900
acctaccggg tcgtgtccgt gctgaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 960
tacaagtga aggtgtccaa caaggccctg cccgccccca tcgagaagac catctccaag 1020
gccaagggcc agcctcggga gcccagggtg tacacactgc ccccttccag ggacgagctg 1080
accaagaacc aggtgtccct gacctgtctg gtgaagggt tctaccctc cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agtccaacgg ccagcccag aacaattaca agaccacac tcccgtcctg 1200
gactccgacg gctccttctt tctgtactcc aagctgaccg tggacaagtc caggtggcag 1260
caaggcaacg tgttctcctg ctccgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag 1320

aagtccctga gcctgtcccc cggc 1344
<210> 59
<211> 648
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 59
cagagcgtgc tgacacagcc tccatccgtg tctggcgccc ctggccagag agtgaccatc 60
agctgcacca gcagcagcag cgacatcgga gccggcctgg gcgtgcaact gtatcagcag 120
ctgcctggca cgcggcccaa gctgctgac gagggctact acaaccggcc cagcggcgctg 180
cccgaccggt ttagcggcag caagagcggc accagcgcca gcctgacaat caccggcctg 240
ctgcccagg acgagggcga ctactactgc cagagctggg acggcaccct gagcgccctg 300
ttcggcggag gcaccaagct gaccgtccta ggtcagccca aggcgctcc cagcgtgacc 360
ctgttcccc caagcagcga ggaactgcag gccaacaagg ccacctgggt gtgcctgatc 420
agcgacttct accctggggc cgtgaccgtg gcctggaagg ccgatagcag ccctgtgaag 480
gccggcgtgg aaaccaccac cccctccaag cagagcaaca acaaatacgc cgccagcagc 540
tacctgtccc tgacccccga gcagtggaag tcccaccggt cctacagctg ccaggtgaca 600
cacgagggca gcaccgtgga aaagaccgtg gccccaccg agtgacgc 648
<210> 60
<211> 448
<212> PRT

```

<213> Homo sapiens

<400> 60

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 Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Leu Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Arg 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 Glu Val Pro Glu Thr Ala Ala Phe Glu 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

<210> 61

<211> 216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Ser Ser Ser Ser Asp Ile Gly Ala Gly
 20 25 30
 Leu Gly Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Glu Gly Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Leu Pro Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Gly Thr
 85 90 95
 Leu Ser Ala Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125
 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160
 Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175
 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190
 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215
 <210> 62
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 62
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

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

<210> 63

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

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

<210> 64

<211> 329

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

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

<210> 65

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

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

```

      115              120              125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
      130              135              140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
      145              150              155              160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
      165              170              175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      180              185              190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      195              200              205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      210              215              220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
      225              230              235              240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245              250              255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      260              265              270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275              280              285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290              295              300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305              310              315              320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      325              330

```

<210> 66

<211> 329

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

```

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

```

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

```
<210> 67
<211> 326
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 67
```

[illegible]

```
<210> 68
<211> 325
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 68
```

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

<210> 69

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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


```

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

```

<210> 70

<211> 325

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

```

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

```

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly
 325

<210> 71

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

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