



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ C07K 16/28; A61K 39/39; C07K 16/30; (13) B
A61P 35/02; A61K 39/00; A61K 39/395

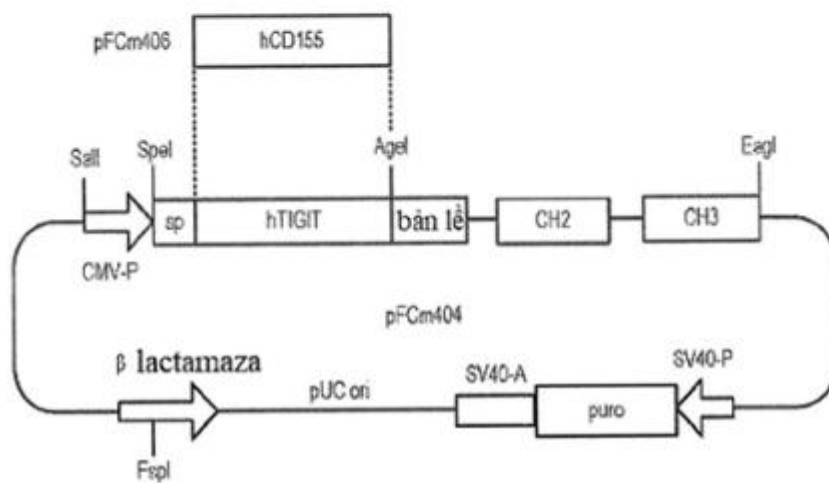
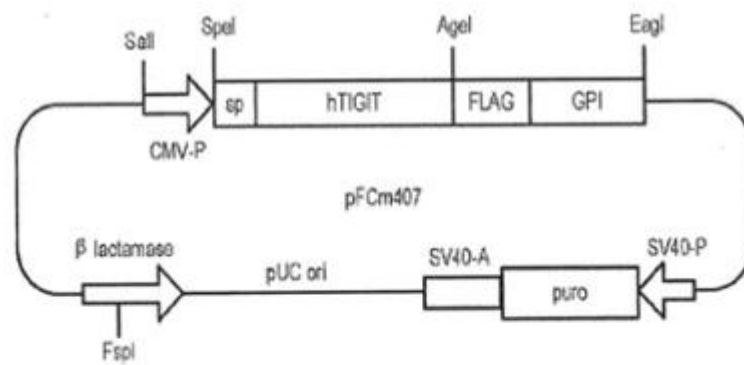


1-0042011

- (21) 1-2018-04388 (22) 03/03/2017
(86) PCT/US2017/020719 03/03/2017 (87) WO2017/152088 A1 08/09/2017
(30) 62/304,405 04/03/2016 US; 62/413,025 26/10/2016 US
(45) 25/12/2024 441 (43) 25/04/2019 373A
(73) 1. JN BIOSCIENCES, LLC (US)
320 Logue Avenue, Mountain View, CA 94043, US
2. ABMUNO THERAPEUTICS LLC (US)
914 Channing Way, Berkeley, CA 94710, US
(72) TSO J. Yun (US); TSURUSHITA Naoyo (JP); DURAMAD Omar (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG LIÊN KẾT VỚI POLYPEPTIT TIGIT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG NÀY

(57) Sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với TIGIT. Các kháng thể đơn dòng này có khả năng hoạt hóa đáng kể các tế bào T và các tế bào tiêu diệt tự nhiên bằng cách ức chế liên kết của TIGIT với CD155. Các kháng thể đơn dòng này có thể được sử dụng để điều trị ung thư và bệnh truyền nhiễm, cùng với các ứng dụng khác. Sáng chế cũng bộc lộ kháng thể kháng TIGIT và dược phẩm chứa kháng thể.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Được đề xuất trong bản mô tả này, ngoài những điều khác, các kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với các phân tử điểm kiểm soát đáp ứng miễn dịch, qua đó đem lại sự hoạt hóa đáng kể các tế bào miễn dịch cũng như việc sử dụng các kháng thể đơn dòng này trong điều trị ung thư và bệnh truyền nhiễm, bên cạnh các ứng dụng khác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đáp ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên là một quá trình sinh học phức tạp được kiểm soát bởi nhiều lớp các nhân tố điều hòa âm tính và dương tính. Các tế bào T ban đầu được kích thích thông qua thụ thể tế bào T (TCR) bằng cách nhận biết kháng nguyên peptit cùng nguồn với chúng được biểu hiện bởi các phân tử phức hợp tương thích mô chính (MHC) trên các tế bào trình diện kháng nguyên. Việc hoạt hóa tế bào T tối ưu đòi hỏi một “tín hiệu thứ cấp” được tạo ra bởi các phân tử đồng kích thích ví dụ như CD28. Đáp ứng miễn dịch được tăng cường điều hòa dương tính bởi các phân tử đồng kích thích, như OX40, GITR và 4-1BB thuộc siêu họ thụ thể TNF, và được điều hòa âm tính bởi các phân tử điểm kiểm soát như PD-1 và CTLA-4. Chức năng của các phân tử điểm kiểm soát là ngăn chặn sự phản ứng quá mức không mong muốn của hệ miễn dịch trong cơ thể; tuy nhiên, chúng cũng hạn chế khả năng chống ung thư và bệnh truyền nhiễm một cách hiệu quả của hệ thống miễn dịch. Việc chặn chức năng của PD-1 hoặc CTLA-4 bằng kháng thể IgG đơn dòng đối kháng được báo cáo là có hiệu quả trong liệu pháp miễn dịch đối với bệnh ung thư ở người (đề xem lại, xem Pardoll, Nat. Rev. Cancer, 12:252-264, 2012; Mahoney et al., Nat. Rev. Drug Discov. 14:561-584, 2015; Shin et al., Curr. Opin. Immunol. 33:23-35, 2015; Marquez-Rodas et al. Ann. Transl. Med. 3:267, 2015).

Các phân tử điểm kiểm soát khác như TIM-3, LAG-3, TIGIT, BTLA và VISTA đã được báo cáo (Mercier et al., *Front. Immunol.* 6:418, 2015). TIGIT (thụ thể miễn dịch tế bào T với Ig và các miền ITIM), một thành viên của siêu họ globulin miễn dịch với motif ức chế dựa vào tyrosine của thụ thể miễn dịch (ITIM) ở đuôi tế bào chất, được biểu hiện trên các tập hợp con của các tế bào T được hoạt hóa và các tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK) (Yu et al., *Nat. Immunol.* 10: 48–57, 2009). TIGIT được biết là có tương tác với CD155 (còn gọi là PVR và necl-5), CD112 (còn được gọi là PVRL2 và nectin-2), và có thể với CD113 (còn được gọi là PVRL3 và nectin-3) (Mercier et al., *supra*; Martinet et al., *Nat. Rev. Immunol.* 15: 243-254, 2015). Liên kết của TIGIT với phối tử ái lực cao CD155, các phối tử này được biểu hiện trên các tế bào trình diện kháng nguyên, đã được báo cáo là có ức chế chức năng của tế bào T và tế bào NK (Mercier et al., *supra*; Joller et al., *J. Immunol.* 186: 1338–1342, 2011; Stanitsky et al., *Eur. J. Immunol.* 43:2138-2150, 2013; Li et al., *J. Biol. Chem.* 289:17647-17657, 2014; Zhang et al. *Cancer Immunol. Immunother.* Epub vào ngày 3, tháng 2, 2016). TIGIT cũng đã được báo cáo là có ức chế tế bào T gián tiếp bằng cách điều chỉnh sự sản sinh cytokin bởi các tế bào phân nhánh (Yu et al., *supra*).

Các khối u tạo thành các môi trường vi mô ức chế cao, nơi các tế bào T thâm nhập bị kiệt quệ và các tế bào NK bị chặn đứng bởi các phân tử điểm kiểm soát như PD-1 và TIGIT để tránh các đáp ứng miễn dịch (Johnston et al., *Cancer Cell.* 26:926-937, 2014; Chauvin et al., *J. Clin. Invest.* 125:2046-2058, 2015; Inozume et al., *J. Invest. Dermatol.* Epub on Oct 12, 2015). Sự biểu hiện mức độ cao của TIGIT trên tế bào T CD8+ đã được báo cáo là có tương quan với kết quả lâm sàng kém của các đối tượng AML (Kong et al., *Clin. Cancer Res.* Epub on Jan. 13, 2016). Các khiếm khuyết chức năng của tế bào T TIGIT + CD8+ kiệt quệ từ các đối tượng AML đã được báo cáo là được thay đổi hoàn toàn nhờ sự phá vỡ qua trung gian siARN của biểu hiện TIGIT (Kong et al., *supra*). Cũng được ghi chép lại rằng tế bào T CD8+ tác động trong lây nhiễm HIV trong máu và nhiễm

SIV trong mô bạch huyết thể hiện mức độ cao hơn của TIGIT (Chew et al., PLOS Pathogens, 12:e1005349, 2016). Ngoài ra, sự ngăn chặn kháng thể ex vivo của TIGIT đã được báo cáo là để khôi phục các đáp ứng tác động tế bào T CD8+ đặc hiệu virus.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất, ngoài những điều khác, một kháng thể cạnh tranh với bất kỳ trong số TIG1, TIG2 hoặc TIG3 để liên kết với TIGIT ở người. Kháng thể TIG1 được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành SEQ ID NO:14 và vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành SEQ ID NO:10, kháng thể TIG2 được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành SEQ ID NO:22 và vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành SEQ ID NO:18, và kháng thể TIG3 được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành SEQ ID NO:30 và vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành SEQ ID NO:26, để liên kết đặc hiệu với TIGIT. Một số kháng thể liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên trên TIGIT ở người như TIG1, TIG2 hoặc TIG3. Một số kháng thể ức chế sự liên kết của TIGIT ở người với CD155. Một số kháng thể bao gồm ba CDR chuỗi nhẹ và ba CDR chuỗi nặng, thực chất là từ ba CDR chuỗi nhẹ và ba CDR chuỗi nặng tương ứng từ TIG1. Một số kháng thể chứa ba CDR chuỗi nhẹ và ba CDR chuỗi nặng của TIG1, TIG2, hoặc TIG3. Một số kháng thể bao gồm ba CDR chuỗi nặng như được xác định bởi Kabat và ba CDR chuỗi nhẹ như được xác định bởi Kabat của bất kỳ trong số TIG1 (SEQ ID NO: 15-17 với chuỗi nhẹ và 11-13 với chuỗi nặng), TIG2 (SEQ ID NO: 23-25 với chuỗi nhẹ, 19-21 với chuỗi nặng) hoặc TIG3 (SEQ ID NO: 31-33 với chuỗi nhẹ và 27-29 với chuỗi nặng).

Một số kháng thể đơn dòng liên kết với một quyết định kháng nguyên của TIGIT ở người bao gồm các gốc 35 và 37 của SEQ NO:1 và/hoặc các gốc 49 và 51 của SEQ ID NO:1. Một số kháng thể đơn dòng liên kết với quyết định kháng nguyên của TIGIT ở người bao gồm các gốc 35, 37, 49 và 51 của SEQ ID NO:1. Một số kháng thể đơn dòng liên kết với một peptit bao gồm các gốc từ 35 đến 51

của SEQ ID NO:1 và không quá năm axit amin chặn từ SEQ ID NO:1 ở hai bên. Một số kháng thể đơn dòng liên kết với một peptit gồm các gốc từ 35 đến 51 của SEQ ID NO:1. Một số kháng thể đơn dòng như vậy liên kết với một quyết định kháng nguyên gồm từ 3 đến 20 gốc kế tiếp của SEQ ID NO:1.

Một số kháng thể là kháng thể khảm, kháng thể được nhân hóa (humanized antibody: có nghĩa là kháng thể từ các loài không phải con người, có chuỗi protein đã được sửa đổi để tăng tính tương đồng của chúng với các biến thể kháng thể được tạo ra tự nhiên ở người), kháng thể có bề mặt thay đổi gốc (veneered antibody: có nghĩa là kháng thể mà các gốc trên bề mặt của phân tử được thay đổi thành các axit amin kế tiếp ở người để giảm khả năng miễn dịch) hoặc kháng thể ở người. Một số kháng thể có isotyp kappa IgG1 ở người. Một số kháng thể có isotyp kappa IgG4 ở người. Một kháng thể có thể là kháng thể nguyên vẹn hoặc kháng thể đơn chuỗi, mảnh Fab hoặc $F(ab')_2$.

Sáng chế cũng đề xuất thêm được phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên và chất mang được dụng.

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp điều trị hoặc dự phòng hiệu quả ung thư ở một đối tượng, bao gồm việc cho đối tượng bị hoặc có nguy cơ bị ung thư tiếp nhận một phác đồ điều trị hiệu quả của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nêu trên. Theo một số phương pháp, đối tượng mắc bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính hoặc bệnh bạch cầu tế bào T trưởng thành.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này kết hợp với các chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch. Sự ngăn chặn của các điểm kiểm soát miễn dịch, dẫn đến sự khuếch đại các đáp ứng của tế bào T đặc hiệu kháng nguyên, đã được chứng minh là một cách tiếp cận đầy hứa hẹn trong các liệu pháp điều trị ung thư ở người. Ví dụ về các điểm kiểm soát miễn dịch (các phối tử và các thụ thể), một số được tăng cường điều chỉnh trong các loại tế bào khối u khác nhau, đó là ứng cử viên cho việc ngăn chặn bao gồm PD-1 (protein xúc tiến sự chết tế bào theo chương trình 1); PD-L1 (phối tử xúc tiến sự chết tế bào theo chương trình 1); BTLA (thụ thể suy giảm tế bào lympho B và lympho T); CTLA-4 (kháng nguyên kết hợp tế bào lympho T

gây độc 4); TIM-3 (protein màng tế bào T 3); LAG-3 (gen hoạt hóa tế bào lympho 3); chất ức chế globulin miễn dịch miền V của sự hoạt hóa tế bào T (VISTA); CD96; A2aR (thụ thể adenosin A2a); A2bR (thụ thể adenosin A2b); CD73 (ecto-5'-nucleotidaza); CD39 (ENTPD1, NTPDaza1); Arginaza; indoleamin-pyrol 2,3-dioxygenaza (IDO); tryptophan 2,3-dioxygenaza (TDO); và các thụ thể ức chế tế bào tiêu diệt. Các chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch, và liệu pháp kết hợp chúng, được thảo luận chi tiết ở phần khác trong bản mô tả sáng chế này.

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp điều trị đối tượng bị nhiễm một tác nhân gây bệnh bao gồm việc cho đối tượng đó tiếp nhận một phác đồ hiệu quả của bất kì kháng thể nào nêu trên. Theo một số phương pháp, tác nhân gây bệnh là HIV hoặc SIV. Theo các phương pháp khác, tác nhân gây bệnh là virus, vi khuẩn, nấm hoặc động vật nguyên sinh.

Theo những khía cạnh khác, được đề xuất trong bản mô tả này, kháng thể kháng TIGIT liên kết với polypeptit TIGIT tại một hoặc nhiều gốc axit amin bao gồm D51, tại vị trí mà polypeptit TIGIT có trình tự axit amin tương ứng với SEQ ID NO:1. Theo các phương án khác, kháng thể là một kháng thể đơn dòng. Theo một số phương án trong các phương án bất kì được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, kháng thể là kháng thể khảm, kháng thể nhân hóa hoặc kháng thể có bề mặt thay đổi gốc. Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể người. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, kháng thể không liên kết với một hoặc nhiều gốc axit amin chứa L44, I47, hoặc H55. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành SEQ ID NO:14 và vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành SEQ ID NO:10. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, kháng thể liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như TIG1 trên trình tự axit amin tương ứng với SEQ ID NO:1. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, kháng thể chứa ba CDR chuỗi nhẹ bao gồm SEQ ID NO:15-17 và ba CDR chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:11-13. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ

trong bản mô tả sáng chế này, kháng thể chứa một vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% với SEQ ID NO:35 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% với SEQ ID NO:37. Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:35 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:37. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nặng, tạo thành chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:40 trong trường hợp mà lysin đầu C có thể có mặt hoặc không, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nhẹ, tạo thành chuỗi nhẹ chứa trình tự SEQ ID NO:41.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một kháng thể đơn dòng cạnh tranh với bất kỳ trong số TIG1, TIG2 hoặc TIG3 để liên kết với TIGIT ở người, trong đó kháng thể TIG1 được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành SEQ ID NO:14 và vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành SEQ ID NO:10, kháng thể TIG2 được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành SEQ ID NO:22 và vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành SEQ ID NO:18, và kháng thể TIG3 được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành SEQ ID NO:30 và vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành SEQ ID NO:26, để liên kết đặc hiệu với CD155. Theo một số phương án, kháng thể liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên trên TIGIT ở người như bất kỳ trong số TIG1, TIG2 hoặc TIG3. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, kháng thể ức chế sự liên kết của CD155 với TIGIT ở người. Theo một số phương án, kháng thể bao gồm ba CDR chuỗi nhẹ và ba CDR chuỗi nặng tương ứng với ba CDR chuỗi nhẹ và ba CDR chuỗi nặng của bất kỳ trong số TIG1, TIG2 hoặc TIG3. Theo một số phương án, kháng thể bao gồm ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ của bất kỳ trong số TIG1, TIG2 hoặc TIG3. Theo một số phương án, kháng thể bao gồm ba CDR chuỗi nặng như được xác định bởi Kabat và ba CDR chuỗi nhẹ như được xác định bởi Kabat của bất kỳ trong số TIG1 (SEQ ID NO: 15-17 với chuỗi nhẹ và 11-13 với chuỗi

nặng), TIG2 (SEQ ID NO: 23-25 với chuỗi nhẹ, 19-21 với chuỗi nặng) hoặc TIG3 (SEQ ID NO: 31-33 với chuỗi nhẹ và 27-29 với chuỗi nặng). Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, kháng thể là kháng thể khảm, kháng thể nhân hóa hoặc kháng thể có bề mặt thay đổi gốc. Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể ở người. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, kháng thể có isotyp kappa IgG1 ở người. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, kháng thể là kháng thể nguyên vẹn. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, kháng thể là kháng thể đơn chuỗi, mảnh Fab hoặc F(ab')₂. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% với SEQ ID NO:35 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% với SEQ ID NO:37. Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 95 hoặc 99% với SEQ ID NO:35 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 95 hoặc 99% với SEQ ID NO:37. Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin SEQ ID NO:35 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin SEQ ID NO:37. Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nặng, tạo thành chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:40 trong trường hợp mà lysin đầu C có thể có mặt hoặc không, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nhẹ, tạo thành chuỗi nhẹ chứa trình tự SEQ ID NO:41. Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nặng, tạo thành chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:60 trong trường hợp mà lysin đầu C có thể có mặt hoặc không, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nhẹ, tạo thành chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO:64. Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được liên kết với vùng hằng

định chuỗi nặng, tạo thành chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:61 trong trường hợp mà lysin đầu C có thể có mặt hoặc không, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nhẹ, tạo thành chuỗi nhẹ chứa trình tự SEQ ID NO:64. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% với SEQ ID NO:43 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% với SEQ ID NO:45. Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 95 hoặc 99% với SEQ ID NO:43 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 95 hoặc 99% với SEQ ID NO:45. Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin SEQ ID NO:43 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin SEQ ID NO:45. Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nặng, tạo thành chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:48 trong trường hợp mà lysin đầu C có thể có mặt hoặc không, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nhẹ, tạo thành chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO:49. Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nặng, tạo thành chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:62 trong trường hợp mà lysin đầu C có thể có mặt hoặc không, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nhẹ, tạo thành chuỗi nhẹ chứa trình tự SEQ ID NO:65. Theo một số phương án, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nặng, tạo thành chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:63 trong trường hợp mà lysin đầu C có thể có mặt hoặc không, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nhẹ, tạo thành chuỗi nhẹ chứa trình tự SEQ ID NO:65. Theo các khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất một kháng thể đơn dòng liên kết với quyết định kháng nguyên chứa các gốc 35 và 37 của SEQ NO:1 và/hoặc gốc 49 và 51 của SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, kháng thể liên kết với một quyết định kháng nguyên chứa các gốc 35, 37, 49 và 51 của SEQ ID

NO:1. Theo một số phương án, kháng thể liên kết với một peptit bao gồm các gốc từ 35 đến 51 của SEQ ID NO:1 và không quá năm axit amin chặn từ SEQ ID NO:1 ở hai bên. Theo một số phương án, kháng thể liên kết với peptit gồm các gốc từ 35 đến 51 của SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, quyết định kháng nguyên chứa từ 3 đến 20 gốc kế tiếp của SEQ ID NO:1. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, kháng thể có một hoặc nhiều đặc tính sau: (a) ức chế liên kết của TIGIT với CD155, tùy chọn với IC50 từ 15 đến 100 ng/ml, (b) làm tăng sự hoạt hóa tế bào T nội tại khi có mặt các tế bào trình diện kháng nguyên biểu hiện CD155 được đo bằng sự tạo thành IL-2, tùy chọn gấp 1,5 đến 3 lần, (c) làm tăng sự hoạt hóa tế bào T đặc hiệu kháng nguyên được đo bằng sự tạo thành IL-12, tùy chọn gấp 1,5 đến 3 lần, (d) làm tăng sự hoạt hóa tế bào tiêu diệt tự nhiên được đo bằng sự tạo thành bất kỳ trong số IL-2, IL-6, TNF α hoặc IFN γ , tùy chọn gấp 1,5 đến 3 lần, (e) làm tăng sự tạo thành tế bào T của ít nhất một xytokin gây viêm, tùy chọn gấp 1,5 đến 3 lần, và (f) làm giảm sự tạo thành tế bào T của ít nhất một xytokin kháng viêm, tùy chọn gấp 1,5 đến 3 lần.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này và chất mang được dùng.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp điều trị hoặc thực hiện dự phòng hiệu quả ung thư bao gồm việc cho một đối tượng bị hoặc có nguy bị ung thư tiếp nhận một phác đồ điều trị hiệu quả hoặc một liều lượng điều trị hiệu quả của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính hoặc bệnh bạch cầu tế bào T trưởng thành. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, đối tượng được tiếp nhận các tế bào T xâm nhập khối u được hoạt hóa bằng kháng thể. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, đối tượng được tiếp nhận vắc-xin gây đáp ứng miễn dịch chống ung thư, được tăng cường bởi kháng thể. Theo một số phương án, vắc-xin chứa kháng nguyên

hoặc một mảnh của nó được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào ung thư. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, đối tượng được tiếp nhận các tế bào tiêu diệt tự nhiên mà độc tính chống ung thư của chúng được tăng cường bởi kháng thể. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, đối tượng còn được tiếp nhận kháng thể thứ cấp chống lại kháng nguyên biểu hiện trên bề mặt của các tế bào ung thư, nhờ đó độc tố qua trung gian tác động của kháng thể thứ cấp chống ung thư được tăng cường bởi kháng thể. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, đối tượng còn được tiếp nhận một kháng thể thứ cấp chống lại một kháng nguyên được biểu hiện trên bề mặt của một tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch là một tế bào T hoặc tế bào tiêu diệt tự nhiên. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, kháng nguyên là CTLA-4, PD-1 hoặc PD-L1. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, đối tượng còn được tiếp nhận một hoặc nhiều liệu pháp được chọn từ nhóm bao gồm hóa trị, xạ trị, liệu pháp tế bào và phẫu thuật. Theo một số phương án trong các phương án bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, đối tượng còn được tiếp nhận chất ức chế của một hoặc nhiều thụ thể hoặc phối tử điểm kiểm soát miễn dịch. Theo một số phương án, chất ức chế được chọn từ nhóm bao gồm ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab (lambrolizumab) và atezolizumab.

Theo các khía cạnh bổ sung, sáng chế đề xuất các phương pháp để điều trị một đối tượng bị nhiễm tác nhân gây bệnh bao gồm việc áp dụng phác đồ điều trị hiệu quả hoặc một lượng điều trị hiệu quả của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được trình bày trong tài liệu này. Theo một số phương án, tác nhân gây bệnh là virus, vi khuẩn, nấm hoặc động vật nguyên sinh. Theo một số phương án, tác nhân gây bệnh là HIV, SIV, viêm gan, virus ecpet, virus adeno, virus cúm, virus flavi, virus echo, virus rhino, virus coxsackie, virus corno, virus hợp bào hô hấp, virus quai bị, virus rota, virus sởi, virus rubella, virus parvo, virus vaccinia, virus HTLV, virus sốt xuất huyết, virus papilloma, virus molluscum, virus bại liệt, virus

dại, virus JC, virus arboviral encephalitis, chlamydia, vi khuẩn rickettsial, mycobacteria, tụ cầu khuẩn, streptococci, pneumococci, meningococci, conococci, trực khuẩn klebsiella, proteus, trực khuẩn serratia, vi khuẩn pseudomonas, vi khuẩn legionella, vi khuẩn bạch hầu, vi khuẩn salmonella, trực khuẩn, bệnh tả, uốn ván, ngộ độc, bệnh than, bệnh dịch hạch, bệnh trùng xoắn móc câu và vi khuẩn bệnh Lyme. Theo một số phương án trong số các phương án được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, đối tượng được điều trị bằng vắc-xin gây đáp ứng miễn dịch chống lại tác nhân gây bệnh được tăng cường bởi kháng thể. Theo một số phương án, vắc-xin chứa protein của tác nhân gây bệnh hoặc mảnh của nó. Theo một số phương án trong số các phương án được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, đối tượng còn được tiếp nhận kháng thể thứ cấp chống lại tác nhân gây bệnh, trong đó độc tính trung gian tác động của kháng thể thứ cấp chống lại tác nhân gây bệnh được tăng cường bởi kháng thể. Theo một số phương án trong số các phương án được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, đối tượng còn được tiếp nhận một hoặc nhiều chất kháng virus, chất kháng ký sinh trùng, chất kháng khuẩn hoặc chất chống nấm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp hỗ trợ trong điều trị ung thư bao gồm cho một đối tượng mắc ung thư tiếp nhận một lượng điều trị hiệu quả của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể nào được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính hoặc bệnh bạch cầu tế bào T trưởng thành ở người. Theo một số phương án trong số các phương án được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, đối tượng được tiếp nhận các tế bào T xâm nhập khối u được hoạt hóa bằng kháng thể. Theo một số phương án trong số các phương án được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, đối tượng được tiếp nhận vắc-xin gây đáp ứng miễn dịch chống ung thư, được tăng cường bởi kháng thể. Theo một số phương án, vắc-xin chứa kháng nguyên được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào ung thư hoặc mảnh của chúng. Theo một số phương án trong số các phương án được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, đối tượng được tiếp nhận các tế bào tiêu diệt tự nhiên có độc tính chống ung thư được tăng cường bởi kháng thể. Theo một số phương án trong số các

phương án được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, đối tượng được tiếp nhận kháng thể thứ cấp chống lại kháng nguyên được biểu hiện trên bề mặt của các tế bào ung thư, nhờ đó độc tính trung gian tác động của kháng thể thứ cấp chống ung thư được tăng cường bởi kháng thể. Theo một số phương án trong số các phương án được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, đối tượng còn được tiếp nhận một kháng thể thứ cấp chống lại một kháng nguyên được biểu hiện trên bề mặt của một tế bào miễn dịch. Theo một số phương án, tế bào miễn dịch là một tế bào T hoặc tế bào tiêu diệt tự nhiên. Theo một số phương án trong số các phương án được bộc lộ trong bản sáng chế này, kháng nguyên là CTLA-4, PD-1 hoặc PD-L1. Theo một số phương án trong số các phương án được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, đối tượng còn được tiếp nhận một hoặc nhiều liệu pháp được chọn từ nhóm bao gồm hóa trị, xạ trị, liệu pháp tế bào và phẫu thuật. Theo một số phương án trong số các phương án được bộc lộ trong bản mô tả sáng chế này, đối tượng còn được tiếp nhận chất ức chế của một hoặc nhiều thụ thể hoặc phối tử điểm kiểm soát miễn dịch. Theo một số phương án, một hoặc nhiều thụ thể hoặc phối tử điểm kiểm soát miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm CTLA-4, PD-1 và PD-L1. Theo một số phương án, chất ức chế được chọn từ nhóm bao gồm ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab (lambrolizumab) và atezolizumab.

Mỗi trong số các khía cạnh và phương án được mô tả ở đây có khả năng được sử dụng cùng nhau, trừ khi bị loại trừ một cách dứt khoát hoặc rõ ràng khỏi phạm vi của phương án hoặc khía cạnh.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình. 1 là lược đồ cấu trúc của vật truyền biểu hiện đối với TIGIT các protein tái tổ hợp và CD155.

Hình. 2 mô tả sự ức chế tương tác TIGIT-CD155 bởi các kháng thể kháng TIGIT.

Hình. 3 mô tả trình tự axit amin của TIG1 VH.

Hình. 4 mô tả trình tự axit amin của TIG1 VL.

Hình. 5 mô tả trình tự axit amin của TIG2 VH.

Hình. 6 mô tả trình tự axit amin của TIG2 VL.

Hình. 7 mô tả trình tự axit amin của TIG3 VH.

Hình. 8 mô tả trình tự axit amin của TIG3 VL.

Hình. 9A mô tả trình tự nucleotit của gen HuTIG1 VH và trình tự axit amin được mã hóa trong khi Hình. 9B mô tả trình tự nucleotit của gen HuTIG1 VL và trình tự axit amin được mã hóa.

Hình. 10 thể hiện lược đồ cấu trúc của vật truyền biểu hiện pHuTIG1.AA.

Hình. 11 thể hiện kết quả phân tích ELISA về liên kết của HuTIG1-IgG1.AA với TIGIT ở người.

Hình. 12: Phân tích FACS về liên kết của HuTIG1-IgG1.AA và HuTIG3-IgG1.AA với TIGIT ở người.

Hình. 13 là biểu đồ thể hiện sự ngăn chặn tương tác giữa TIGIT ở người và CD155 ở người bởi HuTIG1-IgG1.AA và HuTIG3-IgG1.AA.

Hình. 14A mô tả trình tự nucleotit của gen HuTIG3 VH và trình tự axit amin được mã hóa trong khi Hình. 14B mô tả trình tự nucleotit của gen HuTIG3 VL và trình tự axit amin được mã hóa.

Hình. 15 mô tả phân tích ELISA về liên kết của HuTIG3-IgG1.AA với TIGIT ở người.

Hình. 16 thể hiện sự gia tăng tạo thành IL-2 bởi TIG1 khi có sự kích thích nhắc lại đặc hiệu kháng nguyên.

Hình. 17 mô tả sự tăng sinh tế bào T CD4 + và CD8+ được tăng cường bởi TIG1 khi có sự kích thích nhắc lại đặc hiệu kháng nguyên.

Hình. 18 mô tả sự biểu hiện của CD155 trên các tế bào K562 (trên) và TIGIT trên các tế bào NK (dưới).

Hình. 19 mô tả độc tính trung gian tế bào NK được tăng cường bởi TIG1 trên tế bào đích K562.

Hình. 20 chỉ ra rằng HuTIG1-IgG1.AA làm tăng các đáp ứng tác động xytokin.

Hình. 21 mô tả sự biểu hiện dòng tế bào Jurkat-TIGIT của TIGIT ở người trên bề mặt tế bào của nó.

Hình. 22 chỉ ra rằng HuTIG1-IgG1.AA và HuTIG3-IgG1.AA không tạo ra hoạt tính CDC.

Hình. 23 thể hiện rằng HuTIG1-IgG1.AA và HuTIG3-IgG1.AA đã làm gia tăng sự hoạt hóa tế bào T nội tại trong thử nghiệm đo hoạt tính đối kháng tế bào T in vitro đối với các kháng thể kháng TIGIT ở người.

Hình. 24 mô tả các tế bào tua có nguồn gốc bạch cầu đơn nhân (moDC) được biệt hóa nhờ GM-CSF/IL-4 biểu hiện CD112, CD155, và PD-L1.

Hình. 25 mô tả sự bài tiết IFN γ được tăng cường khi bổ sung HuTIG1-IgG1.AA, kháng thể kháng PD-L1 và HuTIG1-IgG1. AA kết hợp với kháng thể kháng PD-L1.

Hình. 26A mô tả sự biểu hiện của TIGIT và CD96 trên tế bào bạch huyết và tế bào myeloid ở người. Hình. 26B mô tả biểu đồ thể hiện quá trình nhuộm màu kháng TIGIT ở các mức biểu hiện khác nhau.

Hình. 27 mô tả lập bản đồ quyết định kháng nguyên HuTIG1-IgG1.AA bằng phép đếm tế bào theo dòng chảy.

Hình. 28 mô tả một đại diện dải ruy-băng của miền IgV ngoại bào của TIGIT ở người với các chuỗi bên gốc quyết định kháng nguyên được đánh số biểu thị ở dạng que.

Hình. 29A và Hình. 29B mô tả kết quả phân tích tập hợp con tế bào T CD4+ đối với biểu hiện TIGIT.

Hình. 30A và Hình. 30B mô tả kết quả phân tích tập hợp con tế bào T CD8+ đối với biểu hiện TIGIT.

Hình. 31 mô tả độc tính trung gian tế bào NK được tăng cường bởi HuTIG1-IgG1.AA và HuTIG3-IgG1.AA trên các tế bào đích K562.

Hình. 32A mô tả sự biểu hiện của TIGIT trên các tế bào lympho xâm nhập khối u từ các mẫu khối u được phân tách. Hình. 32B mô tả biểu đồ đại diện của việc nhuộm kháng TIGIT ở các mức biểu hiện khác nhau.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất, không kể những cái khác, các kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu với miền ngoại bào của TIGIT, một thành viên của siêu họ globulin miễn dịch với motif ức chế dựa vào tyroxin của thụ thể miễn dịch (ITIM) ở đuôi tế bào chất. Các kháng thể đơn dòng ức chế sự liên kết của TIGIT với CD155 và do đó có thể hoạt hóa tế bào T và/hoặc tế bào NK. Các kháng thể đơn dòng có thể được sử dụng trong điều trị ung thư và bệnh truyền nhiễm, bên cạnh các ứng dụng khác.

I. Các định nghĩa

Các kháng thể đơn dòng hoặc các thực thể sinh học khác, chẳng hạn như mảnh của TIGIT thường được cung cấp ở dạng phân lập. Điều này có nghĩa là một kháng thể hoặc thực thể sinh học khác thường chiếm ít nhất 50% khối lượng tinh của các protein can thiệp và các tạp chất khác sinh ra từ quá trình tạo thành hoặc tinh chế của nó, nhưng không loại trừ khả năng kháng thể đơn dòng được kết hợp với lượng dư thừa các chất mang được dùng hoặc tá dược khác nhằm tạo thuận lợi cho việc sử dụng nó. Đôi khi, các kháng thể đơn dòng chiếm ít nhất 60, 70, 80, 90, 95 hoặc 99% khối lượng tinh của các protein can thiệp và các tạp chất từ quá trình tạo thành hoặc tinh chế của nó. Thường thì một kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc chất thực thể sinh học khác là các loài đại phân tử chiếm ưu thế còn lại sau quá trình tinh chế.

Liên kết đặc hiệu của một kháng thể đơn dòng với kháng nguyên đích của nó có nghĩa là ái lực (hằng số liên kết hoặc K_a) có giá trị ít nhất là 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , hoặc 10^{10} M^{-1} , được xác định bởi, thử nghiệm của ví dụ 15. Liên kết đặc hiệu được nhận thấy là cao hơn về độ lớn và có thể phân biệt được với liên kết không đặc hiệu xuất hiện với ít nhất một đích không liên quan. Liên kết đặc hiệu có thể là kết quả của sự hình thành các liên kết giữa các nhóm chức năng riêng biệt hoặc liên kết không gian riêng biệt (ví dụ, loại khóa và chìa) trong khi liên kết không đặc hiệu thường là kết quả của lực Van der Waals. Tuy nhiên, liên kết đặc hiệu không nhất thiết có nghĩa là kháng thể đơn dòng liên kết với một và chỉ một đích.

Đơn vị cấu trúc cơ bản của kháng thể là một cấu trúc chuỗi bốn của các tiểu đơn vị. Mỗi cấu trúc chuỗi bốn này bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi cặp có một chuỗi “nhẹ” (khoảng 25 kDa) và một chuỗi “nặng” (khoảng 50-70 kDa). Phần đầu amin của mỗi chuỗi chứa miền biến đổi có khoảng từ 100 đến 110 hoặc nhiều hơn các axit amin chịu trách nhiệm về nhận biết kháng nguyên. Vùng biến đổi này ban đầu được biểu hiện liên kết với một peptit tín hiệu phân tách. Vùng biến đổi không có peptit tín hiệu đôi khi được coi như một vùng biến đổi trưởng thành. Do đó, ví dụ như, vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nhẹ có nghĩa là vùng biến đổi chuỗi nhẹ không có peptit tín hiệu chuỗi nhẹ. Phần đầu cacboxy của mỗi chuỗi xác định vùng hằng định chịu trách nhiệm về chức năng tác động.

Chuỗi nhẹ được phân loại là kappa hoặc lambda. Các chuỗi nặng được phân loại là gamma, mu, alpha, delta hoặc epsilon và xác định isotyp của kháng thể như IgG, IgM, IgA, IgD và IgE, tương ứng. Trong các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, các vùng biến đổi và vùng hằng định được kết nối bởi vùng “J” với khoảng 12 axit amin hoặc nhiều hơn, với chuỗi nặng cũng bao gồm vùng “D” với khoảng 10 axit amin hoặc nhiều hơn. (nhìn chung, xem Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7) (được kết hợp ở đây để tham khảo đến toàn bộ nội dung đối với mọi mục đích).

Các vùng biến đổi trưởng thành của mỗi cặp chuỗi nhẹ/chuỗi nặng tạo thành vị trí liên kết kháng thể. Vì thế, một kháng thể nguyên vẹn có hai vị trí liên kết. Ngoại trừ các kháng thể hai nhóm chức hoặc đặc hiệu kép, hai vị trí liên kết là giống nhau. Tất cả các chuỗi đều thể hiện cùng một cấu trúc chung của các vùng khung (FR) được bảo tồn tương đối được liên kết bởi ba vùng siêu biến, còn được gọi là các vùng xác định bỏ thể hoặc các CDR. Các CDR từ hai chuỗi của mỗi cặp thường được sắp xếp thẳng hàng bởi các vùng khung, giúp liên kết với một quyết định kháng nguyên đặc hiệu. Từ đầu N đến đầu C, cả hai miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng đều có chứa các miền FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. Sự sắp xếp các axit amin với mỗi miền là phù hợp với các định nghĩa của Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991), hoặc Chothia & Lesk, J.

Mol.Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989). Kabat cũng cung cấp một quy ước đánh số được sử dụng rộng rãi (Kabat numbering) trong các gốc tương ứng giữa các chuỗi nặng khác nhau hoặc giữa các chuỗi nhẹ khác nhau được đánh số giống nhau.

Thuật ngữ “kháng thể” bao gồm các kháng thể nguyên vẹn và các mảnh liên kết của chúng. Do đó, bất kỳ tham chiếu về kháng thể nên được hiểu là nhắc tới các kháng thể ở dạng nguyên vẹn hoặc mảnh liên kết trừ khi bối cảnh yêu cầu khác. Thông thường, các mảnh cạnh tranh với kháng thể nguyên vẹn mà chúng bắt nguồn để liên kết đặc hiệu với đích bao gồm các chuỗi nặng, chuỗi nhẹ riêng biệt Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)_c, Dabs, kháng thể siêu vi và scFv, kháng thể đôi, scFv-Fc, minibody, IgNAR, V-NAR, hIgG, bis-scFv, kháng thể ba và kháng thể tư. Các mảnh có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp, hoặc bằng cách phân tách enzym hoặc phân tách hóa học các globulin miễn dịch nguyên vẹn. Thuật ngữ “kháng thể” cũng bao gồm một kháng thể đặc hiệu kép. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể hai nhóm chức là kháng thể lai nhân tạo có hai cặp chuỗi nặng/nhẹ khác nhau và hai vị trí liên kết khác nhau (xem, ví dụ như, Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-53 (1992)).

Thuật ngữ “quyết định kháng nguyên” đề cập đến vị trí trên kháng nguyên mà tại đó kháng thể liên kết. Một quyết định kháng nguyên có thể được tạo ra từ các axit amin kế tiếp hoặc axit amin không kế tiếp được nhân ghép bằng sự gấp cuộn ba lần của một hoặc nhiều protein. Quyết định kháng nguyên được hình thành từ các axit amin kế tiếp (cũng được biết đến là quyết định kháng nguyên dạng mạch thẳng) thường được giữ cho tiếp xúc với các dung môi biến tính trong khi các quyết định kháng nguyên được hình thành bằng cách gấp cuộn ba lần (cũng được biết đến như quyết định kháng nguyên cấu trúc) thường bị mất đi khi xử lý với dung môi biến tính. Một quyết định kháng nguyên thường bao gồm ít nhất là 3, và thường nhiều hơn, ít nhất là 5 hoặc 8 đến 10 axit amin trong cấu trúc không gian duy nhất. Các phương pháp xác định cấu trúc không gian của quyết định kháng nguyên bao gồm, ví dụ, tinh thể học tia X và cộng hưởng từ hạt nhân

2 chiều. Xem, ví dụ như, Epitope Mapping Protocols, trong *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Các kháng thể nhận biết các quyết định kháng nguyên giống nhau hoặc các quyết định kháng nguyên chồng chéo có thể được xác định trong một xét nghiệm miễn dịch đơn giản mà cho thấy khả năng của một kháng thể khi cạnh tranh với sự liên kết của một kháng thể khác với kháng nguyên đích. Quyết định kháng nguyên của kháng thể cũng có thể được xác định bằng phương pháp tinh thể học tia X của kháng thể liên kết với kháng nguyên của nó để xác định các gốc tiếp xúc. Ngoài ra, hai kháng thể có cùng một quyết định kháng nguyên nếu tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết của một kháng thể lại làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết của kháng thể kia. Hai kháng thể có các quyết định kháng nguyên chồng chéo nếu một số đột biến axit amin làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của một kháng thể lại làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của kháng thể kia.

Sự cạnh tranh giữa các kháng thể được xác định bằng một xét nghiệm trong đó một kháng thể trong các điều kiện thí nghiệm ức chế liên kết đặc hiệu của kháng thể đối chứng với kháng nguyên thông thường (xem, ví dụ như, Junghans et al., *Cancer Res.* 50:1495, 1990). Kháng thể thí nghiệm cạnh tranh với kháng thể đối chứng nếu một lượng dư kháng thể thí nghiệm (ví dụ, ít nhất 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 15x, 20x, 25x, 30x, 35x, 40x, 45x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, 100x, hoặc nhiều hơn, bao gồm các số nằm ở giữa các giá trị này) ức chế sự liên kết của kháng thể đối chứng ít nhất 50% nhưng tốt hơn là 75%, 90% hoặc 99%. Theo các phương án khác, kháng thể thí nghiệm cạnh tranh với kháng thể đối chứng nếu một lượng dư kháng thể thí nghiệm ức chế sự liên kết của kháng thể đối chứng với ít nhất khoảng 55%, 60%, 65%, 70% hoặc tốt hơn là ít nhất khoảng 75% , 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% khi được đo trong thí nghiệm liên kết cạnh tranh. Các kháng thể được xác định bởi thí nghiệm liên kết cạnh tranh (các kháng thể cạnh tranh) bao gồm các kháng thể liên kết với cùng quyết định kháng nguyên như kháng thể đối chứng và

các kháng thể liên kết với quyết định kháng nguyên liên kết đủ gần với quyết định kháng nguyên được liên kết bởi kháng thể đối chứng cho trở ngại lập thể xảy ra. Tốt hơn là, sự cạnh tranh được đánh giá như trong Ví dụ 14.

Thuật ngữ “đối tượng” bao gồm các đối tượng là người và các động vật có vú khác. Theo một số trường hợp, các phương pháp của sáng chế được sử dụng trong các động vật thí nghiệm, trong ứng dụng thú y, và trong việc phát triển các mẫu động vật cho bệnh, bao gồm, nhưng không giới hạn, các loài gặm nhấm bao gồm chuột nhắt, chuột, chuột đồng cũng như các loài linh trưởng, ví dụ như các loài linh trưởng bậc cao. Theo một số phương án, đối tượng nhận hoặc là ứng cử viên tiếp nhận điều trị dự phòng hoặc điều trị trị liệu.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, một gốc axit amin của một trình tự axit amin được quan tâm mà “tương ứng với” gốc axit amin của trình tự axit amin đối chứng cho thấy rằng gốc axit amin của trình tự được quan tâm là tại một vị trí tương đồng hoặc tương đương với gốc được liệt kê trong trình tự của axit amin đối chứng. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định liệu vị trí của một gốc axit amin cụ thể trong một polypeptit, ví dụ như polypeptit TIGIT, có tương ứng với vị trí của trình tự đối chứng tương đồng hay không. Ví dụ, trình tự của một polypeptit TIGIT có thể được sắp xếp với trình tự của trình tự đối chứng bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết (ví dụ như, công cụ tìm kiếm sắp xếp cục bộ cơ bản - BLAST), ClustalW2, phần mềm sắp xếp các trình tự dựa trên cấu trúc (STRAP), hoặc các kỹ thuật tương tự). Ngoài ra, các tọa độ cấu trúc tinh thể của trình tự đối chứng có thể được sử dụng như một sự trợ giúp trong việc xác định cấu trúc ba chiều của gốc polypeptit đồng nhất (Stengel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109:5399-5404, 2012). Theo một khía cạnh khác, các gốc tương đương có thể được xác định bằng cách xác định tính đồng nhất ở cấp độ của cấu trúc bậc ba. Bằng cách sử dụng các phương pháp này, các gốc axit amin của biến thể polypeptit TIGIT có thể được đánh số theo sự đánh số vị trí gốc axit amin tương ứng của trình tự đối chứng. Ví dụ, trình tự axit amin SEQ ID NO:1 có thể được sử dụng để xác định việc đánh số vị trí gốc axit amin của mỗi gốc axit amin của biến thể TIGIT được quan tâm hoặc quyết định kháng nguyên.

Theo một số phương án, một trình tự axit amin tương ứng với trình tự axit amin khác nếu nó có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100%.

Nhằm mục đích phân loại các sự thay thế các axit amin là bảo toàn hoặc không bảo toàn, các axit amin được phân nhóm như sau: Nhóm I (các chuỗi bên kỵ nước): met, ala, val, leu, ile; Nhóm II (các chuỗi bên ưa nước trung tính): cys, ser, thr; Nhóm III (các chuỗi bên có tính axit): asp, glu; Nhóm IV (các chuỗi bên có tính bazơ): asn, gln, his, lys, arg; Nhóm V (các gốc ảnh hưởng đến sự định hướng chuỗi): gly, pro; và Nhóm VI (các chuỗi bên thơm): trp, tyr, phe. Sự thay thế bảo toàn bao gồm các sự thay thế giữa các axit amin ở cùng lớp. Các sự thay thế không bảo toàn có thể bao gồm sự trao đổi một thành viên của một trong các lớp này với một thành viên của một lớp khác.

Tỷ lệ phần trăm mức độ tương đồng trình tự được xác định với các trình tự kháng thể được sắp xếp tối đa bằng quy ước đánh số Kabat. Sau khi sắp xếp, nếu vùng kháng thể đối tượng (ví dụ toàn bộ vùng biến đổi trưởng thành của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ) được so sánh với vùng tương tự của kháng thể đối chứng, tỷ lệ phần trăm mức độ tương đồng trình tự giữa vùng kháng thể đối chứng và vùng kháng thể đối tượng là số lượng các vị trí được giữ bởi cùng một axit amin trong cả vùng kháng thể đối chứng và đối tượng chia cho tổng số các vị trí được sắp xếp của hai vùng, các khoảng trống không được tính, nhân với 100 để quy đổi ra tỷ lệ phần trăm.

Các dược phẩm hoặc các phương pháp “bao gồm” một hoặc nhiều thành phần có thể bao gồm các thành phần khác không được nhắc lại cụ thể. Ví dụ, một dược phẩm chứa kháng thể có thể bao gồm chỉ riêng kháng thể hoặc kết hợp với các thành phần khác.

Trừ khi có sự khác biệt rõ ràng trong bối cảnh, việc tham chiếu đến một phạm vi sẽ bao gồm tất cả các số nguyên nằm trong khoảng đó và tất cả các phạm vi phụ được xác định bởi các số nguyên như vậy.

II. Các phân tử đích

Trừ khi được chỉ định khác, TIGIT có nghĩa là TIGIT ở người. Trình tự điển hình ở người được gán số truy cập Swiss-Prot là Q495A1. Trình tự TIGIT hoàn chỉnh ở người có 244 axit amin trong đó các axit amin từ 1 đến 21 là một peptit tín hiệu và các axit amin từ 22 đến 244 cấu thành nên protein trưởng thành (SEQ ID NO:1). Các gốc khoảng từ 22 đến 141 cấu thành miền ngoại bào (SEQ ID NO:3). Các gốc khoảng từ 142 đến 162 cấu thành một miền xuyên màng, và các gốc khoảng từ 163 đến 244 cấu thành miền tế bào chất.

Trừ khi có chỉ định khác, CD155 đề cập đến dạng protein ở người của protein này. Một trình tự điển hình ở người của CD155 ở người được chỉ định là Swiss-Prot P15151, đây là một protein gồm 417 axit amin, trong đó các gốc khoảng từ 1 đến 20 là peptit tín hiệu, các gốc khoảng từ 21 đến 343 là miền ngoại bào (SEQ ID NO:6), các gốc khoảng từ 344 đến 367 là miền xuyên màng, và các gốc khoảng từ 368 đến 417 là miền tế bào chất.

Trừ khi có sự khác biệt rõ ràng trong bối cảnh, tham chiếu đến một trong các protein nêu trên có nghĩa là ít nhất là miền ngoại bào của protein và thường là protein hoàn chỉnh hơn là peptit tín hiệu có thể phân tách.

III. Các kháng thể của sáng chế

A. Tính đặc hiệu liên kết và các đặc tính chức năng

Sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng liên kết với các quyết định kháng nguyên trong miền ngoại bào của protein TIGIT. Các kháng thể được chỉ định TIG1, TIG2 và TIG3 là ba kháng thể ở chuột điển hình như vậy. Các trình tự của các vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể này được chỉ định là SEQ ID NO: 10 và 14, 18 và 22, và 26 và 30 tương ứng với TIG1, TIG2 và TIG3 liên kết đặc hiệu với miền ngoại bào của TIGIT ở người.

Một số kháng thể của sáng chế liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên hoặc quyết định kháng nguyên chồng chéo như kháng thể được chỉ định TIG1, TIG2 hoặc TIG3. Các kháng thể khác có tính đặc hiệu liên kết như vậy có thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch cho các con chuột với TIGIT hoặc một

phần của chúng bao gồm quyết định kháng nguyên mong muốn, và sàng lọc các kháng thể thu được để liên kết với miền ngoại bào của TIGIT, tùy chọn cạnh tranh với TIG1, TIG2 hoặc TIG3. Các kháng thể cũng có thể được sàng lọc chống lại các dạng đột biến của kháng nguyên TIGIT để nhận dạng một kháng thể có cùng cấu hình liên kết hoặc cấu hình liên kết tương tự với tập hợp các thay đổi đột biến như TIG1, TIG2 hoặc TIG3. Các đột biến có thể là sự thay thế có hệ thống bằng alanin (hoặc serin nếu một alanin đã có mặt) cho một gốc vào một thời điểm, hoặc nhiều khoảng không gian rộng trong toàn bộ miền ngoại bào của kháng thể TIGIT hoặc thông qua một phần của chúng nơi mà quyết định kháng nguyên có mặt.

Ví dụ 16 sắp xếp các gốc 35, 37, 49 và 51 của SEQ ID NO:1 như là các gốc tạo ra quyết định kháng nguyên của kháng thể TIG1. Sự thay thế alanin tại bất kỳ gốc nào trong các gốc này về cơ bản là phá hủy sự liên kết kháng thể. Do đó, sáng chế bao gồm các kháng thể khác liên kết với một quyết định kháng nguyên của TIGIT ở người chứa các gốc 35 và 37 của SEQ NO:1 và/hoặc gốc 49 và 51 của SEQ ID NO:1, và tốt hơn là một quyết định kháng nguyên chứa tất cả các gốc này. Quyết định kháng nguyên có thể là dạng mạch thẳng (ví dụ các gốc kế tiếp từ 3 đến 20, từ 3 đến 17 hoặc từ 5 đến 10) hoặc dạng cấu trúc. Một số kháng thể như vậy liên kết với peptit chứa các gốc từ 35 đến 51 của SEQ ID NO:1 và không quá 1, 2, 3, 4 hoặc 5 axit amin chặn từ SEQ ID NO:1 ở mỗi bên. Một số kháng thể như vậy liên kết với một peptit chứa các gốc từ 35 đến 51 của SEQ ID NO:1. Một số kháng thể như vậy có thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch với các peptit như vậy. Ví dụ 19 cũng cho thấy rằng gốc 90 của SEQ ID NO:1 là rất quan trọng đối với sự liên kết của kháng thể (Hu)TIG1 được nhân hóa với TIGIT, ngoài các gốc 35, 37, 49 và 51 của SEQ ID NO:1. Theo các phương án khác, kháng thể (ví dụ như kháng thể HuTIG1) liên kết với quyết định kháng nguyên bao gồm một hoặc nhiều gốc tương ứng với các vị trí axit amin 35, 37, 49, 51 và/hoặc 90 của SEQ ID NO:1. Theo phương án tiếp theo, kháng thể (chẳng hạn như kháng thể HuTIG1) không liên kết với một hoặc nhiều gốc tương ứng với các vị trí axit amin 34, 39, 44, 47, 52, 55, 86, 88, 92 và/hoặc 96 của SEQ ID NO:1.

Các kháng thể có tính đặc hiệu liên kết của kháng thể ở chuột được chọn lọc (ví dụ TIG1, TIG2, hoặc TIG3) cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng một biến thể của phương pháp biểu hiện phage. Xem Winter, WO 92/20791. Phương pháp này đặc biệt thích hợp để sản xuất các kháng thể ở người. Theo phương pháp này, cả vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể ở chuột đều được chọn làm vật liệu khởi đầu. Ví dụ, nếu một vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn làm vật liệu khởi đầu, một thư viện phage được xây dựng trong đó các thành viên hiển thị cùng một vùng biến đổi chuỗi nhẹ (tức là vật liệu khởi đầu từ chuột) và một vùng biến đổi chuỗi nặng khác. Các vùng biến đổi chuỗi nặng có thể, ví dụ như, thu được từ thư viện của các vùng biến đổi chuỗi nặng được tái sắp xếp. Một phage thể hiện liên kết đặc hiệu mạnh với TIGIT (ví dụ như ít nhất là 10^8 và tốt hơn là ít nhất 10^9 M^{-1}) được chọn lọc. Vùng biến đổi chuỗi nặng từ phage này sau đó đóng vai trò như là một vật liệu khởi đầu để xây dựng một thư viện phage khác. Trong thư viện này, mỗi phage biểu hiện cùng một vùng biến đổi chuỗi nặng (tức là vùng được nhận dạng từ thư viện biểu hiện thứ nhất) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ khác. Ví dụ, các vùng biến đổi chuỗi nhẹ có thể thu được từ một thư viện các vùng biến đổi chuỗi nhẹ ở người được tái sắp xếp. Một lần nữa, phage thể hiện liên kết đặc hiệu mạnh với TIGIT được chọn lọc. Các kháng thể thu được thường có tính đặc hiệu quyết định kháng nguyên giống hoặc tương tự như vật liệu khởi đầu từ chuột.

Một số kháng thể có một vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành bao gồm các CDR H1, H2 và H3 và một vùng chuỗi nhẹ trưởng thành chứa toàn bộ hoặc về thực chất là các CDR L1, L2 và L3 từ TIG1. Một số kháng thể có một vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành bao gồm các CDR H1, H2 và H3 và một vùng chuỗi nhẹ trưởng thành bao gồm toàn bộ hoặc thực chất là CDR L1, L2 và L3 từ TIG2. Một số kháng thể có một vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành bao gồm các CDR H1, H2 và H3 và một vùng chuỗi nhẹ trưởng thành bao gồm toàn bộ hoặc thực chất là CDR L1, L2 và L3 từ TIG3. Các CDR có thể được định nghĩa bằng bất kỳ định nghĩa thông thường nào như Kabat, Chothia, Kabat và Chothia composite, AbM hoặc định nghĩa Contact như được thể hiện trong bảng dưới đây:

Vòng lặp	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L-24 -- L34	L24--34	L24 -- L34	L30 -- L36
L2	L50 -- L56	L50 -- 156	L50 -- L56	L46 -- L55
L3	L89 -- L97	L89--97	L89 -- L97	L89 -- L96
H1	H31 -- H35B (Đánh Số Kabat)	H26 -- H35b	H26 - H32 đến 34	H30 -- H35B
H1	H31-H35 (Đánh số Chothia)	H26 -- H35	H26 -- H32	H30 -- H35
H2	H50 -- H65	H50 -- H58	H52 -- H56	H47 -- H58
H3	H95 - H102	H95 -- H102	H95 -- H102	H93 -- H10

Các kháng thể khác có thể thu được bằng sự phát sinh đột biến của cADN mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể điển hình, chẳng hạn như TIG1, TIG2, hoặc TIG3. Các kháng thể đơn dòng mà có mức độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với TIG1, TIG2 hoặc TIG3 trong trình tự axit amin của các vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ trưởng thành và duy trì các đặc tính chức năng của nó, và/hoặc khác với kháng thể tương ứng bởi một số lượng nhỏ các sự thay thế axit amin không quan trọng về chức năng (ví dụ sự thay thế bảo toàn), các sự mất đoạn, hoặc các sự chèn đoạn vào cũng được bao gồm trong sáng chế. Các axit amin trong các khung vùng biến đổi có thể là quan trọng để liên kết có thể được xác định như được mô tả trong các phần về sự nhân hóa dưới đây. Các kháng thể đơn dòng có ít nhất một và tốt hơn là cả sáu CDR theo định nghĩa của Kabat mà có mức độ tương đồng trình tự khoảng 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với các CDR tương ứng của TIG1, TIG2 hoặc TIG3 cũng được bao gồm.

Tốt hơn là, các kháng thể có một hoặc nhiều đặc điểm sau (i) ức chế liên kết của TIGIT ở người với CD155 ở người, (ii) ức chế liên kết của TIGIT với các phối tử khác, ví dụ như CD112 và CD113, (iii) gia tăng đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên, (iv) hoạt hóa các tế bào tiêu diệt tự nhiên, (v) kích thích sự hoạt hóa tế bào T nội tại, và (vi) kích thích sự tạo thành của một hoặc nhiều xytokin kích thích miễn dịch và/hoặc làm giảm sự tạo thành của một hoặc nhiều xytokin kích thích miễn dịch bởi các tế bào T và các tế bào khác của hệ miễn dịch. Các thí nghiệm điển hình để đo các thuộc tính này được đưa ra trong các ví dụ.

Các kháng thể được ưu tiên ức chế hoàn toàn hoặc một phần sự liên kết của TIGIT với CD155. Một số kháng thể có thể ức chế sự tương tác này với IC_{50} có giá trị bất kỳ trong khoảng từ 25 đến 300 ng/ml, 25 đến 75 ng/ml, 25 đến 50 ng/ml, 40 đến 75 ng/ml, 50 đến 75 ng/ml, 50 đến 90 ng/ml, 50 đến 100 ng/ml, 75 đến 100 ng/ml, 50 đến 150, 75 đến 175 ng/ml, 100 đến 200 ng/ml, 125 đến 225 ng/ml, 100 đến 250 ng/ml, 150 đến 300 ng/ml, 175 đến 250 ng/ml, 200 đến 300 ng/ml, 25 đến 275 ng/ml, 250 đến 300 ng/ml, 49 +/- 10% ng/ml, 65 +/-10% ng/ml hoặc 76 +/- 10% ng/ml được đo như trong các ví dụ. Theo các phương án khác, các kháng thể có thể ức chế hoàn toàn hoặc một phần liên kết của TIGIT với CD155 với IC_{50} có giá trị tối thiểu bất kỳ khoảng 25 ng/ml, 50 ng/ml, 75 ng/ml, 100 ng/ml, 125 ng/ml, 150 ng/ml, 175 ng/ml, 200 ng/ml, 225 ng/ml, 250 ng/ml, 275 ng/ml, hoặc 300 ng/ml, hoặc lớn hơn, bao gồm các nồng độ nằm trong khoảng các giá trị này. Một số kháng thể có thể gia tăng các đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên lên gấp từ 1,5 đến 3 lần, chẳng hạn như bất kỳ khoảng 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, hoặc gấp 3 lần hoặc nhiều hơn, như được đo trong các ví dụ. Một số kháng thể có thể làm tăng sự tạo thành của 1, 2, 3 hoặc tất cả IL-2, IL-6, TNF α và IFN γ bởi các tế bào NK từ 1,5 đến 3 lần, chẳng hạn như bất kỳ khoảng 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, hoặc 3 lần trở lên, được đo trong các ví dụ. Một số kháng thể có thể gia tăng sự hoạt hóa tế bào T nội tại từ 1,5 đến 3 lần, chẳng hạn như bất kỳ khoảng 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, hoặc gấp 3 lần hoặc hơn, được đo trong các ví dụ. Một số kháng thể có thể ức chế ung thư hoặc một

bệnh truyền nhiễm như được thể hiện trong mẫu động vật hoặc thí nghiệm lâm sàng. Các mẫu động vật mắc bệnh ung thư trong đó các tế bào ung thư ở người được tiêm vào một động vật thí nghiệm suy giảm miễn dịch, ví dụ như chuột hoặc chuột nhắt, được sử dụng rộng rãi.

Việc nhân hóa hoặc khảm hóa các kháng thể làm gia tăng chu kỳ bán huỷ in vivo so với các kháng thể chuột khởi đầu. Chu kỳ bán huỷ thu được có thể là từ 10 đến 50 ngày ví dụ ở người. Chu kỳ bán huỷ có thể được đo bằng các nghiên cứu động học, như được mô tả bởi Kim et al., Eur J of Immunol 24:542 (1994).

B. Kháng thể không ở người

Việc tạo ra các kháng thể đơn dòng không ở người, ví dụ như ở chuột, chuột lang, linh trưởng, thỏ, gà hoặc chuột, kháng lại TIGIT có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, gây miễn dịch cho động vật với TIGIT hoặc một mảnh của nó, hoặc các tế bào có TIGIT. Xem Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSHP NY, 1988) (được dẫn chiếu và đưa vào tài liệu này cho mọi mục đích). Chất kháng nguyên này có thể thu được từ một nguồn tự nhiên, bằng cách tổng hợp peptit hoặc bằng biểu hiện tái tổ hợp. Tùy chọn, các chất kháng nguyên có thể được hợp nhất hoặc phức hợp với một protein vận chuyển. Tùy chọn, các kháng thể có thể được sử dụng với tá dược. Một số loại tá dược có thể được sử dụng như mô tả dưới đây. Tá dược Freund hoàn chỉnh được bổ sung tiếp theo tá dược không hoàn chỉnh được ưu tiên cho việc tạo miễn dịch các động vật thí nghiệm. Thỏ hoặc chuột lang thường được sử dụng để tạo ra kháng thể đa dòng. Chuột thường được dùng để tạo các kháng thể đơn dòng. Các kháng thể được sàng lọc cho liên kết đặc hiệu với TIGIT. Tùy chọn, kháng thể có thể được tiếp tục sàng lọc đối với liên kết đến vùng đặc hiệu của TIGIT. Việc sàng lọc như vậy có thể đạt được bằng cách xác định liên kết của kháng thể với tập hợp của các đột biến mất đoạn của TIGIT và xác định các đột biến mất đoạn nào liên kết với kháng thể. Việc liên kết có thể được đánh giá, ví dụ như, bằng phương pháp Western blot, FACS và ELISA.

C. Kháng thể được nhân hóa

Sự giảm hoặc loại bỏ đáp ứng HAMA (kháng thể kháng chuột ở người (cũng có thể áp dụng cho kháng thể kháng chuột nhất ở người hoặc kháng thể kháng thỏ ở người hoặc kháng thể kháng chuột hamster ở người, v.v.) là một khía cạnh quan trọng của phát triển lâm sàng của các chất điều trị phù hợp. Xem, ví dụ như, Khaxzaeli et al., J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80:937; Jaffers et al., Transplantation (1986), 41:572; Shawler et al., J. Immunol. (1985), 135:1530; Sears et al., J. Biol. Response Mod. (1984), 3:138; Miller et al., Blood (1983), 62:988; Hakimi et al., J. Immunol. (1991), 147:1352; Reichmann et al., Nature (1988), 332:323; Junghans et al., Cancer Res. 1990), 50:1495. Như được mô tả trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất các kháng thể được nhân hóa mà làm cho đáp ứng HAMA bị giảm hoặc loại bỏ. Các biến thể của các kháng thể này có thể tiếp tục thu được bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, một số trong đó sẽ được mô tả thêm dưới đây.

Một kháng thể được nhân hóa thường là một kháng thể được thiết kế di truyền trong đó các CDR từ kháng thể của “thể cho” không ở người được ghép vào các trình tự kháng thể của “thể nhận” ở người (xem, ví dụ như, Queen, US 5,530,101 and 5,585,089; Winter, US 5,225,539, Carter, US 6,407,213, Adair, US 5,859,205 6,881,557, Foote, US 6,881,557). Ví dụ, các trình tự kháng thể của thể nhận có thể là một trình tự kháng thể ở người trưởng thành, là một hợp nhất của các trình tự đó, một mức độ tương đồng trình tự của các trình tự kháng thể ở người, hoặc trình tự vùng dòng mầm. Do đó, một kháng thể được nhân hóa là kháng thể có một số hoặc toàn bộ CDR mà toàn bộ hoặc thực chất là từ kháng thể của thể cho và các trình tự khung vùng biến đổi và các vùng hằng định, nếu có, là toàn bộ hoặc thực chất là từ các trình tự kháng thể ở người. Tương tự, chuỗi nặng được nhân hóa có ít nhất một, hai và thường là tất cả ba CDR mà toàn bộ hoặc thực chất là từ chuỗi nặng của kháng thể của thể cho, và trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng hằng định chuỗi nặng, nếu có, thực chất là từ các trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nặng ở người và trình tự vùng hằng định. Tương tự, chuỗi nhẹ được nhân hóa có ít nhất một, hai và thường tất cả ba CDR mà toàn bộ hoặc thực chất là từ chuỗi nhẹ của kháng thể thể cho, và trình tự khung vùng biến

đổi chuỗi nhẹ và vùng hằng định chuỗi nhẹ, nếu có, thực chất là từ các trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ ở người và các trình tự vùng hằng định. Khác với các kháng thể siêu vi và các dAb, kháng thể được nhân hóa chứa chuỗi nặng được nhân hóa và chuỗi nhẹ được nhân hóa. Ở đây cũng như ở các phần khác của sáng chế, CDR trong kháng thể đối tượng thực chất là từ CDR tương ứng trong kháng thể đối chứng khi có ít nhất khoảng 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% các gốc tương ứng (theo định nghĩa của Kabat) là đồng nhất giữa các CDR tương ứng; tuy nhiên, CDR H2 được định nghĩa bởi Kabat trong một kháng thể đối tượng thực chất là từ CDR tương ứng trong kháng thể đối chứng khi ít nhất khoảng 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% các gốc tương ứng (theo định nghĩa của Kabat) là đồng nhất giữa các CDR tương ứng. Các trình tự khung vùng biến đổi của chuỗi kháng thể hoặc vùng hằng định của chuỗi kháng thể thực chất là từ trình tự vùng khung biến đổi ở người hoặc vùng hằng định ở người tương ứng khi ít nhất khoảng 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% các gốc tương ứng được định nghĩa bởi Kabat là tương tự nhau.

Mặc dù các kháng thể được nhân hóa thường kết hợp tất cả sáu CDR (tốt hơn là được định nghĩa bởi Kabat) từ kháng thể không ở người (ví dụ như chuột), chúng cũng có thể được tạo ra với lượng ít hơn tất cả CDR (ví dụ như ít nhất 3, 4 hoặc 5) từ kháng thể không ở người (ví dụ như, Pascalis et al., *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos et al., *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000).

Trong một số kháng thể, chỉ một phần của CDR, cụ thể là tập con của các gốc CDR cần để liên kết, gọi là các SDR, là cần thiết để duy trì liên kết trong một kháng thể được nhân hóa. Các gốc CDR không tiếp xúc với kháng nguyên và không có trong các SDR có thể được xác định dựa trên các nghiên cứu trước đây

(ví dụ các gốc từ H60 đến H65 trong CDR H2 thường không cần thiết), từ các vùng của các CDR Kabat nằm bên ngoài vòng siêu biến Chothia (Chothia, J. Mol.Biol. 196:901, 1987), bằng cách tạo mô hình phân tử và/hoặc theo kinh nghiệm, hoặc như được mô tả trong Gonzales et al., Mol.Immunol.41: 863, 2004. Trong các kháng thể được nhân hóa như vậy, ở các vị trí trong đó một hoặc nhiều gốc CDR của thể cho không có mặt hoặc trong đó toàn bộ CDR thể cho bị loại bỏ, axit amin chiếm vị trí có thể là axit amin chiếm vị trí tương ứng (bằng đánh số Kabat) trong trình tự kháng thể thể nhận. Số lần diễn ra các sự thay thế như vậy của các axit amin thể nhận cho các axit amin thể cho trong các CDR phản ánh về sự cân bằng trong cân nhắc cạnh tranh. Các sự thay thế đó có khả năng mang lại thuận lợi trong việc giảm số lượng các axit amin ở chuột trong kháng thể được nhân hóa và do đó làm giảm khả năng tạo miễn dịch tiềm năng. Tuy nhiên, các sự thay thế cũng có thể tạo ra các thay đổi về ái lực, và sự giảm đáng kể ái lực thì tốt hơn là nên tránh. Các vị trí cho sự thay thế trong các CDR và các axit amin thể cho cũng có thể được chọn lọc theo kinh nghiệm.

Trong khi thể nhận có thể tương đồng về trình tự với trình tự khung ở người được chọn, cho dù nó là từ globulin miễn dịch ở người hoặc khung tương đồng ở người, sáng chế này dự tính rằng trình tự của thể nhận có thể bao gồm các sự thay thế axit amin có từ trước tương ứng với trình tự globulin miễn dịch hoặc trình tự khung tương đồng ở người. Các sự thay thế có từ trước tốt hơn là ở mức tối thiểu; thông thường, chỉ bốn, ba, hai hoặc một axit amin khác biệt chỉ liên quan đến trình tự globulin miễn dịch ở người hoặc trình tự khung tương đồng.

Các trình tự kháng thể nhận ở người có thể tùy ý được chọn từ trong số nhiều trình tự kháng thể ở người đã biết để đem lại mức độ tương đồng trình tự cao (ví dụ như độ tương đồng từ 65% đến 85%) giữa các khung vùng biến đổi trình tự thể nhận ở người và các khung vùng biến đổi tương ứng của chuỗi kháng thể cho.

Một số axit amin nhất định từ các gốc khung vùng biến đổi ở người có thể được chọn cho sự thay thế dựa trên ảnh hưởng có thể của chúng lên cấu hình CDR và/hoặc sự liên kết với kháng nguyên. Nghiên cứu về các ảnh hưởng có thể đó

bằng cách tạo mô hình, kiểm tra các đặc tính của các axit amin ở các vị trí cụ thể, hoặc quan sát theo kinh nghiệm về các tác động của sự thay thế hoặc sự đột biến của các axit amin cụ thể.

Ví dụ, khi có axit amin khác nhau giữa gốc khung vùng biến đổi không ở người và gốc khung vùng biến đổi được chọn, thì axit amin vùng khung ở người có thể được thay thế bằng axit amin vùng khung tương đương từ kháng thể không ở người khi nó được dự kiến hợp lý rằng axit amin:

- (1) liên kết trực tiếp với kháng nguyên không qua cộng hóa trị,
- (2) tiếp xúc với vùng CDR,
- (3) nếu không, tương tác với vùng CDR (ví dụ như trong khoảng 6 Å của vùng CDR)

Các ứng cử viên khác cho sự thay thế là các axit amin khung của thể nhận ở người mà bất thường đối với globulin miễn dịch ở người tại vị trí đó. Các axit amin này có thể được thế bởi các axit amin từ vị trí tương đương của kháng thể ở thể cho không ở người hoặc từ các vị trí tương đương của các globulin miễn dịch ở người điển hình hơn. Các ứng cử viên khác cho sự thay thế là các axit amin khung thể nhận ở người mà bất thường đối với globulin miễn dịch ở người tại vị trí đó.

Kháng thể được nhân hóa được ưu tiên có vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có ít nhất khoảng 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc ít hơn 100% độ tương đồng với SEQ ID NO:35 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có ít nhất khoảng 80%, 81 %, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhỏ hơn 100% độ tương đồng với SEQ ID NO:37. Bất kỳ biến đổi nào cũng xảy ra tại các gốc khung vùng biến đổi thì tốt hơn là tại các gốc mà được xác định là có thể quan trọng đối với việc tạo liên kết. (xem đoạn 73). Tốt hơn là, bất kỳ biến đổi nào cũng là sự thay thế axit amin bảo toàn. Kháng thể được ưu tiên chứa vùng biến đổi chuỗi nặng với trình tự SEQ ID NO:35 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành với trình tự SEQ ID NO:37. Đối với sự biểu hiện của kháng thể có chiều dài đầy đủ, vùng biến đổi

chuỗi nặng trưởng thành tốt hơn là được liên kết với vùng hằng định chuỗi nặng, tạo thành chuỗi nặng bao gồm hoặc chứa trình tự SEQ ID NO:40, trong trường hợp mà lysin đầu C có thể có mặt hoặc không, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nhẹ, tạo thành chuỗi nhẹ bao gồm hoặc chứa trình tự SEQ ID NO:41.

Một kháng thể được nhân hóa khác được ưu tiên có một vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có ít nhất khoảng 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc ít hơn 100% độ tương đồng với SEQ ID NO:43 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có ít nhất khoảng 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhỏ hơn 100% độ tương đồng với SEQ ID NO:45. Tốt hơn là, bất kỳ biến đổi nào cũng xảy ra tại các gốc khung vùng biến đổi hơn là tại các gốc được xác định là có thể quan trọng đối với việc tạo liên kết (xem đoạn 73 và các ví dụ). Tốt hơn là, bất kỳ biến đổi nào cũng là sự thay thế axit amin bảo toàn. Kháng thể được ưu tiên chứa vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự SEQ ID NO:43 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự SEQ ID NO:45. Đối với sự biểu hiện của kháng thể có chiều dài đầy đủ, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành tốt hơn là được liên kết với vùng hằng định chuỗi nặng, tạo thành chuỗi nặng bao gồm hoặc chứa trình tự SEQ ID NO:48, trong trường hợp mà lysin đầu C có thể có mặt hoặc không, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành tốt hơn là được liên kết với vùng hằng định chuỗi nhẹ, tạo thành chuỗi nhẹ bao gồm hoặc chứa trình tự SEQ ID NO:49.

D. Kháng thể khảm và kháng thể có bề mặt thay đổi gốc

Sáng chế còn đề xuất các dạng kháng thể khảm và kháng thể có bề mặt thay đổi gốc của các kháng thể không ở người, đặc biệt là các kháng thể TIG1, TIG2 và TIG3 trong các ví dụ.

Kháng thể khảm là kháng thể trong đó các vùng biến đổi trưởng thành của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể không ở người (ví dụ như chuột) được kết hợp với các vùng hằng định chuỗi nhẹ và chuỗi nặng ở người. Những kháng thể như vậy phần lớn hoặc hoàn toàn giữ tính đặc hiệu liên kết của kháng thể

không ở người, và khoảng 2/3 trình tự ở người.

Kháng thể có bề mặt thay đổi gốc là một loại kháng thể được nhân hóa, giữ lại một số và thường là tất cả các CDR và một số gốc khung vùng biến đổi không ở người của kháng thể không ở người, nhưng thay thế các gốc khung vùng biến đổi khác mà các gốc đó có thể tham gia vào các quyết định kháng nguyên tế bào B hoặc tế bào T, ví dụ như các gốc tiếp xúc (Padlan, Mol. Immunol. 28: 489, 1991) với các gốc từ các vị trí tương ứng của trình tự kháng thể ở người. Kết quả là kháng thể trong đó các CDR là hoàn toàn hoặc về thực chất là từ một kháng thể không ở người và các khung vùng biến đổi của kháng thể không ở người được nhân hóa bằng các sự thay thế. Các dạng thay thế bề mặt của kháng thể TIG1, TIG2, hoặc TIG3 được bao gồm trong sáng chế này.

E. Kháng thể ở người

Kháng thể ở người chống lại TIGIT được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật được mô tả dưới đây. Một số kháng thể người được chọn lọc bằng các thí nghiệm liên kết cạnh tranh, bằng phương pháp biểu hiện phage của Winter nêu trên, hoặc cách khác, để có tính đặc hiệu quyết định kháng nguyên giống như kháng thể ở chuột cụ thể, chẳng hạn như một trong các kháng thể đơn dòng ở chuột được mô tả trong các ví dụ. Các kháng thể người cũng có thể được sàng lọc cho tính đặc hiệu quyết định kháng nguyên cụ thể bằng cách sử dụng chỉ một mảnh TIGIT làm kháng nguyên đích, và/hoặc bằng cách sàng lọc các kháng thể chống lại tập hợp các đột biến mất đoạn của TIGIT.

Các phương pháp tạo ra các kháng thể ở người bao gồm phương pháp trioma của Oestberg et al., Hybridoma 2:361-367 (1983); Oestberg, U.S. Patent No. 4,634,664; và Engleman et al., US Patent 4,634,666, sử dụng các con chuột biến đổi gen bao gồm các gen globulin miễn dịch ở người (xem ví dụ như, Lonberg et al., WO93/12227 (1993); US 5,877,397, US 5,874,299, US 5,814,318, US 5,789,650, US 5,770,429, US 5,661,016, US 5,633,425, US 5,625,126, US 5,569,825, US 5,545,806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991) và các phương pháp biểu hiện phage (xem, ví dụ như, Dower et al., WO 91/17271 và McCafferty et al., WO

92/01047, US 5,877,218, US 5,871,907, US 5,858,657, US 5,837,242, US 5,733,743 và US 5,565,332).

F. Lựa chọn vùng hằng định

Các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể khảm, kháng thể nhân hóa (bao gồm cả kháng thể có bề mặt thay đổi gốc), hoặc kháng thể ở người có thể được liên kết với ít nhất một phần của vùng hằng định ở người. Lựa chọn vùng hằng định phần nào phụ thuộc vào việc liệu độc tính trung gian bỏ thể phụ thuộc kháng thể và/hoặc trung gian tế bào được mong muốn hay không. Ví dụ, các isotop IgG1 và IgG3 ở người có độc tính trung gian bỏ thể nhưng các isotop IgG2 và IgG4 ở người thì không. Các vùng hằng định chuỗi nhẹ có thể là lambda hoặc kappa. Đối với liệu pháp tạo miễn dịch chống ung thư hoặc tác nhân gây bệnh không biểu hiện TIGIT, IgG2 hoặc IgG4 ở người hoặc một dạng bị suy giảm của IgG1 ở người với chức năng tác động bị suy giảm thường được ưu tiên. Đối với IgG4 ở người, việc bao gồm một đột biến được thiết kế S228P (đánh số Eu) trên chuỗi nhẹ để ngăn chặn sự chuyển đổi mảnh Fab thường được ưu tiên. Tuy nhiên, để loại bỏ các tế bào ung thư biểu hiện TIGIT (ví dụ như khối u của các tế bào T hoặc các tế bào NK) hoặc để ức chế miễn dịch, IgG1 hoặc IgG3 ở người thường được ưu tiên.

Các vùng hằng định ở người cho thấy biến thể allotyp và biến thể isoallotyp giữa các cá thể khác nhau, tức là, các vùng hằng định có thể khác biệt ở các cá thể khác nhau tại một hoặc nhiều vị trí đa hình. Isoallotyp khác với allotyp ở chỗ huyết thanh nhận diện một isoallotyp liên kết với vùng không đa hình của một hoặc nhiều isotyp khác. Tham chiếu đến vùng hằng định ở người bao gồm một vùng hằng định với allotyp tự nhiên hoặc bất kỳ sự hoán vị của các gốc chiếm các vị trí đa hình trong allotyp tự nhiên.

Một hoặc một số axit amin ở đầu amino hoặc đầu cacboxy của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng, chẳng hạn như lysin đầu C của chuỗi nặng, có thể bị thiếu hoặc bị dẫn xuất ở một phần hoặc tất cả các phân tử. Sự thay thế có thể được thực hiện trong các vùng hằng định để giảm hoặc gia tăng chức năng tác động ví dụ như độc tính trung gian bỏ thể hoặc ADCC (xem, ví dụ như, Winter et al., US

Patent No. 5,624,821; Tso et al., US Patent No. 5,834,597; and Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:4005, 2006), hoặc để kéo dài chu kỳ bán huỷ ở người (xem, ví dụ như, Hinton et al., J. Biol.Chem. 279:6213, 2004). Các sự thay thế điển hình bao gồm Gln ở vị trí 250 và/hoặc Leu ở vị trí 428 (đánh số Eu) để gia tăng chu kỳ bán huỷ của kháng thể.

Một số kháng thể theo sáng chế được thiết kế bằng cách đưa vào (các) đột biến vùng hằng định để giảm chức năng tác động, chẳng hạn như CDC và ADCC hoặc ADCP so với cùng một kháng thể không có (các) đột biến. Tốt hơn là, mỗi hoặc tất cả các chức năng tác động này đều bị giảm ít nhất 50%, 75%, 90% hoặc 95% so với các kháng thể không có đột biến. Các ví dụ hiện tại cho thấy cách đo CDC. Các xét nghiệm khác được mô tả bởi Shields et al., 2001 J. Biol.Chem., Vol. 276, p 6591-6604; Chappel et al., 1993 J. Biol. Chem., Vol 268, p 25124-25131; Lazar et al., 2006 PNAS, 103; 4005-4010.

Sự thay thế của vị trí bất kỳ hoặc tất cả các vị trí 234, 235, 236 và/hoặc 237 làm giảm ái lực đối với các thụ thể Fcγ, đặc biệt là thụ thể FcγRI (xem, ví dụ như, US 6,624,821). Alanin là gốc được ưu tiên cho sự thay thế và L234A/L235A là đột biến kép được ưu tiên để giảm chức năng tác động. Các sự kết hợp các đột biến khác có các chức năng tác động bị làm giảm đi bao gồm L234A/L235A/G237A, E233P/L234V/ L235A/G236, A327G/A330S/P331S, K322A, L234A và L235A, L234F/L235E/P331S. Tùy chọn, các vị trí 234, 236 và/hoặc 237 trong IgG2 ở người được thế với alanin và vị trí 235 với glutamin (xem, ví dụ như, US 5,624,821.). Hai sự thay thế axit amin trong liên kết bổ thể C1q xảy ra ở vị trí số EU 330 và 331 làm giảm sự cố định bổ thể (xem Tao et al., J. Exp. Med. 178:661 (1993) và Canfield and Morrison, J. Exp. Med. 173:1483 (1991)). Sự thế vào IgG1 ở người của các gốc IgG2 tại các vị trí 233 đến 236 và các gốc IgG4 tại các vị trí 327, 330 và 331 làm giảm đáng kể ADCC và CDC (xem, ví dụ như, Armour KL. et al., 1999 Eur J Immunol. 29(8):2613-24; và Shields RL. et al., 2001.J Biol Chem. 276(9):6591-604). Các đột biến N297A, N297Q, hoặc N297G (đánh số Eu) làm giảm sự glycosyl hóa và do đó làm giảm chức năng tác động.

G. Sự biểu hiện của kháng thể tái tổ hợp

Kháng thể khảm, kháng thể được nhân hóa (bao gồm kháng thể được thay thế gốc) và kháng thể ở người thường được tạo ra bằng phương pháp biểu hiện tái tổ hợp. Các cấu trúc polynucleotit tái tổ hợp thường bao gồm trình tự kiểm soát biểu hiện hoạt động liên kết với các trình tự mã hóa của các chuỗi của kháng thể, bao gồm vùng khởi động dị tương đồng hoặc vùng khởi động liên quan tự nhiên. Tốt hơn là, các trình tự kiểm soát biểu hiện là các hệ thống vùng khởi động sinh vật nhân chuẩn trong các vật truyền có khả năng biến đổi hoặc chuyển nhiễm các tế bào vật chủ sinh vật nhân chuẩn. Một khi vật truyền đã được kết hợp vào trong vật chủ thích hợp, vật chủ được bảo quản trong điều kiện thích hợp cho sự biểu hiện mức độ cao của các trình tự nucleotit, và sự thu gom và sự tinh chế của các kháng thể tái tổ hợp.

Các tế bào ở động vật có vú là vật chủ được ưu tiên để biểu hiện các đoạn nucleotit mã hóa các globulin miễn dịch hoặc các mảnh của chúng. Xem Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Một số dòng tế bào vật chủ có khả năng tiết ra các protein dị tương đồng nguyên vẹn đã được phát triển trong lĩnh vực kỹ thuật này, và bao gồm dòng tế bào CHO, các dòng tế bào COS khác nhau, các tế bào HeLa, các tế bào HEK293, các tế bào L và các tế bào u tủy không tạo ra kháng thể bao gồm Sp2/0 và NS0. Tốt hơn là, các tế bào này không ở người. Các vật truyền biểu hiện các tế bào này có thể bao gồm các trình tự kiểm soát biểu hiện, ví dụ như điểm khởi đầu sao chép, vùng khởi động, vùng tăng cường (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), và các vị trí xử lý thông tin cần thiết, ví dụ như các vị trí liên kết ribosom, các vị trí ghép ARN, các vị trí polyadenyl hóa, và các trình tự kết thúc phiên mã. Các trình tự kiểm soát biểu hiện được ưu tiên là các vùng khởi động có nguồn gốc từ các gen nội sinh, cytomegalovirus, SV40, virus adeno, virus papilloma ở bò và các loại tương tự. Xem Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

Sau khi được biểu hiện, các kháng thể có thể được tinh chế theo các quy trình tiêu chuẩn trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm tinh chế HPLC, sắc ký cột,

điện di gel và các quy trình tương tự (xem, nói chung, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)).

IV. Ứng dụng trị liệu

Các kháng thể có thể được sử dụng để tăng cường đáp ứng miễn dịch trong điều trị ung thư và các bệnh truyền nhiễm. Các rối loạn có thể điều trị bằng các kháng thể theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn, ung thư, bao gồm khối u huyết học ác tính và khối u rắn. Các loại ung thư này có thể hoặc không biểu hiện TIGIT hoặc CD155. Các kháng thể với TIGIT có hiệu quả trong chống ung thư không biểu hiện TIGIT vì sự ức chế tương tác giữa TIGIT với CD155 kích thích đáp ứng miễn dịch chống lại các bệnh ung thư như vậy. Ví dụ về bệnh huyết học ác tính bao gồm bệnh bạch cầu, u lympho và u tủy, bao gồm bệnh bạch cầu tủy cấp, bệnh bạch cầu tế bào T trưởng thành, bạch cầu hạt bạch cầu lớn tế bào T, bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, bệnh bạch cầu lympho cấp tính, bệnh bạch cầu tủy mãn tính, bệnh bạch cầu đơn nhân cấp tính, bệnh U lympho Hodgkin và không phải Hodgkin và đa u tủy. Ví dụ về khối u rắn bao gồm, không giới hạn, ung thư buồng trứng, ung thư nội mạc tử cung, ung thư vú, ung thư phổi (tế bào nhỏ hoặc không phải tế bào nhỏ), ung thư ruột kết, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư cổ tử cung, ung thư tuyến tụy, ung thư dạ dày, ung thư thực quản, ung thư biểu mô tế bào gan (ung thư gan), ung thư biểu mô tế bào thận (ung thư thận), khối u đầu và cổ, u trung biểu mô, khối u ác tính, bệnh sacom và u não (ví dụ như u thần kinh đệm, chẳng hạn như u nguyên bào đệm).

Các phương pháp của sáng chế có thể được thực hành trong điều trị hỗ trợ. “Điều trị hỗ trợ” đề cập đến một điều trị lâm sàng trong đó một đối tượng có tiền sử bệnh tăng sinh, đặc biệt là ung thư, và nói chung (nhưng không nhất thiết) đã đáp ứng với liệu pháp, bao gồm, nhưng không giới hạn, phẫu thuật, xạ trị, và/hoặc hóa trị. Tuy nhiên, do có tiền sử của bệnh tăng sinh, các đối tượng này được xem là có nguy cơ phát triển căn bệnh đó. Điều trị hoặc tiếp nhận trong “điều trị hỗ trợ” đề cập đến một phương thức điều trị tiếp theo. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất một phương pháp điều trị hoặc thực hiện dự phòng ung thư bao gồm

việc điều trị cho đối tượng bị hoặc có nguy bị ung thư bằng một lượng điều trị hiệu quả của bất kỳ kháng thể nào trong số các kháng thể nào được bộc lộ trong bản mô tả này trong điều trị bổ trợ.

Các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này cũng có thể được thực hiện trong “điều trị bổ trợ mới”, nghĩa là phương pháp này có thể được thực hiện trước liệu pháp chính/cuối cùng. Theo một số khía cạnh, đối tượng trước đó đã được điều trị. Theo các khía cạnh khác, đối tượng chưa được điều trị trước đó. Theo một số khía cạnh, việc điều trị là liệu pháp đầu tiên. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất một phương pháp để điều trị hoặc thực hiện dự phòng ung thư bao gồm việc điều trị cho đối tượng bị hoặc có nguy bị ung thư bằng một lượng điều trị hiệu quả của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này trong điều trị bổ trợ mới.

Các rối loạn khác có thể điều trị bằng các kháng thể theo sáng chế bao gồm các bệnh truyền nhiễm của vi rút, vi khuẩn, nấm, động vật nguyên sinh và các tác nhân gây bệnh khác (ví dụ như, viêm gan (A, B hoặc C), virus ecpet (ví dụ như VZV, HSV-1, HAV- 6, HSV-II, và CMV, virus Epstein Barr), virus adeno, virus cúm, virus flavi, virus echo, virus rhino, virus coxsackie, virus corno, virus đồng bộ hô hấp, virus quai bị, virus rota, virus sởi, virus rubella, virus parvo, virus vaccinia, vi rút HTLV, virus sốt xuất huyết, virus papilloma, virus molluscum, virus bại liệt, virus dại, virus JC, HIV, SIV và virus viêm não arboviral encephalitis, vi khuẩn chlamydia, vi khuẩn rickettsial, mycobacteria, tụ cầu khuẩn, treptocci, pneumonococci, meningococci và conococci, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, bạch hầu, khuẩn salmonela, trực khuẩn, bệnh tả, bệnh uốn ván, botulism, bệnh than, bệnh dịch hạch, bệnh xoắn khuẩn và vi khuẩn gây bệnh Lyme

A. Sự sử dụng các kháng thể

Các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng trong một phác đồ hiệu quả có nghĩa là liều lượng, cách thức sử dụng và tần suất tiếp nhận mà làm trì hoãn sự khởi phát, giảm mức độ nghiêm trọng, ức chế sự suy giảm thêm, và/hoặc cải thiện ít nhất một dấu hiệu hoặc triệu chứng của rối loạn. Nếu

một đối tượng đã đang phải chịu một rối loạn, phác đồ này có thể được gọi là phác đồ điều trị hiệu quả. Nếu đối tượng có nguy cơ cao về rối loạn liên quan đến quần thể nói chung nhưng chưa trải qua các triệu chứng, phác đồ này có thể được gọi là phác đồ dự phòng hiệu quả. Trong một số trường hợp, tính hiệu quả điều trị hoặc dự phòng có thể được quan sát ở đối tượng riêng liên quan đến sự kiểm soát trong lịch sử hoặc trải nghiệm quá khứ ở cùng một đối tượng. Trong các trường hợp khác, tính hiệu quả điều trị hoặc dự phòng có thể được thể hiện trong thí nghiệm tiền lâm sàng hoặc thí nghiệm lâm sàng trong một quần thể của các đối tượng được điều trị so với quần thể đối chứng của các đối tượng không được điều trị.

Theo một số khía cạnh, bất kỳ phương pháp nào được mô tả trong bản mô tả này bao gồm việc sử dụng một lượng điều trị hiệu quả của một hoặc nhiều kháng thể được mô tả trong bản mô tả này cho những đối tượng cần chúng. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "lượng điều trị hiệu quả" hoặc "liều lượng điều trị hiệu quả" của liệu pháp chống ung thư (ví dụ như của kháng thể bất kỳ kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này) là một lượng đủ để mang lại kết quả có lợi hoặc kết quả mong muốn. Đối với việc sử dụng trị liệu, các kết quả mong muốn hoặc có lợi bao gồm các kết quả lâm sàng ví dụ như việc giảm một hoặc nhiều triệu chứng của ung thư, gia tăng chất lượng cuộc sống của đối tượng mắc ung thư, giảm liều lượng các thuốc cần thiết khác để điều trị ung thư, tăng cường tác dụng của thuốc khác ví dụ thông qua việc nhắm đích, trì hoãn sự tiến triển của bệnh, và/hoặc kéo dài thời gian sống. Liều lượng hiệu quả có thể được tiếp nhận trong một hoặc nhiều lần sử dụng. Để phục vụ mục đích của sáng chế, liều lượng hiệu quả của liệu pháp chống ung thư là lượng đủ để đạt được điều trị trị liệu hoặc điều trị dự phòng trực tiếp hoặc gián tiếp. Khi được hiểu trong phạm vi lâm sàng, một liều lượng điều trị hiệu quả của liệu pháp chống ung thư có thể hoặc không đạt được khi kết hợp với một liệu pháp chống ung thư khác.

Các liều lượng điển hình đối với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được mô tả trong tài liệu này nằm trong khoảng từ 0,1 đến 20 mg/kg hoặc từ 0,5 đến 5 mg/kg trọng lượng cơ thể (ví dụ như khoảng 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg,

3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, hoặc 20 mg/kg) hoặc từ 10 đến 1500 mg (ví dụ như bất kỳ liều lượng nào dưới 10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg, 500 mg, 550 mg, 600 mg, 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg, 1000 mg, 1100 mg, 1200 mg, 1300 mg, 1400 mg hoặc 1500 mg hoặc cao hơn, bao gồm các giá trị nằm trong khoảng các số này), như một liều lượng cố định. Liều lượng phụ thuộc vào tình trạng của đối tượng và đáp ứng với việc trị liệu trước đó, nếu có, liệu việc trị liệu là dự phòng hay điều trị và liệu rối loạn là cấp tính hay mãn tính, trong số các yếu tố khác.

Thuốc điều trị có thể được tiêm, tiêm tĩnh mạch, uống, tiêm dưới da, trong động mạch, nội sọ, nội tủy mạc, tiêm ngoài màng bụng, trong khối u, tiêm cục bộ, mũi hoặc tiêm bắp. Việc sử dụng trong hệ tuần hoàn bằng cách tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da được ưu tiên. Ví dụ tiêm tĩnh mạch có thể, ví dụ, bằng cách truyền trong một khoảng thời gian ví dụ như từ 30 đến 90 phút.

Tần suất sử dụng thuốc phụ thuộc vào chu kỳ bán hủy của kháng thể trong hệ tuần hoàn, tình trạng của đối tượng và đường sử dụng, trong số các yếu tố khác. Tần suất có thể là hàng ngày, hàng tuần, hàng tháng, hàng quý hoặc theo chu kỳ bất thường để đáp ứng với những thay đổi về tình trạng của đối tượng hoặc tiến triển của rối loạn đang được điều trị. Một tần suất điển hình cho tiêm tĩnh mạch là giữa hàng tuần và hàng quý cho một nguyên nhân điều trị liên tục, mặc dù liều lượng cũng có thể nhiều hơn hoặc ít thường xuyên hơn. Đối với tiêm dưới da, tần suất dùng liều điển hình là hàng ngày cho đến hàng tháng, mặc dù liều lượng cũng có thể nhiều hơn hoặc ít thường xuyên hơn.

Số lượng liều lượng sử dụng phụ thuộc vào liệu rối loạn là cấp tính hay mãn tính và đáp ứng của rối loạn đối với việc trị liệu. Đối với các rối loạn cấp tính hoặc sự gia tăng cấp tính của các rối loạn mãn tính, thì từ 1 đến 10 liều thường là đủ. Đôi khi, một liều đơn tiêm nhanh, tùy chọn ở dạng được chia, là đủ cho một rối loạn cấp tính hoặc sự gia tăng cấp tính của một rối loạn mãn tính. Việc trị liệu

có thể được lặp lại đối với sự tái phát của rối loạn cấp tính hoặc sự gia tăng cấp tính. Đối với các rối loạn mãn tính, kháng thể có thể được sử dụng định kỳ, ví dụ, hàng tuần, hai tuần một lần, hàng tháng, hàng quý, sáu tháng một lần trong ít nhất 1 năm, 5 năm hoặc 10 năm, hoặc trong suốt cuộc đời của đối tượng.

Việc trị liệu có kháng thể kháng TIGIT có thể làm thuyên giảm bệnh bằng cách tăng tỷ lệ sống không tiến triển trung bình hoặc thời gian sống tổng thể của các đối tượng mắc ung thư lên ít nhất khoảng 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36 %, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, nhưng tốt hơn là ít nhất khoảng 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67% , 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84 %, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc thậm chí 100%, so với các đối tượng đối chứng, hoặc tăng một trong hai loại thời gian lên 2 tuần, 1, 2 hoặc 3 tháng, hoặc tốt hơn là 4 hoặc 6 tháng hoặc thậm chí 9 tháng hoặc một năm. Ngoài ra hoặc theo cách khác, việc trị liệu có kháng thể kháng TIGIT có thể tăng tỷ lệ đáp ứng hoàn toàn, tỷ lệ đáp ứng một phần, hoặc tỷ lệ đáp ứng khách quan (hoàn toàn + một phần) của các đối tượng ít nhất khoảng 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, nhưng tốt hơn là ít nhất khoảng 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65 %, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% , 99% hoặc thậm chí 100% so với các đối tượng đối chứng. Các đối tượng đối chứng tiếp nhận cùng trị liệu giống như các đối tượng nhận kháng thể kháng TIGIT ngoại trừ kháng thể kháng TIGIT. Do đó, các đối tượng đối chứng có thể chỉ nhận thuốc an thần hoặc kết hợp thuốc an thần với một số chất hóa học trị liệu trừ kháng thể kháng TIGIT nếu như chúng cũng được tiếp nhận bởi các đối tượng nhận kháng thể kháng TIGIT.

Các kháng thể kháng TIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này có thể tăng cường độc tính tế bào qua trung gian tế bào NK của các tế bào biểu hiện CD155

(ví dụ như, nhưng không giới hạn, các tế bào K562), lên khoảng 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35% hoặc cao hơn so với lượng độc tính qua trung gian tế bào NK của các tế bào biểu hiện CD155 khi vắng mặt một trong số các kháng thể kháng TIGIT được bộc lộ ở đây.

Thông thường, trong thí nghiệm lâm sàng (ví dụ như thí nghiệm giai đoạn II, giai đoạn II/III hoặc giai đoạn III), các sự gia tăng ở tỷ lệ sống sót và/hoặc tỷ lệ đáp ứng không tiến triển trung bình của các đối tượng được điều trị bằng kháng thể kháng TIGIT, so với nhóm các đối tượng đối chứng là đáng kể về mặt thống kê, ví dụ ở mức $p = 0,05$ hoặc $0,01$ hoặc thậm chí $0,001$. Các tỷ lệ đáp ứng hoàn toàn và một phần được xác định theo tiêu chí khách quan thường được sử dụng trong các thí nghiệm lâm sàng đối với ung thư, ví dụ như tiêu chí được liệt kê và chấp nhận bởi Viện Ung thư Quốc gia (National Cancer Institute) và/hoặc Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm (Food and Drug Administration) và có thể bao gồm thể tích khối u, số lượng khối u, di căn, thời gian sống sót, và chất lượng của các lĩnh vực trong cuộc sống, trong số các tiêu chí khác.

Tốt hơn là, các dược phẩm để tiêm là vô trùng và thực chất là có tính đẳng trương và được sản xuất trong điều kiện GMP. Các dược phẩm có thể được cung cấp theo dạng đơn vị liều lượng (tức là liều lượng cho mỗi lần sử dụng). Các dược phẩm có thể được tạo ra bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang dược dụng sinh lý, chất pha loãng, tá dược và chất bổ trợ. Dạng hình thành phụ thuộc vào con đường tiếp nhận được chọn. Để tiêm, kháng thể có thể được tạo ra trong dung dịch nước, tốt hơn là trong các dung dịch đệm sinh lý như dung dịch Hank, dung dịch Ringer, hoặc dung dịch muối sinh lý hoặc dung dịch đệm axetat (để giảm sự khó chịu tại vị trí tiêm). Dung dịch có thể chứa các chất tạo thành ví dụ như chất tạo huyền phù, chất ổn định và/hoặc chất phân tán. Ngoài ra, các kháng thể có thể ở dạng đông khô để cấu thành với chất mang thích hợp, ví dụ như nước không pyrogen vô trùng, trước khi sử dụng. Nồng độ kháng thể trong các công thức dạng lỏng có thể khác nhau, ví dụ từ 10 đến 150 mg/ml. Trong một số công thức, nồng độ khoảng từ 25 đến 50 mg/ml.

B. Liệu pháp kết hợp

Sáng chế đề cập đến việc sử dụng các kháng thể kháng TIGIT kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị hoạt tính (ví dụ, các chất hóa trị liệu) hoặc các phương thức điều trị hoặc dự phòng khác (ví dụ như bức xạ). Trong liệu pháp kết hợp như vậy, các tác nhân hoạt tính khác nhau thường có các cơ chế hoạt động bổ sung khác nhau. Liệu pháp kết hợp như vậy có thể đặc biệt thuận lợi bằng cách cho phép giảm liều lượng một hoặc nhiều chất, do đó làm giảm hoặc loại bỏ các tác dụng phụ của một hoặc nhiều chất. Ngoài ra, liệu pháp kết hợp như vậy có thể có tác dụng trị liệu hoặc dự phòng tổng hợp đối với bệnh, chứng rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý cơ bản.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "kết hợp" có nghĩa là bao gồm các liệu pháp có thể được sử dụng một cách độc lập, ví dụ như được tạo được phẩm một cách độc lập để sử dụng một cách độc lập (ví dụ như có thể được cung cấp trong bộ kit) và các liệu pháp có thể được sử dụng cùng nhau trong được phẩm duy nhất (tức là "đồng được phẩm").

Theo các phương án nhất định, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng TIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này được sử dụng hoặc áp dụng tuần tự, ví dụ như trong đó, một chất được sử dụng trước một hay nhiều chất khác. Theo các phương án khác, các kháng thể được sử dụng đồng thời, ví dụ như trong đó, hai hoặc nhiều kháng thể được sử dụng tại cùng hoặc khoảng cùng một thời điểm; hai hoặc nhiều chất có thể có mặt trong hai hoặc nhiều được phẩm riêng biệt hoặc kết hợp vào trong cùng một được phẩm (tức là đồng được phẩm). Bất kể liệu hai hoặc nhiều chất được sử dụng tuần tự hoặc đồng thời, chúng được coi như được sử dụng kết hợp cho các mục đích của sáng chế.

Các kháng thể của sáng chế này có thể được sử dụng kết hợp với ít nhất một chất (hoạt tính) khác theo cách thích hợp trong các trường hợp. Theo một phương án, việc trị liệu với ít nhất một hoạt chất và ít nhất một kháng thể kháng TIGIT của sáng chế này được duy trì trong một khoảng thời gian. Theo phương án khác, việc trị liệu với ít nhất một hoạt chất được giảm đi hoặc ngưng (ví dụ như khi đối tượng ổn định), trong khi trị liệu với kháng thể kháng TIGIT của sáng

chế này được duy trì theo phác đồ liều lượng không đổi. Theo phương án khác, việc trị liệu với ít nhất một hoạt chất được giảm đi hoặc ngưng (ví dụ như khi đối tượng ổn định), trong khi trị liệu với kháng thể kháng TIGIT của sáng chế này được giảm đi (ví dụ như ở liều lượng thấp hơn, tần suất ít hơn hoặc phác đồ điều trị ngắn hơn). Theo phương án khác nữa, việc trị liệu với ít nhất một hoạt chất được làm giảm hoặc ngưng (ví dụ như khi đối tượng ổn định), và trị liệu với kháng thể kháng TIGIT của sáng chế này được gia tăng (ví dụ như ở liều lượng cao hơn, tần suất nhiều hơn hoặc phác đồ điều trị dài hơn). Theo phương án khác nữa, việc trị liệu với ít nhất một hoạt chất được duy trì với trị liệu với kháng thể kháng TIGIT của sáng chế này bị giảm hoặc ngưng (ví dụ như liều lượng thấp hơn, tần suất ít hơn hoặc phác đồ điều trị ngắn hơn). Theo phương án khác nữa, việc trị liệu với ít nhất một hoạt chất với trị liệu với kháng thể kháng TIGIT của sáng chế này bị giảm hoặc ngưng (ví dụ như liều lượng thấp hơn, tần suất ít hơn hoặc phác đồ điều trị ngắn hơn).

Việc trị liệu bằng các kháng thể của sáng chế có thể được kết hợp với các phương pháp trị liệu khác có tác dụng chống lại rối loạn đang được điều trị. Khi được sử dụng trong điều trị tình trạng tăng sinh, ung thư, khối u hoặc bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng tiền ung thư, các kháng thể của sáng chế có thể được kết hợp với hóa trị, xạ trị (ví dụ như liệu pháp xạ trị cục bộ hoặc liệu pháp xạ trị toàn thân), liệu pháp tế bào gốc, phẫu thuật hoặc điều trị với các sinh phẩm khác.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các phương pháp ức chế khối u đối với sự tăng trưởng khối u bao gồm việc sử dụng các kháng thể kháng TIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này kết hợp với chất ức chế dẫn truyền tín hiệu (STI) để đạt được sự ức chế phụ hoặc tổng hợp đối với sự tăng trưởng khối u. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất ức chế dẫn truyền tín hiệu" dùng để chỉ một chất ức chế một cách có chọn lọc một hoặc nhiều công đoạn trong một con đường phát tín hiệu. Các chất ức chế dẫn truyền tín hiệu (STI) của sáng chế bao gồm: (i) chất ức chế kinaza BCR-Abl (ví dụ như imatinib mesylat (GLEEVEC)); (ii) chất ức chế thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF), bao gồm chất ức chế kinaza và kháng thể; (iii) chất ức chế thụ thể HER-2/neu (ví

dụ như HERCEPTIN); (iv) chất ức chế của kinaza họ Akt hoặc con đường Akt (ví dụ như rapamycin); (v) chất ức chế kinaza chu kỳ tế bào (ví dụ như flavopiridol); và (vi) chất ức chế photphatidyl inositol kinaza. Các chất liên quan đến sự điều chỉnh miễn dịch cũng có thể được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng TIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này đối với sự ức chế phát triển khối u ở bệnh nhân ung thư.

Các ví dụ về các chất hóa trị liệu bao gồm, nhưng không giới hạn, trong số các chất ankyl hóa như tiotepa và cyclophotphamit; ankyl sunphonat như busunphan, improsunphan và piposunphan; aziridin như benzodopa, cacboquone, meturedopa, và uredopa; etylenimin và metylamelamin bao gồm altretamin, trietylenmelamin, trietylenphotphoramit, trietylentiotphotphaoramit và trimetylolomelamin; các loại mù tạt nitơ như chiorambuxil, clornaphazin, cholophotphamit, etramutin, ifofamide, mecloretamin, mecloretamin oxit hydroclorua, menphalan, novembichin, pheneterin, prednimutin, trophophamit, mù tạt uraxin; nitrosurea như cacmutine, clorozotoxin, fotemutin, lomutine, nimutine, ranimutine; thuốc kháng sinh như aclacinomyxin, actinomyxin, authramyxin, azaserin, bleomyxin, cactinomyxin, calicheamixin, carabixin, caminomyxin, carzinophilin, cromyxin, dactinomyxin, daunorubixin, detorubixin, 6-diazo-5-oxo-L-noleuxin, doxorubixin, epirubixin, esorubixin, idarubixin, macellomyxin, mitomyxin, axit mycophenolic, nogalamyxin, olivomyxin, peplomyxin, potfiromyxin, puromyxin, quelamyxin, rodorubixin, streptonigrin, streptozoxin, tubecidin, ubenimex, zinostatin, zorubixin; các chất chống chuyển hóa như methotrexate và 5-fluorouraxin (5-FU); các chất tương tự axit pholic như denopterin, methotrexat, pteropterin, trimetrexat; các chất tương tự purin như fludarabin, 6-mecaptopurin, thiamiprin, thioguanin; tương tự pyrimidin như ancitabin, azacitidin, 6-azauridin, cacmophua, cytarabin, dideoxyuridin, doxifluridin, enocitabin, floxuridin, 5-FU; andro như caluteron, dromotanolon propionat, epitioctanol, mepitiotan, testolactone; chất kháng thượng thận như aminoglutetimit, mitotan, trilostan; chất bổ sung axit pholic như axit phrolinic; aceglaton; andophotphamit glycoxit; axit aminolevulinic;

amsacrin; betrabuxin; bixantren; edatraxat; dephophamin; demecolxin; diaziquone; elformitin; elliptinium axetat; etoglucit; gallium nitrat; hydroxyure; lentinan; lonidamin; mitoguazon; mitoxantron; mopidamol; nitracrin; pentostatin; phenamet; pirarubicin; axit podophyllinic; 2-etylhydrazit; procarbazin; razoxan; sizofiran; spirogermanium; axit tenuazonic; triaziquone; 2,2',2"-riclorotrietylamin; uretan; vindesin; dacacbazin; mannomutine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytoxine; arabinosit (Ara-C); cyclophosphamid; thiotepa; toxoid (ví dụ như taxane), ví dụ như paclitaxel, taxol và doxetaxel; clorambuxin; gemxitabin; 6-thioguanin; mecaptopurin; methotrexat; bạch kim và phức hợp kết hợp bạch kim như cisplatin và carboplatin; vinblastin; etoposide (VP-16); ifosfamid; mitomycin C; mitoxantron; vincristin; vinorelbin; navenbin; novantron; teniposit; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronat; CPT11; chất ức chế topoisomeraza; camptothecins, difluoromethylornitin (DMFO); axit retinoic; etperamixin; capexitabin; các chất chống chuyển hóa (ví dụ như azathioprin); thuốc chống u bướu; alkaloid thực vật (bao gồm, ví dụ như vinca alkaloids); và các muối được dùng, axit được dùng hoặc các dẫn xuất chất bất kỳ nêu trên.

Các chất hóa trị liệu cũng bao gồm các chất kháng hormone mà chúng hoạt động để điều chỉnh hoặc ức chế hoạt động của hormone trên các khối u như kháng estrogen, bao gồm tamoxifen, raloxifene, aromatase ức chế 4(5)-imidazol, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, onapriton, và toremifen; và antiandro như flutamid, nilutamit, bicalutamit, leuprolide và goserelin; và các muối, axit được dùng hoặc dẫn xuất của chất bất kỳ nêu trên. Theo các phương án nhất định, liệu pháp kết hợp bao gồm việc sử dụng hormone hoặc chất hormone liên quan.

Các phương thức điều trị bổ sung có thể được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng TIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm xạ trị, kháng thể đơn dòng chống lại kháng nguyên khối u, phức hợp kháng thể đơn dòng và độc tố, tá được tế bào T, cấy tủy xương, hoặc tế bào trình diện kháng nguyên (ví dụ như liệu pháp tế bào tua) hoặc liệu pháp tế bào-tế bào. Thuật ngữ "liệu pháp tế bào" như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến liệu pháp bất kỳ trong đó bao gồm

sự đưa vào các tế bào với mục đích nhằm đạt được hiệu quả điều trị mong muốn, ví dụ như để sửa chữa quần thể tế bào trưởng thành bị tổn thương hoặc hoàn toàn/đầy đủ hoặc các mô hoặc để tăng cường đáp ứng miễn dịch chống lại một tác nhân gây bệnh hoặc tế bào tăng sinh (như tế bào ung thư). Theo các phương án khác, liệu pháp tế bào bao gồm việc đưa tế bào không biệt hóa (như tế bào gốc hoặc tế bào toàn năng hoặc tế bào đa năng khác) có khả năng biệt hóa vào một loại tế bào cụ thể cần thiết để đạt được hiệu quả điều trị mong muốn, ví dụ như để sửa chữa quần thể tế bào trưởng thành bị tổn thương hoặc hoàn toàn hoặc các mô hoặc để tăng cường đáp ứng miễn dịch chống lại một tác nhân gây bệnh hoặc tế bào tăng sinh (như tế bào ung thư). Theo một số phương án, các kháng thể của sáng chế cũng có thể được sử dụng với các tế bào T xâm nhập khối u hoặc với các tế bào tiêu diệt tự nhiên, chúng có thể được mở rộng hoặc được chọn tùy ý để điều chỉnh đối với khối u ex vivo. Kháng thể của sáng chế góp phần vào sự hoạt hóa các tế bào này.

Một sự kết hợp được ưu tiên là kháng thể của sáng chế với kháng thể thứ cấp định hướng vào kháng nguyên bề mặt được ưu tiên biểu hiện trên các tế bào ung thư liên quan đến mô kiểm soát bình thường. Một số ví dụ về kháng thể có thể được sử dụng trong liệu pháp kết hợp với kháng thể của sáng chế để điều trị ung thư bao gồm Herceptin® (trastuzumab) chống lại kháng nguyên HER2, Avastin® (bevacizumab) chống lại VEGF, hoặc kháng thể đối với thụ thể EGF, chẳng hạn như (Erbix®), cetuximab) và Vectibix® (panitumumab). Các chất khác có thể được sử dụng bao gồm kháng thể hoặc chất ức chế khác của bất kỳ trong số PD-1, PD-L1, CTLA-4, 4-1BB, BTLA, VISTA, TIM-3 và LAG-3; hoặc các chất ức chế phát tín hiệu cùng hướng khác, ví dụ như các chất ức chế mTOR và GSK3β; và các xytokin, ví dụ như interferon-γ, IL-2 và IL-15. Một số ví dụ cụ thể về các chất bổ sung bao gồm: ipilimumab, pazopanib, sunitinib, dasatinib, pembrolizumab, INCR024360, dabrafenib, trametinib, atezolizumab (MPDL3280A), tarceva, cobimetinib và nivolumab. Việc lựa chọn kháng thể thứ cấp hoặc chất khác cho liệu pháp kết hợp phụ thuộc vào bệnh ung thư đang được điều trị. Tùy chọn, bệnh ung thư được thí nghiệm đối với biểu hiện hoặc biểu hiện

ưu tiên của kháng nguyên để định hướng lựa chọn kháng thể thích hợp. Tốt hơn là, isotyp của kháng thể thứ cấp là IgG1 ở người để thúc đẩy các chức năng tác động, như ADCC, CDC và thực bào.

Kháng thể của sáng chế cũng có thể được sử dụng với vacxin tạo ra đáp ứng miễn dịch chống ung thư. Đáp ứng miễn dịch này được tăng cường bởi kháng thể của sáng chế. Vacxin có thể bao gồm kháng nguyên được biểu hiện trên bề mặt của tế bào ung thư của mảnh của chúng có tác dụng tạo ra đáp ứng miễn dịch, tùy chọn liên kết với một phân tử mang.

Sáng chế đề cập đến việc sử dụng các kháng thể kháng TIGIT được mô tả trong bản mô tả này kết hợp với các chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch.

Số lượng rất lớn các thay đổi về di truyền và ngoại di truyền là đặc trưng của các loại ung thư mang đến tập hợp kháng nguyên đa dạng mà hệ miễn dịch có thể sử dụng để phân biệt tế bào khối u với các tế bào thông thường. Trong trường hợp của tế bào T, biên độ lớn nhất (ví dụ như mức độ tạo ra xytokin hoặc sự tăng sinh xytokin) và chất lượng (ví dụ như loại đáp ứng miễn dịch được tạo ra, ví dụ như mô hình tạo ra xytokin) của đáp ứng, được bắt đầu thông qua việc nhận dạng kháng nguyên bởi thụ thể tế bào T (TCR), được điều chỉnh bởi sự cân bằng giữa tín hiệu đồng kích thích và tín hiệu ức chế (điểm kiểm soát miễn dịch). Trong điều kiện sinh lý bình thường, điểm kiểm soát miễn dịch là quan trọng để ngăn chặn tính tự miễn dịch (tức là sự duy trì sự tự dung nạp) và cũng để bảo vệ các mô khỏi tổn thương khi hệ miễn dịch phản ứng với sự lây nhiễm tác nhân gây bệnh. Biểu hiện của protein điểm kiểm soát miễn dịch có thể bị rối loạn bởi khối u như một cơ chế kháng miễn dịch quan trọng.

Ví dụ về các điểm kiểm tra miễn dịch (phối tử và thụ thể), một số trong đó được điều chỉnh gia tăng một cách chọn lọc trong các loại tế bào khối u khác nhau, là các ứng cử viên cho sự ngăn chặn bao gồm PD-1 (protein xúc tiến sự chết tế bào theo chương trình 1); PD-L1 (phối tử-1 xúc tiến sự chết tế bào theo chương trình); BTLA (vùng suy giảm lympho B và lympho T); CTLA-4 (kháng nguyên tế bào lympho T gây độc 4); TIM-3 (protein màng tế bào T 3); LAG-3 (gen hoạt hóa lympho 3); gen ức chế globulin miễn dịch miền V của sự hoạt hóa tế bào T

(VISTA); CD96; A2aR (thụ thể adenosin A2a); A2bR (thụ thể adenosin A2b); CD73 (ecto-5'-nucleotidaza); CD39 (ENTPD1, NTPDase1); Arginase; indoleamine-pyrol 2,3-dioxygenase (IDO); tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO); và các thụ thể ức chế tế bào tiêu diệt tự nhiên, chúng có thể chia thành hai nhóm dựa trên đặc điểm cấu trúc của chúng: i) thụ thể tế bào tiêu diệt giống globulin miễn dịch (KIR), và ii) thụ thể lectin loại C (thành viên của họ thụ thể xuyên màng loại II). Các điểm kiểm soát miễn dịch khác ít được xác định rõ hơn đã được mô tả trong tài liệu, bao gồm cả các thụ thể (ví dụ như thụ thể 2B4 (cũng được biết như CD244)) lẫn các phối tử (ví dụ như phối tử ức chế họ B7 ví dụ như B7-H3 (cũng được biết như CD276) và B7-H4 (cũng được biết như B7-S1, B7x và VCTN1)). Xem Pardoll, (April 2012) *Nature Rev. Cancer* 12:252-64.

Sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng TIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này kết hợp với các chất ức chế và các phối tử của các thụ thể điểm kiểm soát miễn dịch và nêu trên, cũng như các thụ thể và các phối tử điểm kiểm soát miễn dịch chưa được mô tả. Các tác nhân điều khiển điểm kiểm soát miễn dịch đang có sẵn, trong khi các tác nhân điều khiển khác đang trong giai đoạn phát triển cuối. Để minh họa, khi được chấp thuận để điều trị u ác tính vào năm 2011, kháng thể đơn dòng CTLA-4 được nhân hóa hoàn toàn ipilimumab (YERVOY; Bristol-Myers Squibb) trở thành chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch đầu tiên nhận được sự phê duyệt theo quy định tại Hoa Kỳ. Các protein dung hợp bao gồm CTLA-4 và một kháng thể (CTLA-4-Ig; abatacept (ORENCIA; Bristol-Myers Squibb)) đã được sử dụng để điều trị viêm khớp dạng thấp, và các protein dung hợp khác đã được chứng minh là có hiệu quả ở các bệnh nhân ghép thận nhạy cảm với virus Epstein Barr. Kháng thể kháng PD-1 đang được phát triển (ví dụ như nivolumab (Bristol-Myers Squibb) và pembrolizumab (lambrolizumab) (Merck)), và kháng thể kháng PD-L1 cũng đang được đánh giá (ví dụ như MPDL3280A (Roche)). Nivolumab và pembrolizumab đã cho thấy tiềm năng ở những bệnh nhân bị u ác tính, ung thư phổi và thận.

Các liệu pháp kết hợp tương tự có thể được sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh truyền nhiễm, chẳng hạn như các bệnh, rối loạn và tình trạng, do vi-

rút, vi khuẩn, nấm và ký sinh trùng, cũng như các rối loạn liên quan. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể được kết hợp với kháng thể được định hướng chống lại tác nhân gây bệnh hoặc vaccin chống lại tác nhân gây bệnh như palivizumab chống lại virus rous sacom. Vaccin này có thể là một protein của tác nhân gây bệnh hoặc mảnh của nó có tác dụng tạo ra đáp ứng miễn dịch. Kháng thể theo sáng chế tăng cường đáp ứng miễn dịch của kháng thể hoặc vaccin được định hướng chống lại tác nhân gây bệnh. Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được dùng với tế bào T hoặc tế bào tiêu diệt tự nhiên được mở rộng ex vivo.

Liệu pháp kết hợp này bao gồm các tác nhân chống virus nhắm đích vào các giai đoạn khác nhau trong vòng đời virus và có các cơ chế tác động khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn, các chất sau: các chất ức chế sự cởi vỏ của virus (ví dụ: amantadin và rimantidin); các chất ức chế enzym phiên mã ngược (ví dụ, acyclovir, zidovudine và lamivudine); các chất nhắm đích integrase; các chất ngăn chặn sự gắn kết của các yếu tố phiên mã với ADN của virus; các chất (ví dụ như các phân tử antisense) tác động đến sự dịch mã (ví dụ như fomivirsen); các tác nhân điều khiển chức năng dịch mã/ribozym; chất ức chế protease; tác nhân điều khiển tổng hợp virus (ví dụ như rifampicin); thuốc kháng virus retro chẳng hạn như các chất ức chế enzym phiên mã ngược tương tự nucleoside (ví dụ azidothymidin (AZT), ddI, ddC, 3TC, d4T); các chất ức chế enzym phiên mã ngược không tương tự nucleoside ví dụ như efavirenz, nevirapin); các chất ức chế enzym phiên mã ngược không tương tự nucleotit; và các chất ngăn chặn việc giải phóng các hạt virus (ví dụ như zanamivir and oseltamivir). Việc điều trị và/hoặc ngăn chặn lây nhiễm virus nhất định (ví dụ như HIV) thường đòi hỏi một nhóm ("cocktail") của các chất chống virus.

Các tác nhân chống virus khác được dự tính sử dụng kết hợp với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng TIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không giới hạn, trong số: abacavi, adefovi, amantadin, amprenavi, ampligen, arbidol, atazanavir, atripla, boceprevirertet, cidofovi, combivi, darunavi, delavidine, didanosin, docosanol, edoxudin, emtrixitabin, enfuvirtide, entecavir, famciclovi, fosamprenavi, foscarnet, fosfonet, ganciclovi, ibacitabin,

imunovi, idoxuridin, imiquimod, indinavi, inosin, các interferon (ví dụ như peginterferon alpha-2a), lopinavi, loviride, maraviroc, moroxydin, methisazon, nelfinavi, nexavi, penciclovi, peramivi, pleconaril, podophillotoxin, raltegravi, ribavirin, ritonavi, pyrimidin, saquinavi, stavudin, telaprevi, tenofovi, tipranavi, trifluridin, trizivi, tromantadin, truvada, valaciclovi, valganciclovi, vicriviroc, vidarabin, viramidin, và zalcitabin.

Sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng TIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này kết hợp với các chất diệt ký sinh trùng. Các chất như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn, trong số tiabendazole, pyrantel pamoate, mebendazole, praziquantel, niclosamide, bithionol, oxamniquine, metrifonate, ivermectin, albendazol, eflornithin, melasoprol, pentamidin, benznidazole, nifutimox và nitroimidazol. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã chú ý đến các chất khác mà chúng có thể có ích đối với việc điều trị các rối loạn do ký sinh trùng.

Các phương án của sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng TIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này kết hợp với các chất có ích trong việc điều trị hoặc ngăn chặn rối loạn do vi khuẩn. Các chất kháng khuẩn có thể được phân loại theo nhiều cách, bao gồm dựa vào cơ chế hoạt động, dựa vào cấu trúc hóa học, và dựa vào hoạt phổ. Ví dụ về các chất kháng khuẩn này bao gồm các chất nhắm đích thành tế bào vi khuẩn (ví dụ như cephalosporin và penicilin) hoặc màng tế bào (ví dụ như polymyxin), hoặc can thiệp vào các enzym vi khuẩn thiết yếu (ví dụ như sulfonamid, rifamycin và quinoline. Hầu hết các chất kháng khuẩn mà nhắm đích đến sự tổng hợp protein (ví dụ như tetracyclin và macrolide) thì có tính kìm khuẩn, trong khi các chất như aminoglycoside có tính diệt khuẩn. Phương thức phân loại chất kháng khuẩn khác được dựa vào tính đặc hiệu đích của chúng, các chất có "phổ hẹp" nhắm đích các loại vi khuẩn đặc trưng (ví dụ như vi khuẩn gram dương như Streptococcus), trong khi các chất có "phổ rộng" có hoạt tính chống lại phạm vi vi khuẩn rộng hơn. Các chuyên gia trong lĩnh vực đã chú ý đến các loại chất chống vi khuẩn thích hợp để sử dụng trong các bệnh nhiễm khuẩn cụ thể.

Các phương án theo sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng TIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này kết hợp với các chất có tác dụng trong việc điều trị hoặc ngăn chặn các rối loạn do nấm. Các tác nhân trị nấm bao gồm polyen (ví dụ như amphotericin, nystatin, và pimaricin); azole (ví dụ như fluconazole, itraconazole, và ketoconazole); allylamin (ví dụ như naftifine, và terbinafine) và morpholine (ví dụ như amorolfine); và antimetaboly (ví dụ như 5-fluorocytosine)

Sáng chế bao gồm các muối, axit được dụng hoặc dẫn xuất của các chất (và các thành viên của các nhóm chất) nêu trên.

Các kháng thể kháng TIGIT có thể được kết hợp với kháng thể hoặc chất thứ hai bất kỳ trong số các kháng thể hoặc chất thứ hai được mô tả để sử dụng trong các liệu pháp kết hợp làm thành phần của một dược phẩm. Trong một dược phẩm, các chất có thể được kết hợp với một hoặc nhiều chất mang được dụng đã được mô tả.

V. Các ứng dụng khác

Các kháng thể kháng TIGIT có thể được sử dụng để phát hiện TIGIT khi chẩn đoán hoặc điều trị lâm sàng hoặc trong nghiên cứu. Ví dụ, các kháng thể có thể được sử dụng để phát hiện sự hiện diện của TIGIT trên các tế bào T, các tế bào tiêu diệt tự nhiên và các tế bào ung thư như một dấu hiệu cho thấy đối tượng đang mắc bệnh ung thư hoặc bệnh truyền nhiễm có thể được điều trị. Biểu hiện của TIGIT trên tế bào T, tế bào tiêu diệt tự nhiên và/hoặc tế bào ung thư của đối tượng mắc ung thư hoặc bệnh truyền nhiễm cũng đưa ra dấu hiệu về ung thư hoặc bệnh truyền nhiễm có thể được điều trị bằng kháng thể theo sáng chế. Các kháng thể cũng có thể được bán như thuốc thử cho nghiên cứu trong phòng thí nghiệm trong việc phát hiện tế bào T, tế bào tiêu diệt tự nhiên và tế bào ung thư, và phản ứng của chúng với các kích thích khác nhau. Trong các ứng dụng như vậy, các kháng thể đơn dòng có thể được dán nhãn bằng các phân tử huỳnh quang, các phân tử có nhãn xoay, enzym hoặc đồng vị phóng xạ, và có thể được cung cấp dưới dạng bộ kit với tất cả các thuốc thử cần thiết để thực hiện thí nghiệm đối với

TIGIT. Các kháng thể cũng có thể được sử dụng để tinh chế TIGIT, ví dụ như bằng sắc ký ái lực.

VI. Kit

Các kháng thể kháng TIGIT có thể được kết hợp với bất kỳ kháng thể hoặc tác nhân thứ hai trong số các kháng thể hoặc tác nhân đã được mô tả để sử dụng trong các liệu pháp kết hợp làm các thành phần của kit. Sáng chế được bộc lộ trong bản mô tả này đề xuất một hoặc nhiều kit chứa một hoặc nhiều kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này cũng như một hoặc nhiều tá dược hoặc chất mang được dụng (ví dụ như, không giới hạn, dung dịch nước muối đệm photphat, nước, nước vô trùng, polyetylen glycol, polyvinyl pyrrolidone, lecithin, dầu arachis, dầu vừng, nhũ tương chẳng hạn như nhũ tương dầu/nước hoặc nhũ tương nước/dầu, vi nhũ tương, vật liệu nano và các loại chất làm ướt khác). Các chất phụ gia như rượu, dầu, glycol, chất bảo quản, chất tạo hương, chất tạo màu, chất gây treo và các chất tương tự cũng có thể được bao gồm trong các kit theo sáng chế cùng với chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược. Theo một phương án, chất mang được dụng thích hợp để sử dụng trong các chế phẩm kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này là vô trùng, không có tác nhân gây bệnh và/hoặc an toàn đối với việc sử dụng cho đối tượng mà không có nguy cơ về lây nhiễm và các tác dụng phụ bất lợi có liên quan khác. Trong kit, các chất tương ứng có thể được cung cấp trong các lọ riêng biệt với các hướng dẫn về sự kết hợp cùng với việc sử dụng hoặc hướng dẫn cho việc sử dụng riêng biệt. Kit cũng có thể bao gồm các hướng dẫn bằng văn bản để sử dụng và lưu trữ đúng cách đối với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng TIGIT được bộc lộ trong bản mô tả này.

Dự định rằng mọi giới hạn số liệu tối đa được đưa ra trong suốt bản mô tả này bao gồm mọi giới hạn số liệu thấp hơn, như thể những giới hạn số liệu thấp hơn này đã được trình bày rõ ràng trong bản mô tả này. Mọi giới hạn số liệu tối thiểu được đưa ra trong suốt bản mô tả này sẽ bao gồm mọi giới hạn số liệu cao hơn như thể những giới hạn số liệu cao hơn như vậy được trình bày rõ ràng trong bản mô tả này. Mọi phạm vi số liệu được đưa ra trong suốt bản mô tả này sẽ bao

gồm mọi phạm vi số liệu hẹp hơn nằm trong phạm vi số liệu rộng hơn, như thể các phạm vi số liệu hẹp hơn như vậy đã được trình bày rõ ràng trong bản mô tả này.

Tất cả các hồ sơ sáng chế, trang web, công bố khác, mã số truy cập và những thứ tương tự được trích dẫn ở trên hoặc dưới đây được kết hợp qua dẫn chiếu toàn bộ cho tất cả mục đích ở các mức độ tương tự như thể mỗi mục trên được chỉ rõ một cách cụ thể và riêng biệt để kết hợp qua dẫn chiếu. Nếu các phiên bản khác nhau của một trình tự được đính kèm với một mã số truy cập trong các thời điểm khác nhau, phiên bản có mã số truy cập vào ngày nộp có hiệu lực của đơn này được sử dụng. Ngày nộp đơn có hiệu lực có nghĩa là ngày nộp đơn thực tế trước đó hoặc ngày nộp đơn hưởng quyền ưu tiên đề cập đến mã số truy cập nếu có. Tương tự, nếu các phiên bản khác của công bố, trang web hoặc các thứ tương tự được công bố ở thời điểm khác nhau, phiên bản công bố gần đây nhất tại ngày nộp đơn được sử dụng trừ khi được quy định khác. Bất kỳ đặc điểm, bước, yếu tố, phương án hoặc khía cạnh theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với nhau trừ khi được quy định cụ thể khác.

Mặc dù sáng chế được mô tả chi tiết bằng cách minh họa và ví dụ để nhằm mục đích làm rõ và hiểu rõ, nhưng rõ ràng rằng các thay đổi và sửa đổi nhất định có thể được thực hiện trong phạm vi của các yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây bàn luận về việc tạo ra, xác định đặc điểm, và sự nhân hóa các kháng thể đơn dòng kháng TIGIT ở người và cũng đưa ra các phương pháp điển hình mà nhờ đó các đặc tính liên kết, qua đó các kháng thể được mô tả trong đơn này có thể được xác định.

Ví dụ 1: Sự biểu hiện của protein TIGIT tái tổ hợp ở người

Việc tạo dòng gen, tạo đột biến và tạo cấu trúc plasmit trong ví dụ này đã được thực hiện với các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn ví dụ như các kỹ thuật được mô tả trong Sambrook and Russel (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,

NY), Kostelny et al. (Int. J. Cancer 93:556-565, 2001) and Cole và cộng sự.(J. Immunol.159:3613-3621, 1997).

Vật truyền biểu hiện của động vật có vú pFCm404 (Hình 1) để tạo ra vùng ngoại bào của TIGIT ở người được hợp nhất với vùng Fc của chuỗi globulin miễn dịch $\gamma 1$ ở người (hTIGIT-Fc; SEQ ID NO:59) chứa thành phần di truyền tiếp theo. Tiến hành theo chiều kim đồng hồ từ vị trí SalI của pFCm404 trong Hình. 1, plasmit chứa đơn vị phiên mã cho hTIGIT-Fc bắt đầu với vùng khởi động sớm trực tiếp chính của cytomegalovirus (CMV) ở người và vùng tăng cường (CMV-P trong Hình. 1). Vùng khởi động CMV được theo sau bởi các vùng mã hóa của peptit tín hiệu (sp; SEQ ID NO:2), vùng ngoại bào của TIGIT ở người (hTIGIT; SEQ ID NO:3), tác nhân liên kết polypeptit (SEQ ID NO:4) và vùng $\gamma 1$ Fc ở người (SEQ ID NO:5), và sau đó bởi vị trí polyadenyl hóa của gen chuỗi nặng $\gamma 1$ ở người. Gen hTIGIT-Fc được theo sau bởi vùng khởi động sớm SV40 (SV40-P), gen puromycin N-acetyl-transferaza (puro) cho khả năng kháng puromycin, và mảnh chứa vị trí polyadenyl hóa SV40 (SV40-A). Cuối cùng, pFCm404 chứa một phần của plasmit pUC19, bao gồm điểm mở đầu sao chép vi khuẩn (pUC ori) và gen β lactamaza (β lactamaza). Các mũi tên trong hình thể hiện hướng phiên mã. Các vị trí enzyme giới hạn có liên quan được chỉ ra trong hình.

Vùng mã hóa của vùng ngoại bào TIGIT ở người trong pFCm404 được thay thế bằng đoạn ADN mã hóa vùng ngoại bào của CD155 ở người (hCD155; SEQ ID NO:6), dẫn đến việc tạo ra vật truyền biểu hiện mới pFCm406 (Hình. 1). Vùng ngoại bào của CD155 ở người được hợp nhất với vùng $\gamma 1$ Fc ở người (hCD155-Fc; SEQ ID NO:7) được biểu hiện từ pFCm406.

Vùng mã hóa của vùng $\gamma 1$ Fc giữa các vị trí AgeI và EagI trong pFCm404 được thay thế bằng đoạn ADN mã hóa peptit FLAG (FLAG; SEQ ID: 8) theo sau là tín hiệu liên kết glycosylphosphatidylinositol của CD55 ở người (GPI; SEQ ID: 9), dẫn đến việc tạo ra vật truyền biểu hiện mới pFCm407 (Hình. 1). Vùng ngoại bào của TIGIT ở người hợp nhất với FLAG và GPI (hTIGIT-GPI) mã hóa pFCm406 được thể hiện trên bề mặt tế bào.

Để thu được các dòng tế bào ổn định tạo ra hTIGIT-Fc và hCD155-Fc trong dịch nuôi cấy, vật truyền biểu hiện pFCm404 và pFCm406 lần lượt được đưa vào nhiễm sắc thể của dòng tế bào u tủy ở chuột NS0 (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, UK). Tế bào NS0 được nuôi trong môi trường DME chứa 10% huyết thanh bò thai nhi (FBS) ở 37°C trong một tủ ủ CO₂ 7,5%. Sự chuyển nạp ổn định vào NS0 được thực hiện bằng phương pháp mở lỗ bằng điện như mô tả trong Bebbington et al. (Bio/Technology 10: 169-175, 1992). Trước khi chuyển nạp, các vật truyền biểu hiện được tuyến tính hóa bằng cách sử dụng FspI. Khoảng 10⁷ tế bào được chuyển nạp với 10 µg plasmid được tuyến tính hóa, được gây treo trong môi trường DME chứa 10% FBS, và được cấy vào nhiều đĩa 96 giếng. Sau 24 giờ, các môi trường chọn lọc (môi trường DME chứa 10% FBS và 3 µg/ml puromycin) đã được sử dụng. Khoảng 10 ngày sau khi bắt đầu lựa chọn, dịch nuôi cấy được thí nghiệm để tạo ra các protein dung hợp Fc bằng ELISA bằng cách sử dụng kháng thể chuỗi gamma kháng-người ở dê để phủ và dùng chuỗi gamma kháng-người ở dê liên hợp HRP để phát hiện các protein dung hợp Fc.

Tế bào chuyển nhiễm ổn định NS0 tạo ra một lượng lớn các protein dung hợp Fc đã được thích nghi và mở rộng trong các môi trường Hybridoma-SFM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), và phát triển hết mức trong chai lắc. Sau khi ly tâm và lọc, dịch nuôi cấy được nạp vào trong cột protein-A Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Cột này được rửa bằng nước muối đệm phosphat (PBS) trước khi các protein dung hợp Fc được tách rửa với glyxin-HCL 0,1 M (pH 3,0). Sau khi trung hòa với Tris-HCl 1 M (pH 8), dung dịch đệm của các protein dung hợp Fc đã được tách rửa được chuyển thành PBS bằng phương pháp thẩm tích.

Để có được các dòng tế bào biểu hiện hTIGIT-GPI trên bề mặt, vật truyền biểu hiện pFCm407 được chuyển nhiễm ổn định vào các tế bào NS0. Biểu hiện của hTIGIT-GPI trên bề mặt tế bào được theo dõi bằng cách đếm tế bào theo dòng sử dụng kháng thể đơn dòng kháng FLAG chuột và kháng thể IgG kháng-chuột ở dê được gắn nhãn PE, kháng thể đặc hiệu Fc. Các dòng tế bào NS0 biểu hiện mức

độ cao của hTIGIT-GPI trên bề mặt tế bào (NS0-hTIGIT) đã được sử dụng để sàng lọc kháng thể kháng TIGIT.

Ví dụ 2: Tạo ra và xác định đặc điểm các kháng thể đơn dòng kháng TIGIT

Các tế bào lai ở chuột tạo ra kháng thể đơn dòng kháng TIGIT ở người được tạo ra tại JN Biosciences (Mountain View, CA) theo các kỹ thuật tế bào lai tiêu chuẩn như GenomONE CF EX Cell Fusion Reagent (Cosmo Bio, Carlsbad, CA). Khi các kháng nguyên, các protein dung hợp TIGIT-Fc ở người và các tế bào NS0-hTIGIT đã được sử dụng.

Các kháng thể chuột được tiết ra trong dịch nuôi cấy của các tế bào lai đã phải trải qua một loạt các sàng lọc xác định các kháng thể với các đặc tính sau: (1) liên kết với protein dung hợp hTIGIT-Fc được tinh chế, (2) liên kết với các tế bào NS0-hTIGIT, (3) không liên kết với các tế bào NS0, (4) liên kết với các tế bào T CD3⁺ có nguồn gốc từ các tế bào đơn nhân máu ngoại biên ở người được xử lý bằng phytohemagglutinin và (5) ngăn chặn sự liên kết của protein dung hợp hCD155-Fc với các tế bào NS0-hTIGIT. Đặc tính đầu tiên liên kết với hTIGIT-Fc đã được thí nghiệm bằng ELISA bằng cách sử dụng các kháng thể dê liên hợp HRP chống lại các chuỗi nhẹ kappa và lambda ở chuột (SouthernBiotech, Birmingham, AL) để xác định kháng thể kháng TIGIT ở chuột. Các đặc tính thứ hai, thứ ba và thứ tư được thí nghiệm bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy, bằng cách sử dụng kháng thể chuỗi gamma kháng-chuột ở dê được gắn nhãn PE (SouthernBiotech) để phát hiện các kháng thể liên kết tế bào ở chuột. Đặc tính thứ năm được phân tích bằng cách đếm dòng tế bào theo dòng chảy như mô tả dưới đây. Ba kháng thể đơn dòng ở chuột (TIG1, TIG2 và TIG3) được phát hiện rằng sở hữu tất cả năm đặc tính này. Các kháng thể đơn dòng TIG1, TIG2 và TIG3 được tinh chế từ dịch nuôi cấy của các tế bào lai bằng sắc ký cột protein A như được mô tả ở trên. Các isotyp của TIG1, TIG2 và TIG3 là IgG2b/kappa, IgG2a/kappa và IgG2a/kappa ở chuột, tương ứng.

Hoạt tính của TIG1, TIG2 và TIG3 để ngăn chặn sự tương tác giữa TIGIT và CD155 được phân tích bằng cách đếm tế bào theo dòng chảy. Các tế bào NS0-hTIGIT được ủ với nồng độ dưới mức bão hòa của hCD155-Fc có mặt (hoặc

không có mặt) của các nồng độ khác nhau của kháng thể đơn dòng kháng TIGIT làm đối thủ cạnh tranh. Việc phát hiện hCD155-Fc liên kết với các tế bào NS0-hTIGIT được thực hiện với IgG kháng-người ở dê được gắn nhãn DyLight488, kháng thể đặc hiệu Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Như được thể hiện trong Hình. 2, TIG1, TIG2 và TIG3 ức chế sự liên kết của hCD155-Fc với tế bào NS0-hTIGIT phụ thuộc vào liều lượng. Nồng độ ức chế tối đa một nửa (IC50) để ngăn chặn sự tương tác giữa các tế bào hCD155-Fc và NS0-hTIGIT là 49 ng/ml đối với TIG1, 197 ng/ml đối với TIG2 và 460 ng/ml đối với TIG3. Nồng độ kháng thể cần thiết để ngăn chặn hơn 95% sự liên kết của CD155 với TIGIT là 0,63 µg/ml đối với TIG1, 1,25 µg/ml đối với TIG2 và 2,5 µg/ml đối với TIG3. Ví dụ 3: Trình tự gen V của kháng thể đơn dòng kháng TIGIT

Việc xác định các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (VH và VL, tương ứng) của kháng thể kháng TIGIT ở chuột được thực hiện theo các quy trình được mô tả trong Tsurushita et al. (Methods 36:69-83, 2005). Toàn bộ ARN được chiết xuất từ khoảng 10^7 tế bào sử dụng thuốc thử TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) theo quy chuẩn của nhà cung cấp. Oligo dT-primed cADN cho 5'-RACE được tổng hợp bằng bộ kit khuếch đại SMARTer RACE cADN Amplification Kit (Clontech, Mountain View, CA) theo quy chuẩn của nhà cung cấp. Các cADN VH và VL được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) với polymeraza ADN Phusion (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) sử dụng đoạn môi đầu 3' mà gắn môi đặc hiệu với các vùng hằng định chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ ở chuột (Tsurushita et al., supra), tương ứng, và đoạn môi đầu 5' được cung cấp trong bộ kit SMARTer RACE cADN Amplification Kit. Các gen VH và VL đã khuếch đại được tạo dòng bằng cách sử dụng bộ kit CloneJet PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) và trải qua việc giải trình tự với đoạn môi được cung cấp trong bộ kit CloneJet PCR Cloning Kit. Một số dòng VH và VL đã được giải trình tự và các trình tự đặc biệt tương đồng với các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở chuột điển hình đã được xác định.

Trình tự axit amin của VH trưởng thành của TIG1 (SEQ ID NO:10) được thể hiện trong Hình. 3. Trình tự axit amin CDR1, 2 và 3 của TIG1 VH là NFGMH

(SEQ ID NO:11), FISSGSSSIYYADTVKG (SEQ ID NO:12) và MRLDYYAMDY (SEQ ID NO:13), tương ứng.

Trình tự axit amin của VL trưởng thành của TIG1 (SEQ ID NO:14) được thể hiện trong Hình. 4. Trình tự axit amin CDR1, 2 và 3 của TIG1 VL là RASKSISKYLA (SEQ ID NO:15), SGSTLQS (SEQ ID NO:16) và QQHNEYPWT (SEQ ID NO:17), tương ứng.

Trình tự axit amin của TIG2 VH (SEQ ID NO:18) trưởng thành được thể hiện trong Hình. 5. Trình tự axit amin CDR1, 2 và 3 của TIG2 VH tương ứng là EYTMH (SEQ ID NO:19), GINPNNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO:20) và PGWYNYAMDY (SEQ ID NO:21).

Trình tự axit amin của TIG2 VL (SEQ ID NO:22) trưởng thành được thể hiện trong Hình. 6. Trình tự axit amin CDR1, 2 và 3 của TIG2 VL là KASQGVSTAVA (SEQ ID NO:23), SASRYT (SEQ ID NO:24) và QQHYITPWT (SEQ ID NO:25), tương ứng.

Trình tự axit amin của TIG3 VH (SEQ ID NO:26) trưởng thành được thể hiện trong Hình. 7. Các trình tự axit amin CDR1, 2 và 3 của TIG3 VH là tương ứng với DYDMS (SEQ ID NO:27), YISDGGYNTYYPDTVKG (SEQ ID NO:28) và QILLRYYFDY (SEQ ID NO:29).

Trình tự axit amin của TIG3 VL (SEQ ID NO:30) trưởng thành được thể hiện trong Hình. 8. Trình tự axit amin CDR1, 2 và 3 của TIG3 VL là KSSQSLLYSSNQKNYLA (SEQ ID NO:31), WASTRES (SEQ ID NO:32) và QQYHSYPWT (SEQ ID NO:33), tương ứng.

Sự sắp xếp các trình tự CDR và đánh số các vị trí axit amin trong các hình từ Hình. 3 đến Hình. 8 là theo Kabat et al. (1991). Các trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 được gạch chân trong các hình.

Ví dụ 4: Cấu trúc và biểu hiện của kháng thể TIG1 được nhân hóa

Sự nhân hóa của TIG1 VH và VL được thực hiện như mô tả của Queen et al. (Proc. Natl.Acad. Sci. USA. 86:10029-10033, 1989) theo các quy trình của Tsurushita et al. (Methods 36:69-83, 2005). Tóm lại, mô hình phân tử ba chiều của các vùng biến đổi của TIG1 đầu tiên được xây dựng bằng thuật toán độc quyền

của JN Biosciences. Tiếp theo, các gốc axit amin khung quan trọng cho sự hình thành cấu trúc của các vùng quyết định tính bổ sung (CDR) của TIG1 được xác định bằng cách sử dụng mô hình phân tử. Song song, các trình tự axit amin VH và VL ở người có nguồn gốc từ cADN có độ tương đồng cao với TIG1 VH và VL, tương ứng, được chọn lọc. Cuối cùng, các trình tự CDR cùng với các gốc axit amin khung quan trọng cho việc duy trì cấu trúc CDR được ghép từ TIG1 VH và VL vào các trình tự khung ở người được chọn tương ứng.

Trình tự axit amin của TIG1 VH nhân hóa được thiết kế (HuTIG1 VH) là MDSRLNLVFLVLILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARMRLDYYAMDYWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:34). Trình tự axit amin HuTIG1 VH trưởng thành, EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEW VAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARMRLDYYAMDYWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:35), bắt đầu ở vị trí 20 trong SEQ ID NO:34.

Trình tự axit amin của TIG1 VL nhân hóa được thiết kế (HuTIG1 VL) là MRFQVQVLGLLLWISGAQCIDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIS KYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:36). Trình tự axit amin HuTIG1 VL trưởng thành, DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSISKYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:37), bắt đầu ở vị trí 21 trong SEQ ID NO:36.

Một gen mã hóa HuTIG1 VH được tổng hợp như một exon chứa một tín hiệu cắt ở đầu 3' của vùng mã hóa, vị trí SpeI ở đầu 5' của mảnh, và vị trí HindIII ở đầu 3' của mảnh. Trình tự nucleotit của gen HuTIG1 VH tổng hợp bị chặn bởi các vị trí SpeI và HindIII (SEQ ID NO:38) được thể hiện cùng với trình tự axit amin được suy ra (SEQ ID NO:34) trong Hình. 9A.

Một gen mã hóa HuTIG1 VL được tổng hợp như một exon bao gồm một tín hiệu cắt ở đầu 3' của vùng mã hóa, vị trí NheI ở đầu 5' của mảnh, và vị trí EcoRI ở đầu 3' của mảnh. Trình tự nucleotit của gen HuTIG1 VL tổng hợp bị chặn bởi các vị trí NheI và EcoRI (SEQ ID NO:39) được thể hiện cùng với trình tự axit amin được suy ra (SEQ ID NO:36) trong Hình. 9B.

Vật truyền biểu hiện ở động vật có vú pHuTIG1.AA (Hình. 10) để tạo ra dạng kappa của IgG1 được nhân hóa của kháng thể đơn dòng TIGIT kháng-người ở chuột TIG1 (HuTIG1-IgG1.AA) được xây dựng để chứa các thành phần di truyền sau đây. Tiến hành theo chiều kim đồng hồ từ vị trí SalI trong Hình. 10, vật truyền chứa đơn vị phiên mã chuỗi nặng bắt đầu với vùng khởi động sớm trực tiếp chính của cytomegalovirus (CMV) ở người và vùng tăng cường (CMV-P trong hình) để khởi động quá trình phiên mã gen chuỗi nặng kháng thể. Vùng khởi động CMV được theo sau bởi một exon mã hóa vùng biến chuỗi nặng của dạng được nhân hóa của TIG1 bị chặn bởi các vị trí SpeI và HindIII (HuTIG1 VH), trình tự hệ gen chứa các vùng hằng định chuỗi nặng $\gamma 1$ ở người bao gồm các exon CH1, bản lề, CH2 và CH3 với các intron can thiệp, và vị trí polyadenyl hóa của gen chuỗi nặng $\gamma 1$ ở người. Vùng CH2 được mã hóa trong pHuTIG1.AA mang axit amin thay thế cho gốc alanin ở vị trí 234 và 235 (đánh số EU) (L234A/L235A) để loại bỏ các chức năng tác động (Hezareh et al., J. Virol. 75:12161-12168, 2001). Sau trình tự gen chuỗi nặng, đơn vị phiên mã chuỗi nhẹ bắt đầu với vùng khởi động CMV và vùng tăng cường (CMV-P), tiếp theo là exon mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của dạng TIG1 được nhân hóa bị chặn bởi các vị trí NheI và EcoRI (HuTIG1 VL), một trình tự hệ gen chứa exon vùng hằng định chuỗi kappa ở người (C κ) với một phần của intron trước nó, và vị trí polyadenyl hóa của gen chuỗi kappa ở người theo sau exon C κ . Sau đó, gen chuỗi nhẹ được tiếp nối bởi vùng khởi động sớm SV40 (SV40-P), gen puromycin N-acetyl-transferaza (puro) cho khả năng kháng puromycin, và mảnh chứa vị trí polyadenyl hóa SV40 (SV40-A). Cuối cùng, pHuTIG1.AA chứa một phần của plasmit pUC19, bao gồm điểm mở đầu sao chép của vi khuẩn (pUC ori) và gen β lactamaza (β lactamaza). Các mũi tên trong hình thể hiện hướng phiên mã.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng gamma trưởng thành của HuTIG1-IgG1.AA được mã hóa trong pHuTIG1.AA là
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEW
 VAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
 ARMRLDYYAMDYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNH
 YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:40).

Lysin đầu C có thể có mặt hoặc không.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ gamma trưởng thành của HuTIG1-IgG1.AA được mã hóa trong pHuTIG1.AA là
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSISKYLAWYQQKPGKAPKLLIYS
 GSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGG
 GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTH
 QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:41).

Vật truyền biểu hiện pHuTIG1.AA được đưa vào nhiễm sắc thể của dòng tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc CHO-K1 (ATCC, Manassas, VA) để thu được dòng tế bào tạo ra ổn định HuTIG1-IgG1.AA. Các tế bào CHO-K1 được nuôi trong môi trường SFM4CHO (GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT) ở 37°C trong tủ ủ CO₂ 7,5%. Sự chuyển nạp ổn định vào CHO-K1 được thực hiện bằng phương pháp mở lỗ bằng điện. Trước khi chuyển nạp, pHuTIG1.AA được tuyến tính hóa bằng FspI. Trong một thí nghiệm điển hình, khoảng 10⁷ tế bào được truyền với 20 µg plasmit được tuyến tính hóa, được gây treo trong môi trường SFM4CHO, và được cấy với lượng ở 100 µl/giếng trong một vài đĩa 96-giếng sau sự pha loãng thích hợp của các tế bào. Sau 48 giờ, môi trường

SFM4CHO chứa 20 µg/ml puromycin được thêm vào với lượng 100 µl/giếng để phân lập các tế bào chuyển nhiễm ổn định. Khoảng mười ngày sau khi bắt đầu chọn lọc, các dịch nuôi cấy của các tế bào chuyển nhiễm được thí nghiệm để tạo ra kháng thể.

Biểu hiện của HuTIG1-IgG1.AA được đo bằng ELISA sandwich. Trong một thí nghiệm đặc thù, đĩa ELISA được phủ kháng thể đa dòng đặc hiệu Fc IgG kháng-người ở dê, được rửa bằng đệm Wash Buffer (PBS chứa 0,05% Tween 20), và bị khóa bằng đệm ELISA (PBS chứa 2% sữa gầy và 0,05% Tween 20). Sau khi rửa bằng Wash Buffer, các mẫu thí nghiệm được pha loãng thích hợp trong đệm ELISA Buffer được bơm vào đĩa ELISA. Một kháng thể IgG1/κ được nhân hóa thích hợp được sử dụng làm chuẩn. Sau khi ủ đĩa ELISA trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng và rửa bằng đệm Wash Buffer, các kháng thể liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng chuỗi kappa kháng-người ở dê liên hợp với HRP. Sau khi ủ đĩa trong 0,5 giờ ở nhiệt độ phòng và rửa bằng Wash Buffer, sự thay đổi màu sắc được khởi đầu bằng cách thêm chất nền ABTS (Sigma-Aldrich) với lượng 100 µl/giếng và kết thúc với axit oxalic 2% với lượng 100 µl/giếng. Độ hấp thụ được đọc ở bước sóng 405 nm.

Các tế bào chuyển nhiễm ổn định CHO-K1 tạo ra nhiều HuTIG1-IgG1.AA được mở rộng trong SFM4CHO cho đến khi khả năng tồn tại của tế bào nhỏ hơn 50%. Sau khi ly tâm và lọc, dịch nuôi cấy đã được nạp vào cột Protein A (HiTrap MABSelect SuRe, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Cột được rửa với PBS trước khi kháng thể được tách rửa với glyxin-HCl 0,1 M (pH 3,0). Chất đệm của các kháng thể được tách rửa được trung hòa với Tris-HCl 1 M (pH 8) và sau đó chuyển thành PBS bằng phương pháp thẩm tách. Nồng độ kháng thể được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 280 nm (1 mg/ml = 1,4 OD).

Ví dụ 5: Xác định đặc điểm của HuTIG1-IgG1.AA

Liên kết của HuTIG1-IgG1.AA với TIGIT ở người đã được kiểm nghiệm bằng ELISA. Đĩa ELISA được phủ 5 µg/ml hTIGIT-Fc trong PBS (100 µl/giếng)

ở 4°C qua đêm, rửa bằng Wash Buffer (PBS chứa 0,05% Tween 20), và bị khóa bởi SuperBlock Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific) với lượng 200 µl/giếng. Sau khi rửa giếng bằng Wash Buffer, HuTIG1-IgG1.AA, bắt đầu ở 2,5 µg/ml và pha loãng 2 lần liên tiếp trong SuperBlock Blocking Buffer, được thêm vào để liên kết với TIGIT ở người trên đĩa. Sau khi ủ đĩa ELISA trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng và rửa bằng Wash Buffer, các kháng thể liên kết được phát hiện bằng kháng thể đa dòng chuỗi kappa kháng người ở dê liên hợp với HRP (Southern Biotech), pha loãng với tỉ lệ 1/2.000 trong ELISA Buffer. Sau khi ủ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng và rửa bằng Wash Buffer, sự thay đổi màu được bắt đầu với lượng 100 µl/giếng của chất nền ABTS và dừng lại với 100 µl/giếng của axit oxalic 2%. Độ hấp thụ được đọc ở bước sóng 405 nm. Như thể hiện trong Hình. 11, sự liên kết của HuTIG1-IgG1.AA với TIGIT ở người theo phương thức phụ thuộc vào liều lượng. Nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC50) của HuTIG1-IgG1.AA để liên kết với TIGIT là 65 ng/ml. Điều này thể hiện rằng HuTIG1-IgG1.AA là một chất liên kết tốt với TIGIT ở người.

Việc liên kết của HuTIG1-IgG1.AA với TIGIT ở người cũng được kiểm nghiệm bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. Tế bào NS0-hTIGIT (8×10^5 tế bào) được ủ trong 160 µl dung dịch đệm FACS (PBS chứa 0,5% albumin huyết thanh bò và 0,05% natri azit) khi có mặt (hoặc không có mặt) HuTIG1-IgG1 AA ở nồng độ khác nhau, bắt đầu từ 10 µg/ml và pha loãng 2 lần liên tiếp, trong 20 phút ở 4°C. Sau khi rửa bằng dung dịch đệm FACS, liên kết HuTIG1-IgG1.AA trên các tế bào NS0-hTIGIT được phát hiện với kháng thể IgG kháng người ở dê được gắn nhãn PE trong dung dịch đệm FACS. Sau khi ủ trong 20 phút và rửa bằng dung dịch đệm FACS, các tế bào đã phải trải qua quá trình đếm tế bào theo dòng chảy sử dụng máy đếm dòng tế bào theo dòng chảy FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA) để thu được huỳnh quang tuyến trung bình (MCF) ở mỗi nồng độ kháng thể. Hình 12 biểu thị sơ đồ của MCF (trục dọc) ở mỗi nồng độ kháng thể (trục ngang). Giá trị EC50 là 60 ng/ml. Điều này thể hiện rằng HuTIG1-IgG1.AA là chất kết dính tốt với TIGIT ở người biểu hiện trên bề mặt tế bào.

Hoạt tính của HuTIG1-IgG1.AA để ngăn chặn sự tương tác giữa TIGIT ở người và CD155 ở người được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy sử dụng các tế bào NS0-hTIGIT. Các tế bào NS0-hTIGIT (10^6 tế bào) được ủ với nồng độ dưới mức bão hòa (125 ng/ml) của các protein dung hợp hCD155-Fc được gắn nhãn FITC (hCD155-Fc-FITC) trong 200 μ l dung dịch đệm FACS khi có mặt (hoặc không có) HuTIG1-IgG1.AA ở các nồng độ khác nhau, bắt đầu từ 10 μ g/ml và pha loãng 2 lần liên tiếp, trong 20 phút ở 4°C. Sau khi rửa bằng dung dịch đệm FACS, các tế bào đã phải trải qua quá trình đếm tế bào theo dòng chảy sử dụng máy đếm dòng tế bào theo dòng chảy FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA). Để kiểm tra sự liên kết của hCD155-Fc-FITC trên các tế bào, MCF được lấy ở mỗi nồng độ kháng thể. Như được thể hiện trên Hình. 13, HuTIG1-IgG1.AA ngăn chặn sự tương tác giữa hCD155-Fc-FITC và TIGIT trên bề mặt tế bào theo phương thức phụ thuộc vào liều lượng. Nồng độ ức chế tối đa một nửa (IC_{50}) của HuTIG1-IgG1.AA để ngăn chặn tương tác TIGIT-CD155 là 67 ng/ml. Điều này chỉ ra rằng HuTIG1-IgG1.AA là chất chặn hiệu quả đối với tương tác giữa CD155 và TIGIT.

Ví dụ 6: Cấu trúc và biểu hiện của kháng thể TIG3 được nhân hóa.

Sự nhân hóa của TIG3 VH và VL được thực hiện theo quy trình chung được mô tả trong Ví dụ 4. Trình tự axit amin của TIG3 VH nhân hóa được thiết kế (HuTIG3 VH) là MNFGLRLIFLVLTCLKGVNCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFS DYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISDGGYNTYYPDTVKGRTISRDNACKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQILLRYYFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:42). Trình tự axit amin HuTIG3 VH trưởng thành, EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFS DYDMSWVRQAPGKGLEW VAYISDGGYNTYYPDTVKGRTISRDNACKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARQILLRYYFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:43), bắt đầu ở vị trí 20 trong SEQ ID NO:42.

Trình tự axit amin của TIG3 VL nhân hóa được thiết kế (HuTIG3 VL) là MDSQAQVLM LLLWVSGTCGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSL

LYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFT
 LTISSLQPEDFAVYYCQQYHSYPWTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:44). Trình
 tự axit amin HuTIG3 VL trưởng thành,
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGKA
 PKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYHS
 YPWTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:45), bắt đầu ở vị trí 21 trong SEQ ID NO:44.

Một gen mã hóa HuTIG3 VH được tổng hợp như một exon bao gồm một
 tín hiệu cắt ở đầu 3' của vùng mã hóa, vị trí SpeI ở đầu 5' của mảnh, và vị trí
 HindIII ở đầu 3' của mảnh. Trình tự nucleotit của gen HuTIG3 VH tổng hợp (SEQ
 ID NO:46) được thể hiện cùng với trình tự axit amin được suy ra (SEQ ID NO:42)
 trong Hình. 14A.

Một gen mã hóa TIG3 VL được nhân hoá (HuTIG3 VL) được tổng hợp như
 một exon bao gồm một tín hiệu cắt ở đầu 3' của vùng mã hóa, vị trí NheI ở đầu 5'
 của mảnh, và vị trí EcoRI ở đầu 3' của mảnh. Trình tự nucleotit của gen HuTIG3
 VL tổng hợp (SEQ ID NO:47) được thể hiện cùng với trình tự axit amin được suy
 ra (SEQ ID NO:44) trong Hình. 14B.

Vật truyền biểu hiện ở động vật có vú pHuTIG3.AA để tạo ra dạng
 IgG1/kappa được nhân hoá của kháng thể đơn dòng TIGIT kháng-người TIG3
 (HuTIG3-IgG1.AA) được xây dựng cấu trúc bằng cách biến đổi pHuTIG1.AA
 như sau: (1) gen HuTIG1 VH được thay thế bằng gen HuTIG3 VH giữa các vị trí
 SpeI và HindIII, và (2) gen HuTIG1 VL được thay thế bằng gen HuTIG3 VL giữa
 các vị trí NheI và EcoRI. Vùng CH2 được mã hóa trong pHuTIG3.AA mang axit
 amin thay thế cho các gốc alanin ở vị trí 234 và 235 (đánh số EU) (L234A/L235A)
 để loại bỏ các chức năng tác động.

Trình tự axit amin của chuỗi nặng gamma trưởng thành của HuTIG3-
 IgG1.AA được mã hóa trong pHuTIG3.AA là
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYDMSWVRQAPGKGLEW
 VAYISDGGYNTYYPD TVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY
 CARQILLRYYFDYWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
 GCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS

LGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
 YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:48).

Lysin đầu C có thể có mặt hoặc không.

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kappa trưởng thành của HuTIG3-IgG1.AA được mã hóa trong pHuTIG3.AA là
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGKA
 PKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYHS
 YPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:49).

Sự chuyển nhiễm tạm thời của pHuTIG3.AA vào 100 ml tế bào Expi293 tăng trưởng theo cấp số nhân (Thermo Fisher Scientific) được thực hiện theo quy chuẩn của nhà cung cấp. Các tế bào chuyển nhiễm ổn định CHO-K1 tạo ra nhiều HuTIG1-IgG1.AA cũng được tạo ra bởi phương pháp mở lỗ bằng điện của pHuTIG3.AA như được mô tả trên và được nhân rộng trong SFM4CHO cho đến khi khả năng tồn tại của tế bào nhỏ hơn 50%. HuTIG3-IgG1.AA được tinh chế từ dịch nổi nuôi cấy của mỗi trong số các tế bào Expi293 được chuyển nhiễm tạm thời và các tế bào CHO-K1 được chuyển nhiễm ổn định bằng cột ái lực protein A như được mô tả ở trên.

Ví dụ 7: Xác định đặc điểm của HuTIG3-IgG1.AA

Việc liên kết của HuTIG3-IgG1.AA với TIGIT ở người đã được thí nghiệm bằng ELISA như được mô tả trong ví dụ 5. Như được thể hiện trên Hình. 15, HuTIG3-IgG1.AA liên kết với TIGIT ở người theo phương thức phụ thuộc vào liều lượng. Nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) của HuTIG3-IgG1.AA để liên kết với TIGIT là 85 ng/ml. Điều này cho thấy HuTIG3-IgG1.AA là chất liên kết tốt với TIGIT ở người.

Việc liên kết của HuTIG3-IgG1.AA với TIGIT ở người cũng đã được kiểm tra bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy được mô tả trong ví dụ 5. Như được thể hiện trên Hình. 12, HuTIG3-IgG1.AA liên kết với TIGIT ở người theo phương thức phụ thuộc vào liều lượng. Nồng độ hiệu quả tối đa một nửa (EC_{50}) của HuTIG3-IgG1.AA để liên kết với TIGIT là 370 ng/ml. Điều này cho thấy HuTIG3-IgG1.AA là chất liên kết tốt với TIGIT ở người.

Hoạt tính của HuTIG3-IgG1.AA để ngăn chặn sự tương tác của TIGIT với CD155 được phân tích bằng cách đếm tế bào theo dòng chảy sử dụng tế bào NS0-hTIGIT và hCD155-Fc được gắn nhãn FITC như được mô tả trong ví dụ 5. Như được thể hiện trên Hình. 13, HuTIG3-IgG1.AA ngăn chặn sự tương tác giữa TIGIT và CD155 theo phương thức phụ thuộc vào liều lượng. Nồng độ ức chế tối đa một nửa (IC_{50}) của HuTIG3-IgG1.AA để ngăn chặn tương tác TIGIT-CD155 là 279 ng/ml. Điều này chỉ ra rằng HuTIG3-IgG1.AA là chất chặn hiệu quả đối với tương tác giữa CD155 và TIGIT.

Ví dụ 8: Phản ứng cytokine IL-2 với giải độc tố uốn ván trong tế bào T ở người được tăng cường bằng sự ngăn chặn TIGIT

Khả năng của các kháng thể kháng TIGIT ở chuột trong tăng cường đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên đã được kiểm tra bằng thí nghiệm nhắc lại đặc hiệu kháng nguyên in vitro với giải độc tố uốn ván (xem, ví dụ như, Piersma et al., Vaccine.2006 Apr 12;24(16):3076-83; Zaunders et al., J Immunol. 2009 Aug 15;183(4):2827-36). Sự bảo vệ vắc-xin đầy đủ với giải độc tố uốn ván đạt được bằng cách tiêm tăng cường cho phép hệ miễn dịch tạo ra đáp ứng ghi nhớ trên tế bào T đối với CD4+ và CD8+. Như một biện pháp thay thế hiệu quả (xem, ví dụ như, Plotkin et al., Clin Vaccine Immunol. 2010 Jul; 17(7): 1055–1065; Goulon và cộng sự. Nov. 1972 Presse Med. 1:3049-3050.), mức huyết thanh là 0,1 IU/mL của kháng độc tố uốn ván là dấu hiệu cho thấy đáp ứng miễn dịch được duy trì.

Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ những người tình nguyện viên đã tiêm giải độc tố uốn ván được lấy (iQ Biosciences) cùng với kiểm tra hàm lượng kháng thể kháng uốn ván trong máu của các tình nguyện viên đã được xác

nhận là cao hơn 1,0 IU/ml bằng phương pháp ELISA (Genway). 800.000 PBMC được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 (Invitrogen) có chứa 10% huyết thanh thai bò (FBS) trong các đĩa đáy tròn 96-giếng (Nunc). 2 µg/ml giải độc tố uốn ván (List Biological Laboratories) đã được thêm vào các giếng có chứa PBMC với sự có mặt của kháng thể kháng PD-1 ở chuột (Biolegend, clone EH12.2H7) hoặc kháng thể kháng TIGIT (TIG1) ở nồng độ 3,3 µg/ml hoặc 10 µg/ml trong 4 ngày ở 37°C trong tủ ủ CO₂ 5%. Làm đối chứng, 2 µg/ml giải độc tố uốn ván đã được thêm vào PBMC mà không có bất kỳ kháng thể nào. Dịch nổi từ các giếng nuôi cấy đã được thu và cytokin chỉ thị cho sự hoạt hóa tế bào T, IL-2, được đo bằng dây hạt cytokin (BD Pharmingen, CBA Th1/Th2 Cytokine Kit) bằng cách đếm tế bào theo dòng chảy (BD FACSCalibur). Như thể hiện trong Hình. 16, sản lượng IL-2 chỉ bằng kích thích giải độc tố uốn ván là 31 pg/ml. Sự tạo thành IL-2 được tăng cường hơn nữa lên 70 pg/ml và 86 pg/ml với sự hiện diện của kháng thể kháng TIGIT ở chuột TIG1 ở 3,3 µg/ml và 10 µg/ml tương ứng. Sự tạo thành IL-2 bằng cách kích thích giải độc tố uốn ván cũng tăng lên 39 pg/ml và 57 pg/ml khi có kháng thể kháng PD-1 ở chuột EH12.2H7 với 3,3 µg/ml và 10 µg/ml tương ứng. Những dữ liệu này cho thấy TIG1 có khả năng tăng cường đáp ứng cytokin tế bào T đặc hiệu kháng nguyên.

Ví dụ 9: Phản ứng tăng sinh tế bào T ở người với giải độc tố uốn ván được tăng cường bằng sự ngăn chặn TIGIT

Khả năng của kháng thể kháng TIGIT ở chuột trong tăng cường đáp ứng tế bào T đặc hiệu kháng nguyên đã được kiểm tra bằng thí nghiệm nhắc lại đặc hiệu kháng nguyên in vitro với giải độc tố uốn ván (xem, ví dụ như, Piersma et al., Vaccine. 2006 Apr 12;24(16):3076-83; Zaunders et al., J Immunol. 2009 Aug 15;183(4):2827-36). PBMC từ những người tình nguyện viên đã tiêm giải độc tố uốn ván được lấy (iQ Biosciences) như được mô tả trong ví dụ 8. PBMC được dán nhãn este cacboxyfluorescein succinimidyl (CFSE) (ThermoFisher), một thuốc thử được sử dụng cho việc gắn nhãn in vitro và in vivo của tế bào, để theo dõi nhiều thế hệ bằng cách pha loãng thuốc nhuộm với phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. 250.000 PBMC được dán nhãn CFSE được nuôi cấy trong môi

trường AIM-V (Invitrogen) trong các đĩa đáy tròn 96-giếng (Nunc). 2 µg/ml giải độc tố uốn ván (Astarte Biologics, LLC) đã được thêm vào các giếng có mặt kháng thể kháng PD-1 ở chuột (Biolegend, clone EH12.2H7) hoặc TIG1 ở 2,5 µg/ml, 5 µg/ml hoặc 10 µg/ml trong mỗi giếng. Các tế bào được ủ trong 4 ngày ở 37°C trong tủ ủ 5% CO₂. Vào ngày thứ tư, IL-2 [50 đơn vị/ml] (Peprotech) đã được thêm vào các môi trường nuôi cấy và vào ngày thứ sáu, PBMC được thu thập để đo tăng sinh bằng cách đếm tế bào theo dòng chảy (BD FACSCalibur) khi pha loãng CFSE trên tế bào T CD4+ hoặc tế bào T CD8+.

Như được thể hiện trong Hình. 17 (các bảng trên cùng), giải độc tố uốn ván tạo ra sự tăng sinh 4,5% và 6,5% của các tế bào T CD4+ ở người có nguồn gốc từ những người hiến tặng 1 và 2, tương ứng. Việc bổ sung TIG1 làm tăng cường sự tăng sinh tế bào T CD4+ ở tất cả các nồng độ kháng thể được thí nghiệm (2,5 µg/ml, 5 µg/ml và 10 µg/ml) với các tác dụng tăng sinh tương tự được quan sát với kháng thể kháng PD-1 ở những khoảng liều lượng này.

Như được thể hiện trong Hình. 17 (các bảng dưới cùng), giải độc tố uốn ván tạo ra sự tăng sinh 15% và 15,5% của tế bào T CD8+ ở người có nguồn gốc từ những người hiến tặng 1 và 2 tương ứng. Việc bổ sung TIG1 làm tăng thêm sự tăng sinh tế bào T CD8+ ở tất cả các nồng độ kháng thể được thí nghiệm (2,5 µg/ml, 5 µg/ml và 10 µg/ml) với các tác dụng tăng sinh tương tự được quan sát với kháng thể kháng PD-1 EH12.2H7 ở những khoảng liều lượng này. Những kết quả này chứng minh rằng TIG1 có khả năng tăng cường các đáp ứng tăng sinh tế bào T đặc hiệu kháng nguyên.

Ví dụ 10: Việc gia tăng độc tính trung gian tế bào NK với các tế bào tác động chính ở người và các tế bào đích K562 bằng sự ngăn chặn TIGIT.

Tế bào NK ở người có thể tạo ra độc tính tế bào tự nhiên đến các tế bào đích thiếu MHC I như K562, dòng tế bào bạch cầu tủy (CML) mãn tính (xem, ví dụ như, Nagel et al., Cancer Res 1981;41:2284-2288; Andersson et al., Int J Cancer. 1979 Feb;23(2):143-7. Lozzio et al., Leuk Res. 1979;3(6):363-70). Sự biểu hiện của CD155 (PVR) trên tế bào K562 (ATCC) đã được xác nhận bằng cách sử dụng kháng thể thương mại (Biolegend anti-CD155 clone SKII.4). Như

được thể hiện trên Hình. 18 (bảng trên cùng), 98% các tế bào K562 được phát hiện rằng thể hiện CD155 ở mức độ cao (biểu đồ màu đen). Biểu hiện TIGIT trên các tế bào NK dương tính CD56 ở người trong PBMC (iQ Biosciences) sử dụng kháng thể thương mại (dòng kháng TIGIT MBSA43 eBiosciences và dòng kháng CD56 HCD56 Biolegend) cũng được xác nhận trên 3 người hiến tặng đại diện (Hình. 18, các bảng dưới cùng).

Sự phân giải của tế bào K562 trung gian bởi các tế bào NK được kiểm tra khi có và không có TIG1. PBMC được nuôi cấy qua đêm trong môi trường AIM-V (Invitrogen) với sự có mặt của interleukin-2 (IL-2) [200 đơn vị/ml] (PeproTech) ở 37°C trong tủ ủ CO₂ 5%. Ngày hôm sau, tế bào K562 được gắn nhãn CFSE và cùng nuôi cấy với tỷ lệ 1:100 với PBMC (Mục tiêu: PBMC; một tế bào K562 trên một trăm PBMC có chứa khoảng 5% tế bào NK) trong 4 giờ ở 37°C trong tủ ủ 5% CO₂ với sự có mặt của TIG1 với lượng 10 µg/ml. Sau thời gian ủ, các tế bào được thu hoạch và nhuộm màu với Sytox Red 5 nM (ThermoFisher) để phân biệt các tế bào đích đã chết bằng (CFSE+ Sytox Red+). Tỷ lệ phần trăm của các tế bào đích K562 được phân giải bởi các tế bào NK được xác định bằng cách đếm tế bào theo dòng chảy (FACSCalibur; FlowJo Analysis). Như được thể hiện trong Hình. 19, 2% tế bào K562 được phân giải mà không có TIG1. Khi TIG1 được thêm vào, 4,4% các tế bào K562 được phân giải. Việc bổ sung TIG1 tăng cường độc tính tế bào tự nhiên qua trung gian tế bào NK của các tế bào K562 gấp hai lần, chứng minh rằng TIG1 có khả năng tăng mức độ tiêu diệt tế bào đích bởi tập con của các tế bào tác động ở người.

Ví dụ 11: Sự tạo thành cytokin tế bào T ở người tạo ra SEB được tăng cường bởi sự ngăn chặn TIGIT

Các siêu kháng nguyên như SEB (Staphylococcus Enterotoxin B), kích hoạt tế bào T bằng cách liên kết các phân tử MHC nhóm II trên các tế bào trình diện kháng nguyên với yếu tố vβ của TCR dẫn đến việc tạo ra các cytokin bao gồm interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), yếu tố hoại tử khối u alpha (TNFα), và interferon gamma (IFNγ) (xem, ví dụ như Krakauer et al., Toxins (Basel). 2010 Aug; 2(8): 1963–1983). So với dạng đáp ứng tế bào T tạo kháng nguyên nhắc lại

điển hình, trong đó từ 0,1 đến 0,001% tế bào T có thể được hoạt hóa, SEB có khả năng hoạt hóa tới 10 đến 20% tế bào T trong máu người tùy thuộc vào phân tế bào T mang $\nu\beta 3$, $\nu\beta 12$, $\nu\beta 14$ và $\nu\beta 17$ được tìm thấy trong mỗi người hiến tặng máu. Do đó, SEB có thể được sử dụng cho thí nghiệm tiết cytokin dựa trên tế bào T để xác định mức độ điều chỉnh đích bằng cách ức chế TIGIT với các tế bào máu chung ở người (WBC).

Các mẫu WBC mới được phân lập (Stanford Blood Center) thu được bằng cách sử dụng natri heparin trong vòng 4 giờ liên tục mà không có dấu hiệu của sự tiêu máu. 250 μ l được phân ước vào các giếng trong đĩa đáy tròn 96-giếng (Nunc) và được kích thích bằng SEB (Toxin Technology) ở nồng độ cuối cùng 1 μ g/ml với sự có mặt của kháng thể đơn dòng kháng PD-1 được nhân hóa nồng độ 10 μ g/ml hoặc HuTIG1-IgG1.AA nồng độ 10 μ g/ml trong 24 giờ ở 37°C trong tủ ủ CO₂ 5%. Sau 24 giờ, các đĩa 96 giếng được ly tâm một thời gian ngắn để tách lớp huyết tương ra để thu thập. Sau khi lấy mẫu huyết tương, mức biểu hiện của IL-2, IL-6, TNF α và IFN γ được đo bằng các chuỗi hạt cytokin (Biolegend, LEGENDplex™ Human CD8/NK Panel) bằng cách đếm tế bào theo dòng chảy (BD FACSCalibur) và được phân tích bằng phần mềm Biolegend để đo định lượng.

Để xác định sự thay đổi mức độ biểu hiện của mỗi IL-2, IL-6, TNF α và IFN γ , mức độ cytokin khi có mặt kháng thể thí nghiệm (cộng với SEB) được chia theo mức độ cytokin trong trường hợp không có kháng thể đối với mỗi người hiến tặng. Do đó, sự thay đổi gấp 2 lần (ví dụ như được phát hiện khi có mặt kháng thể kháng-TIGIT) có nghĩa là nồng độ tuyệt đối của cytokin đo được trong thí nghiệm gấp đôi lượng đo được trong các điều kiện đối chứng kích thích SEB. Như được thể hiện trong Hình. 20, sự tạo thành IL-2, IL-6, TNF α hoặc IFN γ kích thích SEB bởi các tế bào máu của người hiến tặng khỏe mạnh được tăng lên khi có mặt kháng thể kháng PD-1 được nhân hóa nồng độ 10 μ g/ml hoặc HuTIG1-IgG1.AA nồng độ 10 μ g/ml. Trong những điều kiện này, việc tạo thành cytokin do SEB gây ra bởi WBC và sự điều chỉnh của nó bằng HuTIG1-IgG1.AA là kết quả tiềm năng của đáp ứng tác động cytokin. HuTIG1-IgG1.AA có khả năng tăng cường hiệu

quả đáp ứng miễn dịch như được chứng minh bằng việc kích thích sự tạo thành IL-2, IL-6, TNF α và IFN γ trong xét nghiệm được trình bày trong bản mô tả này.

Ví dụ 12: Xác định đặc điểm độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể trung gian HuTIG1-IgG1.AA và HuTIG3-IgG1.AA

Độc tính tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) đề cập đến sự phân giải tế bào biểu hiện các phân tử đích của nó khi có mặt bổ thể (xem, ví dụ như, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163). Sự kích hoạt của con đường bổ thể cổ điển được bắt đầu bằng sự liên kết của thành phần thứ nhất của hệ thống bổ thể (C1q) với kháng thể (của phân lớp thích hợp), mà các kháng thể này được liên kết với kháng nguyên cùng nguồn của chúng trên bề mặt tế bào. Để đánh giá sự hoạt hóa bổ thể, dòng tế bào mẹ của tế bào báo cáo Dual Jurkat tế bào T ở người (Dual Jurkat; Invivogen) được thiết kế để biểu hiện ổn định TIGIT ở người (Jurkat-TIGIT) trên bề mặt. Như được thể hiện trên Hình. 21, sự biểu hiện của TIGIT trên bề mặt của các tế bào Jurkat-TIGIT đã được xác nhận bằng cách đếm tế bào theo dòng với kháng thể kháng TIGIT thương mại được dán nhãn PE (dòng MSBA43 eBiosciences). Do đó, Jurkat-TIGIT được sử dụng như là các tế bào đích biểu hiện liên tục màng tế bào liên kết TIGIT và do đó có thể có hoạt tính CDC liên kết kháng thể khi có bổ thể.

Thí nghiệm CDC được thực hiện với các tế bào Jurkat-TIGIT và bổ thể ở người với sự có mặt của HuTIG1-IgG1.AA, HuTIG3-IgG1.AA, hoặc globulin kháng tymocyt ở thỏ (ATG) (Fresenius Biotech GmbH) với nồng độ tăng lên đến 50 μ g/ml. ATG được sử dụng như đối chứng dương do phản ứng của nó với các tế bào Jurkat và ghi nhận hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể với các tế bào Jurkat (xem, ví dụ như, Eiermann et al., J Hematother Stem Cell Res. 2001 Jun;10(3):385-90.; Ayuk et al., AntiCancer Research 29: 1355-1360 (2009). 50.000 tế bào Jurkat-TIGIT trong môi trường RPMI 1640 (Invitrogen) chứa 10% huyết thanh thai bò (FBS) được gieo vào các đĩa đáy tròn 96 giếng (Nunc). Kháng thể điều trị được thêm vào bắt đầu ở nồng độ tối đa 50 μ g/ml, sau đó là loạt pha loãng ba lần và cho phép ủ với tế bào trong 1 giờ ở 37°C trong tủ ủ CO₂ 5%. Sau

1 giờ ủ, bỏ thể ở người đã được thêm vào và cho phép ủ thêm 3 giờ ở 37°C trong tủ ủ CO₂ 5%. Sau khi hoàn thành ủ 3 giờ, propidi iodua 5 µg/ml (ThermoFisher) đã được thêm vào và các mẫu được phân tích bằng cách đếm tế bào theo dòng chảy (BD FACSCalibur) để xác định tỷ lệ phần trăm dương tính của propidi iodua như biểu hiện về tế bào chết.

Để xác định những thay đổi được chuẩn hóa, tỷ lệ phần trăm khả năng tồn tại được đo bằng cách đếm tế bào theo dòng chảy và tỷ lệ phần trăm tế bào dương tính propidi iodua được đánh giá là tế bào chết. Các giá trị mẫu chưa được xử lý đã được chuẩn hóa đến 100%. Tỷ lệ phần trăm khả năng tồn tại của các mẫu khi có mặt kháng thể được chia cho các mẫu không được điều trị được chuẩn hóa để cho ra thay đổi gấp (a fold change: có nghĩa là thước đo mô tả sự thay đổi về lượng giữa giá trị ban đầu và giá trị cuối cùng) về khả năng tồn tại. Như được thể hiện trong Hình. 22, cả HuTIG1-IgG1.AA và HuTIG3-IgG1.AA đến nồng độ 50 µg/ml đều không tạo hoạt tính CDC. Những dữ liệu này chứng minh rằng liên kết của cả HuTIG1-IgG1.AA và HuTIG3-IgG1.AA với TIGIT đều không dẫn đến sự gây chết tế bào trung gian bỏ thể của tế bào T.

Ví dụ 13: Xác định đặc tính dòng tế bào báo cáo Jurkat Dual của HuTIG1-IgG1.AA và HuTIG3-IgG1.AA

Trình tự chức năng quy định việc khóa thụ thể TIGIT ở người được phân tích bằng cách sử dụng dòng thể bào báo cáo Jurkat-TIGIT, các tế bào này mang trong nhiễm sắc thể một gen báo cáo giải phóng luciferaza được thúc đẩy bởi vùng khởi động IFN β tối thiểu được hợp nhất với năm bản sao của yếu tố đáp ứng phiên mã tương đồng NF- κ B và ba bản sao của vị trí liên kết c-Rel. Tế bào Jurkat-TIGIT cũng biểu hiện gen báo cáo phosphataza kiềm từ phôi (SEAP) được sản sinh ra dưới sự kiểm soát của vùng khởi động ISG54 tối thiểu kết hợp với năm yếu tố đáp ứng kích thích IFN.

Các xét nghiệm bao gồm hai dòng tế bào đại diện cho tế bào T tác động (Jurkat-TIGIT) và các tế bào trình diện kháng nguyên. Các tế bào T tác động biểu hiện ổn định reporter luciferaza được hoạt hóa cùng dòng với thụ thể tế bào T (TCR). Các tế bào trình diện kháng nguyên (các tế bào trình diện kháng nguyên

nhân tạo, hoặc “aAPC”) biểu hiện ổn định protein hoạt hóa tế bào T, những protein này liên kết và hoạt hóa tế bào T tác động, như Jurkat-TIGIT, trong một cơ chế không phụ thuộc kháng nguyên (Promega). Các tế bào aAPC được thiết kế thêm để biểu hiện CD155. Khi tế bào T tác động được đồng nuôi cấy với tế bào aAPC tương ứng của nó, tương tác của TIGIT với CD155 ức chế sự hoạt hóa của tế bào T tác động và làm giảm sự biểu hiện của luciferaza. Sự bổ sung kháng thể ngăn chặn kháng TIGIT giải phóng tín hiệu ức chế cho phép biểu hiện hoạt tính luciferaza.

Trong thí nghiệm này, 16.000 aAPC biểu hiện CD155 ở người và protein hoạt hóa tế bào T (TCR Activator CD155 CHO-K1) (Promega) được cho vào đĩa nửa diện tích 96 giếng và ủ ở 37°C trong tủ ủ CO₂ 5% trong 24 giờ. Ngày hôm sau, 50.000 tế bào Jurkat-TIGIT ở người được đồng nuôi cấy với các tế bào CD155 CHO-K 1 hoạt hóa TCR khi không có hoặc có mặt HuTIG1-IgG1.AA hoặc HuTIG3-IgG1.AA bắt đầu ở nồng độ 10 µg/ml với một loạt pha loãng gấp hai lần trong 24 giờ. Dịch nuôi được thu thập và luciferaza tiết ra được đo bằng QUANTI-Luc (Invivogen) và một đầu đọc đĩa đa chức năng (Perkin Elmer EnSpire) làm đơn vị chuỗi nhẹ tương đối. Để xác định những thay đổi gấp của đơn vị chuỗi nhẹ tương đối, các đơn vị chuỗi nhẹ tương đối của Jurkat-TIGIT được đồng nuôi cấy với CD155 CHO-K1 hoạt hóa TCR có mặt các kháng thể kháng TIGIT ở các nồng độ khác nhau được chia cho các đơn vị chuỗi nhẹ tương đối khi không có kháng thể. Do đó, như ví dụ, việc tăng gấp 2 lần (ví dụ như phát hiện có mặt của kháng thể kháng TIGIT), nghĩa là các đơn vị chuỗi nhẹ tương đối được đo trong thí nghiệm gấp đôi lượng đo được trong điều kiện đối chứng được kích thích duy nhất bởi chất hoạt hóa TCR.

Như được thể hiện trên Hình. 23, cả hai HuTIG1-IgG1.AA và HuTIG3-IgG1.AA có thể làm tăng tín hiệu hoạt hóa tế bào T nội tại như được xác định bởi sự gia tăng các đơn vị chuỗi nhẹ tương đối gây ra khi có mặt mỗi kháng thể TIGIT ngăn chặn từ nồng độ 0,6 µg/ml đến 10 µg/ml tức là tăng xấp xỉ từ 1,5 đến 2,5 lần. Dữ liệu này chứng minh rằng kháng thể kháng TIGIT có hoạt tính đối kháng nhờ cách ngăn chặn chức năng của TIGIT và tăng hoạt tính tế bào T nội tại.

Ví dụ 14: Liên kết cạnh tranh với TIGIT

Phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy được sử dụng để xác định một kháng thể cạnh tranh với TIG1 để gắn với TIGIT ở người. TIG1 được gắn nhãn bằng thuốc nhuộm huỳnh quang FITC sử dụng bộ kit Pierce FITC Antibody Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific) theo quy chuẩn của nhà sản xuất. Việc liên kết của TIG1 có gắn nhãn FITC thu được với TIGIT ở người được kiểm tra bằng cách đếm tế bào theo dòng chảy sử dụng các tế bào NS0-hTIGIT. Một trăm nghìn tế bào NS0-hTIGIT được ủ với TIG1 có gắn nhãn FITC ở các nồng độ khác nhau, bắt đầu từ 10 $\mu\text{g/ml}$ và pha loãng liên tiếp gấp hai lần, trong 200 μl dung dịch đệm FACS (PBS chứa 0,5% albumin huyết thanh bò và azit natri 0,05%) ở 4°C trong 30 phút. Sau rửa bằng 2 ml dung dịch đệm FACS, các tế bào NS0-hTIGIT được gây treo trong 0,2 ml dung dịch đệm FACS và phải trải qua quá trình đếm tế bào theo dòng chảy sử dụng máy đếm tế bào theo dòng chảy FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA) và thu được huỳnh quang tuyến trung bình (MCF) ở mỗi nồng độ kháng thể. Nồng độ hòa tan dưới mức bão hoà, trong đó đạt được 90% mức huỳnh quang tối đa, được xác định đối với TIG1 có gắn nhãn FITC.

Nồng độ dưới mức bão hoà của TIG1 được gắn nhãn FITC được ủ với một trăm nghìn tế bào NS0-hTIGIT khi có (hoặc không có mặt) kháng thể thí nghiệm với nồng độ cao hơn gấp 200 lần trong 200 μl FACS Buffer ở 4°C trong 30 phút. Ví dụ, khi sử dụng TIG1 gắn nhãn FITC nồng độ 0,1 $\mu\text{g/ml}$ để liên kết với các tế bào NS0-hTIGIT, thì kháng thể thí nghiệm nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$ được thêm vào huyền phù tế bào. Làm một đối chứng nền, một trăm nghìn tế bào NS0-hTIGIT được ủ mà không có bất kỳ kháng thể nào. Sau khi rửa bằng 2 ml dung dịch đệm FACS, các tế bào NS0-hTIGIT được gây treo trong 0,2 ml dung dịch đệm FACS và trải qua sự phân tích đếm tế bào theo dòng chảy.

MCF của các tế bào NS0-hTIGIT ủ với TIG1 gắn nhãn FITC [MCF A] được chuẩn hóa tới 100% và MCF của các tế bào NS0-hTIGIT không được ủ với kháng thể [MCF B] được chuẩn hóa thành 0%. MCF của các tế bào NS0-hTIGIT ủ với TIG1 gắn nhãn FITC và kháng thể thí nghiệm [MCF C] được chuẩn hóa

theo công thức sau: $100 \times ([\text{MCF C}] - [\text{MCF B}]) / ([\text{MCF A}] - [\text{MCF B}])$. Khi MCF được chuẩn hóa của các tế bào NS0-hTIGIT được ủ với TIG1 gắn nhãn FITC và kháng thể thí nghiệm nhỏ hơn 20%, thì kháng thể thí nghiệm được xác định là cạnh tranh với TIG1 trong liên kết với TIGIT ở người.

Có thể sử dụng cùng thí nghiệm để xác định các kháng thể cạnh tranh với TIG2 hoặc TIG3.

Ví dụ 15: Đo lường ái lực

Ái lực liên kết kháng nguyên của các kháng thể đơn dòng có thể được đo bằng các cảm biến sinh học plasmon bề mặt quang học (SPR) không gắn nhãn, chẳng hạn như Biacore T100 (GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA), ProteOn XPR36 (BioRad, Hercules, CA), Octet RED384 (ForteBio, Menlo Park, CA) và IBIS MX96 (Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, UT) (Yang et al., Anal. Biochem. 508:78-96, 2016). Ái lực liên kết kháng nguyên của mỗi TIG1, TIG2 và TIG3 được đo bằng Biacore T100 như được mô tả bởi Yang et al. (supra). Protein A/G (Thermo Fisher Scientific) được cố định trên các tế bào dòng chảy trong một chip cảm biến CM5 (GE Healthcare Life Sciences) sử dụng quy chuẩn ghép cặp tiêu chuẩn. Một kháng thể thí nghiệm (TIG1, TIG2 hoặc TIG3) bị bắt giữ bởi protein A/G trên chip cảm biến CM5. Các nồng độ khác nhau của các protein TIGIT tái tổ hợp ở người, như Recignant Human TIGIT, được đánh dấu (Creative BioMart, Shirley, NY), được sử dụng trong dòng chảy để liên kết với kháng thể thí nghiệm trên chip cảm biến. Tỷ lệ có (ka) và tỷ lệ không (kd) của tương tác giữa kháng thể thí nghiệm và TIGIT ở người thu được bằng phần mềm BIAevaluation (GE Healthcare Life Sciences). Hằng số liên kết (Ka) được tính bằng cách chia tỷ lệ có (ka) theo tỷ lệ không (kd) của mỗi TIG1, TIG2 và TIG3. Hằng số phân ly (Kd) được tính bằng cách chia tỷ lệ có (kd) với tỷ lệ không (ka).

Các nghiên cứu cảm biến sinh học đối với HuTIG1-IgG1.AA được thực hiện trên hệ thống BioRad ProteOn XPR36 trong HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, Tween-20 0,005% và BSA 0,2 mg/ml ở 25°C. HuTIG1-IgG1.AA được pha loãng đến 3,7, 1,2 và 0,4 nM và bị bắt giữ trong 5 phút trên một chip cảm biến GLM phủ bởi xấp xỉ 10.000 RU kháng thể IgG kháng người của GE. TIGIT người

tái bổ hợp có thể hòa tan được đánh dấu bởi His (Cat # TIT-H52H3; Acro Biosystems, Newark, DE) đã được thí nghiệm ở 100 nM như nồng độ cao nhất trong chuỗi pha loãng gấp 3 lần xuống còn 1,2 nM. Dữ liệu từ ba bề mặt kháng thể mật độ khác nhau trên phù hợp toàn bộ với mô hình tương tác 1:1 sử dụng R_{max} cục bộ. Tỷ lệ có (k_a) và tỷ lệ không (k_d) thu được lần lượt là $(4,42 \pm 0,02) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ và $(4,09 \pm 0,02) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Hằng số phân ly được tính toán (K_d) là $925 \pm 7 \text{ pM}$.

Ví dụ 16: Lập bản đồ quyết định kháng nguyên

Để định vị quyết định kháng nguyên được nhận dạng bởi mỗi TIG1, TIG2 và TIG3 trong phân tử TIGIT, các đột biến thay thế axit amin đơn được tạo ra trong vùng ngoại bào của TIGIT (SEQ ID NO:3) bằng phát sinh đột biến điều hướng vị trí bằng phương pháp PCR mở rộng chông chéo (Higuchi, R., 1989, trong "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Erlich, H. A., ed., Stockton Press, New York, NY, pp 61-70). Sáu đột biến sau trong vùng ngoại bào của TIGIT được sử dụng cho thí nghiệm: Q35A (SEQ ID NO:50), N37A (SEQ ID NO:51), Q39A (SEQ ID NO:52), N49A (SEQ ID NO:53), D51A (SEQ ID NO:54) và F86A (SEQ ID NO:55). Chữ cái bên trái, số ở giữa, và chữ cái bên phải trong tên của mỗi đột biến lần lượt biểu thị một gốc axit amin trong TIGIT loại tự nhiên, vị trí, bằng cách đếm từ nhóm methionine đầu N trong vùng ngoại bào của TIGIT (SEQ ID NO:3), và một axit amin trong đột biến. Các gốc axit amin đều ở trong mã chữ cái đơn. Mỗi đột biến trong số sáu đột biến đều dẫn đến sự thay thế axit amin gần bề mặt chung của phức hợp TIGIT-CD155 (Stengel, Proc. Natl.Acad. Sci. USA, 109:5399-5404, 2012).

Vật truyền biểu hiện ở động vật có vú pFCm179 có cấu trúc giống như pFCm404 (Hình. 1), ngoại trừ (i) gen puromycin N-acetyl-transferaza được thay thế bằng gen E. coli xanthine guanine photphoribosyl transferaza, và (ii) vùng ngoại bào của TIGIT ở người được thay thế bởi IL-15 ở người. Các đoạn ADN mã hóa sáu đột biến thay thế alanin của vùng ngoại bào của TIGIT ở người được đưa riêng lẻ vào trong pFCm179 để thay thế vùng mã hóa IL-15. Các vật truyền biểu hiện nhận được, pFCm179-Q35A, pFCm179-N37A, pFCm179-Q39A,

pFCm179-N49A, pFCm179-D51A và pFCm179-F86A mang các đột biến Q35A, N37A, Q39A, N49A, D51A và F86A ở vùng mã hóa TIGIT, tương ứng, và biểu hiện cùng một trình tự của các protein dung hợp TIGIT-Fc được mã hóa trong pFCm404 ngoại trừ sự thay thế axit amin đơn cụ thể cho từng đột biến.

Các protein dung hợp TIGIT-Fc tự nhiên và đột biến được biểu hiện tạm thời trong dòng tế bào thận phôi người HEK293. Các tế bào HEK293 được nuôi trong DMEM chứa 10% FCS ở 37°C trong tủ ủ CO₂ 7,5%. Vật truyền biểu hiện của các protein dung hợp TIGIT-Fc tự nhiên và đột biến (pFCm404, pFCm179-Q35A, pFCm179-N37A, pFCm179-Q39A, pFCm179-N49A, pFCm179-D51A và pFCm179-F86A) được chuyển nhiễm riêng biệt vào các tế bào HEK293 bằng cách sử dụng phương pháp polyetylenimin (Durocher et al. (1992) Nucl.Acids Res. 30: e9, 2002). Mức độ tạo thành của các protein dung hợp TIGIT-Fc trong các dịch nổi nuôi cấy được đo bằng ELISA. Tóm lại, đĩa ELISA được phủ kháng thể đa dòng đặc hiệu Fc IgG kháng-người ở dê (Sigma-Aldrich) với liều lượng 100 µl/giếng, được pha loãng với tỉ lệ 1/2.000 trong PBS ở 4°C qua đêm, được rửa bằng Wash Buffer và bị khóa với đệm ELISA Buffer liều lượng 200 µl/giếng trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa bằng Wash Buffer, các dịch nổi nuôi cấy của các tế bào HEK293 chuyển nhiễm tạm thời được pha loãng thích hợp trong ELISA Buffer (100 µl/giếng) được bơm vào đĩa ELISA. hTIGIT-Fc đã tinh chế được sử dụng làm chất chuẩn. Sau khi ủ đĩa ELISA trong 30 phút ở nhiệt độ phòng và rửa bằng Wash Buffer, các protein dung hợp Fc liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng IgG kháng-người ở dê liên hợp với HRP (SouthernBiotech) với lượng 100 µl/giếng, pha loãng với tỉ lệ 1/2.000 trong ELISA Buffer. Sau khi ủ đĩa trong 30 phút ở nhiệt độ phòng và rửa bằng Wash Buffer, sự thay đổi màu sắc được khởi đầu bằng cách thêm chất nền ABTS với lượng 100 µl/giếng (Sigma-Aldrich) và dừng lại với axit oxalic 2% với lượng 100 µl/giếng. Độ hấp thụ được đọc ở bước sóng 405 nm.

Việc liên kết của từng kháng thể TIG1, TIG2 và TIG3 ở chuột với các đột biến TIGIT được kiểm tra bằng ELISA. Một đĩa ELISA được phủ kháng thể đa dòng đặc hiệu Fc IgG kháng-người ở dê với lượng 100 µl/giếng (Sigma-Aldrich),

pha loãng trong PBS với tỉ lệ 1/2.000 ở 4°C qua đêm, được rửa bằng Wash Buffer và bị khóa với đệm ELISA Buffer với lượng 200 µl/giếng trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa bằng Wash Buffer, các protein dung hợp TIGIT-Fc biểu hiện tạm thời nồng độ 0,5 µg/ml, các protein này hoặc mang TIGIT tự nhiên hoặc mang một trong số sáu đột biến TIGIT, trong ELISA Buffer (100 µl/giếng) được bơm vào đĩa ELISA hai lần để ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Các dịch nuôi cấy của tế bào HEK293 không được chuyển nhiễm được sử dụng để làm đối chứng âm. Sau khi rửa bằng Wash Buffer, một lượng 100 µl/giếng của kháng thể thí nghiệm nồng độ 200 ng/ml (TIG1, TIG2 hoặc TIG3) trong ELISA Buffer (100 µl/giếng) đã được bơm vào. Sau khi ủ đĩa ELISA trong 30 phút ở nhiệt độ phòng và rửa bằng Wash Buffer, các kháng thể liên kết được phát hiện bằng kháng thể đa dòng chuỗi kappa kháng-chuột ở dê liên hợp với HRP (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX), pha loãng theo tỷ lệ 1/2.000 trong ELISA Buffer. Sau khi ủ đĩa trong 0,5 giờ ở nhiệt độ phòng và rửa bằng Wash Buffer, sự thay đổi màu sắc được khởi đầu bằng cách thêm chất nền ABTS (Sigma-Aldrich) với lượng 100 µl/giếng và dừng lại với lượng 100 µl/giếng axit oxalic 2%. Độ hấp thụ được đọc ở bước sóng 405 nm.

Bảng 1: Sự liên kết của TIG1, TIG2, và TIG3 với đột biến TIGIT

Đột biến TIGIT	Sự liên kết tương đối với TIGIT (%)		
	TIG 1	TIG 2	TIG 3
Q35A (SEQ ID NO: 50)	-0,1	29,1	57,8
N37A (SEQ ID NO: 51)	0,8	75,1	83,5
E39A (SEQ ID NO: 52)	71,1	69,1	94,2
N49A (SEQ ID NO: 53)	0,5	42,6	37,2
D51A (SEQ ID NO: 54)	1,8	61,0	41,1
F86A (SEQ ID NO: 55)	49,5	40,5	42,2

Đối với mỗi TIG1, TIG2 và TIG3, liên kết tương đối với mỗi đột biến TIGIT được tính theo công thức sau. Độ hấp thụ trung bình với các protein dung hợp TIGIT-Fc tự nhiên [Abs A] đã được chuẩn hóa tới 100%, và độ hấp thụ trung bình với các dịch nuôi cấy của các tế bào HEK293 không được chuyển nhiễm [Abs B] được chuẩn hóa tới 0%. Độ hấp thụ trung bình với protein dung hợp TIGIT-Fc đột biến [Abs C] đã được chuẩn hóa theo công thức sau: $100 \times ([\text{Abs}$

C] - [Abs B]) / ([Abs A] - [Abs B]). Kết quả được tóm tắt trong Bảng 1. Sự liên kết tương đối của TIG1 nhỏ hơn 5% khi gốc axit amin được thay thế bằng alanin ở vị trí 35, 37, 49 hoặc 51, thể hiện rằng các gốc axit amin ở bốn vị trí này là rất quan trọng trong liên kết của TIG1 với TIGIT. Không có đột biến TIGIT nào được sử dụng trong thí nghiệm này loại bỏ liên kết của TIG2 và TIG3 với TIGIT.

Ví dụ 17: Tăng cường sự tiết IFN γ khi bổ sung HuTIG1-IgG1.AA, kháng thể kháng PD-L1 và HuTIG1-IgG1. AA kết hợp với kháng thể kháng PD-L1.

PBMC ở người đầu tiên được phân lập từ một lớp đệm bằng cách phân lớp máu trong môi trường gradient mật độ (Lymphoprep; STEMCELL; 07801) và thu thập PBMCs sau khi ly tâm từ kỳ trung gian. Trong bước tiếp theo, các bạch cầu đơn nhân được phân lập từ PBMC bằng chọn lọc CD14 dương (bộ kit EasySep Human CD14 Positive Selection kit; STEMCELL; Cat# 18058) theo quy chuẩn của nhà sản xuất và được nuôi trong sáu ngày trong môi trường RPMI bổ sung FBS 5% và GM-CSF 0,1 μ g/ml (R&D; Cat# 215-GM-050/CF) và IL-4 0,1 μ g/ml (R&D; Cat# 204-IL-050/CF). Các tế bào tua có nguồn gốc bạch cầu đơn nhân đã biệt hóa (moDC) được thu hoạch và được kiểm tra biểu hiện của CD155, CD112 và PD-L1 bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy (Hình. 24).

Các tế bào CD4 $^{+}$ ở người từ 4 người hiến tặng khác nhau được phân lập từ lớp đệm bằng cách làm tiêu dịch âm tính (RosetteSep human CD4 T cell enrichment cocktail; STEMCELL; #15062) và độ tinh khiết được xác định bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy.

Các moDC và các tế bào CD4 $^{+}$ được kết hợp với tỷ lệ 1:4 (25.000 moDC; 100.000 tế bào CD4 $^{+}$) và được nuôi cấy trong bốn ngày trong môi trường không có huyết thanh (X-Vivo-20; LONZA; Cat # 04-448Q) với sự có mặt của HuTIG1-IgG1.AA (5 μ g/ml hoặc 15 μ g/ml) hoặc kháng thể kháng PD-L1 (10 μ g/ml; dòng 243.55.S1; SEQ ID NO: 56 và 57) hoặc cả hai HuTIG1-IgG1.AA (15 μ g/ml) và kháng thể kháng PD-L1 (10 μ g/ml) trong 4 ngày trước khi định lượng IFN γ bằng cách sử dụng Cytometric Bead Array (CBA; Human IFN γ Flex Set; BD; Cat# 560111). IgG1 Fc ở người (25 μ g/ml; BioXcell; Cat # BE0096) được sử dụng làm đối chứng.

Như được thể hiện trên Hình. 25, việc khóa HuTIG1-IgG1.AA và kháng thể kháng PD-L1 một cách độc lập làm tăng sự tạo thành IFN γ so với kháng thể đối chứng isotyp thích hợp. Sự kết hợp của HuTIG1-IgG1.AA với kháng thể kháng PD-L1 tăng cường đáng kể và hiệp đồng sự tạo thành IFN γ so với việc áp dụng một liệu pháp đơn lẻ.

Ví dụ 18: HuTIG1-IgG1.AA và HuTIG3-IgG1.AA phát hiện TIGIT biểu hiện trên tế bào bạch huyết và tế bào myeloid ở người

Tổng số PBMC ở người được phân lập từ mười người cho đã được nhuộm màu cùng với các kháng thể liên hợp trực tiếp mô tả tế bào T, tế bào B, tế bào NK và các tập hợp con của dòng myeloid. Các tế bào chết đã được loại trừ bằng cách sử dụng bộ kit Live/dead Fixable Aqua Dead Cell. Biểu hiện của TIGIT được xác định bằng cách sử dụng kháng thể HuTIG1-IgG1.AA và HuTIG3-IgG1.AA liên hợp với thuốc nhuộm Alexa647. Biểu hiện của CD96 được xác định bằng cách sử dụng kháng thể kháng CD96 có sẵn trên thị trường (dòng NK92.39). Trong Hình. 26A, dấu cộng (+) thể hiện biểu hiện trên nền với dấu (+++) thể hiện biểu hiện cao nhất quan sát được. Dấu cộng/trừ (+/-) thể hiện chỉ có một tập hợp con của các tế bào trong quần thể được chỉ định biểu hiện TIGIT hoặc CD96 trên nền, và dấu trừ (-) thể hiện thiếu sự biểu hiện trên nền. Trong tất cả các trường hợp, nền được xác định bằng cách sử dụng phương pháp Fluorescence Minus One đã biến đổi (FMO) trong đó toàn bộ chất có huỳnh quang sử dụng trong bảng nhuộm được thêm vào ngoại trừ kháng thể đích (tức là HuTIG1-IgG1.AA, HuTIG3-IgG1.AA, kháng thể kháng CD96). Thay vào đó, kháng thể đích được thay thế bằng kháng thể đối chứng isotyp đặc hiệu IgG của cùng liên hợp. Hình. 26B biểu thị biểu đồ đại diện của việc nhuộm kháng thể kháng TIGIT trong PBMC ở các mức biểu hiện khác nhau được sử dụng để sắp xếp các mức độ biểu hiện của CD96 trong Hình. 26A. Biểu đồ sáng màu thể hiện FMO được sửa đổi. Biểu đồ tối màu mô tả cho việc nhuộm HuTIG1-IgG1.AA hoặc HuTIG3-IgG1.AA.

Các tế bào khối u được phân tách từ khối u ác tính, ung thư đại trực tràng, ung thư phổi tế bào không nhỏ và ung thư biểu mô tế bào thận được mua từ một nguồn thương mại và được nhuộm màu với các kháng thể liên hợp trực tiếp phân

định tế bào T và các tập hợp con tế bào trình diện kháng nguyên. Các tế bào bạch cầu được xác định bằng cách sử dụng kháng thể kháng CD45 pan isoform (dòng HI30). Các tế bào chết đã được loại trừ bằng cách sử dụng bộ kit Live/dead Fixable Aqua Dead Cell Stain. Biểu hiện của TIGIT được xác định bằng cách sử dụng kháng thể HuTIG1-IgG1.AA liên hợp với thuốc nhuộm Alexa647. Trong tất cả các trường hợp, nền được xác định bằng sử dụng phương pháp Fluorescence Minus One đã biến đổi (FMO) trong đó toàn bộ chất có huỳnh quang được sử dụng trong bảng nhuộm được thêm vào ngoại trừ kháng thể đích (tức là HuTIG1-IgG1.AA). Thay vào đó, kháng thể đích được thay thế bằng kháng thể đối chứng isotyp đặc hiệu IgG của cùng liên hợp. Hình. 32B biểu diễn biểu đồ mô tả cho việc nhuộm kháng thể kháng-TIGIT trên tế bào lympho xâm nhập khối u (TIL) ở các mức biểu hiện khác nhau, được thể hiện trên Hình. 32A. Biểu đồ sáng màu thể hiện FMO được sửa đổi. Biểu đồ tối màu mô tả cho việc nhuộm HuTIG1-IgG1.AA.

Ví dụ 19: Lập bản đồ quyết định kháng nguyên của kháng thể kháng TIGIT ở người HuTIG1-IgG1AA bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy

cADN TIGIT ở người được tạo dòng thành pcADN 3,1 (+) với thể peptit hemagglutinin (HA) gốc 9, tiếp theo là cầu nối peptit gốc 10 được chèn vào sau peptit tín hiệu tự nhiên gốc 21 và trước đầu N của protein TIGIT trưởng thành (SEQ ID NO:58). Các gốc axit amin được quan tâm (T34, Q35, N37, E39, L44, I47, N49, D51, L52, H55, F86, I88, H90, Y92 và T96) trong vùng ngoại bào của TIGIT ở người đã được đột biến với alanin, một axit amin ngay lập tức. Plasmid được tinh chế và được chuyển nhiễm nhanh chóng vào các tế bào CHO-K1 sử dụng thuốc thử chuyển nhiễm Eugene 6 (Promega) theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Biểu hiện đột biến TIGIT ở người gắn thể HA được xác nhận bằng phương pháp phát hiện kháng thể kháng HA.

Đối với phân tích đếm tế bào theo dòng chảy của quyết định kháng nguyên liên kết kháng thể kháng TIGIT, các protein TIGIT ở người được gắn thể HA có hoặc không có đột biến axit amin đơn lẻ được chuyển nhiễm tạm thời vào các tế bào CHO-K1. Sau 24 giờ, các tế bào được chuyển nhiễm được gây treo trong đệm

HBSS (Thermo Fisher Scientific, Cat# 14175095), và được ủ với kháng thể HuTIG1-IgG1.AA ở các nồng độ khác nhau trong thể tích 50 μ L. Sau 1 giờ ủ ở 4°C, các tế bào được rửa và lần ủ thứ hai với 50 μ L kháng thể thứ cấp IgG(H + L) kháng người được liên hợp Alexa488 (Thermo Fisher Scientific, Cat#A-11013) được thực hiện để phát hiện các tế bào liên kết nhờ kháng thể. Các tế bào được ủ bằng kháng thể kháng HA (Sigma, Cat # H7411) được sử dụng làm đối chứng dương, và các tế bào CHO-K1 không chuyển nhiễm được sử dụng làm đối chứng âm. Các tế bào được phân tích trên thiết bị Attune NxT Cytometer (Thermo Fisher Scientific) và dữ liệu được xử lý bằng phần mềm FlowJo. Đối với mỗi đột biến, MFI cho việc liên kết kháng thể bão hòa (cường độ huỳnh quang trung bình) được chuẩn hóa đến 100% POC (phần trăm của đối chứng), và MFI cho đối chứng không có liên kết kháng thể sơ cấp được chuẩn hóa đến 0% POC. Dữ liệu được làm khớp với đường cong sigmoid phi tuyến tính bốn tham số bằng phần mềm khớp đường cong GraphPad Prism 7 sử dụng công thức như sau: $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope})})$.

Trong thí nghiệm này, HuTIG1-IgG1.AA liên kết với TIGIT tự nhiên ở người với $\text{EC}_{50} = 1,28$ nM. Năm trong số mười lăm đột biến alanine TIGIT đơn điểm liên kết với HuTIG1-IgG1.AA với ái lực liên kết giảm đi hơn 10 lần. TIGIT ở người (SEQ ID NO:3) với các đột biến N49A, D51A, H90A, N37A hoặc Q35A liên kết với HuTIG1-IgG1.AA với hiệu lực giảm trong khoảng từ $\text{EC}_{50} = 17,7$ đến 176 nM, tương ứng (Hình. 27). Tất cả các gốc này cùng định vị ở một vùng riêng biệt trên cấu trúc phía trước tấm β của miền ngoại bào TIGIT IgV (Hình. 28).

Ví dụ 20: Xét nghiệm kiểu hình miễn dịch ex vivo của các tập hợp con tế bào T từ máu nguyên chất của động vật linh trưởng không phải con người được dùng HuTIG1-IgG1.AA theo liều.

Một nghiên cứu dược động học được thực hiện bởi hệ thống phòng thí nghiệm Charles River (Reno, NV). Mục tiêu của nghiên cứu này là kiểm tra ex vivo các mẫu máu nguyên chất từ các con khỉ cynomolgus được điều trị với đơn liều 10 mg/kg kháng thể kháng TIGIT (HuTIG1-IgG1.AA) để đánh giá gián tiếp khả năng tiếp nhận thụ thể đối với TIGIT.

Ba con khỉ cái non cynomolgus thí nghiệm (#67, #68 và #69) được tiếp nhận liều tiêm tĩnh mạch đơn kháng thể HuTIG1-IgG1.AA 10 mg/kg. Các mẫu máu nguyên chất trong heparin natri đã được nhận trong vòng 24 giờ của thời điểm lấy mẫu cuối cùng tương ứng với thời điểm trước khi uống thuốc, các ngày 1, 2, 7, 14, 21 và 28 sau thời điểm uống thuốc. Đối với các nghiên cứu về đếm tế bào theo dòng chảy, TIGIT kháng người được gắn nhãn huỳnh quang từ BioLegend (dòng MBSA43) đã được sử dụng để xác định mức độ biểu hiện của TIGIT trên các tập hợp con tế bào lymphocyt máu ở khỉ cynomolgus khi nó thể hiện phản ứng chéo với các loài linh trưởng không phải con người (PLoS Pathog. 2016 Jan; 12(1); BioLegend). Các tế bào sống thu được bằng FACSCalibur và được phân tích bằng phần mềm FlowJo.

Kháng TIGIT (MBSA43) có thể liên kết với cả hai tập hợp con tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ khi nhuộm các mẫu máu nguyên chất trước khi uống thuốc. Sau khi uống thuốc, kháng TIGIT (MBSA43) không thể phát hiện biểu hiện TIGIT trên các tập hợp con tế bào T cho đến ngày 14 hoặc 21 phụ thuộc vào con khỉ khác được kiểm tra với mức độ trở lại mức phát hiện trước khi uống thuốc là ngày 21 hoặc 28 tùy thuộc vào các động vật khác nhau được kiểm tra (Hình. 29B và 30B). Khả năng không phát hiện được biểu hiện TIGIT không phải do sự thay đổi đáng kể của tần số tế bào T CD4⁺ hoặc CD8⁺ (Hình. 29A và 30A, tương ứng) cho thấy rằng bề mặt TIGIT bị chiếm bởi kháng thể điều trị (HuTIG1-IgG1).AA) và không phải do sự suy giảm tập hợp con tế bào T.

Các dữ liệu này ủng hộ rằng việc kháng thể kháng TIGIT HuTIG1-IgG1.AA là có tính phản ứng chéo với khỉ cynomolgus và việc sử dụng TIGIT kháng người từ BioLegend (dòng MBSA43), đem lại đánh giá về tính tiếp nhận thụ thể TIGIT.

Ví dụ 21: Tăng cường độc tính tế bào trung gian tế bào NK bằng HuTIG1-IgG1.AA và HuTIG3-IgG1.AA trên các tế bào đích K562

Xét nghiệm độc tính tế bào trung gian tế bào NK được mô tả trong ví dụ 10 được lặp lại khi sử dụng tế bào NK đã tinh chế thay cho PBMC. Để có được các tế bào NK tinh chế đầy đủ và thích hợp cho các thí nghiệm này, điều quan trọng

là phải sàng lọc PBMC của thể cho có tần số tế bào NK cao, biểu hiện bề mặt TIGIT đầy đủ và biểu hiện CD226 đầy đủ. Máu ngoại vi LeukoPak (bao gồm 10 tỷ tế bào trở lên) đã được thu thập và sự phân lập tế bào NK được thực hiện bằng cách sử dụng Miltenyi autoMACS Pro Separator theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Miltenyi Biotec, catalog # 130-092-657). Các tế bào NK tinh chế được gây treo lại trong môi trường chứa interleukin-2 (IL-2) [200 đơn vị/ml] trong các đĩa 6 giếng. Các đĩa 6 giếng được đặt ở 37°C trong tủ ủ CO₂ 5% trong 24 giờ trước khi thực hiện các nghiên cứu độc tính tế bào tự nhiên với các tế bào thu hoạch từ các giếng.

Sự phân giải của tế bào K562 trung gian bởi các tế bào NK tinh chế được đo khi có và không có kháng thể kháng TIGIT (TIG1). Tế bào NK được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 (Invitrogen) với sự có mặt của interleukin-2 (IL-2) [200 đơn vị/ml] (Peprotech) qua đêm ở 37°C trong tủ ủ CO₂ 5%. Ngày hôm sau, các tế bào K562 được gắn nhãn CFSE và nuôi cấy cùng với tế bào NK (Mục tiêu: NK; một tế bào K562 với hai mươi tế bào NK) trong 4 giờ ở 37°C trong tủ ủ CO₂ 5% khi có Rituxan 10 µg/ml hoặc kháng thể kháng TIGIT được nhân hóa (HuTIG1-IgG1.AA hoặc HuTIG3-IgG1.AA). Rituxan đã được sử dụng như một đối chứng âm vì các tế bào K562 không biểu hiện CD20. Sau thời gian ủ, các tế bào được thu hoạch và nhuộm màu với Sytox Red 5 nM (ThermoFisher) để phân biệt các tế bào đích chết bằng (CFSE+ Sytox Red+). Tỷ lệ phần trăm của các tế bào đích K562 phân giải bởi các tế bào NK được xác định bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy (FACSCalibur; FlowJo Analysis).

Như được biểu diễn trên Hình. 31, khi sử dụng các tế bào NK tinh chế, việc bổ sung các kháng thể kháng TIGIT làm tăng cường độc tính tế bào tự nhiên của tế bào K562 trung gian tế bào NK, điều đó chứng minh rằng các kháng thể kháng TIGIT (HuTIG1-IgG1.AA hoặc HuTIG3-IgG1.AA) có khả năng tăng mức độ tiêu diệt tế bào đích (lần lượt là 28% hoặc 19%, tương ứng với 'Không có kháng thể' hoặc tỷ lệ phần trăm Rituxan được chuẩn hóa) bởi tập con của các tế bào tác động ở người.

TRÌNH TỰ

SEQ ID NO:1: Trình tự axit amin của TIGIT trưởng thành ở người:

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLL
AICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDG
TYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPLLGAMAATLVVICTAVIVVVALTRK
KKALRIHSVEGDLRRKSAGQEEWSPSAPSPPGSCVQAEAAPAGLCGEQR
GEDCAELHDYFNVLSYRSLGNCSFFTETG

SEQ ID NO:2: Trình tự axit amin của tín hiệu peptit ngược dòng của vùng ngoại bào của TIGIT ở người: MGWSWIFFFLSGTASVLS

SEQ ID NO:3: Trình tự axit amin của vùng ngoại bào của TIGIT ở người (hTIGIT):

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNA
DLGWHISPSFKDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTGTG
RIFLEVLESSVAEHGARFQIPTG

SEQ ID NO:4: Trình tự axit amin của cầu nối polypeptit xuôi dòng tức thì của hTIGIT: TGGG

SEQ ID NO:5: Trình tự axit amin của vùng Fc $\gamma 1$ ở người:
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:6: Trình tự axit amin của vùng ngoại bào của CD155 ở người:
DVVVQAPTQVPGFLGDSVTLPCYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGESGS
MAVFHQQTQGPSYSESKRLEFVAARLGAELRNASLRMFGLRVEDEGNYT
CLFVTFPQGSRSVDIWLRLAKPQNTAEVQKVQLTGEPVPMARCVSTG
GRPPAQITWHSDLGGMPNTSQVPGFLSGTVTVTSLWILVPSSQVDGKNV
TCKVEHESFEKPQLLTVNLTVYYPPPEVSISGYDNNWYLGQNEATLTCDA
RSNPEPTGYNWSTTMGPLPPFAVAQGAQLLIRPVDKPIINTTLICNVTNAL
GARQAELTVQVKEGPPSEHSGMSRNA

SEQ ID NO:7: Trình tự axit amin của vùng ngoại bào của CD155 ở người được dung hợp với chuỗi vùng $\gamma 1$ Fc ở người (hCD155-Fc):
 DVVVQAPTQVPGLGDSVTLPCYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGESGS
 MAVFHQTQGPSYSESKRLEFVAARLGAELRNASLRMFGLRVEDEGNYT
 CLFVTFPQGSRSVDIWLRLAKPQNTAEVQKVQLTGEPVPMARCVSTG
 GRPPAQITWHSDLGGMPNTSQVPGFLSGTVTVTSLWILVPSSQVDGKNV
 TCKVEHESFEKPQLLTVNLTVYYPPEVSISGYDNNWYLGQNEATLTCDA
 RSNPEPTGYNWSTTMGPLPPFAVAQGAQLLIRPVDKPINTTLICNVTNAL
 GARQAELTVQVKEGPPSEHSGMSRNATGGGEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:8: Trình tự axit amin của peptit FLAG (FLAG): DYKDDDDDK

SEQ ID NO:9: Trình tự axit amin của tín hiệu liên kết glycosylphosphatidylinositol của CD55 ở người (GPI):
 PNKGS GTTSGTTRLLSGHTCFTLTGLLGTLVTMGLLT

SEQ ID NO:10: Trình tự axit amin của TIG1 VH:

DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSNFGMHWVRQAPEKG
 LEWVAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMY
 YCARMRLDYYAMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO:11: Trình tự axit amin của TIG1 VH CDR1: NFGMH

SEQ ID NO:12: Trình tự axit amin của TIG1 VH CDR2:
 FISSGSSSIYYADTVKG

SEQ ID NO:13: Trình tự axit amin của TIG1 VH CDR3: MRLDYYAMDY

SEQ ID NO:14: Trình tự axit amin của TIG1 VL:
 DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWEYQEKPGKTNKLLIYSG
 STLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAMYYCQQHNEYPWTFGGG
 TKLEIK

SEQ ID NO:15: Trình tự axit amin của TIG1 VL CDR1: RASKSISKYLA

SEQ ID NO:16: Trình tự axit amin của TIG1 VL CDR2: SGSTLQS

SEQ ID NO:17: Trình tự axit amin của TIG1 VL CDR3: QQHNEYPWT

SEQ ID NO:18: Trình tự axit amin của TIG2 VH:
EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVKQSHGKNLEWI
GGINPNNGGTSYNQKFKGRATLTVDKSSSTAYMELRSLTSDDSAVYYC
ARPGWYNYAMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO:19: Trình tự axit amin của TIG2 VH CDR1: EYTMH

SEQ ID NO:20: Trình tự axit amin của TIG2 VH CDR2:
GINPNNGGTSYNQKFKG

SEQ ID NO:21: Trình tự axit amin của TIG2 VH CDR3: PGWYNYAMDY

SEQ ID NO:22: Trình tự axit amin của TIG2 VL:
DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQGVSTAVAWYQQKPGQSPKLLI
YSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYHCQQHYITPWT
GGGTKLEIK

SEQ ID NO:23: Trình tự axit amin của TIG2 VL CDR1: KASQGVSTAVA

SEQ ID NO:24: Trình tự axit amin của TIG2 VL CDR2: SASYRYT

SEQ ID NO:25: Trình tự axit amin của TIG2 VL CDR3: QQHYITPWT

SEQ ID NO:26: Trình tự axit amin của TIG3 VH:
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSDYDMSWVRQTPEKRLEWV
AYISDGGYNTYYPD TVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAIYYCA
RQILLRYYFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:27: Trình tự axit amin của TIG3 VH CDR1: DYDMS

SEQ ID NO:28: Trình tự axit amin của TIG3 VH CDR2:
YISDGGYNTYYPD TVKG

SEQ ID NO:29: Trình tự axit amin của TIG3 VH CDR3: QILLRYYFDY

SEQ ID NO:30: Trình tự axit amin của TIG3 VL:
DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMTCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQ
SPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTSSVKAEDLAVYYCQQYH
SYPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:31: Trình tự axit amin của TIG3 VL CDR1:
KSSQSLLYSSNQKNYLA

SEQ ID NO:32: Trình tự axit amin của TIG3 VL CDR2: WASTRES

SEQ ID NO:33: Trình tự axit amin của TIG3 VL CDR3: QQYHSYPWT

SEQ ID NO:34: Trình tự axit amin của TIG1 VH được thiết kế nhân hóa
(HuTIG1 VH):

MDSRLNLVFLVLILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
NFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNANKNSL
YLQMNSLRAEDTAVYYCARMRLDYYAMDYWGQGTMVTVSS

SEQ ID NO:35: Trình tự axit amin của HuTIG1 VH trưởng thành:
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEW
VAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARMRLDYYAMDYWGQGTMVTVSS

SEQ ID NO:36: Trình tự axit amin của TIG1 VL (HuTIG1 VL) được thiết
kế nhân hóa (VLTG1):
MRFQVQVLGLLLLWISGAQCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIS
KYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP
EDFATYYCQQHNEYPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:37: Trình tự axit amin của VL HuTIG1 trưởng thành:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSISKYLAWYQQKPGKAPKLLIYS
GSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGG
GTKVEIK

SEQ ID NO:38: Trình tự nucleotit của gen HHTH1 tổng hợp trong
pHuTIG1.AA:

ACTAGTACCACCATGGACTCCAGGCTCAATCTGGTTTTCTTGTCTT
ATTCTGAAAGGCGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGG
AGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
CTGGATTCACTTTCAGTAACTTTGGAATGCACTGGGTTCGACAGGCTC
CAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTCGATTTCATTAGTAGTGGCAGTAGT
TCCATCTACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAG

AGACAATGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGAGG
GCTGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCAAGAATGAGACTGGATTA
CTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCATGGTCACCGTCTCCT
CAGGTAAGTATGGCCTCTAAGCTT

SEQ ID NO:39: Trình tự nucleotit của gen HuTIG1 VL tổng hợp trong pHuTIG1.AA:

GCTAGCACCACCATGAGGTTCCAGGTTTCAGGTTCTGGGGCTCCTTCT
GCTCTGGATCTCAGGAGCCCAGTGTGATATCCAGATGACCCAGTCTC
CATCTTCTCTTTCTGCATCTGTTGGAGATAGAGTCACTATTACTTGCA
GGGCAAGTAAGAGCATTAGCAAATATCTGGCCTGGTATCAACAGAA
ACCTGGGAAAGCTCCTAAGCTGCTTATCTACTCTGGGTCCACTTTGCA
ATCTGGAGTTCCATCAAGATTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATT
TCACTCTCACCATCAGTAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACCTATT
ACTGTCAACAGCATAATGAATACCCCTGGACCTTCGGCGGAGGCACC
AAAGTCGAAATCAAACGTAAGTAGAATCCAAAGAATTC

SEQ ID NO:40: Trình tự axit amin của chuỗi nặng gamma trưởng thành của HuTIG1-IgG1.AA được mã hóa trong pHuTIG1.AA:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEW
VAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARMRLDYYAMDYWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:41: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kappa trưởng thành của HuTIG1-IgG1.AA được mã hóa trong pHuTIG1.AA:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSISKYLAWEYQQKPGKAPKLLIYS

GSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGG
 GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTH
 QGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:42: Trình tự axit amin của TIG3 VH được thiết kế nhân hóa
 (HuTIG3 VH):

MNFGRLRLIFLVLTLKGVNCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFS
 DYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISDGGYNTYYPD TVKGRFTISRDN AKN
 SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQILLRYYFDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:43: Trình tự axit amin của HuTIG3 VH trưởng thành:
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYDMSWVRQAPGKGLEW
 VAYISDGGYNTYYPD TVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY
 CARQILLRYYFDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:44: Trình tự axit amin của TIG3 VL được thiết kế nhân hóa
 (HuTIG3 VL):

MDSQAQVLMLLLLWVSGTCGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSL
 LYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFT
 LTISLQPEDFAVYYCQQYHSYPWTFGGG GTKVEIK

SEQ ID NO:45: Trình tự axit amin của HuTIG3 VL trưởng thành:
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSL LYSSNQKNYLAWYQQKPGKA
 PKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYHS
 YPWTFGGG GTKVEIK

SEQ ID NO:46: Trình tự nucleotit của gen HuTIG3 VH tổng hợp trong
 pHuTIG3.AA:

ACTAGTACCACCATGAACTTTGGGCTCAGATTGATTTTCCTTGTCCTT
 ACTCTGAAAGGCGTGAAGTGTGAAGTCCAGCTCGTGGAGTCTGGGGG
 AGGCCTTGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT
 CTGGATTCGCTTTCAGTGACTATGACATGTCTTGGGTTCGCCAGGCTC
 CTGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCGCATACATTAGTGATGGCGGTTAT
 AACACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAG

AGACAATGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGG
 CTGAGGACACAGCCGTCTATTACTGTGCAAGACAAATTCTGCTGCGG
 TACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTGTCACAGTCTCCTC
 AGGTGAGTCCTTAAAACAAGCTT

SEQ ID NO:47: Trình tự nucleotit của gen HuTIG3 VL tổng hợp trong pHuTIG3.AA:

GCTAGCACCACCATGGATTACAGGCCAGGTTCTTATGCTGCTGCT
 GCTCTGGGTTTCTGGAACCTGTGGGGACATTCAGATGACACAGTCTC
 CATCCTCCCTGTCTGCCTCAGTTGGAGACAGGGTTACTATCACCTGCA
 AGTCCAGTCAGAGTCTTCTGTATAGTAGCAATCAAAGAAGTACTTG
 GCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGGCTCCTAAACTGCTGATTTA
 CTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTAGTCGCTTCTCAGGCA
 GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGCCT
 GAAGACTTCGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATCATAGCTATCCCTGG
 ACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAACGTAAGTAGAATC
 CAAAGAATTC

SEQ ID NO:48: Trình tự axit amin của chuỗi nặng gamma trưởng thành của HuTIG3-IgG1.AA được mã hóa trong pHuTIG3.AA:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYDMSWVRQAPGKGLEW
 VAYISDGGYNTYYPDTVKGRTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAVYY
 CARQILLRYYFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
 YTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:49: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kappa trưởng thành của HuTIG3-IgG1.AA được mã hóa trong pHuTIG3.AA:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGKA
PKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYHS
YPWTFGGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:50: Trình tự axit amin của vùng ngoại bào của TIGIT ở người
với đột biến Q35A:

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTAVNWEQQDQLL
AICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDG
TYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPTG

SEQ ID NO:51: Trình tự axit amin của vùng ngoại bào của TIGIT ở người
với đột biến N37A:

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVAWEQQDQLL
AICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDG
TYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPTG

SEQ ID NO:52: Trình tự axit amin của vùng ngoại bào của TIGIT ở người
với đột biến Q39A:

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNAQQDQLL
AICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDG
TYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPTG

SEQ ID NO:53: Trình tự axit amin của vùng ngoại bào của TIGIT ở người
với đột biến N49A:

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLL
AICAADLGWHISPSFKDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDG
TYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPTG

SEQ ID NO:54: Trình tự axit amin của vùng ngoại bào của TIGIT ở người với đột biến D51A:

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLL
AICNAALGWHISPSFKDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPD
GTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPTG

SEQ ID NO:55: Trình tự axit amin của vùng ngoại bào của TIGIT ở người với đột biến F86A:

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLL
AICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYACIYHTYPD
GTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPTG

SEQ ID NO:56: Trình tự axit amin của chuỗi nặng kháng thể kháng người PD-L1 trưởng thành

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKG
LEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA
VYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:57: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kháng thể kháng người PD-L1 trưởng thành

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPK
LLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLFTPPT
FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ

WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLKADYEEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:58: Trình tự axit amin của các peptit tín hiệu, peptit thẻ HA và peptit cầu nối được dung hợp với TIGIT trưởng thành ở người:

MRWCLLLIWAQGLRQAPLASGYPDYAGGGGSGGGGSMMT
GTIETTNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLG
WHISPSFKDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFL
EVLESSVAEHGARFQIPLLGAMAATLVVICTAVIVVVALTRKKKALRIHS
VEGDLRRKSAGQEEWSPSAPSPPGSCVQAEAAPAGLCGEQRGEDCAEL
HDYFNVLSYRSLGNCSFFTETG

SEQ ID NO:59: Trình tự axit amin của các vùng ngoại bào của TIGIT ở người được dung hợp với vùng Fc của chuỗi $\gamma 1$ globulin miễn dịch ở người (hTIGIT-Fc):

MMTGTIETTNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNA
DLGWHISPSFKDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTG
RIFLEVLESSVAEHGARFQIPTGTGGGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:60: Trình tự axit amin của chuỗi nặng gamma trưởng thành của

HuTIG1-IgG1.Q:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEW
VAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARMRLDYYAMDYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS

LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
 YTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:61: Trình tự axit amin của chuỗi nặng gamma trưởng thành
 của HuTIG1-IgG4.P:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEW
 VAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
 ARMRLDYYAMDYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTEQK
 SLSLSLGK

SEQ ID NO:62: Trình tự axit amin của chuỗi nặng gamma trưởng thành
 của HuTIG3-IgG1.Q:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYDMSWVRQAPGKGLEW
 VAYISDGGYNTYYPD TVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY
 CARQILLRYYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP

ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:63: Trình tự axit amin của chuỗi nặng gamma của HuTIG3-IgG4.P:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYDMSWVRQAPGKGLEW
VAYISDGGYNTYYPD TVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY
CARQILLRYYFDYWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG
CLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSLGK

SEQ ID NO:64: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kappa trưởng thành của
HuTIG1-IgG1.Q và HuTIG1-IgG4.P:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSISKYLA WYQQKPGKAPKLLIYS
GSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGG
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:65: Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ kappa trưởng thành của
HuTIG3-IgG1.Q và HuTIG3-IgG4.P:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSSNQKNYLA WYQQKPGKA
PKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFAVYYCQQYHS
YPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Yêu cầu bảo hộ

1. Kháng thể đơn dòng liên kết với polypeptit TIGIT bao gồm:

- (a) chuỗi nặng CDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:11, chuỗi nặng CDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:12, chuỗi nặng CDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:13, chuỗi nhẹ CDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:15, chuỗi nhẹ CDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:16, và chuỗi nhẹ CDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:17;
- (b) chuỗi nặng CDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:19, chuỗi nặng CDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:20, chuỗi nặng CDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:21, chuỗi nhẹ CDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:23, chuỗi nhẹ CDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:24, và chuỗi nhẹ CDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:25; hoặc
- (c) chuỗi nặng CDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:27, chuỗi nặng CDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:28, chuỗi nặng CDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:29, chuỗi nhẹ CDR1 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:31, chuỗi nhẹ CDR2 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:32, và chuỗi nhẹ CDR3 chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:33.

2. Kháng thể đơn dòng theo điểm 1(a), trong đó kháng thể đơn dòng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% với SEQ ID NO:35 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% với SEQ ID NO:37.

3. Kháng thể đơn dòng theo điểm 1(a), trong đó kháng thể đơn dòng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%

với SEQ ID NO:35 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với SEQ ID NO:37.

4. Kháng thể đơn dòng theo điểm 1(a), trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:35 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành chứa trình tự axit amin SEQ ID NO:37.

5. Kháng thể đơn dòng theo điểm 1, trong đó kháng thể đơn dòng chứa:

- (a) vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành SEQ ID NO:14 và vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành SEQ ID NO:10; hoặc
- (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành SEQ ID NO:22 và vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành SEQ ID NO:18; hoặc
- (c) vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành SEQ ID NO:30 và vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành SEQ ID NO:26.

6. Kháng thể đơn dòng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể có một hoặc nhiều đặc tính sau:

- (a) ức chế liên kết của TIGIT với CD155;
- (b) làm tăng sự hoạt hóa tế bào T nội tại khi có mặt các tế bào trình diện kháng nguyên biểu hiện CD155 được đo bằng sự tạo thành IL-2;
- (c) làm tăng sự hoạt hóa tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên được đo bằng sự tạo thành IL-12;
- (d) làm tăng sự hoạt hóa tế bào tiêu diệt tự nhiên được đo bằng sự tạo thành bất kỳ trong số IL-2, IL-6, TNF α hoặc IFN γ ;
- (e) làm tăng sự tạo thành tế bào T của ít nhất một xytokin gây viêm; và
- (f) làm giảm sự tạo thành tế bào T của ít nhất một xytokin kháng viêm.

7. Kháng thể đơn dòng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nặng, tạo thành chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:40 trong trường hợp mà lysin đầu

C có thể có mặt hoặc không, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nhẹ, tạo thành chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO:41.

8. Kháng thể đơn dòng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nặng, tạo thành chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:60 trong trường hợp mà lysin đầu C có thể có mặt hoặc không, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nhẹ, tạo thành chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO:64; hoặc

(b) vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nặng, tạo thành chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:61 trong trường hợp mà lysin đầu C có thể có mặt hoặc không, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nhẹ, tạo thành chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO:64.

9. Kháng thể đơn dòng theo điểm 6, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nặng, tạo thành chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:40 trong trường hợp mà lysin đầu C có thể có mặt hoặc không, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nhẹ, tạo thành chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO:41.

10. Kháng thể đơn dòng theo điểm 6, trong đó

(a) vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nặng, tạo thành chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:60 trong trường hợp mà lysin đầu C có thể có mặt hoặc không, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nhẹ, tạo thành chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO:64; hoặc

(b) vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được liên kết với vùng hằng định chuỗi nặng, tạo thành chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:61 trong trường hợp mà lysin đầu C có thể có mặt hoặc không, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành

được liên kết với vùng hằng định chuỗi nhẹ, tạo thành chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO:64.

11. Kháng thể đơn dòng theo điểm 1, trong đó kháng thể đơn dòng là kháng thể khảm, kháng thể được nhân hóa, kháng thể có bề mặt thay đổi gốc hoặc là kháng thể ở người; và/hoặc kháng thể đơn dòng (i) có isotyp kappa IgG1 ở người; (ii) là kháng thể nguyên vẹn; hoặc (iii) là kháng thể chuỗi đơn, mảnh Fab hoặc $F(ab')_2$.

12. Dược phẩm để điều trị ung thư chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 và chất mang dược dụng.

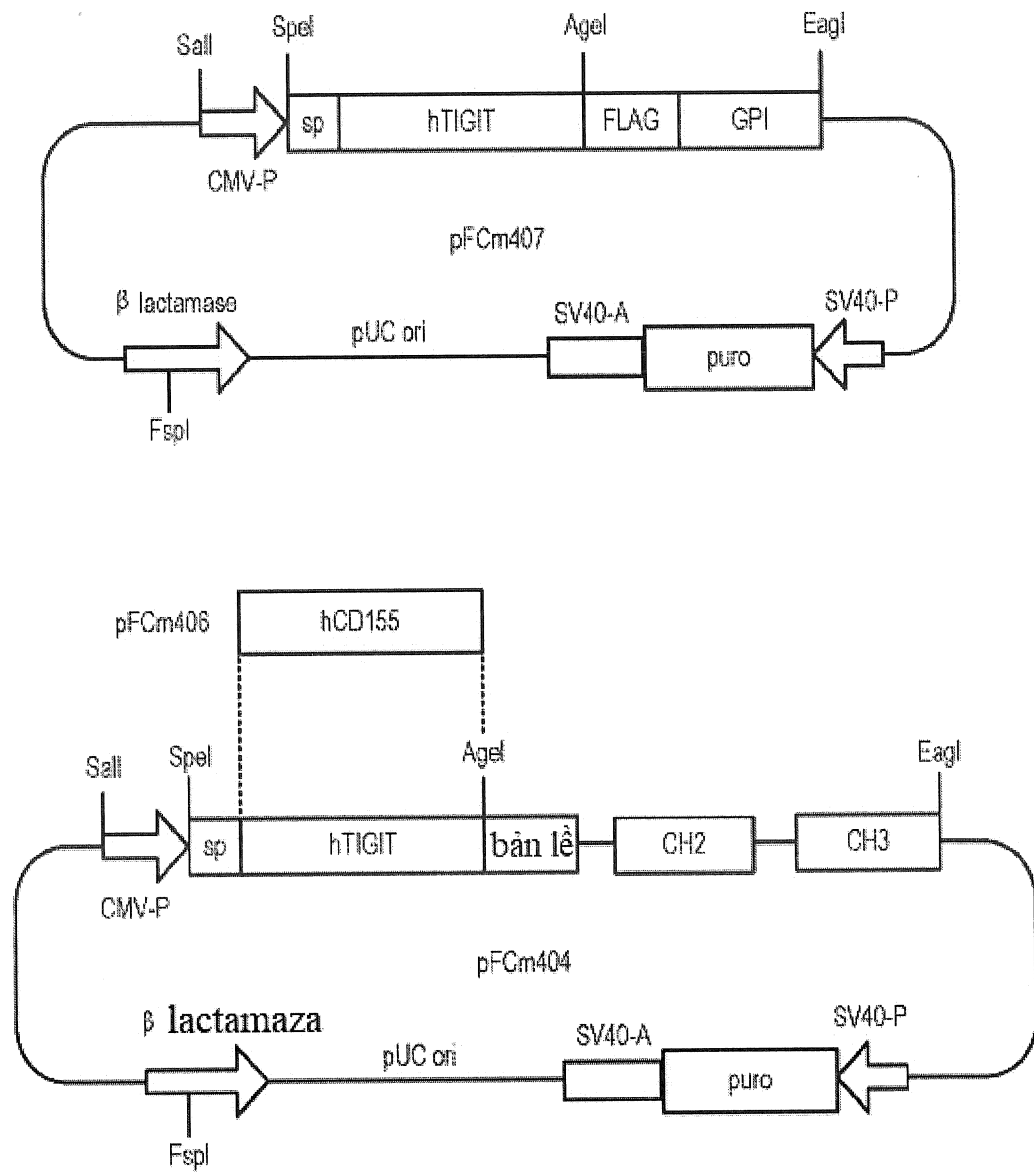
13. Dược phẩm để điều trị ung thư chứa kháng thể theo điểm 6 và chất mang dược dụng.

14. Dược phẩm để điều trị ung thư chứa kháng thể theo điểm 7 và chất mang dược dụng.

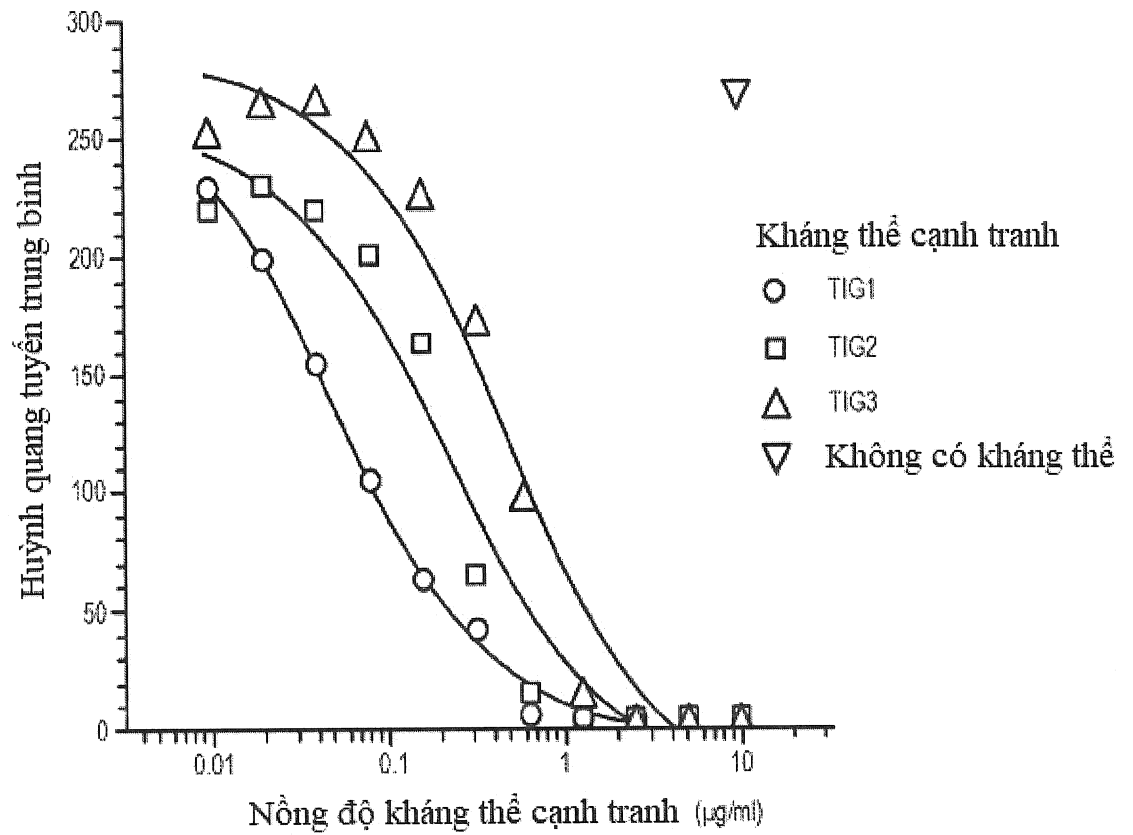
15. Dược phẩm để điều trị ung thư chứa kháng thể theo điểm 8 và chất mang dược dụng.

16. Dược phẩm để điều trị ung thư chứa kháng thể theo điểm 9 và chất mang dược dụng.

17. Dược phẩm để điều trị ung thư chứa kháng thể theo điểm 10 và chất mang dược dụng.

**Hình. 1**

Liên kết của hCD155-Fc với các tế bào
NS0/hTIGIT có mặt kháng thể kháng TIGIT



Hình. 2

TIG1 VH

	1	2	3
123456789	0123456789	0123456789	0123456789
DVQLVESGG	GLVQPGGSRK	LSCAASGFTF	<u>SNFGMHVVRQ</u>
			CDR1

4	5	6	7
0123456789	01223456789	0123456789	0123456789
	a		
APEKGLEWVA	<u>FISSGSSSIYY</u>	ADTVKGRFTI	SRDNPKNLTF
	CDR2		

		1	1
8	9	0	1
0122223456789	0123456789	000123456789	0123
abc		ab	
LQMTSLRSEDAM	YYCARMRLDY	<u>YAMDYWGQGTSV</u>	TVSS
		CDR3	

Hình. 3

TIG1 VL

	1	2	3
123456789	0123456789	0123456789	0123456789
DVQITQSPS	YLAAS PGETI	TINCRASKSI	SKYLAWYQEK
		CDR1	

4	5	6	7
0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
PGKTNKLLIY	<u>SGSTLQSGIP</u>	SRFSGSGSGT	DFTLTISSLE
	CDR2		

		1
8	9	0
0123456789	0123456789	01234567
PEDFAMYYCQ	<u>QHNEYPWTFG</u>	GGTKLEIK
	CDR3	

Hình. 4

TIG2 VH

	1	2	3
123456789	0123456789	0123456789	0123456789
EVQLQQSGP	ELVKPGASVK	ISCKTSGYTF	<u>TEYTMHWVKQ</u> CDR1

4	5	6	7
0123456789	01223456789	0123456789	0123456789
	a		
SHGKNLEWIG	<u>GINPNNGGTSY</u>	<u>NQKFGRATL</u>	TVDKSSSTAY
	CDR2		

		1	1
8	9	0	1
0122223456789	0123456789	000123456789	0123
abc		ab	
MELRSLTSDDSAV	YYCARPGWYN	<u>YAMDYWGQGTSV</u>	TVSS
		CDR3	

Hinh. 5

TIG2 VL

	1	2	3
123456789	0123456789	0123456789	0123456789
DIVMTQSHK	FMSTSVGDRV	NITCKASQGV	STAVAWYQQK

CDR1

4	5	6	7
0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
PGQSPKLLIY	SASYRYTGVP	DRFTGSGSGT	DFTFTISSVQ

CDR2

		1
8	9	0
0123456789	0123456789	01234567
AEDLAVYHCQ	QHYITPWTFG	GGTKLEIK

CDR3

Hình. 6

TIG3 VH

	1	2	3
123456789	0123456789	0123456789	0123456789
EVQLVESGG	GLVKPGGSLK	LSCAASGFAF	<u>SDYDMSWVRQ</u> CDR1

4	5	6	7
0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
	a		
TPEKRLEWVA	<u>YISDGGYNTYY</u>	<u>PDTVKGRFTI</u>	SRDNAKNTLY
	CDR2		

8	9	10	11
0122223456789	0123456789	000123456789	0123
abc		ab	
LQMSSLKSEDTAI	YYCARQILLR	<u>YYFDYWGGTTL</u>	TVSS
	CDR3		

Hình. 7

TIG3 VL

	1	2	3
123456789	0123456789	0123456777777789	0123456789
		abcdef	
DVMSQSPS	SLAVSVGEKV	TMTCKSSQSLLYSSNQ	<u>KNYLAWYQ GK</u>
			CDR1

4	5	6	7
0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
PGQSPKLLIY	<u>WASTRES</u> GVP	DRFTGSGSGT	DFTLTISVK
	CDR2		

		1
8	9	0
0123456789	0123456789	01234567
AEDLAVYYCQ	<u>QYHSYPWTF</u> G	GGTKLEIK
	CDR3	

Hình. 8

Gen HuTIG1 VH

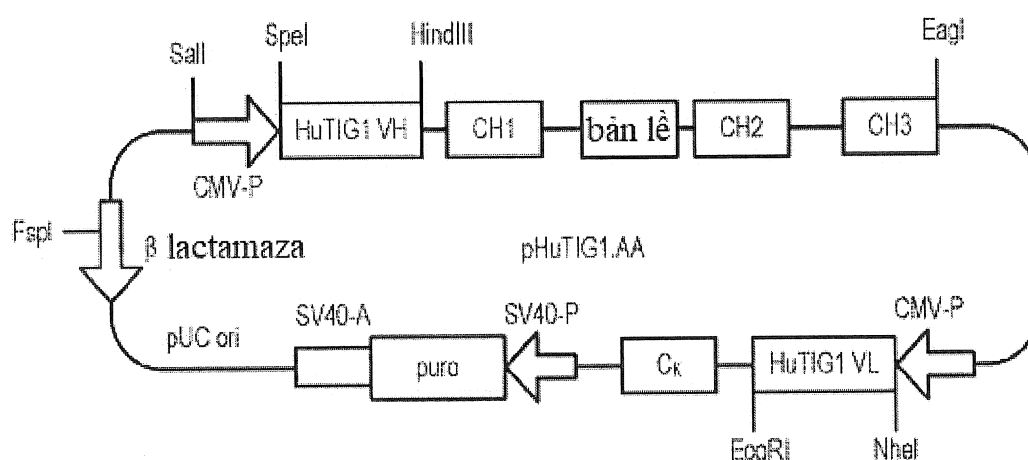
ACTAGTACCACCATGGACTCCAGGCTCAATCTGGTTTTCTTGTCCTTATTCTGAAAGGC
 M D S R L N L V F L V L I L K G
 GTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGGTCC
 V Q C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S
 CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTTTGGAATGCACTGGGTT
 L R L S C A A S G F T F S N F G M H W V
 CGACAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGATTCACTAGTAGTGGCAGTAGTTCC
 R Q A P G K G L E W V A F I S S G S S S
 ATCTACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC
 I Y Y A D T V K G R F T I S R D N A K N
 AGCCTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCA
 S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
 AGAATGAGACTGGATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCATGGTCACCGTC
 R M R L D Y Y A M D Y W G Q G T M V T V
 TCCTCAGGTAAGTATGGCCTCTAAGCTT (SEQ ID NO:38)
 S S (SEQ ID NO:34)

Hình. 9A

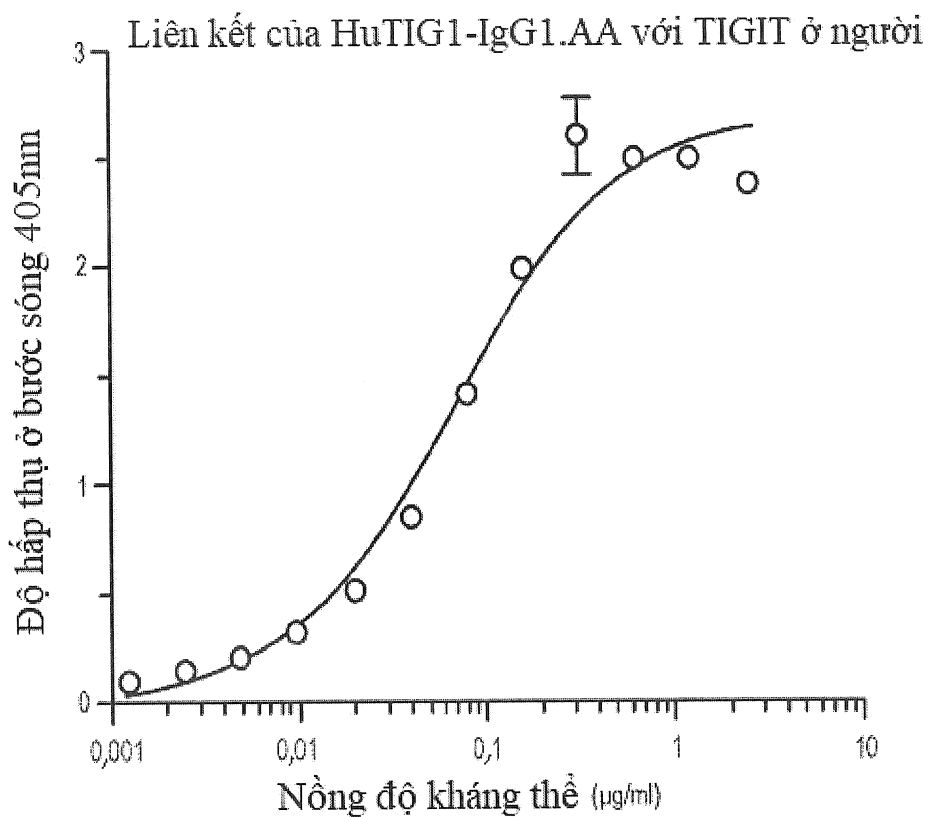
Gen HuTIG1 VL

GCTAGCACCACCATGAGGTTCCAGGTTCCAGGTTCTGGGGCTCCTTCTGCTCTGGATCTCA
 M R F Q V Q V L G L L L L W I S
 GGAGCCCAGTGTGATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTCTTTCTGCATCTGTTGGA
 G A Q C D I Q M T Q S P S S L S A S V G
 GATAGAGTCACTATTACTTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAGCAAATATCTGGCCTGGTAT
 D R V T I T C R A S K S I S K Y L A W Y
 CAACAGAAACCTGGGAAAGCTCCTAAGCTGCTTATCTACTCTGGGTCCACTTTGCAATCT
 Q Q K P G K A P K L L I Y S G S T L Q S
 GGAGTTCCATCAAGATTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGT
 G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S
 AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACCTATTACTGTCAACAGCATAATGAATACCCCTGG
 S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H N E Y P W
 ACCTTCGGCGGAGGCACCAAAGTCGAAATCAAACGTAAGTAGAATCCAAAGAATTC (SEQ ID NO:39)
 T F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:36)

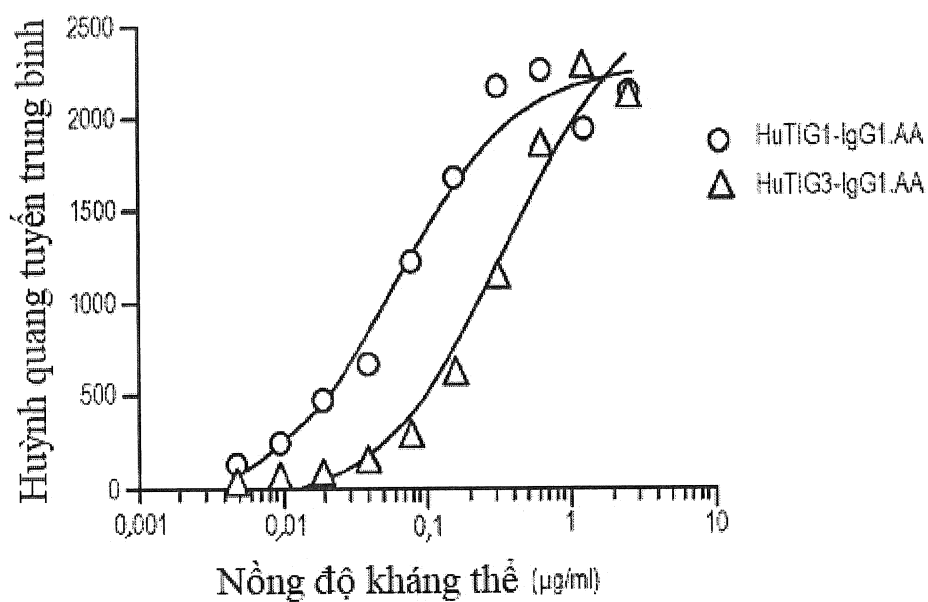
Hình. 9B



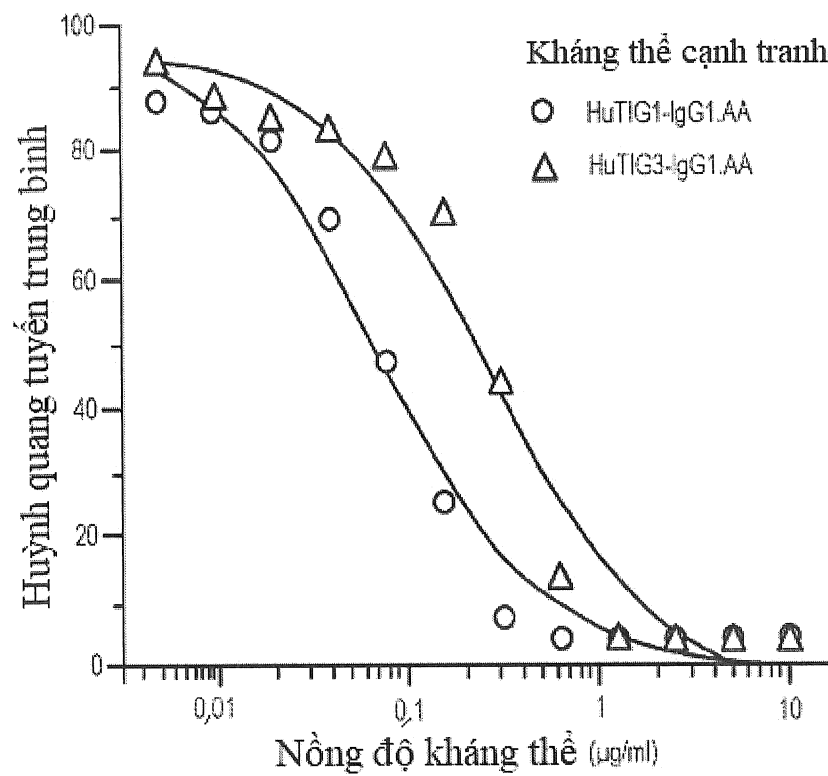
Hình. 10

**Hình. 11**

Phân tích FACS đối với liên kết với các tế bào NS0-hTIGIT

**Hình. 12**

Liên kết của CD155-Fc gắn nhãn FITC với các tế bào NS0-hTIGIT



Hình. 13

Gen HuTIG3 VH

ACTAGTACCACCATGAACTTTGGGCTCAGATTGATTTTCCTTGTCTTACTCTGAAAGGC
 M N F G L R L I F L V L T L K G
 GTGAACTGTGAAGTCCAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTTGTGCAGCCTGGAGGGTCC
 V N C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S
 CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTGCTTTTCAGTGACTATGACATGTCTTGGGTT
 L R L S C A A S G F A F S D Y D M S W V
 CGCCAGGCTCCTGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATAACATTAGTGATGGCGGTTATAAC
 R Q A P G K G L E W V A Y I S D G G Y N
 ACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC
 T Y Y P D T V K G R F T I S R D N A K N
 TCCCTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGTCTATTACTGTGCA
 S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
 AGACAAATTCTGCTGCGGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTGTCACAGTC
 R Q I L L R Y Y F D Y W G Q G T T V T V
 TCCTCAGGTGAGTCCTTAAACAAAGCTT (SEQ ID NO:46)
 S S (SEQ ID NO:42)

Hình. 14A

Gen HuTIG3 VL

GCTAGCAACCAACCATGGATTACAGGCCAGGTTCTTATGCTGCTGCTGCTCTGGGTTTCT

M D S Q A Q V L M L L L L W V S

GGAACCTGTGGGGACATTCAGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCCTCAGTTGGA

G T C G D I Q M T Q S P S S L S A S V G

GACAGGGTTACTATCACTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTTCTGTATAGTAGCAATCAAAAG

D R V T I T C K S S Q S L L Y S S N Q K

AACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAGGCTCCTAAACTGCTGATTTACTGG

N Y L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y W

GCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTAGTCGCTTCTCAGGCAGTGGATCTGGGACAGAT

A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D

TTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGACTTCGCAGTTTATTACTGTCAGCAA

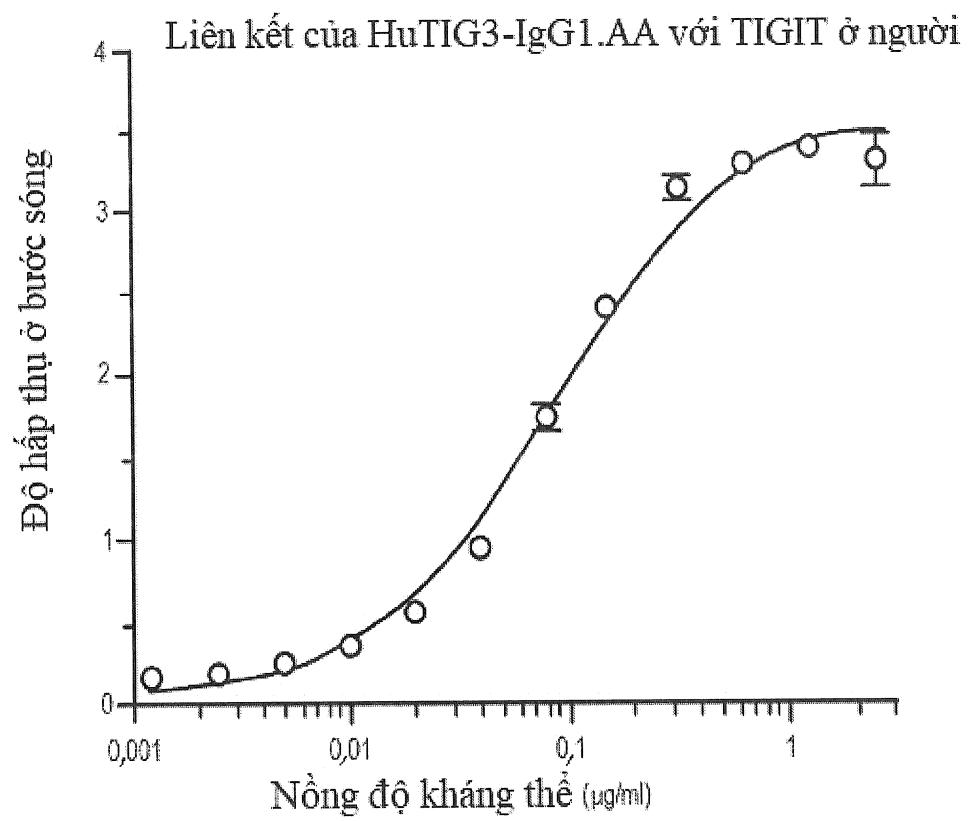
F T L T I S S L Q P E D F A V Y Y C Q Q

TATCATAGCTATCCCTGGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAACGTAAGTAG

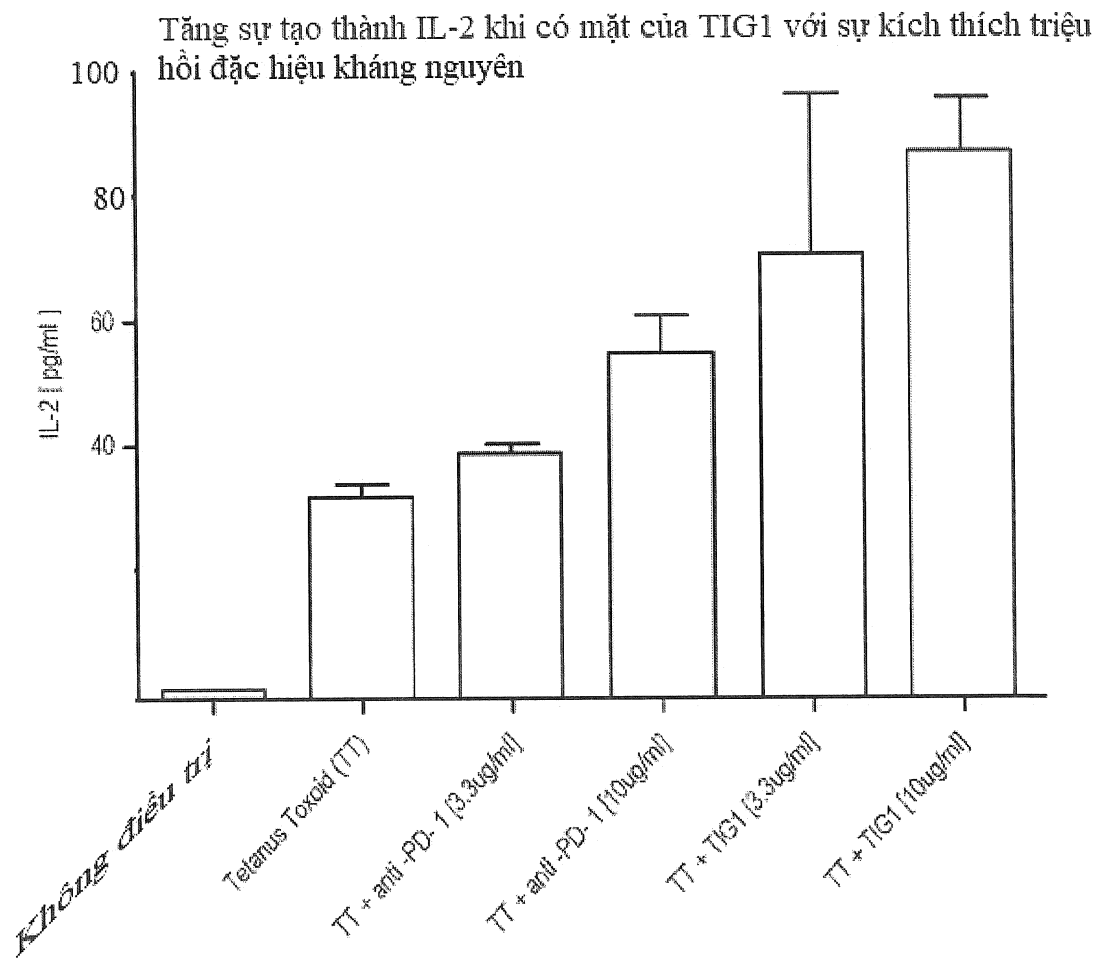
Y H S Y P W T F G G G T K V E I K (SEQ ID NO: 44)

AATCCAAAGAATTC (SEQ ID NO: 47)

Hình. 14B

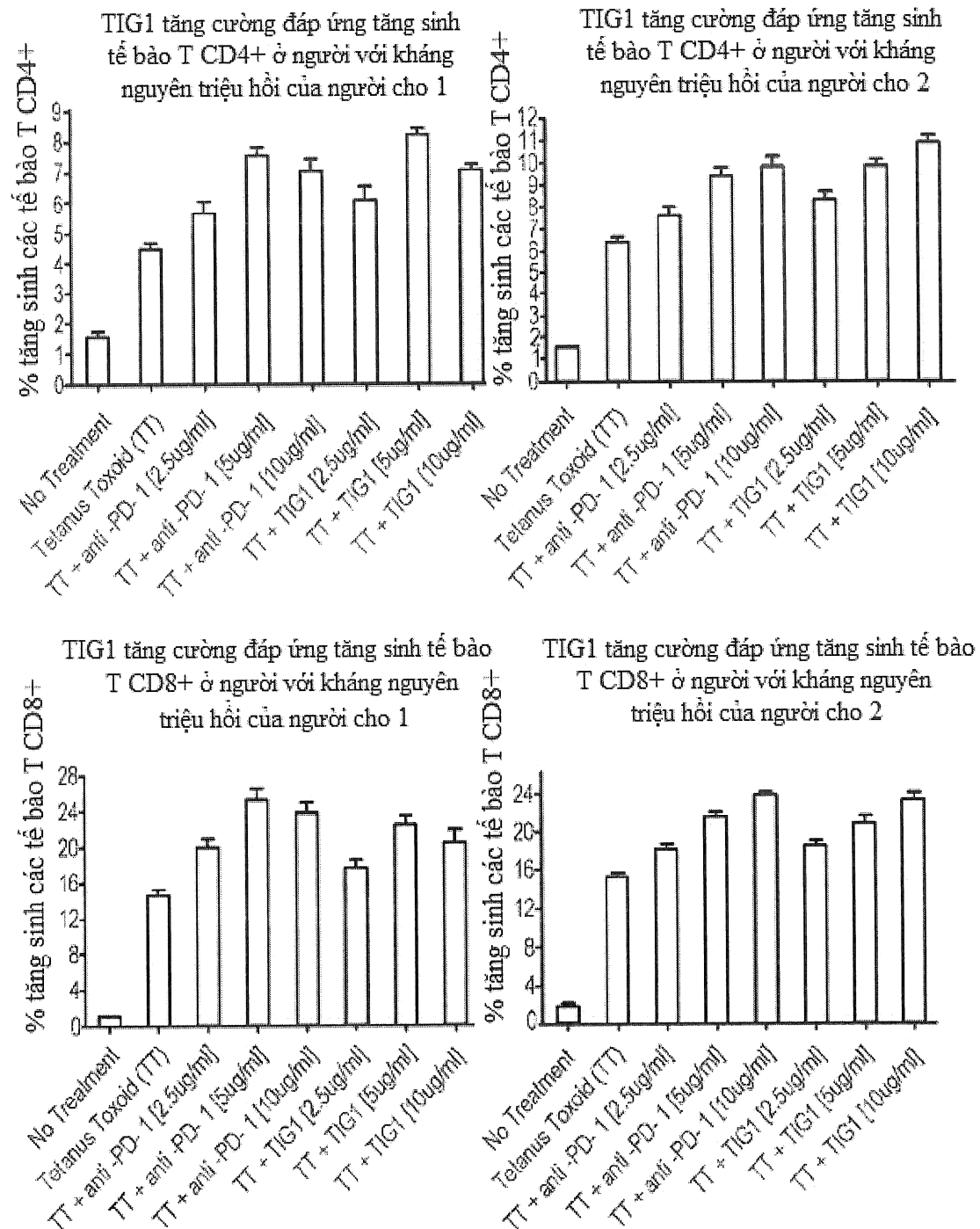


Hình. 15

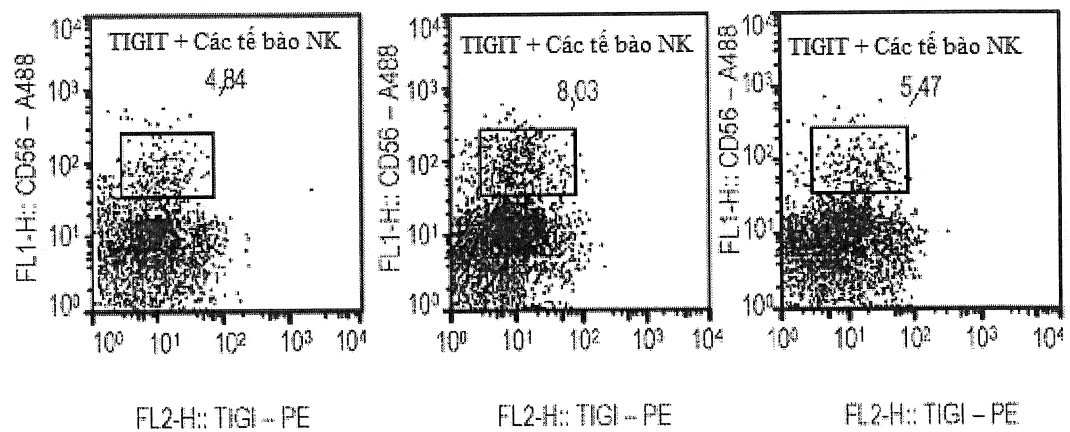
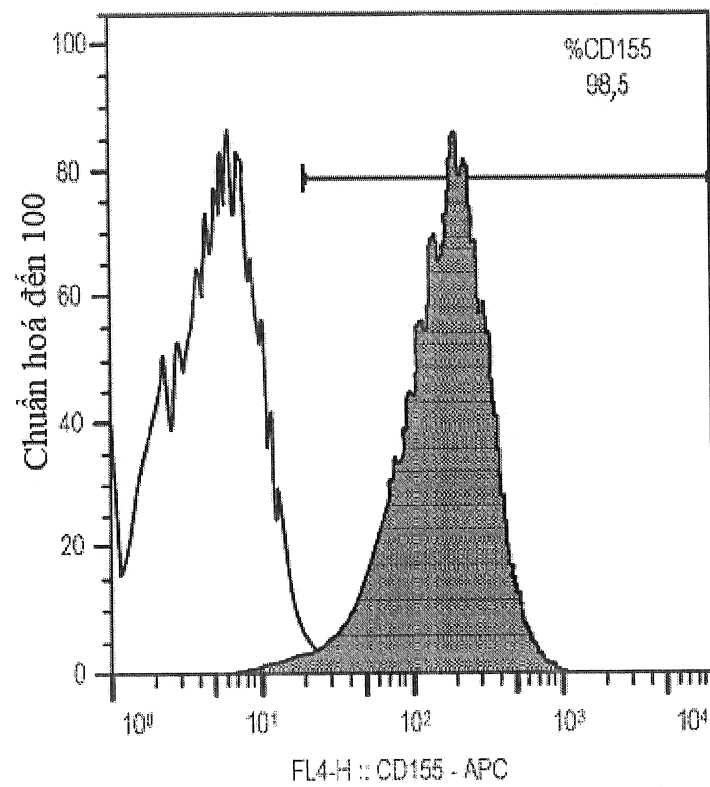


Hình. 16

Tăng cường sự tăng sinh tế bào T CD4+ và CD8+ bởi TIG1
với sự kích thích triệu hồi đặc hiệu kháng nguyên



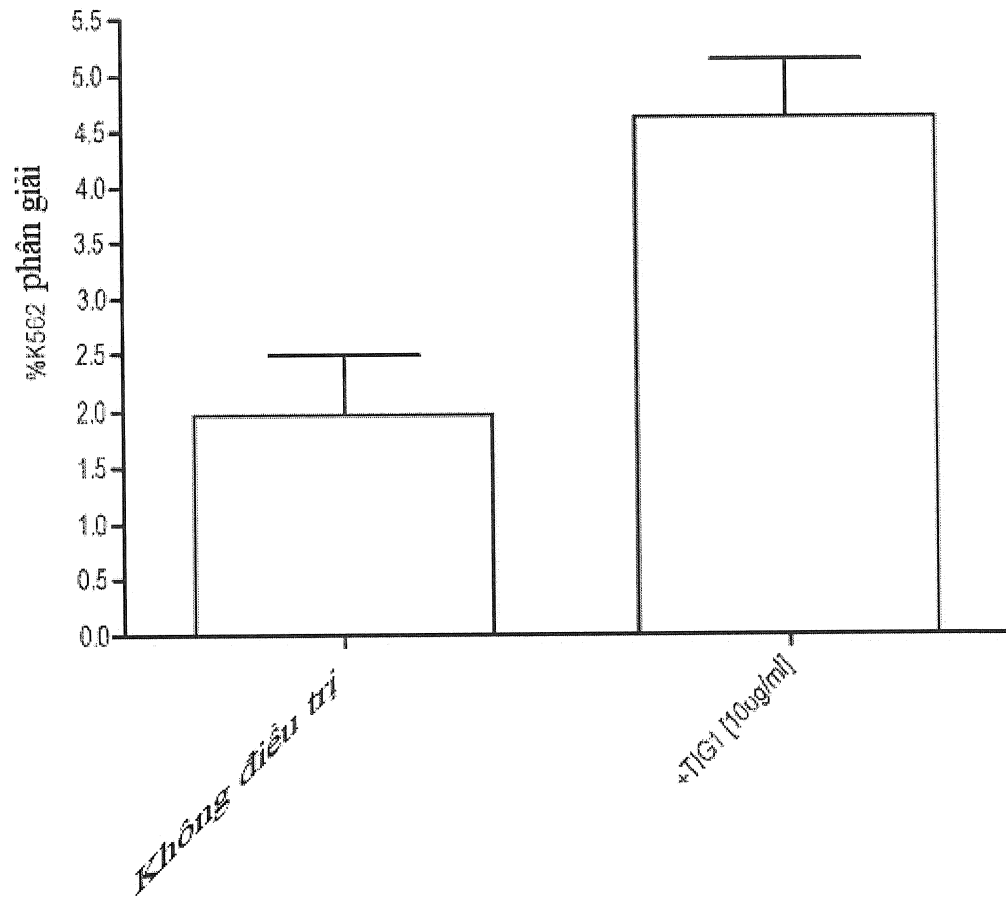
Hình. 17



Hình. 18

Tăng cường độc tính tế bào trung gian tế bào NK
bởi TIG1 trên các tế bào đích K562

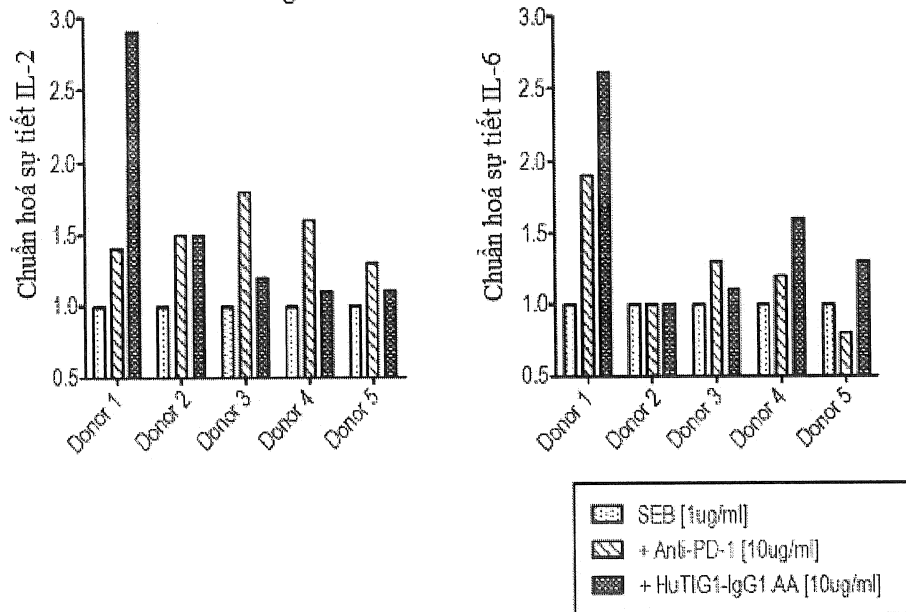
Tăng cường độc tính tế bào tự nhiên tế bào NK
có mặt TIG1 với các tế bào K562



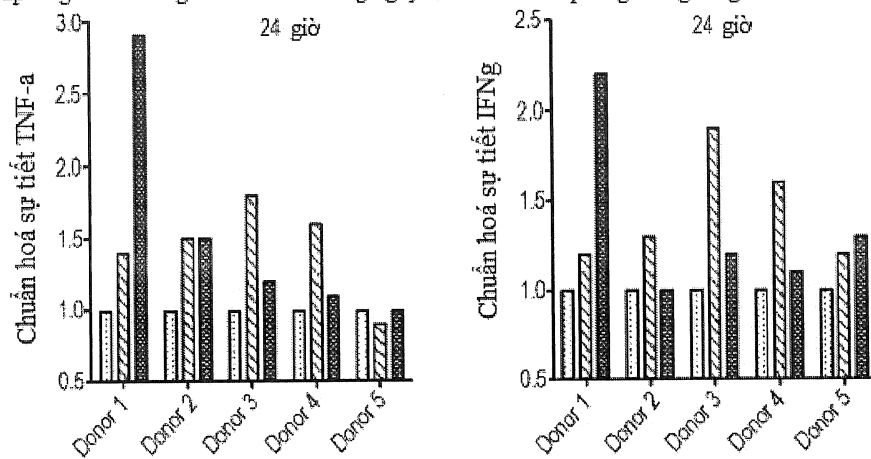
Hình. 19

HuTIG1.AA tăng khả năng đáp ứng tác động xytokin

Đáp ứng IL-2 ở người với siêu kháng nguyên SEB Đáp ứng IL-6 ở người với siêu kháng nguyên SEB
24 giờ 24 giờ



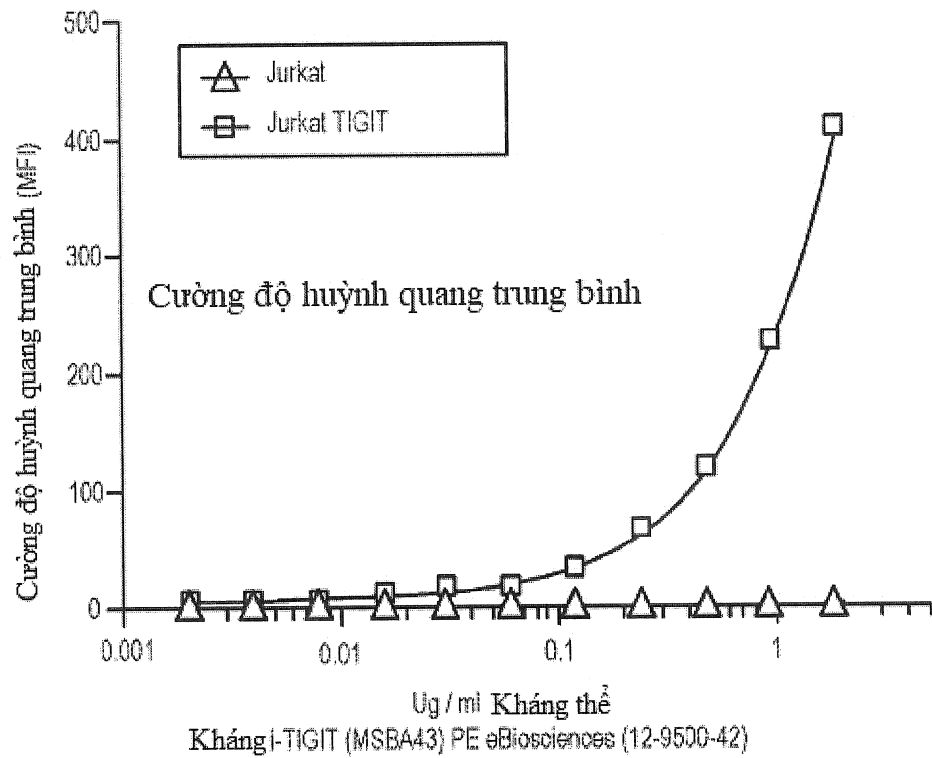
Đáp ứng TNF α ở người với siêu kháng nguyên SEB Đáp ứng IFN γ ở người với siêu kháng nguyên SEB
24 giờ 24 giờ



Hình. 20

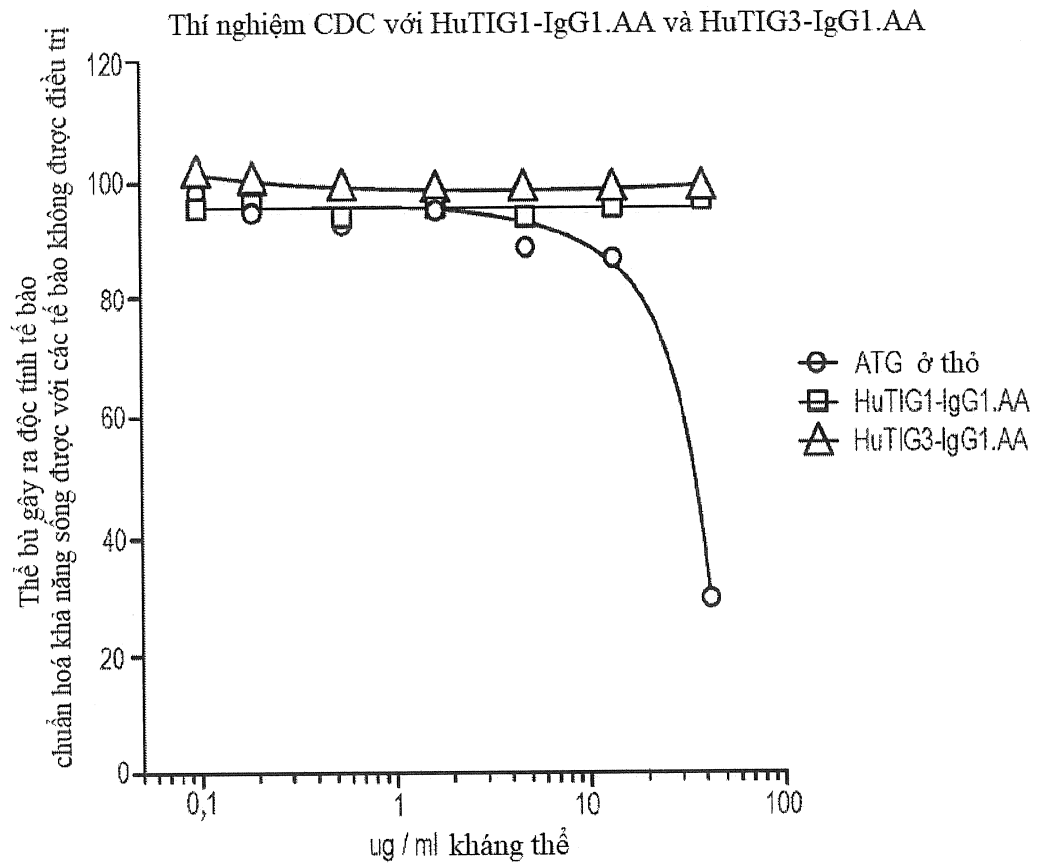
Dòng tế bào Jurkat-TIGIT biểu hiện TIGIT ở người
trên bề mặt tế bào của nó

Biểu hiện của TIGIT ở người trên
dòng tế bào báo cáo Jurkat-TIGIT



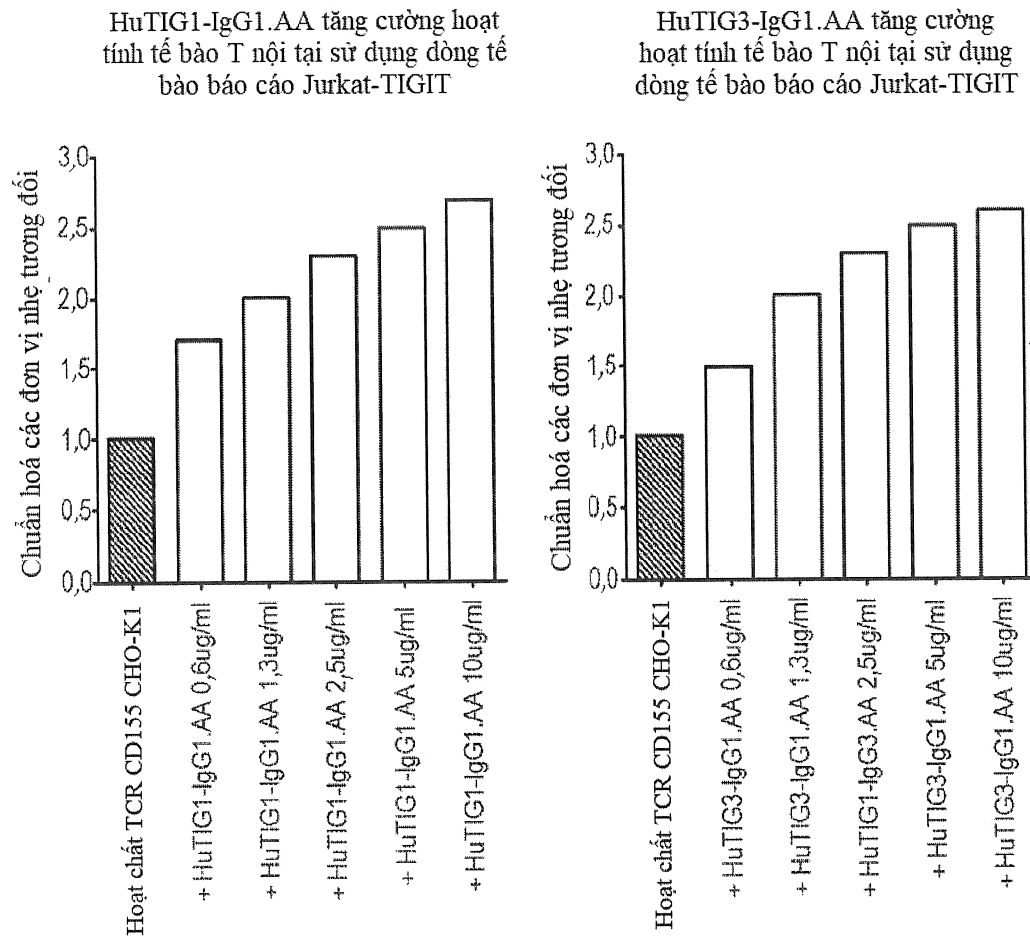
Hình. 21

HuTIG1-IgG1.AA và HuTIG3-IgG1.AA không tạo ra hoạt tính CDC

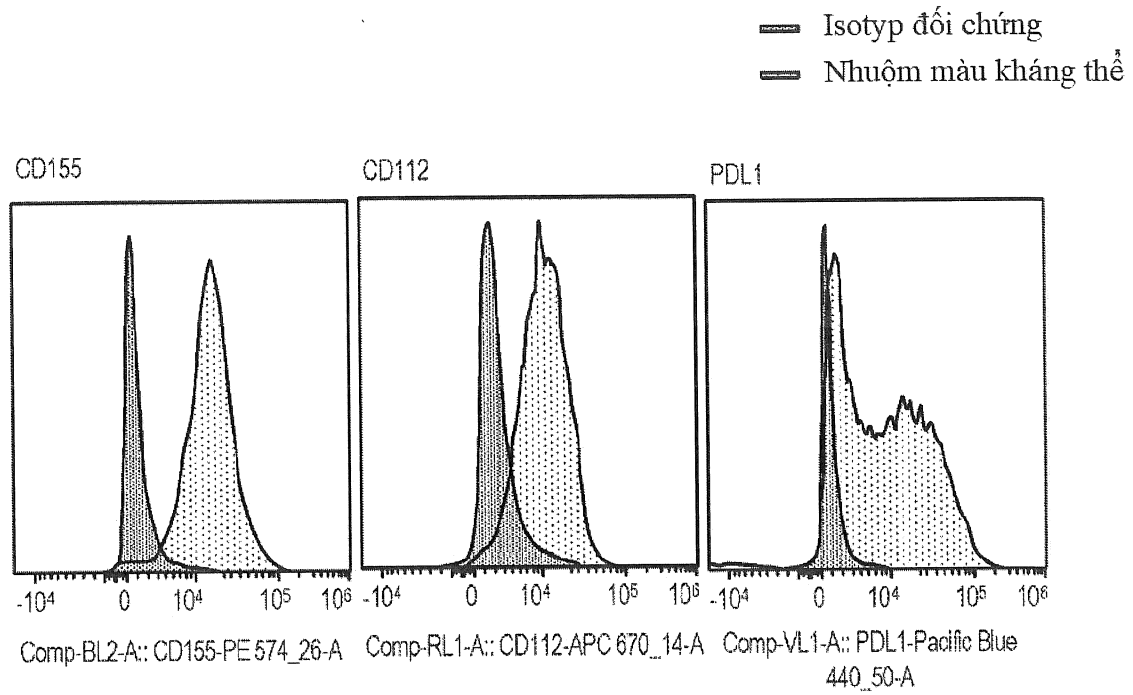
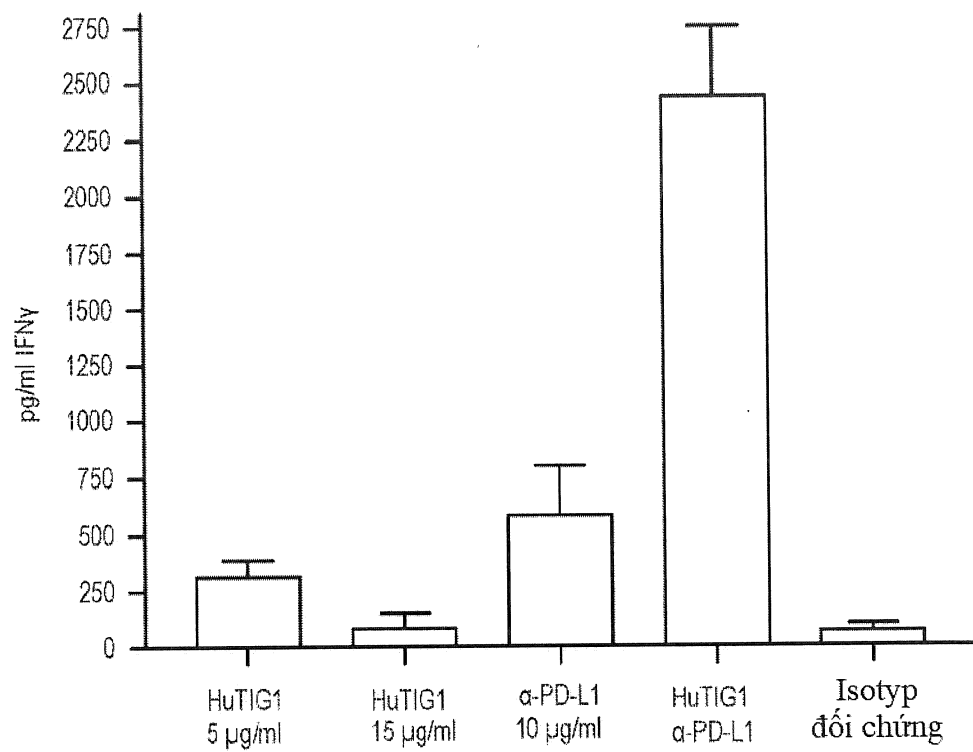


Hình. 22

Thử nghiệm hoạt tính đối kháng tế bào T in vitro đối với các kháng thể kháng TIGIT ở người

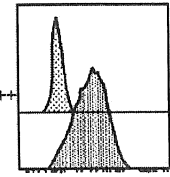
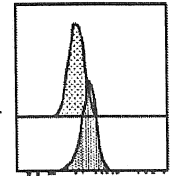
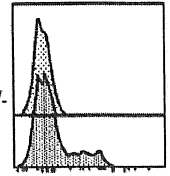
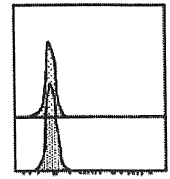


Hình. 23

**Hình. 24****Hình. 25**

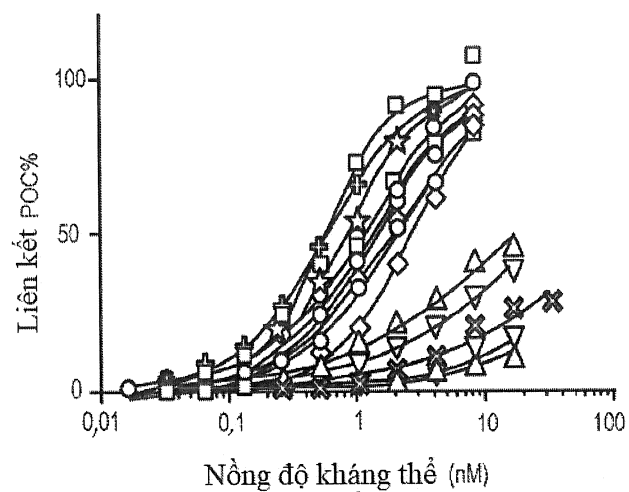
			α-TIGIT			
		Tập hợp con	Chất đánh dấu bề mặt tế bào	HuTIG1	HuTIG3	α-CD96
Lympho	Tế bào B	B1	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	+	+	+
		Đơn giản	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	+	+	+
		Nhớ/Huyết tương	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	+	+	+
	Tế bào NK	CD56 ^{hi}	CD56 ⁺ CD16 ⁻	+	+	+
		CD56 ^{lo}	CD56 ⁺ CD16 ⁺	+++	+++	+
	Các tế bào T γδ		TCRγδ ⁺	+	+	+
	Tế bào T CD4	Đơn giản	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	+	+	+/-
		Tác động	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	+	+	+
		EM	CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	+/-	+/-	+
		CM	CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	+/-	+/-	+
		CD25 ⁺ Treg	CD4 ⁺ CD25RA ⁻ CD127 ⁻	+++	+++	+
	Tế bào T CD8	Đơn giản	CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	+	+	+
		Tác động	CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	+++	+++	+
		EM	CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	+/-	+/-	+
Myeloid	Tế bào tua	Plasmacytoid	CD56 ⁻ CD141 ⁺ CLEC9a ⁺ CD14 ⁺ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	+	+	+
		BDCA3 ⁺	CD56 ⁻ CLEC9a ⁺ CD141 ⁺ HLA-DR ⁺	+	+	+
		Myeloid	CD56 ⁻ CD141 ⁺ CLEC9a ⁺ CD14 ^{hi} CD33 ⁺ HLA-DR ⁺	+	+	+
	Bạch cầu đơn nhân	Cổ điển	CD56 ⁻ CD141 ⁺ CLEC9a ⁺ CD14 ^{hi} CD16 ⁺ HLA-DR ⁺	+	+	+
		Gây viêm	CD56 ⁻ CD141 ⁺ CLEC9a ⁺ CD14 ^{hi} CD16 ⁺ HLA-DR ⁺	+	+	+
		CD16 ^{hi} CD14 ^{lo}	CD56 ⁻ CD141 ⁺ CLEC9a ⁺ CD14 ^{hi} CD33 ⁺ HLA-DR ⁺	+	+	+++

Mức biểu hiện



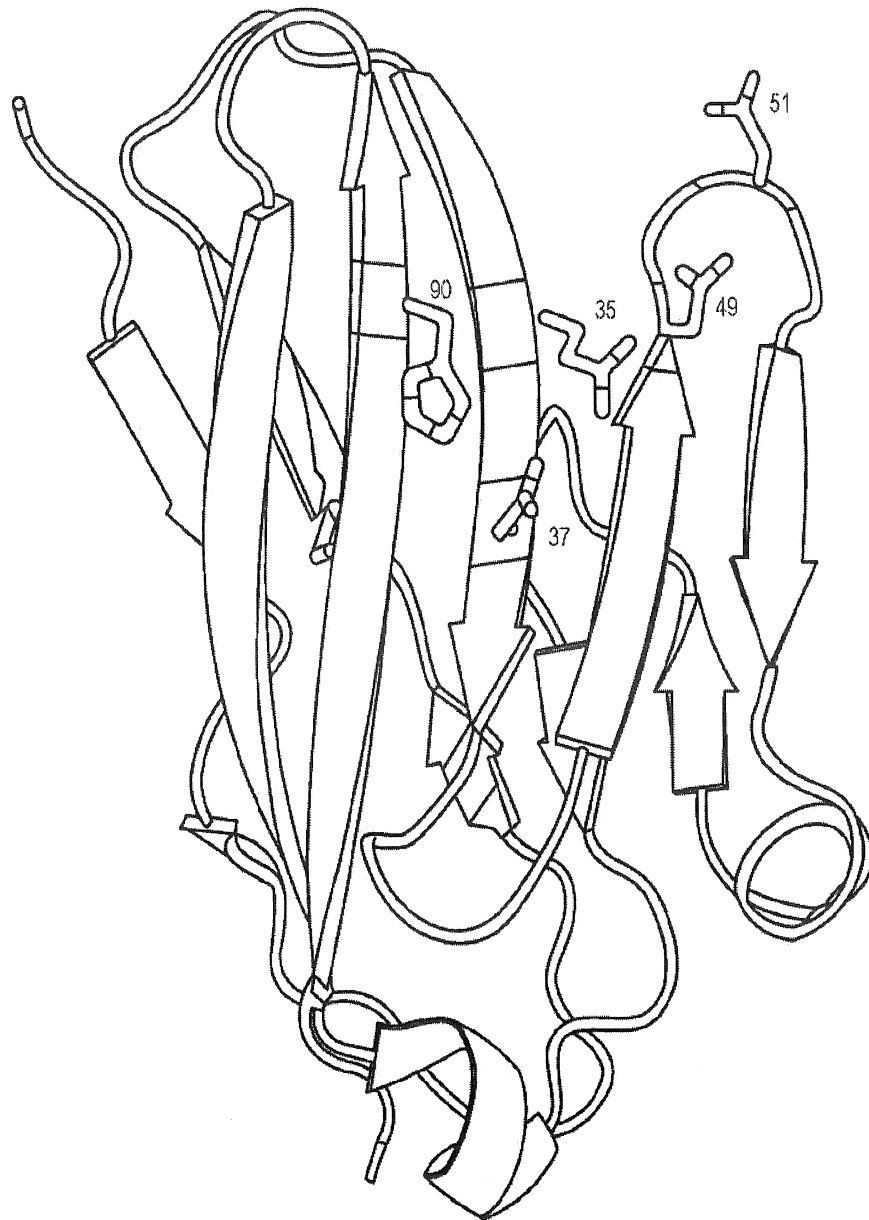
Hình. 26A

Hình. 26B

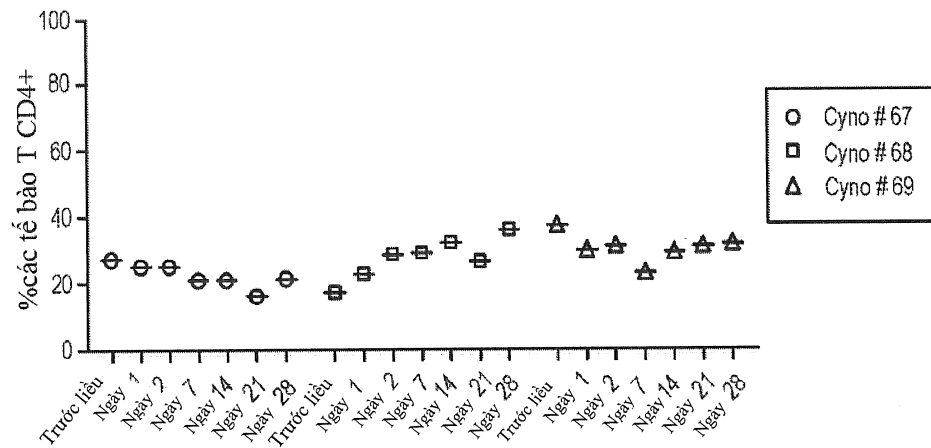


	EC50
WT	1,28
T34A	0,577
Q35A	176
N37A	126
E39A	1,58
L44A	1,23
I47A	1,27
N49A	17,7
D51A	30,5
L52A	2,67
H55A	1,19
F86A	0,844
I88A	0,591
H90A	104
Y92A	2,12
T96A	1,36

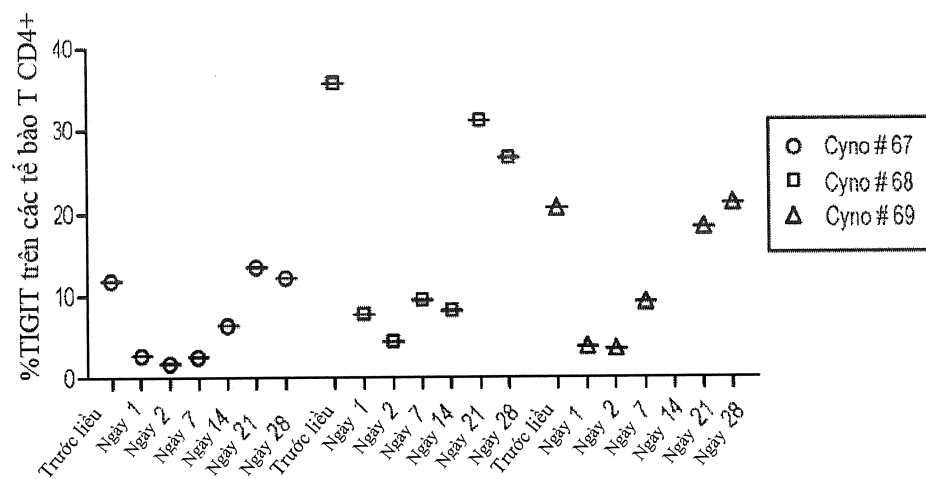
Hình. 27



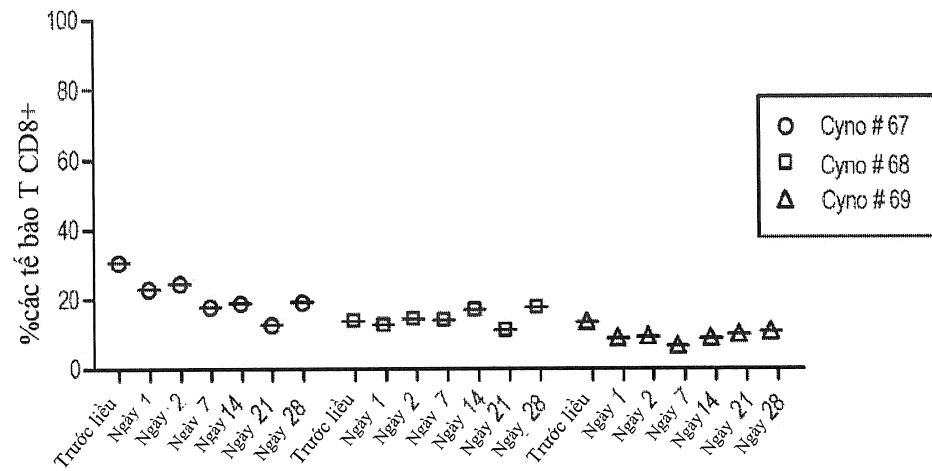
Hình. 28



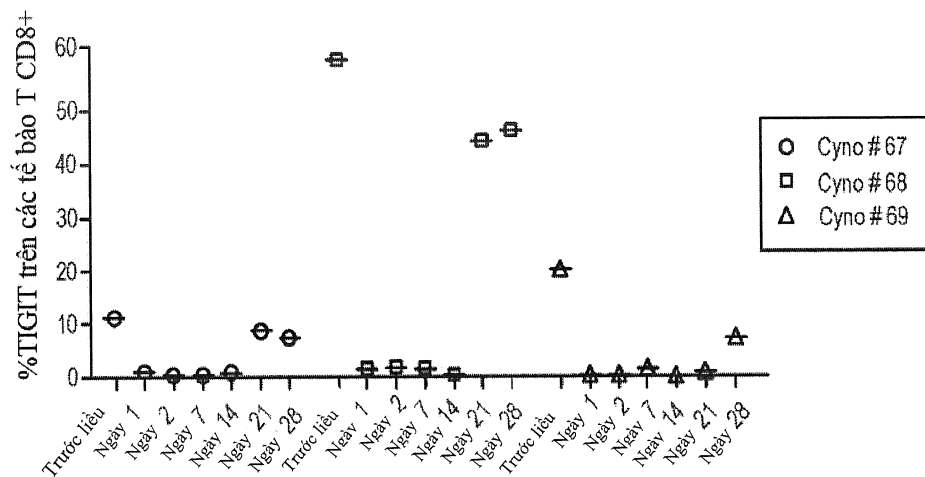
Hình. 29A



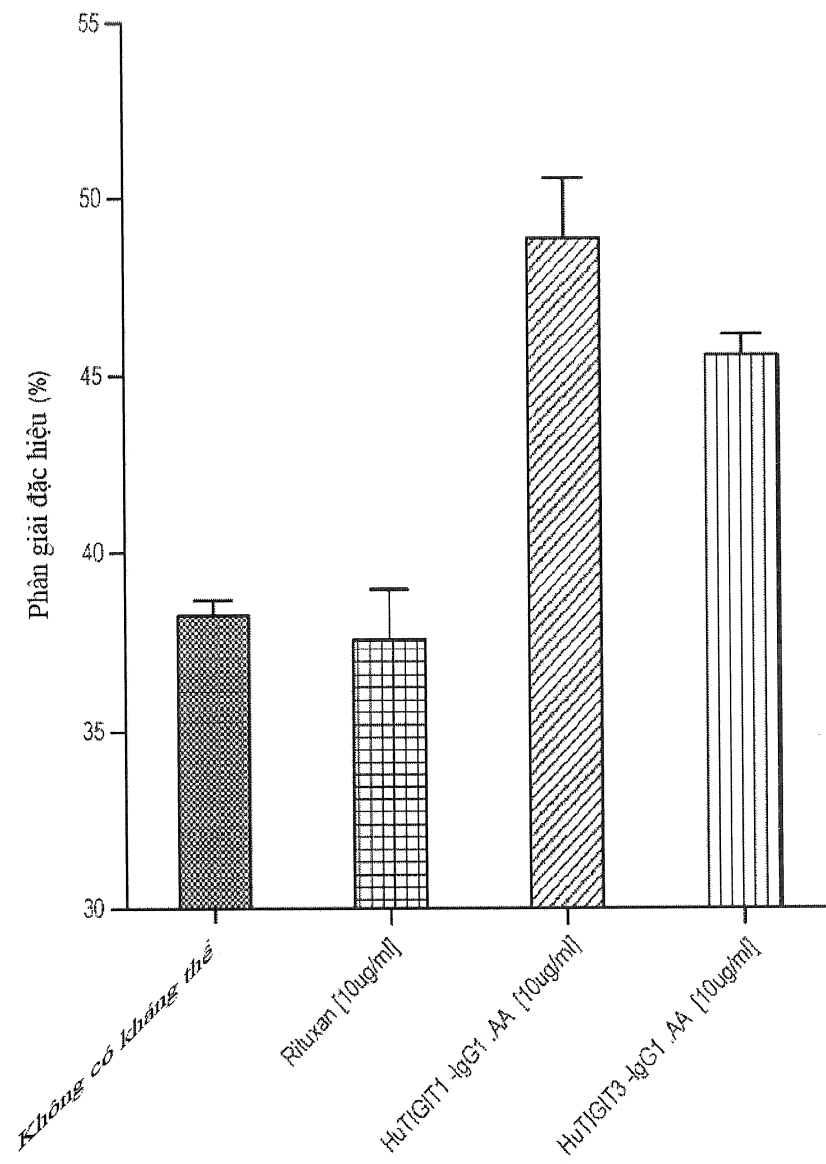
Hình. 29B



Hình. 30A

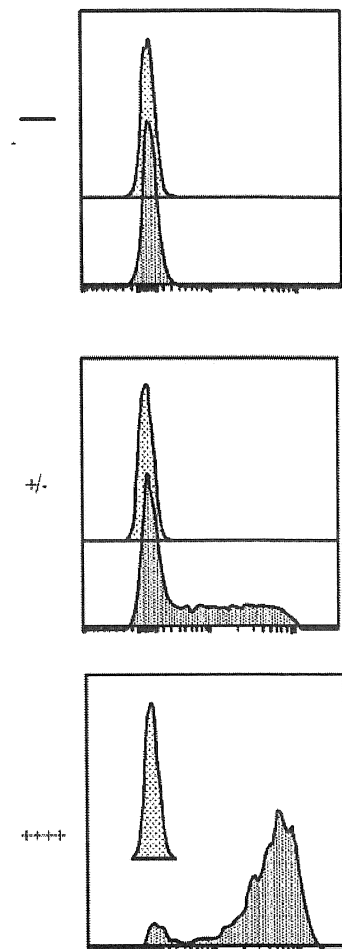


Hình. 30B

**Hình. 31**

		Chất đánh dấu bề mặt tế bào	HuTIG1
U ác tính	Tế bào T	TCR β ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁻	+/-
		TCR β ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	++++
		TCR β ⁺ CD8 ⁺	++++
	Tế bào trình diện kháng nguyên	CD11b ⁺ CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	-
		CD11b ⁻ CD14 ⁻ HLA-DR ⁺	-
Ung thư đại trực tràng	Tế bào T	TCR β ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁻	+/-
		TCR β ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	++++
		TCR β ⁺ CD8 ⁺	++++
	Tế bào trình diện kháng nguyên	CD11b ⁺ CD14 ⁺ HLA-DR ⁻	-
		CD11b ⁻ CD14 ⁻ HLA-DR ⁺	-
Ung thư biểu mô phổi không phải tế bào nhỏ	Tế bào T	TCR β ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁻	+/-
		TCR β ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	++++
		TCR β ⁺ CD8 ⁺	++++
	Tế bào trình diện kháng nguyên	CD11b ⁺ CD14 ⁺ HLA-DR ⁻	-
		CD11b ⁻ CD14 ⁻ HLA-DR ⁺	-
Ung thư biểu mô tế bào thận	Tế bào T	TCR β ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁻	+/-
		TCR β ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	++++
		TCR β ⁺ CD8 ⁺	++++
	Tế bào trình diện kháng nguyên	CD11b ⁺ CD14 ⁺ HLA-DR ⁻	-
		CD11b ⁻ CD14 ⁻ HLA-DR ⁺	-

Mức biểu hiện



Hình. 32A

Hình. 32B

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> JN Biosciences, LLC
 Abmuno Therapeutics LLC
 Tso, J. Yun
 Tsurushita, Naoya
 Duramad, Omar

<120> Kháng thể đơn dòng liên kết với polypeptit TIGIT và dược phẩm chứa kháng thể đơn dòng này

<130> 50658-504001WO

<140> Không được chỉ định

<141> 2017-03-03

<150> 62/304,045

<151> 2016-03-04

<150> 62/413,025

<151> 2016-10-26

<160> 65

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 223

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln

20 25 30

Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys

35 40 45

Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val

50 55 60

Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn
65 70 75 80

Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr
85 90 95

Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu
100 105 110

His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Leu Leu Gly Ala Met Ala Ala Thr
115 120 125

Leu Val Val Ile Cys Thr Ala Val Ile Val Val Val Ala Leu Thr Arg
130 135 140

Lys Lys Lys Ala Leu Arg Ile His Ser Val Glu Gly Asp Leu Arg Arg
145 150 155 160

Lys Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Pro
165 170 175

Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala Ala Pro Ala Gly Leu Cys Gly Glu
180 185 190

Gln Arg Gly Glu Asp Cys Ala Glu Leu His Asp Tyr Phe Asn Val Leu
195 200 205

Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Cys Ser Phe Phe Thr Glu Thr Gly
210 215 220

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Phe Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Ser

1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 3

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys
1 5 10 15

Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln
 20 25 30

Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys
 35 40 45

Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val
 50 55 60

Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn
65 70 75 80

Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr
 85 90 95

Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu
 100 105 110

His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Thr Gly
 115 120

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

Thr Gly Gly Gly

1

<210> 5

<211> 232

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1

5

10

15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

20

25

30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

35

40

45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

50

55

60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln

65

70

75

80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

85

90

95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

100

105

110

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

115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 6
<211> 317
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Val Val Val Gln Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp
1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Pro Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr
20 25 30

His Val Ser Gln Leu Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met
35 40 45

Ala Val Phe His Gln Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg
 50 55 60

Leu Glu Phe Val Ala Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser
 65 70 75 80

Leu Arg Met Phe Gly Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys
 85 90 95

Leu Phe Val Thr Phe Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu
 100 105 110

Arg Val Leu Ala Lys Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln
 115 120 125

Leu Thr Gly Glu Pro Val Pro Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly
 130 135 140

Arg Pro Pro Ala Gln Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro
 145 150 155 160

Asn Thr Ser Gln Val Pro Gly Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr
 165 170 175

Ser Leu Trp Ile Leu Val Pro Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val
 180 185 190

Thr Cys Lys Val Glu His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr
 195 200 205

Val Asn Leu Thr Val Tyr Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr
 210 215 220

Asp Asn Asn Trp Tyr Leu Gly Gln Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp
 225 230 235 240

Ala Arg Ser Asn Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met
 245 250 255

Gly Pro Leu Pro Pro Phe Ala Val Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile
 260 265 270

Arg Pro Val Asp Lys Pro Ile Asn Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr
 275 280 285

Asn Ala Leu Gly Ala Arg Gln Ala Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Glu
 290 295 300

Gly Pro Pro Ser Glu His Ser Gly Met Ser Arg Asn Ala
 305 310 315

<210> 7

<211> 553

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Asp Val Val Val Gln Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp
 1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Pro Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr
 20 25 30

His Val Ser Gln Leu Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met
 35 40 45

Ala Val Phe His Gln Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg
 50 55 60

Leu Glu Phe Val Ala Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser
 65 70 75 80

Leu Arg Met Phe Gly Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys
 85 90 95

Leu Phe Val Thr Phe Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu
 100 105 110

Arg Val Leu Ala Lys Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln
 115 120 125

Leu Thr Gly Glu Pro Val Pro Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly
 130 135 140

Arg Pro Pro Ala Gln Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro
 145 150 155 160

Asn Thr Ser Gln Val Pro Gly Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr
 165 170 175

Ser Leu Trp Ile Leu Val Pro Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val
 180 185 190

Thr Cys Lys Val Glu His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr
 195 200 205

Val Asn Leu Thr Val Tyr Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr
 210 215 220

Asp Asn Asn Trp Tyr Leu Gly Gln Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp
 225 230 235 240

Ala Arg Ser Asn Pro Glu Pro Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met
 245 250 255

Gly Pro Leu Pro Pro Phe Ala Val Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile
 260 265 270

Arg Pro Val Asp Lys Pro Ile Asn Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr
 275 280 285

Asn Ala Leu Gly Ala Arg Gln Ala Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Glu
 290 295 300

Gly Pro Pro Ser Glu His Ser Gly Met Ser Arg Asn Ala Thr Gly Gly
 305 310 315 320

Gly Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 325 330 335

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 340 345 350

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 355 360 365

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 370 375 380

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 385 390 395 400

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 405 410 415

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 420 425 430

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 435 440 445

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 450 455 460

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 465 470 475 480

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 485 490 495

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 500 505 510

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 515 520 525

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 530 535 540

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 545 550

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 9

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Pro Asn Lys Gly Ser Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr Arg Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Gly His Thr Cys Phe Thr Leu Thr Gly Leu Leu Gly Thr Leu Val Thr
20 25 30

Met Gly Leu Leu Thr
35

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 10

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

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

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

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Arg Leu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 11

Asn Phe Gly Met His
1 5

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

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12

Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 13

Met Arg Leu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 14
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 14

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

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 15

Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 16

Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser
 1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 17

Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp Thr
 1 5

<210> 18

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 18

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Gly Trp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 19

Glu Tyr Thr Met His
1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 20

Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 21

Pro Gly Trp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 22

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr His Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 23

Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 24

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 25

Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 26

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 26

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Asp Gly Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 27

Asp Tyr Asp Met Ser
1 5

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 28

Tyr Ile Ser Asp Gly Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 29

Gln Ile Leu Leu Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 30
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 30

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

Lys

<210> 31
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 31

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 32

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 33

Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Trp Thr
 1 5

<210> 34

<211> 138

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asn Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Arg Leu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 35

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 35

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

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

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Arg Leu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Met Arg Phe Gln Val Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser
35 40 45

Ile Ser Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn
 100 105 110

Glu Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 37

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 38

<211> 448

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 38

actagtacca ccatggactc caggctcaat ctggtttcc ttgtccttat tctgaaaggc 60

gtccagtgtg aagtcagct ggtggagtct gggggaggcc tggtcagcc tggagggtcc 120

ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc acttcagta actttggaat gcactgggtt 180

cgacaggctc caggaaggg gctggagtgg gtcgcattca ttagtagtgg cagtagttcc 240

atctactatg cagacacagt gaaggccga ttcacatct ccagagacaa tgccaagaac 300

agcctgtacc tgcaaatgaa cagtctgagg gctgaggaca ctgccgtgta ttactgtgca 360

agaatgagac tggattacta tgctatggac tactggggtc aaggaaccat ggtcacgctc 420

tcctcaggta agtatggcct ctaagctt 448

<210> 39

<211> 416

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 39

gctagcacca ccatgagggt ccagggtcag gttctggggc tccttctgct ctggatctca 60

ggagcccagt gtgatatcca gatgaccag tctccatctt ctcttctgc atctgttga 120
 gatagagtca ctattacttg cagggcaagt aagagcatta gcaaalatct ggcttggtat 180
 caacagaaac ctgggaaagc tcttaagctg ctatctact ctgggtccac ttgcaatct 240
 ggagttccat caagattcag tggcagtgga tctggtacag atttactct caccatcagt 300
 agcctgcagc ctgaagattt tgcaacctat tactgtcaac agcataatga ataccctgg 360
 accttcggcg gaggcaccaa agtcgaaatc aaacgtaagt agaatccaaa gaattc 416

<210> 40

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 40

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
 20 25 30

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

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Met Arg Leu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met 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 Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 41

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 41

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

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

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 42
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

Met Asn Phe Gly Leu Arg Leu Ile Phe Leu Val Leu Thr Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Asn Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
 35 40 45

Ser Asp Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Asp Gly Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80

Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Ile Leu Leu Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 43

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 43

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Asp Gly Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 44
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys
 130

<210> 45
 <211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 45

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

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

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

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

Tyr His Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 46

<211> 448

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 46

actagtacca ccatgaactt tgggctcaga ttgattttcc ttgtccttac tctgaaaggc 60
 gtgaactgtg aagtcagct cgtggagtct gggggaggcc ttgtgcagcc tggagggtcc 120
 ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc gctttcagtg actatgacat gtcttgggtt 180
 cgccaggctc ctggcaaggg gctggagtgg gtgcataca ttagtgatgg cggttataac 240
 acctactatc cagacactgt gaagggccga ttcacatct ccagagacaa tgccaagaac 300
 tccctgtacc tgcaaatgaa cagtcgtagg gctgaggaca cagccgtcta ttactgtgca 360
 agacaaattc tgctcggta ctacttgac tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc 420
 tcctcaggtg agtccttaaa acaagctt 448

<210> 47

<211> 434

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 47

gctagacca ccatggattc acaggcccag gttcttatgc tgctgctgct ctgggtttct 60
 ggaacctgtg gggacattca gatgacacag tctccatcct cctgtctgc ctgattgga 120
 gacagggfta ctatcacctg caagtccagt cagagtcttc tgtatagtag caatcaaaag 180
 aactacttgg cctggtacca gcagaaacca gggaaggctc ctaaactgct gatttactgg 240
 gcatccacta gggaaatctg ggtccctagt cgcttctcag gcagtggatc tgggacagat 300
 ttactctca ccatcagcag tctgcagcct gaagacttcg cagtttatta ctgtcagcaa 360
 tatcatagct atccctggac cttcggcgga ggcaccaagg tggaatcaa acgtaagtag 420
 aatocaaaga attc 434

<210> 48

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 48

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Asp Gly Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Thr Thr 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 Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 49

<211> 220

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 49

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

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

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

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

Tyr His Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 50
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln
 20 25 30

Val Thr Ala Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys
 35 40 45

Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val
 50 55 60

Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn
 65 70 75 80

Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr
 85 90 95

Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu
 100 105 110

His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Thr Gly
 115 120

<210> 51

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln
 20 25 30

Val Thr Gln Val Ala Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys
 35 40 45

Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val
 50 55 60

Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn
 65 70 75 80

Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr
 85 90 95

Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu
 100 105 110

His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Thr Gly
 115 120

<210> 52
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln
 20 25 30

Val Thr Gln Val Asn Trp Ala Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys
 35 40 45

Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val
 50 55 60

Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn
65 70 75 80

Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr
 85 90 95

Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu
 100 105 110

His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Thr Gly
 115 120

<210> 53
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys
1 5 10 15

Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln
 20 25 30

Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys
 35 40 45

Ala Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val
 50 55 60

Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn
65 70 75 80

Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr
 85 90 95

Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu
 100 105 110

His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Thr Gly
 115 120

<210> 54
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln
 20 25 30

Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys
 35 40 45

Asn Ala Ala Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val
 50 55 60

Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn
 65 70 75 80

Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr
 85 90 95

Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu
 100 105 110

His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Thr Gly
 115 120

<210> 55

<211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln
 20 25 30

Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys
 35 40 45

Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val
 50 55 60

Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn
 65 70 75 80

Asp Thr Gly Glu Tyr Ala Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr
 85 90 95

Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu
 100 105 110

His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Thr Gly
 115 120

<210> 56
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 56

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 57

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Phe Thr Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

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

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 58
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58

Met Arg Trp Cys Leu Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu Arg Gln Ala
 1 5 10 15

Pro Leu Ala Ser Gly Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr
 35 40 45

Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys

50 55 60

His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln
65 70 75 80

Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile
85 90 95

Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu
100 105 110

Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile
115 120 125

Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu
130 135 140

Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro
145 150 155 160

Leu Leu Gly Ala Met Ala Ala Thr Leu Val Val Ile Cys Thr Ala Val
165 170 175

Ile Val Val Val Ala Leu Thr Arg Lys Lys Lys Ala Leu Arg Ile His
180 185 190

Ser Val Glu Gly Asp Leu Arg Arg Lys Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp
195 200 205

Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Pro Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala
210 215 220

Ala Pro Ala Gly Leu Cys Gly Glu Gln Arg Gly Glu Asp Cys Ala Glu
225 230 235 240

Leu His Asp Tyr Phe Asn Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Cys

245 250 255

Ser Phe Phe Thr Glu Thr Gly
260

<210> 59

<211> 358

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys
1 5 10 15

Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln
20 25 30

Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys
35 40 45

Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val
50 55 60

Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn
65 70 75 80

Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr
85 90 95

Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu
100 105 110

His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Thr Gly Thr Gly Gly Glu Pro
115 120 125

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
130 135 140

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 145 150 155 160

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 165 170 175

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 180 185 190

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 195 200 205

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 210 215 220

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 225 230 235 240

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 245 250 255

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 260 265 270

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 275 280 285

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 290 295 300

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 305 310 315 320

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 325 330 335

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 340 345 350

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355

<210> 60

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 60

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
 20 25 30

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

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Met Arg Leu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met 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 Gln Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 61

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 61

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
 20 25 30

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

Ala Phe Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Met Arg Leu Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 62

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 62

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Asp Gly Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Thr Thr 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 Gln Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 63
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 63

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Asp Gly Gly Tyr Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 64

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 64

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

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

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 65

<211> 220

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 65

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

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

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

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

Tyr His Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220