



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ C12N 15/13; C12N 1/15; C12P 21/08; (13) B
C12N 15/63; C07K 16/28



1-0043305

-
- (21) 1-2019-01106 (22) 07/08/2017
(86) PCT/KR2017/008494 07/08/2017 (87) WO 2018/026248 08/02/2018
(30) 10-2016-0100210 05/08/2016 KR; 10-2017-0099672 07/08/2017 KR
(45) 25/02/2025 443 (43) 25/07/2019 376A
(73) Y BIOLOGICS INC. (KR)
3F 29, Techno 4-ro Yuseong-gu Daejeon 34015, Republic of Korea
(72) PARK, Jae Eun (KR); KIM, Soo Young (KR); LEE, Hyun Mi (KR); LEE, Si Hyung
(KR); LEE, Hyun Kyung (KR); KIM, Hye-Nan (KR); YOUN, Jin Chul (KR); PARK,
Bum-chan (KR); LIM, Jung Chae (KR); CHO, Young-Gyu (KR); PARK, Young
Woo (KR).
(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)
-

- (54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT VỚI PROTEIN GÂY CHẾT TẾ BÀO THEO CHƯƠNG
TRÌNH 1 (PD-1) VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2019-01106

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng protein gây chết tế bào theo chương trình 1 (programmed cell death 1 - PD1) của người hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, axit nucleic mã hóa kháng thể này, vectơ chứa axit nucleic, tế bào phân lập được biến nạp vectơ này, phương pháp sản xuất kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, và chế phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư chứa kháng thể này. Kháng thể mới gắn kết với PD-1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó có thể gắn kết với PD-1 và ức chế hoạt tính của PD-1, do vậy các kháng thể này là hữu ích để phát triển các thuốc điều trị miễn dịch đối với các bệnh khác nhau liên quan đến PD-1.

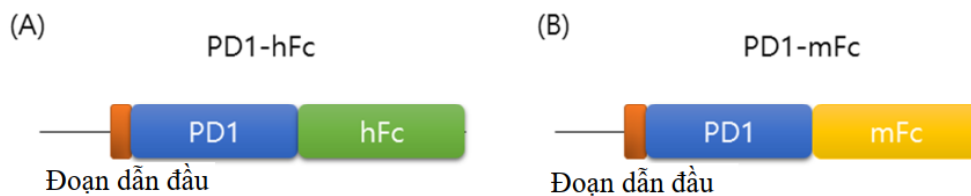


Fig.1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng protein gây chết tế bào theo chương trình 1 (programmed cell death 1 - PD-1) của người hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, axit nucleic mã hóa kháng thể này, vectơ chứa axit nucleic, tế bào phân lập được biến nạp vectơ này, phương pháp tạo kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó và chế phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư chứa kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các thuốc hóa trị chống ung thư thế hệ thứ nhất và thuốc hướng đích chống ung thư thế hệ thứ hai, hiện nay đang được sử dụng rộng rãi, có các vấn đề là gây ra các tác dụng phụ do độc tính của thuốc chống ung thư, nguy cơ kháng thuốc cao và có hạn chế là chúng chỉ được sử dụng cho các bệnh nhân có các đột biến gen đặc hiệu. Các thuốc miễn dịch chống ung thư (thuốc miễn dịch học ung thư) được gọi là “thuốc chống ung thư thế hệ thứ ba”, khắc phục được các vấn đề này, tác động lên đường truyền tín hiệu của tế bào miễn dịch để kích hoạt tế bào miễn dịch và bằng cách đó tấn công tế bào ung thư, do vậy đem lại tác dụng điều trị. Khác với thuốc chống ung thư thông thường, thuốc miễn dịch chống ung thư có thể được sử dụng cho các bệnh khác nhau bao gồm bệnh ung thư theo cách thức điều trị bệnh sử dụng hệ miễn dịch ở người và được báo cáo là có ít tác dụng phụ hơn các thuốc chống ung thư thông thường.

PD-1 (còn gọi là “CD279”) là protein thụ thể 55 KD liên quan đến họ thụ thể đồng kích thích/ức chế CD28/CTLA4 (Blank et al., 2005 Cancer Immunol Immunother 54: 307-314).

Các đặc tính ở chuột và người được kiểm tra bằng cách tách dòng gen và cADN mã hóa PD1 (Ishida et al., 1992 EMBO J 11:3887-3395; Shinohara et al., 1994 Genomics 23:704-706). PD-1 chiều dài đầy đủ chứa 288 gốc axit amin (số truy cập NCBI: NP_005009). Vùng ngoại bào gồm các gốc axit amin 1-167 và phần đuôi có đầu tận cùng C nằm trong tế bào chất chứa các gốc axit amin 191-288, gồm hai môtip điều hòa miễn dịch theo giả thiết, cụ thể là, một môtip ức chế dựa trên tyrosin của thụ thể miễn dịch (ITIM; Vivier et al., 1997 Immunol Today 18: 286-291) và môtip chuyển

tyrosin của thụ thể miễn dịch (ITSM; Chemnitz et al., 2004 J Immunol 173: 945-954).

Đến nay, hai phối tử có liên quan về trình tự, PD-L1 (B7-H1) và PD-L2 (B7-DC), đã được biết là có tương tác đặc hiệu với PD-1 để gây ra sự truyền tín hiệu nội bào và ức chế sự hoạt hóa tế bào T qua trung gian CD3 và CD28 (Riley, 2009 Immunol Rev 229: 114-125), mà cuối cùng điều hòa hoạt tính của tế bào T, ví dụ, làm giảm sự tiết của các yếu tố tăng trưởng khác và xytokin, cũng như sự sinh trưởng của tế bào và tiết ra IL-2 và IFN- γ .

Biểu hiện của PD-1 thường được thấy ở các tế bào miễn dịch như tế bào T, tế bào B, tế bào đơn nhân và tế bào giết tự nhiên (natural killer-NK), và gần như không biểu hiện ở các mô khác của người như cơ, biểu mô và mô thần kinh. Ngoài ra, mức biểu hiện PD-1 cao thường liên quan đến hoạt tính của tế bào miễn dịch. Ví dụ, khi dòng tế bào T ở người, Jurkat được kích hoạt bởi PHA (phytohaemagglutinin) hoặc 12-O-tetradecanoylphorbol-13-axetat hoặc TPA, sự biểu hiện của PD-1 được điều hòa tăng, như được quan sát từ phương pháp thẩm tách miễn dịch (Western blotting). Nhờ sự kích thích của kháng thể kháng CD3, hiện tượng giống như vậy được quan sát ở các lymphô bào T và B của chuột được kích thích và tế bào T CD4⁺ sơ cấp của người. Sự biểu hiện của PD-1 tăng gây ra sự kích thích của tế bào T tác động và dẫn hướng cho tế bào T tác động đã hoạt hóa theo hướng hoạt hóa miễn dịch suy yếu và giảm. Do vậy, tín hiệu ức chế qua trung gian PD-1 được biết có vai trò then chốt trong việc dung nạp miễn dịch.

Sự gia tăng biểu hiện của PD-1 của các lymphô bào thâm nhiễm khối u (tumor-infiltrating lymphocyte-TIL) và biểu hiện của các phối tử PD-1 ở tế bào khối u được báo cáo trong các bệnh ung thư khác nhau và được báo cáo ở các loại mô và cơ quan khác bao gồm phổi, gan, dạ dày, vú, buồng trứng, tụy, tế bào hắc tố và thực quản. Thường xuyên hơn, biểu hiện của PD-1 và PD-L1 ở các bệnh ung thư này có liên quan đến chẩn đoán xấu về kết quả sống của bệnh nhân. Tầm quan trọng của việc truyền tín hiệu PD-1 lên sự điều hòa hệ miễn dịch đối với việc loại bỏ hay dung nạp ung thư đã được mô tả chi tiết thông qua chuột chuyển gen mà ức chế sự sinh trưởng của tế bào ung thư ghép khác loại nhờ loại bỏ các gen PD-1.

Sự điều hòa tăng việc truyền tín hiệu PD-1 dẫn đến sự tăng sinh ung thư dung nạp miễn dịch cũng như dẫn đến sự lây nhiễm virus và sự di căn ở người. Virus gây đại

dịch viêm gan B, HBV và HCV gây ra sự biểu hiện quá mức các phối tử PD-1 ở tế bào gan và hoạt hóa sự truyền tín hiệu PD-1 ở tế bào T tác động, dẫn đến sự thiếu hụt tế bào T và dung nạp lây nhiễm virus. Tương tự, sự lây nhiễm HIV thường lẫn trốn hệ miễn dịch của người qua cơ chế tương tự. Quá trình truyền tín hiệu PD-1 có thể được điều biến nhờ trị liệu bằng các phân tử đối kháng để các tế bào miễn dịch có thể được phục hồi từ việc dung nạp và có thể được hoạt hóa lại để loại bỏ ung thư và sự lây nhiễm virus mạn tính.

Nivolumab và pembrolizumab, là các kháng thể đơn dòng, được biết là các thuốc hướng đích PD-1 và được sử dụng làm thuốc điều trị bệnh u melanin ác tính và bệnh ung thư phổi tế bào không nhỏ. Tuy nhiên, được báo cáo rằng các thuốc này đặt lên bệnh nhân một gánh nặng lớn về mặt tài chính do chi phí sản xuất cao và đòi hỏi phải có sự kiểm nghiệm chính xác đối với các thuốc này. Do vậy, vẫn có nhu cầu cấp bách về việc phát triển các thuốc điều trị hướng đích PD-1 mới có thể khắc phục các hạn chế của các thuốc thông thường.

Trong tình trạng kỹ thuật này, các tác giả của sáng chế đã nỗ lực phát triển các kháng thể để điều trị bệnh ung thư gắn kết đặc hiệu với PD-L1. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã phát triển kháng thể kháng PD-L1 gắn kết với ái lực cao với PD-L1 nhờ sử dụng công nghệ hiển thị trên thể thực khuẩn và đã phát hiện ra rằng kháng thể kháng PD-L1 này có thể ức chế đáng kể việc tạo phức hợp PD-1/PD-L1, do vậy hoàn thành sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Do vậy, mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể mới kháng PD-1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất vector chứa axit nucleic, tế bào tái tổ hợp mà vector này được đưa vào và phương pháp sản xuất chúng.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư, chứa kháng thể nêu trên hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó.

Giải pháp kỹ thuật

Theo sáng chế, các mục đích trên và mục đích khác có thể được thực hiện nhờ đưa ra kháng thể gắn kết với PD-1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó gồm: vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng gồm trình tự có độ tương đồng về trình tự là 90% hoặc cao hơn với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 30, CDR2 của chuỗi nặng gồm trình tự có độ tương đồng về trình tự là 90% hoặc cao hơn với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 31 đến SEQ ID NO: 56, CDR3 của chuỗi nặng gồm trình tự có độ tương đồng về trình tự là 90% hoặc cao hơn với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 57 đến SEQ ID NO: 79, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ gồm trình tự có độ tương đồng về trình tự là 90% hoặc cao hơn với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 198 đến SEQ ID NO: 222, CDR2 của chuỗi nhẹ gồm trình tự có độ tương đồng về trình tự là 90% hoặc cao hơn với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 223 đến SEQ ID NO: 241, CDR3 của chuỗi nhẹ gồm trình tự có độ tương đồng về trình tự là 90% hoặc cao hơn với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 242 đến SEQ ID NO: 269.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vector biểu hiện chứa axit nucleic.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất tế bào được biến nạp vector biểu hiện nêu trên.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, gồm các bước (a) nuôi cấy tế bào, và (b) thu hồi kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó từ tế bào nuôi cấy được.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chế phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư chứa kháng thể nêu trên hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó làm hoạt chất.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các mục đích, dấu hiệu nêu trên và mục đích, dấu hiệu khác và các ưu điểm khác

của sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn từ phần mô tả chi tiết dưới đây kết hợp với các hình vẽ đi kèm, trong đó:

Fig.1 là sơ đồ thể hiện vector biểu hiện PD-1 gồm Fc của người hoặc Fc của chuột dung hợp với đầu tận cùng carboxyl của nó;

Fig.2 thể hiện kết quả tinh chế protein PD-1;

Fig.2A thể hiện kết quả nhận diện protein đối với PD1-hFc trên gel chứa 10% SDS-PAGE trong các điều kiện RE (khử) và NR (không khử);

Fig.2B thể hiện kết quả của phân tích G-3000 SWXL SEC-HPLC ở tốc độ dòng là 1mL/phút và sử dụng PBS làm dung môi hiện;

Fig.2C thể hiện kết quả nhận diện protein đối với PD1-mFc trên gel chứa 10% SDS-PAGE trong các điều kiện RE (khử) và NR (không khử);

Fig.2D thể hiện kết quả của phân tích G-3000 SWXL SEC-HPLC ở tốc độ dòng là 1mL/phút và sử dụng PBS làm dung môi hiện;

Fig.3 thể hiện khả năng gắn kết của kháng thể với PD-1 phụ thuộc vào số lần chọn quét;

Fig.4 thể hiện kết quả của phân tích ELISA để xác định khả năng gắn kết của thực khuẩn thể đơn (monophage) với PD1-His;

Fig.5 thể hiện kết quả của phân tích SDS-PAGE để xác định độ tinh khiết của kháng thể PD-1;

Fig.6 thể hiện kết quả đánh giá hiệu lực *in vitro* của kháng thể PD-1;

Fig.7 thể hiện kết quả đánh giá hiệu lực *in vitro* phụ thuộc vào nồng độ của kháng thể PD-1;

Fig.8 thể hiện khả năng gắn kết của kháng thể gắn kết theo cách phụ thuộc vào nồng độ với PD-1 ở người biểu hiện quá mức trên bề mặt tế bào, trên cơ sở cường độ huỳnh quang trung bình (mean fluorescence intensity-MFI);

Fig.9 thể hiện kết quả đo động học giữa PD1-hFc và PD1-45D6, 49A2;

Fig.10 thể hiện kết quả sàng lọc các đơn dòng tối ưu hóa;

Fig.11 thể hiện phân tích so sánh tỷ lệ biểu hiện giữa kháng thể PD1 và kháng thể

bố mẹ;

Fig.12 thể hiện kết quả đánh giá hiệu lực *in vitro*, liên quan đến kháng thể PD1 theo sáng chế;

Fig.13 thể hiện kết quả đánh giá hiệu lực *in vitro* phụ thuộc vào nồng độ của kháng thể PD-1 theo sáng chế;

Fig.14 thể hiện kết quả nhận dạng liên quan đến sự gắn kết của các biến thể của kháng thể PD1 được chọn với PD-1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào của các kháng thể đơn dòng;

Fig.15 thể hiện kết quả đo khả năng gắn kết của các biến thể của kháng thể PD1 được chọn với PD-1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào của kháng thể đơn dòng;

Fig.16 thể hiện kết quả nhận dạng bằng cách sử dụng phương pháp hấp thụ miễn dịch enzym liên quan đến hoạt tính ức chế của các kháng thể được chọn để ngăn chặn sự tạo thành phức hợp PD-1/PD-L1 hoặc PD-1/PD-L2;

Fig.17 thể hiện kết quả đo động học giữa protein PD1-hFc và PD1-45D6, 49A2 và 49A2 (2B9);

Fig.18 là biểu đồ giản lược thể hiện các thể đột biến PD1;

Fig.19 thể hiện kết quả nhận dạng bằng cách sử dụng phương pháp hấp thụ miễn dịch enzym liên quan đến khả năng gắn kết của các thể thực khuẩn được chọn với các thể đột biến PD-1, trong đó khi khả năng gắn kết giảm, trị số tương ứng giảm;

Fig.20 thể hiện kết quả nhận dạng bằng cách sử dụng phương pháp hấp thụ miễn dịch enzym liên quan đến khả năng gắn kết của các kháng thể được chọn với các thể đột biến PD-1;

Fig.21 thể hiện kết quả nhận dạng bằng cách sử dụng phương pháp hấp thụ miễn dịch enzym liên quan đến tính đặc hiệu gắn kết;

Fig.22 thể hiện kết quả so sánh năng suất sau khi biểu hiện tạm thời ở tế bào HEK-293; và

Fig.23 thể hiện kết quả nhận dạng liên quan đến sự tăng hoạt tính bởi các kháng thể đơn dòng PD1 trong phản ứng lymphô bào hỗn hợp không đồng nhất (mixed lymphocyte reaction-MLR).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi được quy định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa giống như nghĩa được hiểu rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sáng chế đề cập đến. Nói chung, danh pháp được sử dụng trong bản mô tả này được biết rõ trong lĩnh vực này và thường được sử dụng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với PD-1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó bao gồm: vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng gồm trình tự có độ tương đồng về trình tự là 90% hoặc cao hơn với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 30, CDR2 của chuỗi nặng gồm trình tự có độ tương đồng trình tự là 90% hoặc cao hơn với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 31 đến SEQ ID NO: 56, và CDR3 của chuỗi nặng gồm trình tự có độ tương đồng trình tự là 90% hoặc cao hơn với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 57 đến SEQ ID NO: 79; và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ gồm trình tự có độ tương đồng trình tự 90% hoặc cao hơn với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 198 đến SEQ ID NO: 222, CDR2 của chuỗi nhẹ gồm trình tự có độ tương đồng trình tự là 90% hoặc cao hơn với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 223 đến SEQ ID NO: 241, và CDR3 của chuỗi nhẹ gồm trình tự có độ tương đồng trình tự là 90% hoặc cao hơn với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 242 đến SEQ ID NO: 269.

Các tác giả sáng chế đã nỗ lực phát triển kháng thể dùng cho hóa trị mà gắn kết với PD-1, đã biết là được biểu hiện ở nhiều bệnh ung thư khác nhau. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã tạo ra kháng thể kháng PD-1 gắn kết với ái lực cao với PD-1 nhờ sử dụng công nghệ hiển thị trên thể thực khuẩn và phát hiện ra rằng kháng thể kháng PD-1 có thể ức chế hoạt tính của PD-1.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “protein gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-1)” là protein truyền tín hiệu đã biết có chức năng điều hòa sự hoạt hóa và chức năng của tế bào T. Sự gắn kết của PD-1 của tế bào T với PD-L1, là phối tử được biểu hiện bởi tế bào ung thư, trong vi môi trường khối u hoạt hóa đường truyền tín hiệu PD-1 và do đó gây ra sự bất hoạt tế bào T. Hiện tượng này được thấy ở nhiều bệnh ung thư khác nhau

như u melanin ác tính, ung thư phổi tế bào không nhỏ và ung thư thận.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể” chỉ kháng thể kháng PD-1 gắn kết đặc hiệu với PD-1. Phạm vi của sáng chế không chỉ bao gồm kháng thể hoàn chỉnh gắn kết đặc hiệu với PD-1, mà còn bao gồm đoạn gắn kết với kháng nguyên của phân tử kháng thể này.

Kháng thể hoàn chỉnh chỉ cấu trúc có hai chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ và hai chuỗi nặng chiều dài đầy đủ, trong đó mỗi chuỗi nhẹ liên kết với chuỗi nặng tương ứng bằng liên kết disulfua. Vùng hằng định của chuỗi nặng có các kiểu gama (γ), mu (μ), alpha (α), delta (δ) và epsilon (ϵ) và được phân nhóm thành gama 1 ($\gamma 1$), gama 2 ($\gamma 2$), gama 3 ($\gamma 3$), gama 4 ($\gamma 4$), alpha 1 ($\alpha 1$) và alpha 2 ($\alpha 2$). Vùng hằng định của chuỗi nhẹ có kiểu kappa (κ) và lamda (λ).

Đoạn gắn kết với kháng nguyên của kháng thể hoặc đoạn kháng thể chỉ đoạn ít nhất là có khả năng gắn kết với kháng nguyên và gồm đoạn Fab, F(ab'), F(ab')₂, và Fv. Trong số các đoạn kháng thể, Fab chỉ cấu trúc gồm vùng biến đổi của mỗi trong số chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, vùng hằng định của chuỗi nhẹ, và vùng hằng định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng, mỗi vùng có một vị trí gắn kết với kháng nguyên. Fab' khác với Fab ở chỗ nó còn bao gồm vùng bản lề gồm ít nhất một gốc xystein ở đầu tận cùng C của vùng CH1 của chuỗi nặng. F(ab')₂ được tạo nhờ liên kết disulfua giữa các gốc xystein ở vùng bản lề của Fab'. Fv là đoạn kháng thể nhỏ nhất chỉ có một vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ, công nghệ tái tổ hợp để tạo ra Fv, được mô tả trong các Công bố đơn quốc tế như WO88/01649, WO88/06630, WO88/07085, WO88/07086, và WO88/09344. Fv hai chuỗi là đoạn trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ liên kết nhờ liên kết không cộng hóa trị và Fv chuỗi đơn là đoạn trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thường được liên kết nhờ liên kết cộng hóa trị thông qua cầu nối peptit ở giữa hoặc được liên kết trực tiếp ở đầu tận cùng C, tạo ra cấu trúc giống dime, như Fv hai chuỗi. Các đoạn kháng thể này có thể thu được nhờ sử dụng proteaza (ví dụ, các Fab có thể thu được bằng cách phân tách giới hạn toàn bộ kháng thể bằng papain, và đoạn F(ab') có thể thu được bằng cách phân tách giới hạn toàn bộ kháng thể bằng pepsin), và có thể được điều chế bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là dạng Fv (ví dụ, scFv), Fab hoặc

dạng kháng thể hoàn chỉnh. Ngoài ra, vùng hằng định của chuỗi nặng có thể được chọn từ các isotyp (lớp kháng thể) bao gồm gama (γ), mu (μ), alpha (α), delta (δ) or epsilon (ϵ). Ví dụ, vùng hằng định có thể là gama 1 (IgG1), gama 3 (IgG3) hoặc gama 4 (IgG4). Vùng hằng định của chuỗi nhẹ có thể là kapa hoặc lamda.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chuỗi nặng” gồm cả chuỗi nặng chiều dài đầy đủ, gồm vùng biến đổi (variable domain - VL) có trình tự axit amin có trình tự của vùng biến đổi đủ để mang lại tính đặc hiệu đối với kháng nguyên và ba vùng hằng định (CH1, CH2 và CH3), và đoạn của nó. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chuỗi nhẹ” gồm cả chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ, gồm vùng biến đổi (variable domain - VL) có trình tự axit amin có trình tự của vùng biến đổi đủ để mang lại tính đặc hiệu đối với kháng nguyên và vùng hằng định (constant domain - CL), và đoạn của nó.

Kháng thể theo sáng chế gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa đặc hiệu, kháng thể của người, kháng thể được làm giống kháng thể người, kháng thể khảm, Fvs chuỗi ngắn (scFVs), kháng thể chuỗi ngắn, các đoạn Fab, các đoạn F(ab'), Fvs liên kết disulfua (sdFVs), kháng thể kháng idiotyp (kháng Id), hoặc các đoạn liên kết với epitop của các kháng thể này hoặc tương tự.

Kháng thể đơn dòng chỉ kháng thể giống nhau, ngoại trừ các đột biến tồn tại trong tự nhiên có thể có trong đó kháng thể thu được từ quần thể các kháng thể về cơ bản là đồng nhất, tức là, mỗi kháng thể cấu thành quần thể, có thể có mặt với lượng nhỏ. Kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao và được gây cảm ứng kháng một vị trí kháng nguyên.

Kháng thể không phải của người (ví dụ, của chuột) có dạng “được làm giống kháng thể người” là kháng thể khảm chứa trình tự tối thiểu thu được từ globulin miễn dịch không phải của người. Trong phần lớn các trường hợp, kháng thể được làm giống kháng thể người là globulin miễn dịch của người (kháng thể nhận) trong đó một gốc từ vùng siêu biến của thụ thể được thay thế bằng một gốc từ vùng siêu biến của các loài không phải người (kháng thể cho) như chuột, chuột nhắt, thỏ hoặc loài động vật linh trưởng không phải người có tính đặc hiệu, ái lực và khả năng mong muốn.

Thuật ngữ “kháng thể của người” có nghĩa là phân tử thu được từ globulin miễn dịch của người, trong đó tất cả các trình tự axit amin cấu thành kháng thể gồm vùng quyết định bổ thể và vùng cấu trúc được tạo thành bởi globulin miễn dịch của người.

Một số chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là giống hoặc tương đồng với trình tự tương ứng ở kháng thể thu được từ các loài cụ thể hoặc thuộc lớp hoặc phân lớp kháng thể cụ thể, trong khi (các) chuỗi còn lại gồm các kháng thể “khảm” (globulin miễn dịch) là giống hoặc tương đồng với các trình tự tương ứng ở kháng thể thu được từ các loài khác hoặc thuộc lớp hoặc phân lớp kháng thể khác cũng như các đoạn của kháng thể này thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vùng biến đổi của kháng thể” chỉ các vùng chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của phân tử kháng thể gồm các trình tự axit amin có vùng quyết định bổ thể (CDR; tức là, CDR1, CDR2, và CDR3) và vùng khung (framework region - FR). VH chỉ vùng biến đổi của chuỗi nặng. VL chỉ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ.

Thuật ngữ “vùng quyết định bổ thể” (CDR; tức là, CDR1, CDR2, và CDR3) chỉ gốc axit amin của vùng biến đổi của kháng thể, mà cần thiết để liên kết với kháng nguyên. Mỗi vùng biến đổi thường có ba vùng CDR được xác định là CDR1, CDR2, và CDR3.

Theo sáng chế, kháng thể liên kết với PD-1 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm:

CDR1 của chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 30;

CDR2 của chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 31 đến SEQ ID NO: 56; và

CDR3 của chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 57 đến SEQ ID NO: 79; và

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm:

CDR1 của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 198 đến SEQ ID NO: 222;

CDR2 của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 223 đến SEQ ID NO: 241; và

CDR3 của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 242 đến SEQ ID

NO: 269.

Cụ thể, kháng thể liên kết với PD-1 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 1, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 31 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 57;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 1, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 32 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 2, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 33 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 59;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 2, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 33 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 60;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 2, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 33 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 61;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 2, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 33 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 62;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 3, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 34 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 63;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 4, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 35 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 64;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 5, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 36 và CDR3 của chuỗi nặng

được nêu trong SEQ ID NO: 65;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 6, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 37 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 66;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 1, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 32 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 67;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 7, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 38 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 68;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 8, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 39 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 69;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 9, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 40 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 70;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 10, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 41 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 71;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 11, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 42 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 72;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 12, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 43 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 73;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 13, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 44 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 74;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID

NO: 14, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 45 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 75;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 15, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 46 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 76;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 8, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 47 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 77;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 16, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 48 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 78;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 17, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 49 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 18, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 50 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 19, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 51 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 20, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 52 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 21, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 51 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 22, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 53 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 23, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 49 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 17, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 54 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 24, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 55 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 21, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 51 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 25, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 56 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 57;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 26, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 31 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 57;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 27, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 31 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 57;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 28, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 31 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 57;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 29, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 31 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 57;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 30, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 31 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 57;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 1, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 32 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 79; hoặc

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 1, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 32 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 57.

Ngoài ra, kháng thể gắn kết với PD-1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 198, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 223 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 242;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 199, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 224 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 243;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 200, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 225 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 244;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 201, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 226 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 245;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 202, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 227 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 246;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 203, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 228 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 247;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 204, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 229 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 248;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 249;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 206, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 231 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 250;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 207, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 232 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 251;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 208, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 252;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 209, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 233 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 253;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 210, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 234 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 254;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 211, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 235 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 255;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 212, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 236 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 256;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 213, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 257,

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 214, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 237 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 258;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 215, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 249;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 211, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 238 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 259;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 216, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 238 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 260;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 217, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 239 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 261;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 218, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 240 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 262;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 219, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 241 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 263;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 220, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 252;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 215, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 252;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 264;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 265;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 221, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 266;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 252;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 267;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 257;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 220, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 267;

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 222, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 268; hoặc

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 220, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 269.

Cụ thể, kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ:

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 2, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 33 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 62 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 201, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 226 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 245;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 3, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 34 và CDR3 của chuỗi nặng

được nêu trong SEQ ID NO: 63 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 202, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 227 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 246;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 4, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 35 và CDR3 chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 64 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 203, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 228 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 247

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 5, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 36 và CDR3 chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 65 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 204, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 229 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 248;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 1, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 32 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 249;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 6, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 37 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 66 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 206, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 231 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 250;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 1, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 32 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 67 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 207, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 232 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 251;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 1, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 31 và CDR3 của chuỗi nặng

được nêu trong SEQ ID NO: 57 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 208, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 252;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 7, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 38 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 68 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 209, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 233 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 253;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 8, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 39 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 69 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 210, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 234 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 254;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 11, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 42 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 72 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 213, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 257;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 1, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 3 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 215, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 249;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 13, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 44 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 74 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 211, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 238 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 259;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 15, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 46 và CDR3 của chuỗi nặng

được nêu trong SEQ ID NO: 76 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 217, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 239 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 336; hoặc

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 8, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 47 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 77 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 218, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 240 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 337.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể còn được sàng lọc qua quy trình tối ưu hóa và kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể gồm các vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ:

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 17, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 49 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 220, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 252;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 18, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 50 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 215, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 252;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 19, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 51 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 218, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 240 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 337;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 20, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 52 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:

230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 264)

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 21, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 51 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230, CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 265;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 22, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 53, CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 221, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 266;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 23, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 49, CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230, CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 252;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 17, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 54, CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 215, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230, CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 249;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 24, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 55 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 267;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 21, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 51, CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 58 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 220, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 1, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 31 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 57 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 220, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 27, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 31 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 57 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO:

230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 252;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 28, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 31 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 57 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 252;

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 29, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 31 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 57 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 252; hoặc

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm CDR1 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 30, CDR2 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 31 và CDR3 của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 57 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm CDR1 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 220, CDR2 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 230 và CDR3 của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 267.

Thuật ngữ “vùng khung” (framework region - FR) chỉ gốc vùng biến đổi khác gốc CDR. Mỗi vùng biến đổi thường có bốn FR được nhận diện là FR1, FR2, FR3, và FR4.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó có thể bao gồm:

FR1 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 80 đến SEQ ID NO: 95;

FR2 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 96 đến SEQ ID NO: 113;

FR3 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 114 đến SEQ ID NO: 134; hoặc

FR4 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 135 đến SEQ ID NO: 145.

Ngoài ra, kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó có thể bao gồm:

FR1 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 270 đến SEQ ID NO: 294;

FR2 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 295 đến SEQ ID NO: 315;

FR3 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 316 đến SEQ ID NO: 355; hoặc

FR4 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 356 đến SEQ ID NO: 367.

Đoạn “Fv” là đoạn kháng thể chứa các vị trí nhận diện và gắn kết của kháng thể hoàn chỉnh. Vùng này gồm dime, ví dụ, scFv, gồm một vùng biến đổi của chuỗi nặng và một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nối với nhau bằng liên kết cộng hóa trị về cơ bản là chặt.

Đoạn “Fab” chứa các vùng biến đổi và hằng định của chuỗi nhẹ, và vùng biến đổi và vùng hằng định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng. Đoạn kháng thể F(ab')₂ thường gồm một cặp đoạn Fab liên kết cộng hóa trị qua xystein bản lề ở giữa gần đầu carboxyl của nó.

Đoạn kháng thể “Fv chuỗi đơn” hoặc “scFv” gồm các vùng VH và VL của kháng thể, trong đó các vùng này có mặt ở chuỗi polypeptit đơn. Polypeptit Fv có thể còn gồm liên kết polypeptit ở giữa vùng VH và vùng VL để cho scFv tạo ra cấu trúc mong muốn để gắn kết với kháng nguyên.

Kháng thể PD-1 là hóa trị một hoặc hóa trị hai và gồm các chuỗi ngắn hoặc kép. Về mặt chức năng, ái lực gắn kết của kháng thể PD-1 nằm trong khoảng từ 10^{-5} M đến 10^{-12} M. Ví dụ, ái lực gắn kết của kháng thể PD-1 là từ 10^{-6} M đến 10^{-12} M, 10^{-7} M đến 10^{-12} M, 10^{-8} M đến 10^{-12} M, 10^{-9} M đến 10^{-12} M, 10^{-5} M đến 10^{-11} M, 10^{-6} M đến 10^{-11} M, 10^{-7} M đến 10^{-11} M, 10^{-8} M đến 10^{-11} M, 10^{-9} M đến 10^{-11} M, 10^{-10} M đến 10^{-11} M, 10^{-5} M đến 10^{-10} M, 10^{-6} M đến 10^{-10} M, 10^{-7} M đến 10^{-10} M, 10^{-8} M đến 10^{-10} M, 10^{-9} M đến 10^{-10} M, 10^{-5} M đến 10^{-9} M, 10^{-6} M đến 10^{-9} M, 10^{-7} M đến 10^{-9} M, 10^{-8} M đến 10^{-9} M, 10^{-5} M đến 10^{-8} M, 10^{-6} M đến 10^{-8} M, 10^{-7} M đến 10^{-8} M, 10^{-5} M đến 10^{-7} M, 10^{-6} M đến 10^{-7} M, hoặc 10^{-5} M đến 10^{-6} M.

Kháng thể gắn kết với PD1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó có thể gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự có độ tương đồng về trình tự là 90% hoặc

cao hơn với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 146 đến SEQ ID NO: 193. Kháng thể gắn kết với PD-1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó có thể gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 146 đến SEQ ID NO: 193. Theo một phương án của sáng chế, kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó có thể gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, hoặc SEQ ID NO: 171 đến SEQ ID NO: 188.

Ngoài ra, kháng thể gắn kết với PD1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó có thể gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự có độ tương đồng về trình tự là 90% hoặc cao hơn với trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 368 đến SEQ ID NO: 420. Kháng thể gắn kết với PD-1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó có thể gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 368 đến SEQ ID NO: 420. Theo một phương án của sáng chế, kháng thể gắn kết với PD1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó có thể gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 371 đến SEQ ID NO: 380, SEQ ID NO: 383, SEQ ID NO: 385, SEQ ID NO: 386, SEQ ID NO: 388, SEQ ID NO: 389, hoặc SEQ ID NO: 391 đến SEQ ID NO: 415.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể liên kết với PD-1 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 151 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 371;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 152 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 372;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 153 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 373;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 154 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 374;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 155 và vùng biến đổi

của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 375;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 156 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 376;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 157 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 377;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 158 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 378;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 159 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 379;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 160 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 380;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 163 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 383;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 165 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 385;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 166 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 386;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 168 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 388;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 169 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 389;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 171 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 391;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 172 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 392;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 173 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 393;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 174 và vùng biến đổi

của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 394;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 175 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 395;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 176 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 396;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 177 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 397;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 178 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 398;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 179 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 399;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 180 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 400;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 181 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 401;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 181 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 402;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 181 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 403;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 181 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 404;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 181 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 405;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 182 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 406;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 182 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 407;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 182 và vùng biến đổi

của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 408;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 182 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 409;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 183 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 410;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 184 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 411;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 185 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 412;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 186 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 413;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 187 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 414; hoặc

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 188 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 415.

Theo một phương án cụ thể, kháng thể gắn kết với PD-1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó có thể gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 155 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 375;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 158 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 378;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 165 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 385;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 171 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 391;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 175 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 395;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 176 và vùng biến đổi

của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 396;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 178 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 398;

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 181 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 401; hoặc

vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong SEQ ID NO: 181 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong SEQ ID NO: 405.

Phần được biểu diễn bởi X hoặc Xaa trong trình tự theo sáng chế chỉ axit amin không xác định và thể hiện rằng axit amin bất kỳ có thể được bao gồm.

“Hiện thị trên thể thực khuẩn” là một kỹ thuật hiện thị polypeptit đột biến ở dạng protein dung hợp với ít nhất một phần của protein vỏ, ví dụ, trên bề mặt của hạt thể thực khuẩn, ví dụ, thể thực khuẩn dạng sợi. Tính hữu ích của kỹ thuật hiện thị trên thể thực khuẩn là để phân loại nhanh và hiệu quả các trình tự gắn kết với các kháng nguyên đích với ái lực cao trong các thư viện lớn gồm các đột biến protein ngẫu nhiên. Việc hiện thị peptit và thư viện protein trên thể thực khuẩn được sử dụng để sàng lọc hàng triệu polypeptit để nhận diện các polypeptit có đặc tính gắn kết đặc hiệu.

Công nghệ hiện thị trên thể thực khuẩn đưa ra công cụ có hiệu lực để tạo và sàng lọc các protein mới gắn kết với các phối tử đặc hiệu (ví dụ, các kháng nguyên). Bằng cách sử dụng công nghệ hiện thị trên thể thực khuẩn, có thể tạo ra các thư viện lớn gồm các thể đột biến protein và các trình tự gắn kết có ái lực cao với các kháng nguyên đích có thể được phân loại một cách nhanh chóng. Axit nucleic mã hóa polypeptit đột biến được dung hợp với trình tự axit nucleic mã hóa protein vỏ của virus, ví dụ, protein gen III hoặc protein gen VIII. Hệ hiện thị trên thể thực khuẩn một pha, trong đó trình tự axit nucleic mã hóa protein hoặc polypeptit được dung hợp với trình tự axit nucleic mã hóa một phần của protein gen III, đã được phát triển. Trong hệ hiện thị một pha, gen dung hợp được biểu hiện ở mức thấp, protein gen III kiểu dại cũng được biểu hiện và do vậy tính lây nhiễm của hạt được duy trì.

Điều quan trọng để chứng minh sự biểu hiện của các peptit trên bề mặt của thể thực khuẩn dạng sợi và sự biểu hiện của các đoạn kháng thể chức năng trong tế bào chất ngoại vi của *E. coli* để phát triển các thư viện hiện thị kháng thể trên thể thực khuẩn. Các

thư viện gồm các polypeptit gắn kết với kháng thể hoặc kháng nguyên được tạo ra bởi một số phương pháp, ví dụ, cải biến một gen bằng cách chèn trình tự ADN ngẫu nhiên hoặc tách dòng trình tự gen liên quan. Các thư viện có thể được sàng lọc để biểu hiện các protein gắn kết với kháng thể hoặc kháng nguyên có đặc tính mong muốn.

Công nghệ hiển thị trên thể thực khuẩn có một số ưu điểm so với các phương pháp tế bào lai và tái tổ hợp thông thường để sản xuất kháng thể có đặc tính mong muốn. Kỹ thuật này cho phép tạo các thư viện kháng thể lớn có sự đa dạng trình tự trong thời gian ngắn mà không cần sử dụng động vật. Việc sản xuất các tế bào lai và sản xuất các kháng thể được làm giống kháng thể người cần thời gian sản xuất là vài tháng. Ngoài ra, vì không cần tính miễn dịch, thư viện kháng thể của thể thực khuẩn có thể tạo ra các kháng thể kháng các kháng nguyên có tính độc hoặc có tính kháng nguyên thấp. Thư viện kháng thể của thể thực khuẩn cũng có thể được sử dụng để sản xuất và nhận diện các kháng thể điều trị mới.

Các kỹ thuật tạo kháng thể của người từ người không được gây miễn dịch, trình tự dòng mầm hoặc kho Ig của tế bào B non (naive B cell) đã được gây miễn dịch nhờ sử dụng các thư viện hiển thị trên thể thực khuẩn có thể được sử dụng. Các mô bạch huyết khác nhau có thể được sử dụng để tạo ra các thư viện gắn kết kháng nguyên nguyên sơ hoặc không gây miễn dịch.

Các kỹ thuật nhận dạng và tách các kháng thể có ái lực cao từ thư viện hiển thị trên thể thực khuẩn là quan trọng để tách các kháng thể trị liệu mới. Việc tách các kháng thể có ái lực cao từ thư viện có thể phụ thuộc vào kích thước của thư viện, hiệu quả sản xuất ở tế bào vi khuẩn và sự đa dạng của thư viện. Kích thước của thư viện giảm do việc cuộn gấp không hiệu quả protein gắn kết kháng nguyên hoặc kháng thể và việc sản xuất không hiệu quả do sự có mặt của bộ ba kết thúc. Biểu hiện ở tế bào vi khuẩn có thể bị ức chế khi vùng gắn kết kháng nguyên hoặc kháng thể không được cuộn gấp đúng. Sự biểu hiện có thể được cải thiện bằng cách gây đột biến luân phiên các gốc trên bề mặt của mặt phân cách biến đổi/hằng định hoặc các gốc CDR được chọn. Trình tự của vùng khung là một yếu tố góp phần vào việc cuộn gấp đúng khi tạo thư viện kháng thể thể thực khuẩn ở tế bào vi khuẩn.

Quan trọng là tạo ra các thư viện khác nhau gồm các protein gắn kết kháng nguyên hoặc kháng thể trong việc tách các kháng thể có ái lực cao. Các vùng CDR3 được thấy là

thường tham gia vào việc gắn kết với kháng nguyên. Vì vùng CDR3 trên chuỗi nặng thay đổi đáng kể về kích thước, trình tự và hình thái kích thước về mặt cấu trúc, các thư viện khác nhau có thể được tạo ra bằng cách sử dụng vùng này.

Ngoài ra, sự đa dạng có thể được tạo ra bằng cách chọn ngẫu nhiên các vùng CDR của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ biến đổi sử dụng tất cả 20 axit amin ở mỗi vị trí. Việc sử dụng tất cả 20 axit amin dẫn đến trình tự của kháng thể có tính đa dạng tăng và cơ hội nhận dạng các kháng thể mới tăng.

Kháng thể hoặc đoạn kháng thể theo sáng chế có thể gồm trình tự của kháng thể kháng PD-1 theo sáng chế được mô tả trong bản mô tả này cũng như các thể tương đương về mặt sinh học của nó miễn là kháng thể hoặc đoạn kháng thể có thể nhận dạng đặc hiệu PD-1. Ví dụ, có thể tạo ra biến đổi bổ sung cho trình tự axit amin của kháng thể để cải thiện thêm ái lực gắn kết và/hoặc các đặc tính sinh học khác của kháng thể. Biến đổi như vậy bao gồm, ví dụ, loại bỏ, chèn và/hoặc thay thế các gốc trình tự axit amin của kháng thể. Biến đổi axit amin như vậy được thực hiện, dựa trên độ tương tự (tương đồng) tương đối của phần tử thể axit amin chuỗi bên, như tính kỵ nước, tính ưa nước, tích điện hoặc kích thước. Phân tích kích thước, hình dạng và loại của phần tử thể axit amin chuỗi bên thể hiện rằng tất cả các axit amin arginin, lysin và histidin là các gốc tích điện dương, alanin, glyxin và serin có cùng kích thước và phenylalanin, tryptophan và tyrosin có hình dạng giống nhau. Do đó, dựa trên những cân nhắc này, arginin, lysin và histidin; và alanin, glyxin và serin; và phenylalanin, tryptophan và tyrosin được xem là tương đương về chức năng sinh học.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó.

Kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó có thể được sản xuất theo cách tái tổ hợp bằng cách phân lập axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế. Axit nucleic được phân lập và chèn vào vectơ sao chép được để thực hiện việc tách dòng sau đó (khuếch đại ADN) hoặc biểu hiện sau đó. Dựa trên điều này, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vectơ chứa axit nucleic.

Thuật ngữ “axit nucleic” dự định gồm cả phân tử ADN (gADN và cADN) và phân tử ARN và các nucleotit, là các đơn vị cấu thành cơ bản của axit nucleic, gồm các nucleotit thu nhận tự nhiên cũng như các thể tương tự trong đó các gốc đường hoặc bazo

được cải biến. Trình tự của axit nucleic mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ theo sáng chế có thể khác nhau. Biến đổi như vậy bao gồm thêm, bớt hoặc thể không bảo toàn hoặc thể bảo toàn nucleotit.

Trình tự axit amin của kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, hoặc axit nucleic mã hóa nó theo sáng chế cũng được hiểu là bao gồm trình tự thể hiện độ tương đồng đáng kể với trình tự được nêu trong SEQ ID NO tương ứng. Thuật ngữ “trình tự thể hiện độ tương đồng đáng kể” có nghĩa là trình tự có độ tương đồng ít nhất là 90%, tốt nhất là, ít nhất là 95%, 96% hoặc lớn hơn, 97% hoặc lớn hơn, 98% hoặc lớn hơn hoặc 99% hoặc lớn hơn, khi cạnh tranh trình tự theo sáng chế để tương ứng với trình tự khác bất kỳ nhiều nhất có thể và phân tích trình tự được cạnh tranh nhờ sử dụng thuật toán thường được sử dụng trong lĩnh vực này.

Dựa trên việc này, kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể có độ tương đồng trình tự là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% hoặc nhiều hơn. Độ tương đồng này có thể được xác định bằng cách so sánh và/hoặc cạnh tranh trình tự các bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, độ tương đồng trình tự theo tỷ lệ phần trăm của axit nucleic hoặc protein theo sáng chế có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán so sánh trình tự (tức là, BLAST hoặc BLAST 2.0), cạnh tranh thủ công hoặc kiểm tra bằng mắt.

ADN mã hóa kháng thể có thể dễ dàng được tách hoặc tổng hợp bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ, sử dụng mẫu dò oligonucleotit gắn kết đặc hiệu với ADN mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể). Các vector khác nhau có thể thu nhận được. Thành phần vector thường gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều thành phần sau: trình tự báo hiệu, các điểm khởi đầu sao chép, một hoặc nhiều gen đánh dấu, các phân tử tăng cường, các gen khởi đầu và các trình tự kết thúc phiên mã.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vector” chỉ phương tiện để biểu hiện các gen đích ở tế bào chủ và gồm: vector plasmit, vector cosmit; và vector virus như vector thể thực khuẩn, vector adenovirus, vector retrovirus và vector virus liên quan đến adeno. Axit nucleic mã hóa kháng thể trong vector được liên kết chức năng với gen khởi đầu.

Thuật ngữ “liên kết chức năng” có nghĩa là liên kết chức năng giữa trình tự điều hòa biểu hiện axit nucleic (ví dụ, gen khởi đầu, trình tự tín hiệu hoặc dây vị trí gắn kết

điều hòa phiên mã) và trình tự axit nucleic khác và được điều hòa bởi sự phiên mã và/hoặc dịch mã của trình tự axit nucleic.

Khi tế bào nhân sơ được sử dụng làm vật chủ, vector thường gồm gen khởi đầu tiềm năng có khả năng thực hiện phiên mã (như gen khởi đầu tac, gen khởi đầu lac, gen khởi đầu lacUV5, gen khởi đầu lpp, gen khởi đầu pLλ, gen khởi đầu pRλ, gen khởi đầu rac5, gen khởi đầu amp, gen khởi đầu recA, gen khởi đầu SP6, gen khởi đầu trp, hoặc gen khởi đầu T7), vị trí gắn kết với ribosom để bắt đầu dịch mã và trình tự kết thúc phiên mã/dịch mã. Ngoài ra, ví dụ, khi tế bào nhân thực được sử dụng làm vật chủ, vector gồm gen khởi đầu (ví dụ, gen khởi đầu metallothionein, gen khởi đầu β-actin, gen khởi đầu hemoglobin của người và gen khởi đầu creatin cơ ở người) thu được từ hệ gen của tế bào động vật có vú, gen khởi đầu ora thu được từ virus động vật như gen khởi đầu late của adenovirus, gen khởi đầu 7.5K của virus gây bệnh đậu mùa, gen khởi đầu SV40,) gen khởi đầu của cytomegalovirus (CMV), gen khởi đầu tk của HSV, gen khởi đầu của virus gây khối u vú ở chuột (mouse breast tumor virus - MMTV), gen khởi đầu LTR của HIV, gen khởi đầu của virus Moloney, gen khởi đầu của virus Epstein Barr (Epstein Barr virus - EBV), và gen khởi đầu của virus gây bệnh sarcoma Rous (RSV)), và thường có trình tự polyadenyl hóa làm trình tự kết thúc phiên mã.

Tùy ý, vector có thể được dung hợp với trình tự khác để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tinh chế kháng thể được biểu hiện từ vector đó. Trình tự dung hợp gồm, ví dụ, glutathion S-transferase (Pharmacia, Mỹ), protein gắn kết maltoza (NEB, Mỹ), FLAG (IBI, Mỹ), His 6x (hexahistidin; Quiagen, Mỹ), và tương tự.

Vector gồm các gen kháng kháng sinh thường được sử dụng trong lĩnh vực này dưới dạng các gen đánh dấu chọn lọc được và các ví dụ bao gồm gen kháng ampicilin, gentamycin, carbenicilin, chloramphenicol, streptomycin, kanamycin, genetixin, neomycin và tetracyclin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào được biến nạp vector nêu trên. Tế bào được sử dụng để sản xuất kháng thể theo sáng chế có thể là tế bào nhân sơ, tế bào nấm men hoặc tế bào nhân thực bậc cao, nhưng không chỉ giới hạn ở đó.

Các chủng của chi *Bacillus* như *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* và *Bacillus tuligensis*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* (ví dụ, *Pseudomonas putida*), và tế bào chủ nhân sơ như *Proteus mirabilis* và *Staphylococcus* (ví dụ, *Staphylococcus carnosus*) có thể

được sử dụng.

Được quan tâm nhất là các tế bào động vật, và ví dụ về các dòng tế bào chủ hữu dụng gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, COS-7, BHK, CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U20S, hoặc HT1080.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, bao gồm các bước: (a) nuôi cấy tế bào; và (b) thu hồi kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó từ tế bào nuôi cấy.

Tế bào có thể được nuôi cấy trong các môi trường khác nhau. Các môi trường bất kỳ có bán trên thị trường có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy mà không có hạn chế nào. Tất cả các chất bổ sung thiết yếu khác đều được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể được đưa vào ở nồng độ thích hợp. Điều kiện nuôi cấy như nhiệt độ và độ pH đã được sử dụng với tế bào chủ đã chọn để biểu hiện, là hiển nhiên đối với người hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến nạp” có nghĩa là đưa vector chứa axit nucleic mã hóa protein đích vào tế bào chủ để protein được mã hóa bởi axit nucleic này có thể được biểu hiện ở tế bào chủ. Axit nucleic được biến nạp gồm cả axit nucleic được chèn vào và đặt tại nhiễm sắc thể của tế bào chủ và axit nucleic biến nạp nằm ngoài nhiễm sắc thể, miễn là nó có thể biểu hiện ở tế bào chủ. Ngoài ra, axit nucleic gồm ADN và ARN mã hóa protein đích. Axit nucleic có thể được đưa vào ở dạng bất kỳ miễn là nó có thể được đưa vào tế bào chủ và biểu hiện ở tế bào này. Ví dụ, axit nucleic có thể được đưa vào tế bào chủ ở dạng cat-xet biểu hiện, là cấu trúc gen chứa tất cả các yếu tố cần thiết để tự biểu hiện. Cat-xet biểu hiện thường gồm gen khởi đầu, tín hiệu kết thúc phiên mã, vị trí gắn kết với ribosom và tín hiệu kết thúc dịch mã, liên kết chức năng với axit nucleic. Cat-xet biểu hiện có thể lấy vector biểu hiện cho phép tự sao chép. Axit nucleic cũng có thể được đưa vào tế bào chủ ở dạng của chính nó và liên kết chức năng với trình tự cần thiết để biểu hiện ở tế bào chủ.

Việc thu hồi kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách ly tâm hoặc siêu lọc để loại bỏ tạp chất và tinh chế sản phẩm thu được, ví dụ, bằng cách sử dụng phép sắc ký ái lực. Các kỹ thuật tinh chế khác bỏ

sung, chẳng hạn sắc ký trao đổi anion hoặc cation, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký hydroxyl apatit, và phép sắc ký tương tự có thể được sử dụng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư chứa kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó làm hoạt chất.

Sáng chế đề xuất, ví dụ, chế phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư chứa: (a) một lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể kháng PD-1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế; và (b) chất mang được dụng. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư bao gồm việc sử dụng kháng thể kháng PD-1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế với lượng hữu hiệu cần thiết cho bệnh nhân.

Theo sáng chế, bệnh ung thư tốt hơn được chọn từ nhóm gồm u melanin, ung thư phổi, ung thư gan, u tế bào thần kinh đệm, ung thư buồng trứng, ung thư kết tràng, ung thư đầu và cổ, ung thư bàng quang, ung thư thận, ung thư dạ dày, ung thư vú, ung thư di căn, u lympho Hodgkin, ung thư tiền liệt tuyến và ung thư tụy, nhưng không chỉ giới hạn ở các bệnh ung thư này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “điều trị” có nghĩa là loại bỏ hoặc làm thuyên giảm bệnh ung thư hoặc một hoặc nhiều triệu chứng do bệnh ung thư gây ra, cũng như ngăn ngừa sự tiến triển của bệnh ung thư hoặc điều trị bệnh ung thư, làm đảo ngược các triệu chứng của bệnh, nhờ sử dụng chế phẩm và như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “ngăn ngừa” có nghĩa là tác dụng bất kỳ ức chế hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh ung thư nhờ sử dụng chế phẩm. Trong bản mô tả này, ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư được thực hiện nhờ sự gắn kết giữa kháng thể thu được theo sáng chế và PD-1. Kháng thể, gắn kết với PD-1, ức chế đáng kể hoạt tính của PD-1, nhờ đó ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư.

Thuật ngữ “chất mang được dụng” như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ chất mang hoặc chất pha loãng không ảnh hưởng đến hoạt tính hoặc đặc tính sinh học của hợp chất sử dụng mà không gây kích ứng cho sinh vật. Chất mang được dụng cho chế phẩm, được bào chế thành dung dịch lỏng, được tiệt trùng và tương thích sinh học và ví dụ về chúng bao gồm nước muối, nước vô trùng, dung dịch Ringer, nước muối được tạo đệm, dung dịch tiêm albumin, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol, etanol và hỗn hợp gồm một hoặc nhiều chất này. Nếu cần, các chất phụ trợ thông thường khác như

chất chống oxy hóa, chất đệm và chất kìm hãm vi khuẩn có thể được bổ sung vào. Ngoài ra, chất pha loãng, chất phân tán, chất hoạt động bề mặt, chất kết dính và chất làm trơn còn có thể được thêm vào để bào chế các dung dịch tiêm được như dung dịch, hỗn dịch và nhũ dịch chứa nước, viên tròn, viên nang, hạt hoặc viên nén.

Chế phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư chứa kháng thể và chất mang được dụng có thể được áp dụng cho dạng bào chế bất kỳ chứa nó làm hoạt chất và có thể được bào chế cho dạng bào chế dùng qua đường miệng hoặc ngoài được tiêu hóa. Các dạng bào chế được có thể gồm các dạng bào chế thích hợp dùng qua đường miệng, qua trực tràng, qua mũi, khu trú (kể cả dưới má và lưỡi), dưới da, qua âm đạo hoặc ngoài đường tiêu hóa (gồm trong bắp, dưới da và trong tĩnh mạch) hoặc xông hít hoặc bơm vào.

Ví dụ về các dạng bào chế dùng qua đường miệng chứa chế phẩm theo sáng chế làm hoạt chất gồm viên nén, viên dẹt, viên ngậm, hỗn dịch chứa nước hoặc dầu, bột hoặc hạt được bào chế, nhũ dịch, viên nang cứng hoặc mềm, xi rô hoặc cốm ngọt. Để bào chế các dạng bào chế như viên nén hoặc viên nang, chất kết dính như lactoza, sacaroza, sorbitol, manitol, tinh bột, amylopectin, xenluloza hoặc gelatin, tá dược như dicanxi phosphat, chất gây rã như tinh bột ngô hoặc tinh bột khoai lang, chất làm trơn như canxi stearat, natri stearyl fumarat hoặc sáp polyetylen glycol có thể được đưa vào và chế phẩm viên nang còn chứa chất mang lỏng như dầu béo, ngoài các thành phần nêu trên.

Ví dụ về các dạng bào chế dùng ngoài đường tiêu hóa chứa chế phẩm theo sáng chế làm hoạt chất gồm dạng tiêm như tiêm dưới da, tiêm trong tĩnh mạch hoặc tiêm trong bắp, dạng viên đạn hoặc phun như sol xông hít qua các thiết bị thở. Để bào chế thành các dạng bào chế tiêm được, chế phẩm theo sáng chế có thể được trộn trong nước với chất làm ổn định hoặc chất đệm để tạo ra dung dịch hoặc hỗn dịch và dung dịch hoặc hỗn dịch này có thể được bào chế trên cơ sở đơn vị ống hoặc lọ để sử dụng. Để bơm thuốc đạn, chế phẩm dùng qua trực tràng như thuốc đạn hoặc chế phẩm thụt chứa chất nền thuốc đạn thông thường như bơ ca cao hoặc glyxerit có thể được sử dụng. Đối với chế phẩm phun mù như sol khí, chất phụ gia như chất đẩy có thể được trộn để dịch cô đặc phân tán trong nước hoặc bột ướt được phân tán.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư bao gồm việc sử dụng chế phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư chứa kháng thể.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “sử dụng” chỉ việc đưa được phẩm theo sáng chế vào bệnh nhân bằng phương pháp thích hợp bất kỳ. Đường sử dụng chế phẩm theo sáng chế có thể là đường bất kỳ bao gồm đường miệng hoặc đường ngoài đường tiêu hóa. Cụ thể, được phẩm có thể được sử dụng theo cách thông thường qua đường miệng, trực tràng, khu trú, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong bắp, trong động mạch, dưới da, trong mũi, xông hít, qua mắt hoặc trong da.

Phương pháp điều trị theo sáng chế bao gồm việc sử dụng một lượng có hiệu quả được lý của chế phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư theo sáng chế. Hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này tổng liều lượng hàng ngày có thể được xác định nhờ đánh giá thích hợp của chuyên gia y tế. Lượng có hiệu quả điều trị cụ thể đối với một bệnh nhân xác định tốt hơn là phụ thuộc vào nhiều yếu tố gồm loại và mức độ đáp ứng đạt được cũng như sự có mặt của các tác nhân khác được sử dụng, chế phẩm cụ thể và độ tuổi, thể trọng, tình trạng sức khỏe chung, giới tính và chế độ ăn của bệnh nhân, thời gian sử dụng, đường sử dụng và tốc độ bài tiết chế phẩm, thời gian điều trị và thuốc sử dụng kết hợp hoặc đồng thời với chế phẩm cụ thể và vào các yếu tố tương tự đã biết trong lĩnh vực được. Do vậy, lượng hữu hiệu của chế phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư, thích hợp với mục đích của sáng chế, tốt hơn được xác định khi xem xét các yếu tố nêu trên.

Ngoài ra, phương pháp điều trị theo sáng chế có thể được áp dụng cho động vật bất kỳ có thể phát triển các bệnh như phát triển khối u hoặc tân tạo mạch do hoạt tính quá mức của PD-1, và động vật này bao gồm người và động vật linh trưởng cũng như vật nuôi như bò, lợn, cừu, ngựa, chó và mèo.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm để chẩn đoán bệnh ung thư chứa kháng thể PD-1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế. Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp chẩn đoán bệnh ung thư bằng cách điều trị bằng kháng thể PD-1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Bệnh ung thư có thể được chẩn đoán bằng cách đo mức biểu hiện của PD-1 trong mẫu thông qua kháng thể kháng PD-1 theo sáng chế. Mức biểu hiện có thể đo được bằng phương pháp thử nghiệm thông thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, kết tủa miễn dịch phóng xạ, kết tủa miễn dịch, nhuộm hóa mô miễn dịch, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA), ELISA bắt,

phân tích ức chế hoặc cạnh tranh, phân tích sandwich, đếm tế bào dòng chảy, nhuộm huỳnh quang miễn dịch và tính chế ái lực miễn dịch sử dụng kháng thể kháng PD-1.

Bệnh ung thư có thể được chẩn đoán bằng cách phân tích cường độ của tín hiệu cuối nhờ quá trình thử nghiệm miễn dịch. Tức là, khi protein của chất đánh dấu theo sáng chế được biểu hiện cao ở mẫu sinh học và do vậy tín hiệu của mẫu sinh học mạnh hơn của mẫu sinh học bình thường (ví dụ, mô dạ dày, máu, huyết tương hoặc huyết thanh bình thường), bệnh ung thư được chẩn đoán.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kit chẩn đoán bệnh ung thư chứa chế phẩm chẩn đoán bệnh ung thư. Kit theo sáng chế gồm kháng thể kháng PD-1 theo sáng chế và có thể chẩn đoán bệnh ung thư bằng cách phân tích tín hiệu được tạo ra khi phản ứng giữa mẫu và kháng thể. Tín hiệu này có thể gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, enzym liên hợp với kháng thể như phosphatasa kiềm, β -galactosidaza, peroxidaza cải ngựa, luxiferaza hoặc sắc tố tế bào (cytochrome) P450. Trong trường hợp này, khi phosphatasa kiềm được sử dụng làm enzym, dưới dạng cơ chất cho enzym này, cơ chất phản ứng sinh màu như bromcloindol phosphat (BCIP), nitroblue tetrazoli (NBT), naphthol-AS-B1-phosphat và ECF (phát quang hóa học tăng cường) được sử dụng và khi peroxidaza cải ngựa được sử dụng, cơ chất như clonaphthol, aminoethylcarbazol, diaminobenzidin, D-luxiferin, luxigenin (Bis-N-metyl acridini nitrat), resorufin benzyl ete, luminol, thuốc thử Amplex Red (10-axetyl-3,7-dihydroxy phenoxazin), HYR (p-phenylendiamin-HCl và pyrocatechol), TMB (tetrametylbenzidin), ABTS (2,2'-Azin-di[3-etylbenzthiazolin sulfonat]), o-phenylendiamin (OPD) và naphthol/pyronin, glucoza oxidaza, t-NBT (nitroblue tetrazoli) hoặc m-PMS (phenzain metosulfat) được sử dụng nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các chất này.

Ngoài ra, kit theo sáng chế cũng có thể gồm chất đánh dấu để tạo ra tín hiệu phát hiện được và chất đánh dấu này có thể gồm hóa chất (ví dụ, biotin), enzym (phosphatasa kiềm, β -galactosidaza, peroxidaza cải ngựa và sắc tố tế bào P450), chất có hoạt tính phóng xạ (như C14, I125, P32 và S35), chất huỳnh quang (như fluorescein), chất phát quang, chất phát quang hóa học và FRET (fluorescence resonance energy transfer - truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang), nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này.

Việc đo hoạt tính của enzym được sử dụng để chẩn đoán bệnh ung thư hoặc đo tín hiệu có thể được thực hiện bằng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực này.

Do đó, biểu hiện của PD-1 có thể được phân tích định tính hoặc định lượng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng cách tham chiếu đến các ví dụ. Tuy nhiên, hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này là các ví dụ này chỉ để minh họa sáng chế và không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Biểu hiện và tính chế kháng nguyên PD-1

1. Sản xuất vector biểu hiện protein PD-1

Để tách dòng PD-1, thực hiện khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction - PCR) sử dụng các đoạn mồi cho PD1 chứa các vị trí enzym giới hạn *SfiI* ở 5' và 3' (bảng 1) để chỉ thu được vùng ngoại bào nhờ sử dụng thư viện cADN của tế bào Jurkat (Stratagene, USA). Sản phẩm khuếch đại bằng PCR được chuẩn bị bằng cách dung hợp Fc của người (SEQ ID NO: 196) và Fc của chuột (SEQ ID NO: 197) với đầu tận cùng carboxyl sử dụng vector N293F (FIG.1).

Bảng 1

Tên	Trình tự 5'→3'	SEQ ID NO.
PD1-F	ccaggatggttcttagactcccc	194
PD1-R	caccagggtttggaactggc	195

2. Biểu hiện và tính chế kháng nguyên PD-1

Để biểu hiện kháng nguyên ở tế bào động vật, tế bào HEK-293F được chuyển nhiễm ADN plasmit. Dung dịch của phản ứng polyplex để chuyển nhiễm được chuẩn bị bằng cách trộn 25µg ADN plasmit với 3mL môi trường biểu hiện Freestyle 293 và trộn thêm 2mg/mL PET (polyetylenimin, polyplusA-transfection, USA) với hỗn hợp thu được một lần nữa. Dung dịch phản ứng polyplex phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 15 phút và sau đó nuôi cấy trong 40mL môi trường nuôi cấy có nồng độ 1×10^6 tế bào/mL trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C và 8% CO₂ ở tốc độ 120 vòng/phút. Sau 24 giờ chuyển nhiễm, Soytone (BD, USA), là chất bổ sung, được thêm vào đến nồng độ cuối là 10g/L. Kháng thể được tạo ra nhờ sử dụng hệ biểu hiện tạm thời sử dụng tế bào HEK-293F trong

7 ngày. Thực hiện phép sắc ký ái lực để thu được kháng nguyên từ dung dịch nuôi cấy. Thu dịch nổi bằng cách ly tâm ở tốc độ 5.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ tế bào và các mảnh vụn tế bào khỏi môi trường nuôi cấy được thu hồi vào ngày thứ 7. Cho dịch nổi phản ứng với nhựa protein A agarosa tái tổ hợp được rửa bằng DPBS ở 4°C trong 16 giờ.

Khi nhựa protein A agarosa tái tổ hợp được sử dụng, protein được rửa giải bằng 0,1M glyxin và trung hòa bằng 500μL Tris-HCl 1M để thực hiện tinh chế sơ cấp. Protein tinh chế sơ cấp được tinh chế thứ cấp nhờ sử dụng phép sắc ký lọc gel Superdex 200 (1,5cm*100cm).

Độ tinh khiết của protein tinh chế được xác định bằng phép sắc ký trên gel SDS-PAGE và rây phân tử [TSK-GEL G-3000 SWXL size-exclusion chromatography (SEC) (Tosoh)].

Kết quả là, xác nhận được rằng protein PD1 đã tinh chế có độ tinh khiết là 95% hoặc lớn hơn như được thể hiện trên các Fig.2A đến Fig.2D.

Ví dụ 2: Sàng lọc các kháng thể PD-1 của người

1. Chuẩn bị kháng nguyên

PD1-hFc và PD1-mFc được chuẩn bị trong ví dụ 1 và PD1-his (Catalog Number, 10377-H08H) được mua từ Sino Biological Inc. làm kháng nguyên protein được phủ với liều lượng 50ug lên ống hấp thụ miễn dịch và sau đó được phong bế.

2. Chọn ái lực (Bio-panning)

Thế thực khuẩn thư viện kháng thể của người thu được bằng cách cho thư viện scFv của người lây nhiễm tập gồm $2,7 \times 10^{10}$ vi khuẩn và sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 16 giờ. Sau khi nuôi cấy, dung dịch nuôi cấy được ly tâm và cô dịch nổi bằng PEG, và sau đó hòa tan trong đệm PBS để chuẩn bị thư viện kháng thể của người. Thế thực khuẩn thư viện kháng thể của người được nạp vào ống miễn dịch, sau đó cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Sau khi rửa bằng PBS/T 1X và PBS 1X, chỉ các scFv-thể thực khuẩn gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên được tách rửa.

Các thể thực khuẩn được tách rửa được gây nhiễm *E. coli* lần nữa và khuếch đại (quy trình chọn ái lực) để tạo ra các nhóm thể thực khuẩn dương. Quá trình chọn ái lực vòng thứ hai và thứ ba được thực hiện nhờ sử dụng thể thực khuẩn được khuếch đại trong

vòng chọn ái lực thứ nhất theo cách thức như trên, ngoại trừ chỉ số lần bước rửa PBST được tăng lên.

Kết quả là, như được hiện trên bảng 2, quan sát thấy rằng số lượng thực khuẩn thể gắn kết với kháng nguyên (đầu ra) trong quy trình chọn ái lực thứ ba tăng nhẹ, khi được so sánh với số lượng thực khuẩn thể đầu vào.

Bảng 2

Số lần chọn ái lực	Số thể thực khuẩn đầu vào	Số thể thực khuẩn đầu ra
1	2×10^{13}	$3,6 \times 10^7$
2	$1,2 \times 10^{13}$	7×10^7
3	2×10^{13}	2×10^9

3. Thử nghiệm ELISA trên đa thể thực khuẩn

Thử nghiệm ELISA (enzyme linked immunoassay – phân tích miễn dịch được liên kết enzym) trên đa thể thực khuẩn được thực hiện để nghiên cứu tính đặc hiệu đối với kháng nguyên của nhóm kháng thể dương trên đa scFv-thể thực khuẩn thu được bởi mỗi vòng chọn ái lực ở ví dụ 2.

Dung dịch gốc tế bào đông lạnh sau các quá trình chọn ái lực thứ nhất đến thứ ba được bổ sung vào môi trường chứa 5mL YTCM 2x, 2% glucoza và 5mM $MgCl_2$ đến OD_{600} bằng 0,1, và sau đó nuôi cấy ở 37°C trong 2 đến 3 giờ ($OD_{600} = 0,5$ đến 0,7). Thể thực khuẩn hỗ trợ M1 được gây nhiễm và nuôi cấy trong môi trường chứa YTCMK 2x, 5mM $MgCl_2$ và 1mM IPTG ở nhiệt độ 30°C trong 16 giờ. Ly tâm tế bào nuôi cấy (4,500 vòng/phút, 15 phút, 4°C), và chuyển dịch nổi vào ống mới (đa scFv-thể thực khuẩn được chọn ái lực lần thứ nhất đến lần thứ ba). Mỗi trong số hai loại kháng nguyên được phủ ở nồng độ 100ng/lỗ trên đĩa miễn dịch 96 lỗ (NUNC 439454) bằng dung dịch đệm phủ ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ và mỗi lỗ được phong bế bằng sữa tách kem 4% hòa tan trong PBS.

Rửa mỗi lỗ bằng 0,2ml PBS/T, và 100μL đa scFv-thể thực khuẩn được chọn ái lực lần thứ nhất đến lần thứ ba được thêm vào mỗi lỗ, sau đó phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Một lần nữa, rửa mỗi lỗ 4 lần bằng 0,2mL PBS/T, và kháng thể thứ cấp, kháng M13-HRP (Amersham 27-9421-01) được pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 và được

phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi rửa bằng PBS/T, hòa tan các viên OPD (Sigma. 8787-TAB) trong dung dịch đệm PC và dung dịch thu được được thêm vào ở nồng độ 100 μ L/lỗ để hiện màu trong 10 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ ở 490nm bằng quang phổ kế (Molecular Device).

Các kết quả được thể hiện trên Fig.3. Như có thể thấy trên Fig.3, ELISA thể hiện rằng khả năng gắn kết với hai kháng nguyên PD-1 tăng ở đa scFv-thể thực khuẩn thứ ba.

4. Sàng lọc các thể thực khuẩn dương

Các khuẩn lạc thu được từ nhóm kháng thể thể thực khuẩn đa dòng (quy trình chọn ái lực thứ ba) có khả năng gắn kết cao được nuôi cấy trong đĩa 96 lỗ sâu 1ml (Bioneer 90030) ở nhiệt độ 37°C trong 16 giờ. 100 đến 200 μ L tế bào đã sinh trưởng được thêm vào môi trường chứa YTCM 2x, 2% glucoza và 5mM MgCl₂, đến OD₆₀₀ bằng 0,1, và được thêm vào môi trường chứa 1ml YTCM 2x, 2% glucoza và 5mM MgCl₂, và sau đó nuôi cấy trên đĩa 96 lỗ sâu ở nhiệt độ 37°C trong 2 đến 3 giờ đến OD₆₀₀ là từ 0,5 đến 0,7. Các thể thực khuẩn hỗ trợ M1 được gây nhiễm ở tỷ lệ MOI là 1:20 và nuôi cấy trong môi trường chứa YTCMK 2x, 5mM MgCl₂, 1mM IPTG ở 30°C trong 16 giờ.

Kháng nguyên PD1 được phủ ở mật độ 100ng/lỗ trên đĩa miễn dịch 96 lỗ ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ và mỗi lỗ được phong bế bằng 4% sữa tách kem hòa tan trong PBS. Mỗi thể thực khuẩn scFv đơn dòng (100 scFv-thể thực khuẩn) được rửa bằng 0,2mL PBS/T và nuôi cấy trong 16 giờ được bổ sung với lượng 100 μ L vào mỗi lỗ và được cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Một lần nữa, mỗi lỗ được rửa 4 lần bằng 0,2ml PBS/T, và kháng thể thứ cấp, kháng M13-HRP, được pha loãng đến tỷ lệ 1/2000 và được cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi rửa bằng 0,2mL PBS/T, tiến hành hiện màu và đo độ hấp thụ ở bước sóng 490nm.

Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.4, thu được tổng số vài chục dòng đơn thể thực khuẩn đối với PD1 ở dạng dòng đơn thể thực khuẩn có khả năng gắn kết cao với mỗi kháng nguyên.

5. Phân tích trình tự bazơ của kháng thể thể thực khuẩn dương

Các dòng đơn được chọn được đưa vào quá trình tách ADN sử dụng kit tinh chế ADN (Qiagen, Germany) để thu ADN, và phân tích trình tự ADN được yêu cầu (Solgent). Các vùng CDR V_H và V_L của kháng thể đã chọn được nhận diện, dựa trên kết

quả phân tích trình tự và độ giống nhau (độ tương đồng) giữa các kháng thể này và nhóm kháng thể dòng mầm được nghiên cứu nhờ sử dụng chương trình Ig BLAST trên trang web NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>. Kết quả là, thu được 15 loại kháng thể thể thực khuẩn đặc hiệu đối với PD1 và được tóm tắt trong bảng 3 dưới đây.

[Bảng 3] Đặc tính của các đơn dòng PD1

Tên dòng	VH	Độ tương đồng	VL	Độ tương đồng	Nhóm
Nivolumab	VH3-33	91,80%	L6	98,90%	
Pembrolizumab	VH1-2	79,60%	L25	80,80%	
PD1-29A2	VH3-9	91,80%	V2-17	86,50%	1
PD1-29H3	VH3-9	90,80%	V1-11	88,50%	2
PD1-31F3	VH1-69	92,90%	V1-13	93,90%	3
PD1-32A6	VH1-69	87,80%	L5	91,60%	4
PD1-41C9	VH3-30	95,80%	O1	92,10%	5
PD1-42G4	VH3-11	93,80%	O2	93,80%	6
PD1-44B5	VH3-30	99,00%	V1-16	85,60%	7
PD1-45D6	VH3-30	95,80%	O1	93,10%	8
PD1-45F1	VH1-46	91,80%	#-13	93,80%	9
PD1-45F4	VH3-9	90,80%	V2-1	77,70%	10
PD1-48A9	VH1-69	79,60%	O1	96,00%	11
PD1-49B9	VH3-9	88,70%	V1-2	93,90%	12
PD1-49A2	VH3-30	97,90%	O1	93,10%	13
PD1-51D9	VH1-3	82,70%	A3	94,00%	14
PD1-52E8	VH3-9	91,80%	V2-17	90,50%	15

Kháng thể có các CDR chuỗi nặng và nhẹ và trình tự FR của các kháng thể được chọn và các vùng biến đổi của chuỗi nặng và các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa chúng được thể hiện trong các bảng 4 và 5 dưới đây.

[Bảng 4] Các vùng biến đổi của chuỗi nặng của các dòng PD1

Tên	FR1	CD	FR2	CD	FR3	CDR3	FR4
-----	-----	----	-----	----	-----	------	-----

		R1		R2			
PD1-45D6	QVQLVE SGGGVV QPGRSL RLSCAA S	GF TFS SY A	MHWVR QVPGKG LEWVAV	ISY DG ND K	YYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYC	VPTTFEY	WGQ GSQ VTVS S
SEQ ID NO:	80	1	96	31	114	57	135
PD1-49A2	QVQLVE SGGGVV QPGRSL RLSCAA S	GF TFS SY A	MHWVR QAPGKG LEWVAV	ISY DG SN K	YYADSVKGRFTISR DNPKNLYLQMNS LRAEDTAVYYC	TTTTFDS	WGR GTLV TVSS
SEQ ID NO:	80	1	97	32	115	58	136
PD1-27A1 2	QVQLVE SGGGLV QPGRSL RLSCAA S	GF TF ND YA	MHWVR QVPGKG LEWVSG	ISW NS GRI	VYADSMKGRFTIS RDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYC	ARSQQQI LDY	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO:	81	2	98	33	116	59	137
PD1-27B1	QVQLVE SGGGLV KPGGSL RLSCAA S	GF TF ND YA	MHWVR QVPGKG LEWVSG	ISW NS GRI	VYADSMKGRFTIS RDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYC	ARSIRQIL DY	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO:	82	2	98	33	116	60	137
PD1-28D1 2	QVQLVE SGGGLV QPGRSL RLSCAA S	GF TF ND YA	MHWVR QVPGKG LEWVSG	ISW NS GRI	VYADSMKGRFTIS RDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYC	ARSLPXS RSRLDV	WGQ GTLV TVSS
SEQ	81	2	98	33	116	61	137

ID NO:							
PD1- 29A2	QVQLVE SGGGLV QPGRSL RLSCAA S	GF TF ND YA	MHWVR QVPGKG LEWVSG	ISW NS GRI	VYADSMKGRFTIS RDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYC	ARAXTSP LDMSLD Y	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO:	81	2	98	33	116	62	137
PD1- 29H3	QMQLVE SGGNLV QPGRSL RLSCAA S	GF TF DD YG	MHWVR QAPGKG LEWVSS	ISW NS GTI	GYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNS LRSED TAVYYC	ARLLHQ MNEHEF MDV	WGQ GTTV TVSS
SEQ ID NO:	83	3	99	34	117	63	138
PD1- 31F3	QVQLVQ SGAEVK KPGSSV KVSCKA S	GG TFS SY A	ISWVRQ APGQGL EWMGG	IIPL FST A	HSAQKFQGRVTIT ADESSSTAYMELSS LRSED TAVYYC	AKHKGL PFDWSPD GFD T	WGQ GTM VTVS S
SEQ ID NO:	84	4	100	35	118	64	139
PD1- 32A6	QVQLVQ SGAEVK KPGSSV KVSCKA S	GD TFT RN A	VSWVR QAPGEG LEWMA D	IIP I FGS A	NYAQKFQGR LTLT ADVSTSTAYMELS SLRSED TAVYYC	ARTIEGA FDI	WGQ GTM VTVS S
SEQ ID NO:	84	5	101	36	119	65	139
PD1- 41C9	QMQLVE SGGGVV QPGRSL RLSCAA S	GF TFS SY A	MHWVR QAPGKG LEWVAV	ISY DG SN K	YYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNR LRSED TAVYYC	TTTTFDS	WGQ GT LI TVSS

SEQ ID NO:	85	1	97	32	120	58	140
PD1- 42G4	QVQLVE SGGGLV KPGGSL RLSCAA S	GF TFS DY Y	MSWIRQ APGKGL E WVSD	ISA SG NSI	YYADSVKRRFTISR DNSKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYC	VTSGPFG EFRN	WGL GTLV TVSS
SEQ ID NO:	82	6	102	37	121	66	141
PD1- 44B5	QVQLVE SGGGVV QPGRSL RLSCAA S	GF TFS SY A	MHWVR QAPGKG LEWVAV	ISY DG SN K	YYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYC	ARLMHT FSVQYFL DV	WGQ GTTV TVSS
SEQ ID NO:	80	1	97	32	114	67	138
PD1- 45D6	QVQLVE SGGGVV QPGRSL RLSCAA S	GF TFS SY A	MHWVR QVPGKG LEWVAV	ISY DG ND K	YYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYC	VPTTFEY	WGQ GSQ VTVS S
SEQ ID NO:	80	1	96	31	114	57	135
PD1- 45F1	QVQLVQ SGAEVK KPGASV KLSCKA S	GY TF NS YY	VHWVR QAPGQG LEWMGI	INP SD GS A	TYAQKFQGRVTMT SDTSTSSVYMELSS LRSED TAVYYC	ARDGNY YDSRGY YYDTFD M	WGQ GTLI TVSS
SEQ ID NO:	86	7	103	38	122	68	140
PD1- 45F4	QMQLVE SGGGLV QPGRSL RLSCAA	GF TF DD YA	MHWVR QAPGQG LEWVSG	ISW NS NNI	KYADSVKGRFTISR DNSKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYC	ARGALTP LDV	WGQ GTPV TVSS

	S						
SEQ ID NO:	87	8	104	39	123	69	142
PD1- 47B8	QMQLVQ SGAEVK KPGASV KVSCKA S	GY TFT SY D	INWVRQ ASGQAP EWMGW	LH AD SG KT	GYAQTFQGRVTMT RDTSIDTAYLELSS LRSED TAVYYC	ARGTHW LDS	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO:	88	9	105	40	124	70	137
PD1- 48A6	QVQLVQ SGGGLIQ PGGSLRL SCAAS	GF TV SR NS	MNWVR QTPGKG PEWVSL	IFS GG TT K	YKDSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNS LRAED TAVYYCA	AREEQFL IALAGRY FDY	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO:	89	10	106	41	125	71	138
PD1- 48A9	QMQLVQ SGAEVK KPGSSV KVSCKA S	GD TFT RYI	INWVRQ APGQGL EWMGR	VIP TL GLT	TYAQNFQDTVTHA DKSTNTAYMELKN LRSED TAVYYC	ARGYGS GAFDI	WGQ GTMI TVSS
SEQ ID NO:	90	11	107	42	126	72	143
PD1- 48G6	QMQLVE SGGGVV QPGRSL RLSCAA S	GF TFS HY A	MHWVR QAPGKG LEWVAV	ISY DG SKI	YYADSVKGRFTVS RDNSKNTLYLQMN SLRAED TAVYYC	ARIGYKD AFDI	WGQ GTM VTVS S
SEQ ID NO:	85	12	97	43	127	73	139
PD1- 49A2	QVQLVE SGGGVV QPGRSL RLSCAA	GF TFS SY A	MHWVR QAPGKG LEWVAV	ISY DG SN K	YYADSVKGRFTISR DNPKN TLYLQMNS LRAED TAVYYC	TTTTFDS	WGR GTLV TVSS

	S						
SEQ ID NO:	80	1	97	32	115	58	136
PD1- 49B9	QMQLVE SGGGLV QPGRSL RLSCAA S	GF TFE DY A	MHWVR QPPGKG LEWVSS	ISW NS HNI	AYADSVKGRFTISR DNSKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYC	STSGLGV HA	WGQ GTM VTVS S
SEQ ID NO:	87	13	108	44	128	74	139
PD1- 51A6	QVQLVE SGGGLV QPGGSL RLSCAA S	GL SFS SY W	MTWVR QAPGKG LEWVAN	IKQ DG SE K	YYVDSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYC	ARDSFG GHLDL	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO:	91	14	109	45	129	75	137
PD1- 51D9	QVQLVE SGAEVK KPGASV KLSCKA S	GY TFS SY W	MHWVR QAPGQR LEWMG E	INP GN GH T	NYNEKFKSRVTITV DKSASTAYMELSS LRSED TAVYYC	AREGDG SYWGYF DS	WGQ GTPI TVSS
SEQ ID NO:	92	15	110	46	130	76	144
PD1- 52E8	QVQLVQ SGGNLV QPGRSL RLSCAA S	GF TF DD YA	MHWVR QAPGKG LEWVSG	ISW NS GT P	GYADSVQGRFTISR DNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYC	ARGHNY LDSSYYD Y	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO:	93	8	111	47	131	77	137
PD1- 62E1	QVQLVE SGGDLV KPGRSL	GF TF GD	LTWVRQ IPGKGLE WVGF	IRS KA YG	TTEYAASVKGRFTI SRDDSKSIAYLQM NSLRAEDTAVY	ASVSYCS GGSCYQ GTFDY	WGQ GTLV TVSS

	RLSCTGS	HP		E			
SEQ ID NO:	94	16	112	48	132	78	137
PD1- 72D1 0	QVQLVE SGGGVV QPGRSL RLSCAA S	GF TFS SY A	MHWVR QAPGKG LEWVAV	ISY DG SN K	YYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYC	TTTTFDS	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO:	80	1	97	32	114	58	137
PD1- 74A1 1	QVQLVQ SGGGVV QPGRSL RLSCAA S	GF TFS SY A	MHWVR QAPGKG LEWVAV	ISY DG SN K	YYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYC	ARTTFDY	WGQ GTLI TVSS
SEQ ID NO:	95	1	97	32	114	79	140
PD1- 75C1 0	QVQLVE SGGGVV QPGRSL RLSCAA S	GF TFS SY A	MHWVR QAPGKG LEWVAV	ISY DG SN K	YYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYC	VPTTFEY	WGQ GSQ VTVS S
SEQ ID NO	80	1	97	32	114	57	135
PD1- 74A0 1	QVQLVE SGGGVV QPGRSL RLSCAA S	GF TFS SY A	MHWVR QAPGKG LEWVAV	ISY DG SN K	YYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNS LRSED TAVYYC	VPTTFEY	WGQ GSQ VTVS S
SEQ ID NO	80	1	97	32	133	57	135
PD1- 74H1 2	QVQLVE SGGGVV QPGRSL	GF TFS SY	MHWVR QAPGKG LEWVAV	ISY DG SN	YYADSVKGRFTISR DNSKNMLYLEMN SLRAEDTAVYYC	VPTTFEY	WGQ GSQ VTVS

	RLSCAA S	A		K			S
SEQ ID NO	80	1	97	32	134	57	135

[Bảng 5] Các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của các dòng PD1

Tên	FR1	CDR1	FR2	CDR 2	FR3	CDR3	FR4
PD1- 27A12	DIQMTQSP SSVSASVG DRVITTCR AS	RDIS RW	LAWYQQ KPGEAP KLLIY	GAS	SLRSGVSSRFS GSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATY FC	QQGK SFPY T	FGQ GTK VDIK
SEQ ID NO	270	198	295	223	316	242	356
PD1- 27B1	DIVMTQTP LSSPVTLG QPASISCRS S	QSLV H	LNWFHQ RPGQPPR LLIH	KIS	NRVSGVPDRFS GSGAGTDFTLK ISRVEAEDVGV YYC	MQST QFPY T	FGQ GTK VDIK
SEQ ID NO	271	199	296	224	317	243	356
PD1- 28D12	DIQMTQSP SSVSASLG DRVITTCR AS	QAIS NW	LTWYQQ KPGKAP KLLIY	ATS	SLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTI SSLQPEDVATY YC	QQTD SFPLT	FGG GTK VDIK
SEQ ID NO	272	200	297	225	318	244	357
PD1- 29A2	SYELTQSPS VSMSPGQT ARITCSGD	ALSK QY	ASWYQL KPGQAP VVVMY	KDT	ERPSGIPDRFSG SSSGTTVTLTIS GVQAEDGADY YC	QSITD KSGT DVI	FGG GTK LTV L
SEQ ID NO	273	201	298	226	319	245	358
PD1- 29H3	QLVLTQPS SMSEAPGQ RVTISCSGG	TSNI GTNA	VNWWYQ QPPGKA PTLLIY	YDD	RLTSGVSDRFS GSKSGTSASLA ISRLQSEDEAD YYC	AAW DDSL NGW V	FGG GTK LTV L
SEQ	274	202	299	227	320	246	358

ID NO							
PD1-31F3	QFVLTQPP SVSGAPGQ RVIISCTGS	SSNI GAG YD	VHWHYQ QLPGTAP KVLIIY	GNS	DRPSGVPDRFS ASKSATSASLA ITGLQAEDEAD YYC	QSYD SSLS GYV	FGT GTK VTV L
SEQ ID NO	275	203	300	228	321	247	359
PD1-32A6	DIQMTQSP SSVSASVG DRVTTTCR AS	QGIV SW	LAWYQQ KPGKAP RLIIY	RAS	DLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTI SSLQPEDVATY YC	QQAD SFPLT	FGG GTK VEIK
SEQ ID NO	270	204	301	229	322	248	360
PD1-41C9	DIVMTQTP LSLPVTPGE AASISCRSS	QSLLD SED GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLIIY	TLS	HRASGVPDRFS GSGSGTDFTLK ISRVAEDVGL YYC	LQRM GFPY T	FGQ GTK LDIK
SEQ ID NO	276	205	302	230	323	249	361
PD1-42G4	DIQMTQSP SSLSASVG DRVTTTCR AS	QGIS SY	LAWYQQ KPGKAP KLLIY	AAS	TLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATY FC	QQSY TSPR T	FGQ GTK LDIK
SEQ ID NO	277	206	303	231	324	250	361
PD1-44B5	QFVLTQSP SASGTPGQ NIVISCSAS	TFNI GTTT	VNWHYQ LPGTAPK LLIY	NYD	QRPSGVPDRFS GSKSGTSASLA ISGLQSEDEAD YYC	AAW DDSL NAWL	FGG GTK LTV L
SEQ ID NO	278	207	304	232	325	251	358
PD1-45D6	DIVMTQTP LSLPVTPGE AASISCRSS	QSLLD SDD GKTY	LDWYLQ KPGQSP QLIIY	TLS	YRASGVPDRFS GSGSGTEFNLR ISRVEAEDVGI YYC	MQR VEFP FT	FGQ GTK LDIK
SEQ ID NO	276	208	302	230	326	252	361
PD1-45F1	SYELTQDP AVSVALGQ	SLRT YY	ASWYQQ KPGQAPI	GKN	NRPSGIPDRFSG SSSGNTASLTIT	NSRD SSGK	FGG GTK

	TVRITCQG D		LVIY		AAQAEDEADY YC	SLV	LTV L
SEQ ID NO	279	209	305	233	327	253	358
PD1- 45F4	SYELTQAP SLSVSPGQ TANIICSGD	NLRT KY	VSWYQQ KPGQSPL LVIY	QDT	RRPSGIPARFSG SNSGNTATLTIS GTQTRDESTYY C	MTW DVDT TSMI	FGG GTK LTV L
SEQ ID NO	280	210	306	234	328	254	358
PD1- 47B8	QSALTQPA SVSGSPGQ SITISCTGT	SSDV GGY NY	VSWYQQ HPGKAP KLMIY	DVS	KRPSGVS NRFS GSKSGNTASLT ISGLQAEDEAD YYC	SSFTS SSTV V	FGG GTK LTV L
SEQ ID NO	281	211	307	235	329	255	358
PD1- 48A6	QFVLTQPP SVSGAPGQ RVTISCTGS	RSNF GAG HD	VHWCQQ LPGTAPK LLIY	GNN	NRPSGVPDRFS GSKSGTSASLA ITGLQAEDEAE YYC	QSYD SSLS AWG	VRR RDQ ADR P
SEQ ID NO	282	212	308	236	330	256	362
PD1- 48A9	DIVMTQTP LSPVTPGE PASISCRSS	QSLD DSHD GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TLS	HRASGVPDRFS GSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGL YYC	MQRI DFPY T	FGQ GTK VEIK
SEQ ID NO	283	213	302	230	331	257	363
PD1- 48G6	NFMLTQPP STSGTPGQ RVTISCSGR	SSNI GINT	VTWYQQ LPGTAPK VLMY	RDD	QRPSGVPDRFS GSRSGISASLAI SGLQSEDEADY YC	ASWD DTLN GWV	FGG GTK LTV L
SEQ ID NO	284	214	309	237	332	258	358
PD1- 49A2	DIVMTQSP LSPVTPGE PASISCRSS	QSLF DSDD GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TLS	HRASGVPDRFS GSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGI YYC	LQRM GFPY T	FGQ GTK VEIK
SEQ	285	215	302	230	333	249	363

ID NO							
PD1-49B9	QSALTQPP SASGSPGQ SVTISCTGT	SSDV GGY NY	VSWYQQ HPGKAP KLMIY	EVS	KRPSGVPDRFS GSKSGNTASLT VSGLQPEDEAD YYC	SSFA RNSN YV	FGT GTK VTV L
SEQ ID NO	286	211	307	238	334	259	359
PD1-51A6	DIVMTQTP LSLSVTPG QPASISCK S	QSL YIDG ETY	LFWYLQ KPGQSP QLLIY	EVS	SRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGV YYC	MQGI HLPL T	FGQ GTR LEIK
SEQ ID NO	287	216	310	238	335	260	364
PD1-51D9	DIVMTQTP LSLPVTPGE PASISCRSS	QSL HSNG NNY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	LGS	YRASGVPDRFS GSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGL YYC	MQGL QIPST	FGP GTK VDIK
SEQ ID NO	283	217	302	239	336	261	365
PD1-52E8	SYELTQPLS LSVAPGQT ARITCSGD	ALSK EY	SYWYQQ KPGQAP VLVMY	KDS	ERPSGIPERFSG SSSGTTVTLTIS GVQAEDEADY YC	QSVD SSDT SVV	FGG GTK LTV L
SEQ ID NO	288	218	311	240	337	262	358
PD1-62E1	DIQMTQSP AILSLSPGE RATLSCRA S	QSVT SD	VAWYQ HIRGQAP RLLIY	DAS	NRASGIPARFS GGGSGTEFTLT ISSLEPEDFAVY YC	QQYN NWPL T	FGG GTK VEIK
SEQ ID NO	289	219	312	241	338	263	360
PD1-72D10	DIVMTQTP LSLPVTPGE AASISCRSS	QSL DSED GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TLS	HRASGVPDRFS GSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGI YYC	MQR VEFP FT	FGQ GTK LEIK
SEQ ID NO	276	205	302	230	333	252	366
PD1-74A11	DIVMTQTP LSLPVTPGE	QSLF DSDD	LDWYLQ KPGQSP	TLS	YRASGVPDRFS GSGSGTDFTLK	MQR VEFP	FGQ GTK

	PASISCRSS	GNTY	QLLIY		ISRVAEDVGI YYC	FT	VDIK
SEQ ID NO	283	215	302	230	353	252	356
PD1- 75C10	DIVMTQTP LSLPVTPGE AASISCRSS	QSL DSED GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TLS	HRASGVPDRFS GSGSGTDFTLK ITRVEAEDVGV YYC	MQRI EFPY T	FGQ GTK LEIK
SEQ ID NO	276	205	302	230	354	264	366
PD1- 74A01	DIVMTQTP LSLPVTPGE PASISCRSS	QSL DRG GGHT Y	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TLS	HRASGVPDRFS GSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGI YYC	MQR KEFP LT	FGP GTK LEIK
SEQ ID NO	283	222	302	230	333	268	367
PD1- 74H12	DIVMTQTP LSLSVTPGE PASISCRSS	QSL DSDD GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TLS	HRASGVPDRFS GRGSHTDFTLT ISSVEAEDVGV YYC	MQRI HFPL T	FGQ GTR LEIK
SEQ ID NO	294	220	302	230	355	269	364

Ví dụ 3: Sản xuất kháng thể PD-1 của người

1. Biến đổi dạng scFv thành dạng IgG

PCR (iCycler iQ, BIO-RAD) được thực hiện trên các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ để biến đổi 15 loại kháng thể thực khuẩn đơn dòng được chọn kháng PD từ các thực khuẩn thể thành vector đầy đủ IgG. Kết quả là thu được các chuỗi nặng và nhẹ và các vector và các chuỗi nặng và nhẹ của mỗi dòng được cắt (phân hủy) bằng enzym giới hạn. ADN được tách rửa từ mỗi vector và chuỗi nặng bằng kit tách chiết ADN trên gel (Qiagen). Thực hiện việc gắn bằng cách trộn 1 μ L (10ng) vector, 15 μ L (100-200ng) chuỗi nặng, 2 μ L dung dịch đệm 10x, 1 μ L ligaza (1U/ μ L) và nước cất, để hỗn hợp yên ở nhiệt độ trong phòng trong 1 đến 2 giờ, bơm hỗn hợp thu được vào tế bào biến nạp (tế bào khả biến, XL1-xanh da trời), đặt tế bào lên nước đá trong 5 phút và đưa tế bào vào quá trình sốc nhiệt ở nhiệt độ 42°C trong 90 giây.

Sau khi sốc nhiệt, 1mL môi trường được bổ sung vào tế bào và sau đó tế bào được sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ, cấy trải trên đĩa LB Amp và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 16 giờ. Khuẩn lạc thu sau đó được nuôi cấy cùng với 5mL môi trường LB Amp, nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 16 giờ và đưa vào quy trình tách ADN bằng cách sử dụng kit DNA-prep (Nuclogen). Yêu cầu phân tích trình tự ADN thu được (Solgent).

Kết quả là, xác nhận được rằng trình tự của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của 15 dòng kháng PD1 đã biến đổi thành IgG đầy đủ tương ứng với các trình tự của kháng thể của thực khuẩn thể của 15 dòng được thể hiện trong bảng 3. Để chuyển nhiễm vào tế bào HEK 293F, chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các dòng tương ứng đã biến đổi thành IgG đầy đủ được sinh trưởng trong 100mL môi trường LB Amp và thu được ADN nhờ sử dụng kit Midi-prep (QIAGEN).

2. Sản xuất kháng thể của người

Vecto pNATVH và pNATVL tách dòng được đồng chuyển nhiễm với tỷ lệ 6:4 vào tế bào HEK293F và thu gom dịch nổi vào ngày thứ 7, tế bào và mảnh vụn được loại bỏ bằng cách ly tâm và bộ lọc trên cùng 0,22µm và gom dịch nổi và đưa vào sắc ký ái lực protein A để tinh chế kháng thể IgG. Sau khi tinh chế, tách kháng thể bằng dung dịch đệm glyxin và dung dịch đệm được thay để dung dịch đệm tái tạo huyền phù cuối cùng là PBS. Kháng thể đã tinh chế được định lượng bằng BCA và nano drop, và mỗi trong số 15 loại kháng thể được nạp với liều lượng 5µg trong điều kiện khử và không khử và phân tích bằng SDS-PAGE để xác định độ tinh khiết và độ linh động của protein đã tinh chế (Fig.5).

Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.5, tất cả 15 kháng thể được phát hiện ở khối lượng phân tử 150 kDa hoặc lớn hơn trong các điều kiện không khử và Nivolumab được sản xuất làm kháng thể đối chứng.

Ví dụ 4: Đặc tính của kháng thể đơn dòng kháng PD-1

1. Đánh giá hoạt tính của kháng thể

Thử nghiệm đối với hoạt tính của kháng thể đã chọn được thực hiện nhờ sử dụng kit thử nghiệm sinh học phong bế PD1/PD-L1 (promega, J1250). Dòng tế bào CHO biểu hiện cao PD-L1 được cấy trải trên đĩa 96 lỗ, nuôi cấy trong 16 giờ hoặc lâu hơn, xử lý bằng mỗi kháng thể được pha loãng theo bậc ở nồng độ không đổi và sau đó nuôi cấy

cùng với dòng tế bào Jurkat biểu hiện cao PD-1 của người trong 6 giờ. Mức phục hồi ức chế kháng thể được xác định bằng quang phổ kế (SpectraMax M5 spectrophotometer, Molecular Devices, USA), được xác định từ cường độ phát quang thu được từ việc phân hủy cơ chất bởi luxiferaza. Hoạt tính của 16 loại kháng thể PD-1 kể cả kháng thể đối chứng được phát hiện dựa trên trị số để phục hồi tín hiệu giảm nhờ sự tạo ra phức hợp PD-1/PD-L1 và 41C9, 45D6 và 49A2 thể hiện hoạt tính giống với kháng thể đối chứng (Fig.6).

Để đo hoạt tính của kháng thể PD-1, 41C9, 45D6 và 49A2 theo cách thức phụ thuộc vào nồng độ, thực hiện lại việc pha loãng theo bậc và thử nghiệm sinh học phong bế PD1/PD-L1 để phục hồi tín hiệu giảm theo cách thức phụ thuộc vào gradien nồng độ. Mức phục hồi có thể được thể hiện dưới dạng EC50 (nồng độ mAb hữu hiệu ở 50% mức tín hiệu phục hồi), được phân tích sử dụng Graphpad Prism6, và khả năng phục hồi ức chế hiệu quả *in vitro* EC50 được thể hiện trên Fig.7.

2. Ải lực của kháng thể PD1 đối với tế bào biểu hiện quá mức

Đối với nhóm tế bào biến nạp biểu hiện cao PD-1, HEK293E được biến nạp plasmit pcDNA3.1 chứa PD-1 của người (NM_005018.2) và sàng lọc trong môi trường chọn lọc chứa 150 ug/mL Zeocin (#R25001, Thermo Fisher). Mỗi nhóm tế bào được nhận diện và chọn lọc bằng phân tích phân loại tế bào hoạt hóa bằng huỳnh quang (fluorescence activated cell sorting - FACS) sử dụng kháng PD-1 (#557860, BD) và được sử dụng cho thử nghiệm chức năng như thử nghiệm gắn kết FACS hoặc thử nghiệm cạnh tranh FACS.

Mỗi 0,5 đến 1×10^6 tế bào trên mỗi mẫu được chuẩn bị từ nhóm tế bào biến nạp biểu hiện cao PD-1 của người, và các kháng thể được pha loãng theo bậc với tỷ lệ pha loãng không đổi và được cho phản ứng với tế bào đã chuẩn bị ở nhiệt độ 4°C trong 20 phút. Sau đó, tế bào được rửa ba lần bằng PBS (#LB001-02, Welgene) chứa 2% huyết thanh bào thai bò và được cho phản ứng ở nhiệt độ 4°C trong 20 phút với kháng thể kháng IgG của người (#FI-3000, Vectorlabs) liên hợp với chất huỳnh quang FITC (fluorescein isothioxyanat). Sau đó, tế bào được đưa vào quy trình rửa giống như trên và tạo huyền phù trong 0,5mL PBS chứa 2% FBS (#26140-079, Thermo Fisher) với thiết bị đếm tế bào dòng chảy FACSCanto II (BD Biosciences, USA) làm thiết bị đếm tế bào dòng chảy. Kết quả là, cả ba kháng thể PD-1 gắn kết đặc hiệu và khả năng gắn kết của

chúng được xác định từ hằng số phân ly cân bằng (K_d) thu được thông qua chức năng phân tích của thiết bị Graphpad Prism6.

Kết quả là, như có thể thấy trên Fig.8, khả năng gắn kết của kháng thể gắn kết theo cách thức phụ thuộc vào nồng độ với PD-1 của người được biểu hiện quá mức trên bề mặt tế bào có thể được phát hiện bởi MFI (cường độ huỳnh quang trung bình).

3. Sàng lọc các kháng thể thực khuẩn dương có trình tự giống với PD1-45D6 và 49A2

Sàng lọc kháng thể bổ sung được thực hiện đối với 45D6 và 49A2 ngoài 41C9, được xem là có hoạt tính và khả năng gắn kết tuyệt vời trong FACS.

Các kháng thể có trình tự giống với PD1-45D6 và 49A2 còn được sàng lọc bằng quy trình giống như ở ví dụ 2. Các đặc tính của chúng được thể hiện vắn tắt trong Bảng 6 dưới đây.

[Bảng 6] Đặc tính của các dòng kháng thể giống 45D6 và 49A2 được sàng lọc bổ sung

Tên dòng	VH	Độ tương đồng	VL	Độ tương đồng 2	Nhóm
PD1-72D10	VH3-30	96,90%	O1	94,10%	1
PD1-74A11	VH3-30	97,96%	O1	95,05%	2
PD1-75C10	VH3-30	96,94%	O1	95,05%	3
PD1-74A01	VH3-30	95,92%	O1	92,08%	4
PD1-74H12	VH3-30	94,90%	O1	92,08%	5

4. Ải lực của kháng thể PD1 sử dụng thiết bị ProteOn XPR36

Thiết bị ProteOn XPR36 (BioRad) được sử dụng. Chip cảm biến GLC (BioRad) được gắn vào thiết bị này và được rửa bằng dung dịch đệm PBST và bề mặt carboxymetyldextran được hoạt hóa bằng dung dịch hỗn hợp EDC/sulfo-NHS. PD1-hFc hòa tan ở nồng độ 5 $\mu\text{g/mL}$ trong dung dịch đệm natri axetat 10mM (độ pH = 5) được bơm và cố định trên chip cảm biến GLC.

Để làm bất hoạt các nhóm carboxyl đã hoạt hóa mà vẫn không phản ứng với protein PD1, cho etanolamin 1M chảy qua và glyxin 10mM (độ pH = 2) được bơm để rửa các protein mà vẫn không gắn kết với chip cảm biến. Sau đó, dữ liệu sensogram được thu thập trong quá trình gắn kết và phân ly theo thời gian trong khi cho kháng thể chảy với

tốc độ chảy 30 μ L/phút (30nM đến 0,123nM) trong 10 phút sử dụng dung dịch đệm PBST.

Hằng số phân ly cân bằng (KD) được tính bằng cách vẽ đồ thị và khớp dữ liệu sensogram trong trạng thái cân bằng phụ thuộc vào nồng độ. Kết quả là, kháng thể 45D6 và 49A2 có KD lần lượt là 0,001nM và 0,019nM, thể hiện ái lực cao với kháng nguyên PD1 (Fig.9).

Ví dụ 5: Tối ưu hóa kháng thể cho kháng thể PD1, 45D và 49A2

1. Tạo thư viện để tối ưu hóa các kháng thể PD1-45D6 và 49A2

Để tối ưu hóa kháng thể, các thư viện xáo trộn LC mới được tạo ra bằng cách cố định chuỗi nặng và bơm 10^5 - 10^6 nhóm chuỗi nhẹ của Ybiologics, Inc. . Ngoài ra, thực hiện sự tối ưu hóa kháng thể bằng ba phương pháp sau: xáo trộn LC; đóng gói lõi + xáo trộn LC bao gồm phân tích so sánh các gốc có các vị trí cấu trúc quan trọng như các lõi kỵ nước của chuỗi nặng, các gốc được lộ ra, các cụm tích điện, cầu muối, đột biến chúng thành các gốc bảo toàn và sau đó thực hiện xáo trộn LC; điểm nóng CDR + xáo trộn LC, trong trường hợp ADN ở các vùng biến đổi của kháng thể, kể cả gây đột biến ngẫu nhiên các điểm nóng đột biến mà có thể thường bị đột biến trong quá trình thuần thực ái lực *in vivo* và sau đó thực hiện xáo trộn LC.

Để tạo ra các thư viện xáo trộn LC, các gen LC của các kháng thể 45D6 và 49A2 được cắt (phân hủy) bằng BstX I và sau đó được sử dụng làm vector và nhóm thư viện của Ybiologics, Inc. được cắt (phân hủy) trong BstX I và được sử dụng làm các đoạn chèn. Sau khi gắn bằng ligaza, thực hiện biến nạp bằng cách sử dụng tế bào để biến nạp bằng cách mở lỗ màng tế bào nhờ xung điện (electroporation transformation). Thư viện kháng thể được tạo ra bằng cách gom các tế bào đã biến nạp trên đĩa hình vuông. Kết quả là, thu được khoảng $1,5 \times 10^7$ thư viện khác nhau. Kết quả phân tích trình tự thể hiện rằng tất cả các trình tự HC là giống nhau và các trình tự LC khác nhau.

Để tạo ra các thư viện đóng gói lõi + xáo trộn LC, các vị trí khung (FR) của các kháng thể 45D6 và 49A2 được thay thế bằng các trình tự axit amin bảo toàn, các gen LC được cắt bằng BstX I và sau đó được sử dụng làm vector, và nhóm thư viện của Ybiologics, Inc. được cắt bằng BstX I và sau đó được sử dụng làm các đoạn chèn. Sau khi gắn bằng ligaza, thực hiện biến nạp sử dụng tế bào để biến nạp bằng cách mở lỗ màng

tế bào nhờ sung điện. Thư viện kháng thể được tạo ra bằng cách gom các tế bào đã biến nạp trên đĩa hình vuông. Kết quả là, thu được khoảng $8,4 \times 10^6$ thư viện khác nhau. Kết quả phân tích trình tự thể hiện rằng các vị trí FR của HC đã được thay thế bằng các trình tự axit amin bảo toàn và các trình tự LC là khác nhau.

Để tạo ra các thư viện điểm nóng lõi + xáo trộn LC, các vị trí khung (FR) của các kháng thể 45D6 được thay thế bằng trình tự axit amin bảo toàn, thư viện điểm nóng của CDR1 được cắt bằng Sfi I và sau đó được sử dụng làm các đoạn chèn và nhóm thư viện của Ybiologics, Inc. được cắt bằng Sfi I và sau đó được sử dụng làm vector. Sau khi gắn bằng ligaza, thực hiện biến nạp sử dụng tế bào để biến nạp bằng cách mở lỗ màng tế bào nhờ sung điện. Thư viện kháng thể được tạo ra bằng cách gom các tế bào đã biến nạp trên đĩa hình vuông. Kết quả là, thu được khoảng $5,6 \times 10^6$ thư viện khác nhau. Kết quả phân tích trình tự thể hiện rằng các vị trí FR của HC đã được thay thế bằng các trình tự axit amin bảo toàn, trình tự điểm nóng của CDR1 được gây đột biến ngẫu nhiên và các trình tự LC là khác nhau.

Ví dụ 6: Sàng lọc các kháng thể PD-1 của người

1. Chuẩn bị kháng nguyên

PD1-hFc và PD1-mFc do Ybiologics, Inc sản xuất, và PD1-his (Catalog Number, 10377-H08H) được mua từ Sino Biological Inc. làm các kháng nguyên protein được phủ với liều 50ug lên ống hấp thụ miễn dịch và sau đó được phong bế.

2. Chọn ái lực

Thế thực khuẩn của thư viện kháng thể của người thu được bằng cách gây nhiễm thư viện scFv của người bằng tập gồm $2,7 \times 10^{10}$ vi khuẩn và sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C trong 16 giờ. Sau khi nuôi cấy, dung dịch nuôi cấy được ly tâm và cô dịch nổi bằng PEG, và sau đó được hòa tan trong dung dịch đệm PBS để tạo ra thư viện kháng thể của người. Thế thực khuẩn của thư viện kháng thể của người được nạp vào ống miễn dịch, sau đó cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Sau khi rửa bằng PBS/T 1X và PBS 1X, chỉ các scFv-thế thực khuẩn gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên được tách rửa.

Các thế thực khuẩn được tách rửa được gây nhiễm *E. coli* lần nữa và khuếch đại (quy trình chọn ái lực) để thu được các nhóm thế thực khuẩn dương. Để tối ưu hóa kháng thể, chỉ thực hiện quy trình chọn ái lực thứ nhất. Kết quả là, như được hiện trên bảng 7,

quan sát thấy rằng số lượng thể thực khuẩn gắn kết với kháng nguyên (đầu ra) trong quy trình chọn ái lực thứ nhất tăng nhẹ, khi được so sánh với số lượng thể thực khuẩn đầu vào.

[Bảng 7] So sánh hiệu giá của kháng thể trong quy trình chọn ái lực tối ưu hóa

Mẫu	Số thể thực khuẩn đầu vào	Số thể thực khuẩn đầu ra
45D6 (LS)	$1,3 \times 10^{13}$	$2,8 \times 10^7$
45D6 (đóng gói lõi +LS)	$1,1 \times 10^{13}$	$4,8 \times 10^7$
45D6 (điểm nóng CDR +LS)	$1,1 \times 10^{13}$	$3,6 \times 10^6$
49A2 (LS)	$1,3 \times 10^{13}$	$1,8 \times 10^7$
49A2 (điểm nóng CDR +LS)	$1,1 \times 10^{13}$	$1,6 \times 10^6$

3. Sàng lọc các thể thực khuẩn dương

Các khuẩn lạc thu được từ quy trình chọn ái lực được nuôi cấy trong đĩa 96 lỗ sâu 1ml (Bioneer 90030) ở nhiệt độ 37°C trong 16 giờ. 100 đến 200 μ L tế bào được sinh trưởng theo cách này được thêm vào môi trường chứa YTCM 2x, 2% glucoza và 5mM $MgCl_2$, đến OD₆₀₀ bằng 0,1, và được thêm vào môi trường chứa 1ml YTCM 2x, 2% glucoza và 5mM $MgCl_2$, và sau đó nuôi cấy trên đĩa 96 lỗ sâu ở nhiệt độ 37°C trong 2 đến 3 giờ đến giá trị OD₆₀₀ từ 0,5 đến 0,7. Các thể thực khuẩn hỗ trợ M1 được gây nhiễm ở tỷ lệ MOI là 1:20 và được nuôi cấy trong môi trường chứa YTCMK 2x, 5mM $MgCl_2$ và 1mM IPTG ở 30°C trong 16 giờ.

Kháng nguyên PD1 được phủ ở mật độ 100ng/lỗ trên đĩa miễn dịch 96 lỗ ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ và mỗi lỗ được phong bế bằng 4% sữa tách kem hòa tan trong PBS. Mỗi scFv-thể thực khuẩn đơn dòng (100 scFv-thể thực khuẩn) được rửa bằng 0,2mL PBS/T và nuôi cấy trong 16 giờ được bổ sung với lượng 1 μ L vào mỗi lỗ và được cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Một lần nữa, mỗi lỗ được rửa 4 lần bằng 0,2ml PBS/T, và kháng thể thứ cấp, kháng M13-HRP, được pha loãng đến tỷ lệ 1/2000 và được cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi rửa bằng 0,2mL PBS/T, tiến hành hiện màu và đo độ hấp thụ ở bước sóng 490nm.

Kết quả là, thu được các dòng thể thực khuẩn đơn có khả năng gắn kết cao hơn với mỗi kháng nguyên so với kháng thể bố mẹ (49A2 hoặc 45D6) và kết quả được thể hiện trên Fig.10.

4. Phân tích trình tự bazơ của kháng thể thể thực khuẩn dương

Các dòng đơn được chọn được đưa vào quá trình tách ADN sử dụng kit tinh chế ADN (Qiagen, Germany) để thu ADN, và phân tích trình tự ADN được yêu cầu (Solgent). Các vùng CDR V_H và V_L của các kháng thể đã chọn được nhận diện, dựa trên kết quả phân tích trình tự và độ giống nhau (độ tương đồng) giữa các kháng thể này và nhóm kháng thể dòng mầm được nghiên cứu nhờ sử dụng chương trình Ig BLAST trên trang web NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>. Kết quả là, thu được 25 loại kháng thể thực khuẩn thể (49A2: 10 loại, 45D6: 15 loại) có khả năng gắn kết cao hơn so với kháng thể bố mẹ và được tổng kết trong bảng 8 dưới đây.

[Bảng 8] Đặc tính của các dòng đơn biến thể của kháng thể kháng PD1 được chọn bằng cách tối ưu hóa

Tên dòng	VH	Độ tương đồng	VL	Độ tương đồng 2	Nhóm
PD1-49A2(A/1B2)	VH3-30	92,86%	O1	93,07%	1
PD1-49A2(A/1D11)	VH3-30	91,84%	O1	97,03%	2
PD1-49A2(A/1F12)	VH3-30	92,86%	O1	93,07%	3
PD1-49A2(A/1H4)	VH3-30	92,86%	O1	92,08%	4
PD1-49A2(A/1H8)	VH3-30	92,86%	O1	90,10%	5
PD1-49A2(A/2A6)	VH3-30	91,84%	O1	89,11%	6
PD1-49A2(A/2A11)	VH3-30	93,88%	O1	90,10%	7
PD1-49A2(A/2B9)	VH3-30	92,86%	O1	93,07%	8
PD1-49A2(A/2B10)	VH3-30	93,88%	O1	95,05%	9
PD1-45D6(A/3D2)	VH3-30	93,88%	O1	94,06%	10
PD1-45D6(A/3G1)	VH3-30	93,88%	O1	95,05%	11
PD1-45D6(A/3H4)	VH3-30	93,88%	O1	93,07%	12
PD1-45D6(A/3H6)	VH3-30	93,88%	O1	95,05%	13
PD1-45D6(A/3H7)	VH3-30	93,88%	O1	92,08%	14

PD1-45D6(A/4C1)	VH3-30	94,90%	O1	96,04%	15
PD1-45D6(A/4C9)	VH3-30	94,90%	O1	93,07%	16
PD1-45D6(A/4D4)	VH3-30	94,90%	O1	92,08%	17
PD1-45D6(A/4H6)	VH3-30	94,90%	O1	95,05%	18
PD1-49A2(A/2D7)	VH3-30	92,86%	O1	95,05%	19
PD1-45D6(A/5A6)	VH3-30	91,84%	O1	96,04%	20
PD1-45D6(A/5B2)	VH3-30	93,88%	O1	94,06%	21
PD1-45D6(A/5B5)	VH3-30	92,86%	O1	92,08%	22
PD1-45D6(A/5B12)	VH3-30	93,88%	O1	94,06%	23
PD1-45D6(A/5C8)	VH3-30	92,86%	O1	95,05%	24
PD1-45D6(A/5H9)	VH3-30	92,86%	O1	94,06%	25

Kháng thể gồm CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và trình tự FR của các kháng thể được chọn và vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa chúng được thể hiện trong bảng 9 và 10 dưới đây.

[Bảng 9] Các vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể kháng PD1 của người

Tên	FR1	CDR 1	FR2	CDR 2	FR3	CD R3	FR4
PD1-49A2 (A/1 B2)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FLR YA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISY DG QD K	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TT TT FD S	WGR GTLV TVSS
SEQ ID NO	80	17	97	49	114	58	136
PD1-49A2 (A/1 D11)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FKN NA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISY DG RH K	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TT TT FD S	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO	80	18	97	50	114	58	137
PD1-49A2	QVQLVESGG GVVQPGRSL	GFT FRN	MHWVRQ APGKGLE	ISY DG	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR	TT TT	WSQG TLVT

(A/1F 12)	RLSCAAS	YA	WVAV	QH K	AEDTAVYYC	FD S	VSS
SEQ ID NO	80	19	97	51	114	58	145
PD1- 49A2 (A/1 H4)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FPIY A	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISY DG AH K	YYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TT TT FD S	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO	80	20	97	52	114	58	137
PD1- 49A2 (A/1 H8)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FKT YA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISY DG QH K	YYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TT TT FD S	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO	80	21	97	51	114	58	137
PD1- 49A2 (A/2 A6)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FKY YA	MHWVRQ APGKGLE WVTV	ISY DG QY K	YYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TT TT FD S	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO	80	22	113	53	114	58	137
PD1- 49A2 (A/2 A11)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FRS YA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISY DG QD K	YYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TT TT FD S	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO	80	23	97	49	114	58	137
PD1- 49A2 (A/2 B9)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FLR YA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISY DGR YK	YYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TT TT FD S	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID	80	17	97	54	114	58	137

NO							
PD1-49A2 (A/2 B10)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FLV YA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISY DGS HK	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TT TT FD S	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO	80	24	97	55	114	58	137
PD1-49A2 (A/2 D7)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FKT YA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISY DG QH K	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TT TT FD S	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO	80	21	97	51	114	58	137
PD1-45D6 (A/3 D2)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FSS YA	MHWVRQ VPGKGLE WVAV	ISY DG ND K	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VP TT FE Y	WGQ GSQV TVSS
SEQ ID NO	80	1	96	31	114	57	135
PD1-45D6 (A/3 G1)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FSS YA	MHWVRQ VPGKGLE WVAV	ISY DG ND K	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VP TT FE Y	WGQ GSQV TVSS
SEQ ID NO	80	1	96	31	114	57	135
PD1-45D6 (A/3 H4)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FSS YA	MHWVRQ VPGKGLE WVAV	ISY DG ND K	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VP TT FE Y	WGQ GSQV TVSS
SEQ ID NO	80	1	96	31	114	57	135
PD1-45D6 (A/3)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FSS YA	MHWVRQ VPGKGLE WVAV	ISY DG ND	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VP TT FE	WGQ GSQV TVSS

H6)				K		Y	
SEQ ID NO	80	1	96	31	114	57	135
PD1- 45D6 (A/3 H7)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FSS YA	MHWVRQ VPGKGLE WVAV	ISY DG ND K	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VP TT FE Y	WGQ GSQV TVSS
SEQ ID NO	80	1	96	31	114	57	135
PD1- 45D6 (A/4 C1)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FSS YA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISY DG ND K	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VP TT FE Y	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO	80	1	97	31	114	57	137
PD1- 45D6 (A/4 C9)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FSS YA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISY DG ND K	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VP TT FE Y	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO	80	1	97	31	114	57	137
PD1- 45D6 (A/4 D4)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FSS YA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISY DG ND K	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VP TT FE Y	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO	80	1	97	31	114	57	137
PD1- 45D6 (A/4 H6)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FSS YA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISY DG ND K	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VP TT FE Y	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO	80	1	97	31	114	57	137

PD1-45D6 (A/5 A6)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FRL YA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISH DG ND K	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VP TT FE Y	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO	80	25	97	56	114	57	137
PD1-45D6 (A/5 B2)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FSF YA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISY DG ND K	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VP TT FE Y	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO	80	26	97	31	114	57	137
PD1-45D6 (A/5 B5)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FRT YA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISY DG ND K	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VP TT FE Y	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO	80	27	97	31	114	57	137
PD1-45D6 (A/5 B12)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FSV YA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISY DG ND K	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VP TT FE Y	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO	80	28	97	31	114	57	137
PD1-45D6 (A/5 C8)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FMR YA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISY DG ND K	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VP TT FE Y	WGQ GTLV TVSS
SEQ ID NO	80	29	97	31	114	57	137
PD1-45D6 (A/5 H9)	QVQLVESGG GVVQPGRSL RLSCAAS	GFT FWT YA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISY DG ND K	YYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VP TT FE Y	WGQ GTLV TVSS

SEQ ID NO	80	30	97	31	114	57	137
-----------------	----	----	----	----	-----	----	-----

[Bảng 10] Các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể kháng PD1 của người

Tên	FR1	CDR1	FR2	CD R2	FR3	CDR 3	FR4
PD1-49A2 (A/1 B2)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLLDSDDGNTY	LDWYLQKPGQSPQLLIY	TL S	HRASGVPDRFSGS GSGTEFNLRISRV EAEDVGIYYC	MQRVEFPFT	FGQ GTK LEIK
SEQ ID NO	283	220	302	230	339	252	366
PD1-49A2 (A/1 D11)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLFDSDDGNTY	LDWYLQKPGQSPQLLIY	TL S	YRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC	MQRVEFPFT	FGQ GTK VEIK
SEQ ID NO	283	215	302	230	340	252	366
PD1-49A2 (A/1 F12)	DIVMTQTPH SLPVTPGEPA SISCRSS	QSLLDSEDGNTY	LDWYLQKPGQSPQLLIY	TL S	HRALGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRV EAEDSGIYYC	MQR IEFP YT	FGQ GTK LEIK
SEQ ID NO	290	205	302	230	341	264	366
PD1-49A2 (A/1 H4)	DIVMTQSPLS LPVTPGEAA SISCRSS	QSLLDSEDGNTY	LDWYLQKPGQSPQLLIY	TL S	HRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRV EAEDSGIYYC	MQR VEF PYT	FGQ GTK LDIK
SEQ ID NO	291	205	302	230	342	265	361
PD1-49A2 (A/1 H8)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLLD RDG GHTY	VDWYLQKPGQS PRLLIY	TL S	HRALGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRV EADDVGLYYC	MQR IEFP FT	FGQ GTK VEIK

SEQ ID NO	283	221	313	230	343	266	363
PD1- 49A2 (A/2 A6)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAA SISCRSS	QSLLDSED GNTY	LDWYLQ RPGQSP QLLIY	TL S	HRASGVPGRFSGS GSGTEFNLRISRV EAEDVGIYYC	MQR VEF PFT	FGQ GTK VEIK
SEQ ID NO	276	205	314	230	344	252	363
PD1- 49A2 (A/2 A11)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLFDSDD GNTY	LDWYLQ KPGQSP RLLIY	TL S	HRALGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRV AAEDVGLYYC	LQR MGF PYT	FGQ GTK LEIK
SEQ ID NO	283	215	315	230	345	249	366
PD1- 49A2 (A/2 B9)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAA SISCRSS	QSLLDSED GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TL S	HRASGVPDRFSGS GSGTDFTLEISRV EAEDVGVYYC	MQR RDF PFT	FGQ GTK VDIK
SEQ ID NO	276	205	302	230	346	267	356
PD1- 49A2 (A/2 B10)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLLDSDDGNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TL S	HRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRV AAEDVGLYYC	MQR VEF PFT	FGQ GTK LDIK
SEQ ID NO	283	220	302	230	323	252	361
PD1- 49A2 (A/2 D7)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLLD RDG GHTY	VDWYLQ QKPGQS PRLLIY	TL S	HRALGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRV EADNVGLYYC	MQR IEFP FT	FGQ GTK VEIK
SEQ ID NO	283	221	313	230	347	266	363
PD1-	DIVMTQTPLS	QSLLD	LDWYLQ	TL	HRASGVPDRFSGS	MQR	FGQ

45D6 (A/3 D2)	LPVTPGEAA SISCRSS	DSED GNTY	KPGQSP QLLIY	S	GSGTDFTLKISRV EAEDVGIIYYC	VEF PFT	GTK VEIK
SEQ ID NO	276	205	302	230	333	252	363
PD1- 45D6 (A/3 G1)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLD DSED GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TL S	HRASGVDPDRFSGS GSGTDFTLEISRV EAEDVGVYYC	MQR VEF PFT	FGQ GTK LDIK
SEQ ID NO	283	205	302	230	346	252	361
PD1- 45D6 (A/3 H4)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLF DSDD GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TL S	HRASGVSDRFSGS GSGTDFTLKISRV EAEDSGIYYC	MQR VEF PFT	FGQ GTK LDIK
SEQ ID NO	283	215	302	230	348	252	361
PD1- 45D6 (A/3 H6)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAA SISCRSS	QSLD DSED GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TL S	HRASGVDPDRFSGS GSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC	MQR VEF PFT	FGQ GTK LEIK
SEQ ID NO	276	205	302	230	349	252	366
PD1- 45D6 (A/3 H7)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLD DSDD GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TL S	HRASGVPGRFSGS GSGTEFNLRISRV EAEDVGIIYYC	MQR VEF PFT	FGQ GTK LEIK
SEQ ID NO	283	220	302	230	344	252	366
PD1- 45D6 (A/4 C1)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLD DSDD GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TL S	HRASGVDPDRFSGS GSGTDFTLKISRV EAEDVGIIYYC	MQR VEF PFT	FGQ GTK LDIK
SEQ	283	220	302	230	333	252	361

ID NO							
PD1- 45D6 (A/4 C9)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAA SISCRSS	QSLLD SED GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TL S	HRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRV AAEDVGIYYC	MQR VEF PFT	FGQ GTK LEIK
SEQ ID NO	276	205	302	230	350	252	366
PD1- 45D6 (A/4 D4)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLLD SED GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TL S	HRASGVPDRFSGS GSGTEFNLRISRV EAEDVGIYYC	MQR VEF PFT	FGQ GTK VDIK
SEQ ID NO	283	205	302	230	339	252	356
PD1- 45D6 (A/4 H6)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLFD SDD GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TL S	HRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRV EAEDVGGLYYC	MQR VEF PFT	FGQ GTK LEIK
SEQ ID NO	283	215	302	230	331	252	366
PD1- 45D6 (A/5 A6)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLLD SED GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TL S	HRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC	MQR IDFP YT	FGQ GTK LDIK
SEQ ID NO	283	205	302	230	349	257	361
PD1- 45D6 (A/5 B2)	DIVMTQTPLS PPVTPGEPAS ISCRSS	QSLLD SDD GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TL S	HRASGVPDRFSGS GSGTDFTLEISRV EAEDVGVYYC	MQR RDF PFT	FGQ GTK LDIK
SEQ ID NO	292	220	302	230	346	267	361
PD1- 45D6	DIVMTQTPLS LPVMPGEAA	QSLLD SED	LDWYLQ KPGQSP	TL S	HRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRV	MQR VEF	FGQ GTK

(A/5 B5)	SISCRSS	GNTY	QLLIY		EADDVGIYYC	PFT	VEIK
SEQ ID NO	293	205	302	230	351	252	363
PD1- 45D6 (A/5 B12)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAA SISCRSS	QSL DSED GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TL S	HRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRV EAEDVGIYYC	MQR VEF PFT	FGQ GTK VEIK
SEQ ID NO	276	205	302	230	333	252	363
PD1- 45D6 (A/5 C8)	DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSL DSED GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TL S	HRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC	MQR VEF PFT	FGQ GTK LDIK
SEQ ID NO	285	205	302	230	349	252	361
PD1- 45D6 (A/5 H9)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSL DSDD GNTY	LDWYLQ KPGQSP QLLIY	TL S	HRASGVSDRFSGS GSGTDFTLEISRV EAEDVGVYYC	MQR RDF PFT	FGQ GTK VEIK
SEQ ID NO	283	220	302	230	352	267	363

Ví dụ 7: Sản xuất kháng thể PD-1 của người

1. Biến đổi dạng scFv thành dạng IgG

PCR (iCycler iQ, BIO-RAD) được thực hiện trên các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ để biến đổi 25 loại kháng thể thực khuẩn đơn dòng được chọn kháng PD từ các thể thực khuẩn thành vector đầy đủ IgG. Kết quả là thu được các chuỗi nặng và nhẹ và các vector có các chuỗi nặng và nhẹ của mỗi dòng được cắt (phân hủy) bằng enzym giới hạn. ADN được tách rửa từ mỗi vector và chuỗi nặng bằng kit tách chiết ADN-gel (Qiagen). Thực hiện việc buộc bằng cách trộn 1 μ L (10 ng) vector, 15 μ L (100-200 ng) chuỗi nặng, 2 μ L dung dịch đệm 10x, 1 μ L ligaza (1U/ μ L) và nước cất, để hỗn hợp yên ở nhiệt độ trong

phòng trong 1 đến 2 giờ, bơm hỗn hợp thu được vào tế bào biến nạp (tế bào khả biến, XL1-xanh da trời), đặt tế bào lên đá trong 5 phút và đưa tế bào vào quá trình sốc nhiệt ở nhiệt độ 42°C trong 90 giây.

Sau khi sốc nhiệt, 1ml môi trường được bổ sung vào tế bào và sau đó tế bào được cho sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ, cấy trải trên đĩa LB Amp và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 16 giờ. Khuẩn lạc thu được được nuôi cấy với 5mL môi trường LB Amp, nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 16 giờ và đưa vào quy trình tách ADN bằng cách sử dụng kit DNA-prep (Nuclogen). Yêu cầu phân tích trình tự ADN thu được (Solgent).

Kết quả là, xác nhận được rằng trình tự của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của 25 dòng đối với PD1 đã biến đổi thành IgG đầy đủ tương ứng với trình tự của kháng thể thực khuẩn. Để chuyển nhiễm vào tế bào HEK 293F, chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của dòng tương ứng được biến đổi thành IgG đầy đủ được cho sinh trưởng trong 100ml môi trường LB Amp và các ADN thu được nhờ sử dụng kit Midi-prep (QIAGEN).

2. Sản xuất kháng thể của người

Vector pNATVH và pNATVL tách dòng được đồng chuyển nhiễm với tỷ lệ 6:4 vào tế bào HEK293F và thu gom dịch nổi vào ngày thứ 7, tế bào và mảnh vụn được loại bỏ bằng cách ly tâm và bộ lọc trên cùng 0,22µm và gom dịch nổi và đưa vào sắc ký ái lực protein A để tinh chế kháng thể IgG. Sau khi tinh chế, tách kháng thể bằng dung dịch đệm glyxin và dung dịch đệm được thay để dung dịch đệm tái tạo huyền phù cuối cùng là PBS. Kháng thể tinh chế được định lượng bằng BCA và nano drop, và mỗi trong số 25 loại kháng thể được nạp với liều lượng 5µg trong các điều kiện khử và không khử và được phân tích bằng SDS-PAGE để xác định độ tinh khiết và tính di động của protein tinh chế. Ngoài ra, một số dịch nổi được nạp lên SDS-PAGE để so sánh tỷ lệ biểu hiện với kháng thể bố mẹ, phần lớn kháng thể được biểu hiện nhiều hơn kháng thể bố mẹ và kết quả có thể được thấy từ Fig.11.

Ví dụ 8: Đặc tính của kháng thể đơn dòng PD-1

1. Đánh giá hoạt tính của kháng thể

Thử nghiệm đối với hoạt tính của các kháng thể đã chọn được thực hiện nhờ sử dụng kit thử nghiệm sinh học phong bế PD1/PD-L1 (promega, J1250). Dòng tế bào CHO biểu hiện cao PD-L1 được cấy trải trên đĩa 96 lỗ, nuôi cấy trong 16 giờ hoặc lâu hơn, xử

lý bằng mỗi kháng thể được pha loãng theo bậc ở nồng độ không đổi và sau đó nuôi cấy với dòng tế bào Jurkat biểu hiện cao PD-1 của người trong 6 giờ. Mức phục hồi ức chế của kháng thể được xác định bằng quang phổ kế (SpectraMax M5 spectrophotometer, Molecular Devices, USA), được xác định từ cường độ phát quang thu được từ việc phân hủy cơ chất bởi luxiferaza. Hoạt tính của 24 loại kháng thể PD-1 được phát hiện dựa trên giá trị để phục hồi tín hiệu giảm do sự tạo thành phức hợp PD-1/PD-L1 và trong số các kháng thể 45D6, 45D6-3D2, 45D6-3H7, 45D6-5B2, và 45D6-5B5 và trong số các kháng thể 49A2, 49A2-1B2, 49A2-1H8, 49A2-2A6, và 49A2-2B9 thể hiện hoạt tính cao hơn kháng thể bố mẹ và có hoạt tính tương tự với kháng thể đối chứng (Fig.12).

Để đo hoạt tính của 8 loại kháng thể PD-1, (45D6-3D2, 45D6-3H7, 45D6-5B2, 45D6-5B5, 49A2-1B2, 49A2-1H8, 49A2-2A6, 49A2-2B9) theo cách thức phụ thuộc vào nồng độ, thực hiện lại việc pha loãng theo tuần tự và thử nghiệm sinh học phong bế PD1/PD-L1 để phục hồi tín hiệu giảm theo cách thức phụ thuộc vào gradien nồng độ. Mức phục hồi có thể được thể hiện dưới dạng EC50 (nồng độ hữu hiệu của mAb ở mức 50% tín hiệu phục hồi), được phân tích sử dụng Graphpad Prism6, và 49A2-1B2 thể hiện khả năng phục hồi ức chế hiệu quả in vitro cao nhất của EC50 (Fig.13, Bảng 11)

[Bảng 11] Hoạt tính của các đơn dòng của các biến thể kháng thể PD1 được chọn

Kháng thể	EC50 [nM]
PD-1-41C9	3,91
PD-1-45D6	2
PD-1-45D6-A-3D2	2,16
PD-1-45D6-A-3G1	0,98
PD-1-45D6-A-3H4	1,67
PD-1-45D6-A-3H6	1,49
PD-1-45D6-A-3H7	1,98
PD-1-45D6-A-4C1	1,76
PD-1-45D6-A-4C9	2,72
PD-1-45D6-A-4D4	1,74
PD-1-45D6-A-4H6	1,19
PD-1-45D6-A-5A6	0,92
PD-1-45D6-A-5B12	0,8

PD-1-45D6-A-5B2	1,48
PD-1-45D6-A-5B5	1,68
PD-1-45D6-A-5C8	1,44
PD-1-45D6-A-5H9	2
PD-1-48A9	8,64
PD-1-49A2	3,78
PD-1-49A2-A-1B2	1,3
PD-1-49A2-A-1D11	2,89
PD-1-49A2-A-1F12	1,03
PD-1-49A2-A-1H4	0,84
PD-1-49A2-A-1H8	1,21
PD-1-49A2-A-2A11	0,79
PD-1-49A2-A-2A6	1,51
PD-1-49A2-A-2B10	0,65
PD-1-49A2-A-2B9	1,23
PD-1-51D9	~ 4,695e+010
PD-1-52E8	8,43
PD-1-62E1	2,73
PD1-72D10	1,21
PD1-74A11	1,31
PD1-75C10	0,81
PD1-74A01	1,01
PD1-74H12	0,98

2. Ái lực của kháng thể PD1 đối với tế bào biểu hiện quá mức

Đối với nhóm tế bào biến nạp biểu hiện cao PD-1 của người, HEK293E được biến nạp plasmit pcDNA3.1 chứa PD-1 của người (NM_005018.2) hoặc PD-L1 của người (NM_014143.2) và sàng lọc trong môi trường chọn lọc chứa 400 ug/mL Zeocin (#R25001, Thermo Fisher). Mỗi nhóm tế bào được nhận dạng và chọn lọc bằng phép phân tích phân loại tế bào hoạt hóa bằng huỳnh quang (fluorescence activated cell sorting - FACS) sử dụng kháng thể kháng PD-1 (#557860, BD) và được sử dụng cho thử nghiệm

chức năng như thử nghiệm gắn kết FACS hoặc thử nghiệm cạnh tranh FACS. 0,5 đến 1×10^6 tế bào trên mỗi mẫu được chuẩn bị từ nhóm tế bào biến nạp biểu hiện cao PD-1 của người và kháng thể được pha loãng theo tuần tự với tỷ lệ pha loãng không đổi và được cho phản ứng với tế bào đã chuẩn bị ở nhiệt độ 4°C trong 20 phút. Sau đó, tế bào được rửa ba lần bằng PBS (#LB001-02, Welgene) chứa 2% huyết thanh bào thai bò và được cho phản ứng ở nhiệt độ 4°C trong 20 phút với kháng thể kháng IgG của người (#FI-3000, Vectorlabs) liên hợp với chất phát huỳnh quang FITC (fluorescein isothiocyanat). Sau đó, tế bào được đưa vào quy trình rửa giống như trên và được tạo huyền phù trong 0,5mL PBS chứa 2% FBS (#26140-079, Thermo Fisher) với thiết bị đếm tế bào dòng chảy FACSCanto II (BD Biosciences, USA) làm thiết bị đếm tế bào dòng chảy.

0,5 đến 1×10^6 tế bào trên mỗi mẫu được chuẩn bị từ nhóm tế bào biến nạp biểu hiện cao PD-1 của người, và các kháng thể được pha loãng theo bậc với tỷ lệ pha loãng không đổi và được cho phản ứng với tế bào đã chuẩn bị ở nhiệt độ 4°C trong 20 phút. Sau đó, tế bào được rửa ba lần bằng PBS (#LB001-02, Welgene) chứa 2% huyết thanh bào thai bò và được cho phản ứng ở nhiệt độ 4°C trong 20 phút với kháng thể kháng IgG của người (#FI-3000, Vectorlabs) liên hợp với chất phát huỳnh quang FITC (fluorescein isothiocyanat). Sau đó, tế bào được đưa vào quy trình rửa giống như trên và được tạo huyền phù trong 0,5ml PBS chứa 2% FBS (#26140-079, Thermo Fisher) với thiết bị đếm tế bào dòng chảy FACSCanto II (BD Biosciences, USA) làm thiết bị đếm tế bào dòng chảy. Khả năng gắn kết được xác định từ hằng số phân ly cân bằng (K_d) thu được từ hàm phân tích của Graphpad Prism6. Kết quả là, như được thể hiện trên Fig.15, khả năng gắn kết của kháng thể gắn kết theo cách thức phụ thuộc vào nồng độ với PD-1 của người được biểu hiện quá mức trên bề mặt tế bào có thể được phát hiện bởi MFI (cường độ huỳnh quang trung bình). Như có thể được quan sát trên Fig.14 và Fig.15, các kháng thể ngoại trừ 49A2 (49A2 bố mẹ) có khả năng gắn kết giống nhau.

3. Khả năng ức chế của kháng thể chống lại việc tạo ra phức hợp PD-1/PD-L1 hoặc PD-1/PD-L2 bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch enzym

PD-1-Fc (S1420, Y-Biologics) hoặc PD-L2-Fc của người (#10292-H02H, Sino) được thêm vào các lỗ của vi đĩa miễn dịch 96 lỗ (#439454, Thermo) và sau đó rửa ba lần bằng PBS chứa 0,05% tween-20 (#P9416, Sigma-Aldrich), sau đó để yên trong dung dịch

làm sạch chứa 4% sữa tách kem (#232120, Becton, Dickinson and Company) ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ để phong bế gắn kết không đặc hiệu. Đồng thời, PD-L1-His (S1479, Y-Biologics) hoặc PD-1-His (S1352, Y-Biologics) của người được cho phản ứng với kháng thể đã được pha loãng theo bậc ở tỷ lệ pha loãng không đổi ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, sau đó để yên trong vi đĩa đã chuẩn bị ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi sản phẩm thu được được đưa vào phương pháp rửa như trên, kháng thể kháng Biotin-His (#MA1-21315-BTIN, Thermo) được pha loãng đến tỷ lệ 1:2000 được thêm vào lỗ của vi đĩa, để cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ, kháng thể streptavidin poly-HRP (#21140, Pierce) được pha loãng đến tỷ lệ 1:5000 được bổ sung vào lỗ của vi đĩa, để cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ và sau đó rửa theo cách tương tự. 100 μ L dung dịch cơ chất TMB (#T0440, Sigma-Aldrich) được thêm vào sản phẩm phản ứng, được che chắn ánh sáng và sản phẩm phản ứng được để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 3 phút, 50 μ L dung dịch axit sulfuric 2,5 M (#S1478, Samchun) được thêm vào để dừng phản ứng và đo độ hấp thụ ở 450nm sử dụng quang phổ kế (#GM3000, Glomax[®] Discover System Promega). Các kết quả được thể hiện trên Fig.16.

4. Ái lực của kháng thể PD1 sử dụng thiết bị ProteOn XPR36

Thiết bị ProteOn XPR36 (BioRad) được sử dụng. Chip cảm biến GLC (BioRad) được lắp vào thiết bị này và được rửa bằng dung dịch đệm PBST và bề mặt carboxymetyldextran được hoạt hóa bằng cách sử dụng dung dịch hỗn hợp EDC/sulfo-NHS. PD1-hFc được hòa tan ở nồng độ 5 μ g/mL trong dung dịch đệm natri axetat 10mM (độ pH= 5) được bơm và cố định trên chip cảm biến GLC.

Để bất hoạt nhóm carboxyl hoạt tính vẫn không phản ứng với protein PD1, cho etanolamin 1M chảy qua và glyxin 10mM (độ pH =2) được bơm để rửa protein vẫn không gắn kết với chip cảm biến. Sau đó, dữ liệu sensogram được thu thập trong quá trình gắn kết và phân ly theo thời gian trong khi cho kháng thể chảy với tốc độ chảy 30 μ L/phút (30nM đến 0,123nM) trong 10 phút sử dụng dung dịch đệm PBST.

Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính toán bằng cách vẽ đồ thị và so khớp dữ liệu sensogram ở trạng thái cân bằng phụ thuộc vào nồng độ. Kết quả là, 49A2 (2B9) có K_D là 0,001nM và thể hiện ái lực cao với kháng nguyên PD1 (Fig.17).

Ái lực của các kháng thể khác với protein PD-1 của người, ái lực đối với protein PD-1 của khỉ và ái lực đối với protein PD-1 của chuột như được thể hiện trong các bảng 12 đến 14.

[Bảng 12] Động học gắn kết giữa protein PD-1 của người và kháng thể được chọn

Ab	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
PD1 49A2	$2,371 \times 10^{-10}$	$3,953 \times 10^5$	$9,372 \times 10^{-5}$
PD1 49A2 1H8	$1,245 \times 10^{-11}$	$2,201 \times 10^5$	$2,741 \times 10^{-6}$
PD1 49A2 1B2	$1,659 \times 10^{-10}$	$3,853 \times 10^5$	$6,390 \times 10^{-5}$
PD1 49A2 2A6	$6,907 \times 10^{-11}$	$3,101 \times 10^5$	$2,142 \times 10^{-5}$
PD1 49A2 2B9	$1,0 \times 10^{-12}$	$3,774 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-7}$
PD1 45D6	$1,0 \times 10^{-12}$	$2,701 \times 10^5$	$1,07 \times 10^{-7}$
PD1 45D6 3D2	$1,0 \times 10^{-12}$	$1,81 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-7}$
PD1 45D6 3H7	$2,53 \times 10^{-11}$	$3,076 \times 10^5$	$7,781 \times 10^{-6}$
PD1 45D6 5B2	$5,818 \times 10^{-11}$	$3,315 \times 10^5$	$1,928 \times 10^{-5}$
PD1 45D6 5B5	$4,773 \times 10^{-11}$	$2,96 \times 10^5$	$1,413 \times 10^{-5}$

[Bảng 13] Động học gắn kết giữa protein PD-1 của khỉ và kháng thể được chọn

Ab	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
PD-1-49A2	$1,0 \times 10^{-12}$	$1,683 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-7}$
PD-1-49A2-2B9	$1,0 \times 10^{-12}$	$1,853 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-7}$
PD-1-45D6	$1,0 \times 10^{-12}$	$1,535 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-7}$
PD-1-45D6-5B2	$1,0 \times 10^{-12}$	$2,078 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-7}$

[Bảng 14] Động học gắn kết giữa protein PD-1 của chuột và kháng thể được chọn

Ab	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
PD-1-49A2-2B9	$4,231 \times 10^{-9}$	$1,478 \times 10^5$	$6,252 \times 10^{-4}$
PD-1-45D6	$2,391 \times 10^{-9}$	$5,544 \times 10^4$	$1,326 \times 10^{-4}$
PD-1-45D6-5B2	$4,590 \times 10^{-9}$	$1,879 \times 10^5$	$8,626 \times 10^{-4}$

Ví dụ 9: Xác định epitop của kháng thể đơn dòng PD1

scFv-thể thực khuẩn đơn dòng gắn kết với kháng nguyên PD1 được nuôi cấy trong môi trường chứa YTCM 2x, 2% glucoza và 5mM MgCl₂ ở 37°C trong 16 giờ. Tế bào được sinh trưởng theo cách này được nuôi cấy trong môi trường chứa YTCM 2x, 2% glucoza và 5mM MgCl₂ đến OD₆₀₀ bằng 0,1, và sau đó nuôi cấy ở 37°C trong 2 đến 3 giờ ở OD₆₀₀ là từ 0,5 đến 0,7. Các thể thực khuẩn hỗ trợ M1 được lây nhiễm ở tỷ lệ MOI là 1:20 và nuôi cấy trong môi trường chứa YTCMK 2x, 5mM MgCl₂ và 1mM IPTG ở 30°C trong 16 giờ.

Kháng nguyên PD1 kiểu dại (wild type - WT) hoặc một số biến thể (Fig.18) được phủ ở mật độ 100ng/lỗ trên đĩa miễn dịch 96 lỗ ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ và các lỗ được phong bế bằng sữa tách kem 4% hòa tan trong PBS. Rửa mỗi lỗ bằng 0,2mL PBS/T, và sau đó scFv-thể thực khuẩn đơn dòng (mỗi 100 scFv-thể thực khuẩn) được cấy trong 16 giờ được thêm vào với lượng 100μL vào mỗi lỗ và được cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Một lần nữa, rửa mỗi lỗ 4 lần bằng 0,2mL PBS/T, và sau đó kháng thể thứ cấp, kháng M13-HRP được pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 và được cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi rửa bằng 0,2mL PBS/T, tiến hành hiện màu và đo độ hấp thụ ở bước sóng 490nm.

Kết quả là, xác nhận được rằng scFv-thể thực khuẩn đơn dòng được chọn, scFv-thể thực khuẩn đối chứng và các biến thể PD-1 thể hiện các đặc tính gắn kết khác nhau và có các epitop khác nhau (Fig.19).

Kháng nguyên PD1 kiểu dại (WT) hoặc một số biến thể (Fig.18) được phủ ở mật độ 100ng/lỗ trên đĩa miễn dịch 96 lỗ ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ và các lỗ được phong bế bằng sữa tách kem 4% hòa tan trong PBS. Rửa mỗi lỗ bằng 0,2mL PBS/T, và sau đó scFv-thể thực khuẩn đơn dòng được nuôi cấy trong 16 giờ được thêm vào với lượng 100μL (1ug/mL) vào mỗi lỗ và được cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Một lần nữa, rửa mỗi lỗ 4 lần bằng 0,2mL PBS/T, và sau đó kháng thể thứ cấp, kháng Fab được pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 và được cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi rửa bằng 0,2mL PBS/T, tiến hành hiện màu và đo độ hấp thụ ở bước sóng 490nm.

Kết quả là, xác nhận được rằng scFv-thể thực khuẩn đối chứng và các biến thể PD-1 thể hiện các đặc tính gắn kết khác nhau và có các epitop khác nhau (Fig.20).

Ví dụ 10: Sự gắn kết đặc hiệu của kháng thể bổ mệ PD1

Để xác định khả năng gắn kết của kháng thể bổ mẹ kháng PD1 và kháng thể đối chứng (Nivolumab) với các kháng nguyên khác nhau ngoài kháng nguyên PD1 (Bảng 15), khoảng 90 kháng nguyên không đặc hiệu được phủ với mật độ 100 ng/lỗ trên đĩa miễn dịch 96 lỗ ở nhiệt độ 4°C trong 16 giờ và các lỗ tương ứng được phong bế bằng cách sử dụng 4% sữa tách kem tan trong PBS. Rửa mỗi lỗ bằng 0,2mL PBS/T, và sau đó kháng thể bổ mẹ và kháng thể đối chứng được bổ sung với lượng 100µL (1µg/mL) vào mỗi lỗ và được cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Một lần nữa, rửa mỗi lỗ 4 lần bằng 0,2mL PBS/T, và sau đó kháng thể thứ cấp, kháng kapa-HRP được pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 và được cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi rửa bằng 0,2mL PBS/T, tiến hành hiện màu và đo độ hấp thụ ở bước sóng 490nm.

[Bảng 15]

Fc	GP1BA	LRRN4	TLR3	LRTM1	TPBG	SEMA6A	SEMA5A	SLITRK5	EPYC	LINGO1	OGN
OPTC	RTN4RL1	LRRC4C	LRRTM2	TLR4	TLR7	TLR9	LRRN1	SLITRK2	FZD10	C2orf28	SUSD1
FSTL3	SPOCK1	CD209	CD97	SCARF1	WIF1	TNR	EMR1	SPARC	DNER	BAMBI	FSTL1
Kremen1	CFC1	TMEFF2	NRG4	SPOCK2	CD40LG	FASLG	TNFSF4	GREM1	Fc	LRP11	LRP12
APCDD1	CHRD1	DKK4	DMP1	LRP6	TNFSF9	TNFSF8	TNF	TNFSF12	TMED1	CD320	SOST
C18orf1	OSTM1	NBL1	DKK3	ECM1	TNFSF18	TNFSF13	DKK1	SELP	HAPLN4	ULBP1	SPINT2
PLXDC1	PLXDC2	PODXL	CDCP1	PI3	WFDC2	AGR2	AGR3	CREG1	EVI2A	RAET1E	MICA
CD86	ICOSLG	CD276	PDCD1	BTN2A1	BTN3A2	BTN3A1	BTNL9	BTN3A3	BTN1A1	Fc	trống

Kết quả là, xác nhận được rằng cả kháng thể đối chứng và kháng thể bổ mẹ đều gắn kết đặc hiệu chỉ với kháng nguyên PD1 mà không gắn kết với kháng nguyên không xác định (Fig.21).

Ví dụ 11: So sánh năng suất ở hệ biểu hiện tạm thời của các kháng thể đơn dòng kháng PD1

Có thể thấy rằng kháng thể được tối ưu có độ đồng nhất tương đối và có năng suất cao nhờ các đặc tính vật lý hoàn hảo khi sản xuất và tinh chế thông qua hệ biểu hiện tạm thời. Một số kháng thể có năng suất cao hơn các kháng thể có trên thị trường thông thường (Fig.22).

Ví dụ 12: Tăng hoạt tính của kháng thể đơn dòng PD1 trong phản ứng MLR ngoại sinh

Trộn tế bào T với tế bào tua thu được từ bạch cầu đơn nhân tách từ những người khác nhau ở tỷ lệ 1:10 và nuôi cấy trong 5 ngày và lượng interferon gama trong môi trường nuôi cấy được xác định. Kết quả là, môi trường nuôi cấy chứa kháng thể bổ mẹ

45D6 và 49A2 có sự gia tăng hàm lượng interferon gama phụ thuộc vào nồng độ (Fig.23).

Ví dụ 13: Thử nghiệm về độ ổn định nhiệt của kháng thể đơn dòng PD1

Protein kháng thể được pha loãng trong DPBS đến nồng độ 3uM, 45uL, được trộn với 5uL thuốc nhuộm màu cam Sypro 200x (#S6650, Thermo) và sau đó chia thành các phân ước với lượng 50uL vào ống qPCR (#B77009, B57651, bioplastics). Thực hiện qPCR nhờ sử dụng hệ PCR theo thời gian thực Biorad CFX96. Các điều kiện qPCR được đưa ra như sau: phản ứng ở 25°C trong 30 giây, tăng nhiệt với bước nhiệt 1°C đến 99°C và đồng thời phản ứng ở mỗi nhiệt độ trong 1 phút và phản ứng cuối ở 25°C trong 10 giây. Tm (nhiệt độ nóng chảy) được sử dụng làm hằng số tốc độ mà tại đó cấu trúc kháng thể không gắn kết. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 16 dưới đây.

Bảng 16

Mẫu	Tm
Pembrolizumab	63
Opdivo	64
45D6	63
49A2	63
49A2-2B9	64

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Các kháng thể mới gắn kết với PD-1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của chúng theo sáng chế có thể gắn kết với PD-1 và ức chế hoạt tính của PD-1, do vậy các kháng thể này là hữu ích để phát triển các thuốc điều trị miễn dịch đối với các bệnh khác nhau liên quan đến PD-1.

Mặc dù các phương án cụ thể của sáng chế đã được mô tả chi tiết, nhưng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rõ rằng bản mô tả này được đưa ra ở dạng các phương án ưu tiên nhằm minh họa và không được hiểu là giới hạn phạm vi của sáng chế. Do vậy, phạm vi thực sự của sáng chế được xác định bởi yêu cầu bảo hộ đi kèm và các dạng tương đương của chúng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể gắn kết với PD-1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó bao gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, CDR2 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 32, CDR3 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 58, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 230, CDR3 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 249,

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, CDR2 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 31, CDR3 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 57, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 208, CDR2 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 230, CDR3 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 252,

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, CDR2 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 32, CDR3 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 58, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 215, CDR2 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 230, CDR3 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 249,

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, CDR2 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 31, CDR3 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 57, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 230, CDR3 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 252,

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, CDR2 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 31, CDR3 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 57, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 220, CDR2 của

chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 230, CDR3 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 252,

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 26, CDR2 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 31, CDR3 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 57, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 220, CDR2 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 230, CDR3 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 267,

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 27, CDR2 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 31, CDR3 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 57, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 230, CDR3 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 252,

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17, CDR2 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 49, CDR3 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 58, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 220, CDR2 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 230, CDR3 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 252,

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 21, CDR2 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 51, CDR3 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 58, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 221, CDR2 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 230, CDR3 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 266,

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 22, CDR2 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 53, CDR3 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 58, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 230, CDR3 của chuỗi nhẹ gồm trình tự

nêu trong SEQ ID NO: 252, hoặc

vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 17, CDR2 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 54, CDR3 của chuỗi nặng gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 58, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 205, CDR2 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 230, CDR3 của chuỗi nhẹ gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 267.

2. Kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm 1 bao gồm:

FR1 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 80 đến SEQ ID NO: 95;

FR2 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 96 đến SEQ ID NO: 113;

FR3 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 114 đến SEQ ID NO: 134; hoặc

FR4 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 135 đến SEQ ID NO: 145.

3. Kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm 1 bao gồm:

FR1 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 270 đến SEQ ID NO: 294;

FR2 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 295 đến SEQ ID NO: 315;

FR3 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 316 đến SEQ ID NO: 355; hoặc

FR4 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các trình tự SEQ ID NO: 356 đến SEQ ID NO: 367.

4. Kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm 1 bao gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nặng gồm trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 175,

SEQ ID NO: 176 và SEQ ID NO: 178.

5. Kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm 1 bao gồm:

vùng biến đổi của chuỗi nhẹ gồm trình tự được chọn từ nhóm gồm các trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 375, SEQ ID NO: 378, SEQ ID NO: 385, SEQ ID NO: 391, SEQ ID NO: 395, SEQ ID NO: 396, SEQ ID NO: 398, SEQ ID NO: 401, SEQ ID NO: 405, SEQ ID NO: 411 và SEQ ID NO: 412.

6. Axit nucleic mã hóa kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.

7. Vector biểu hiện bao gồm axit nucleic theo điểm 6.

8. Tế bào được biến nạp vector biểu hiện theo điểm 7.

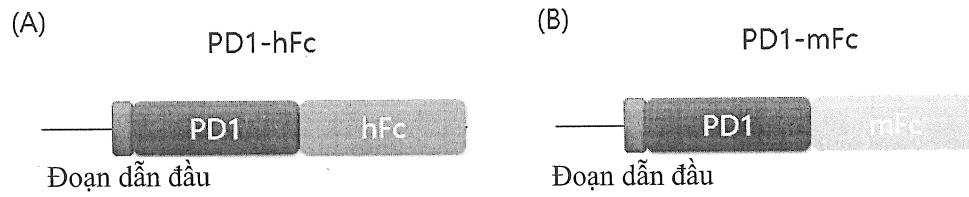
9. Phương pháp sản xuất kháng thể gắn kết với PD-1 hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) nuôi cấy tế bào theo điểm 8; và

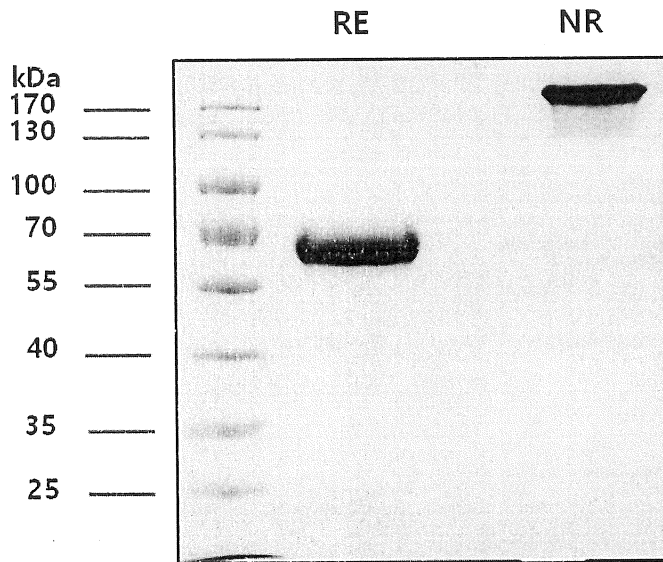
(b) thu hồi kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó từ dịch nuôi cấy tế bào nuôi.

10. Chế phẩm ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh ung thư chứa kháng thể hoặc đoạn gắn kết với kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 làm hoạt chất.

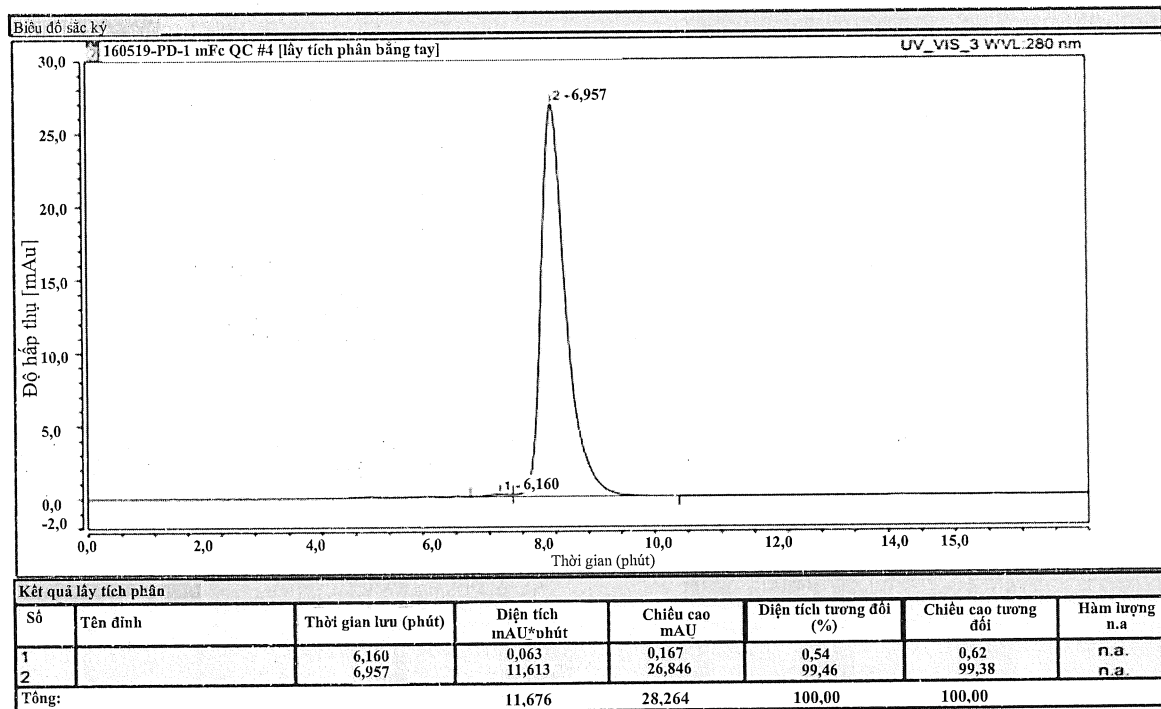
【Fig.1】



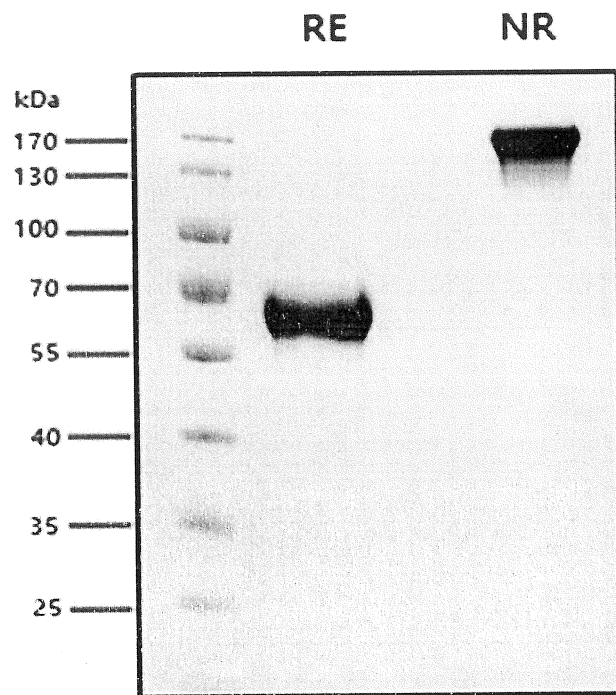
【Fig.2a】



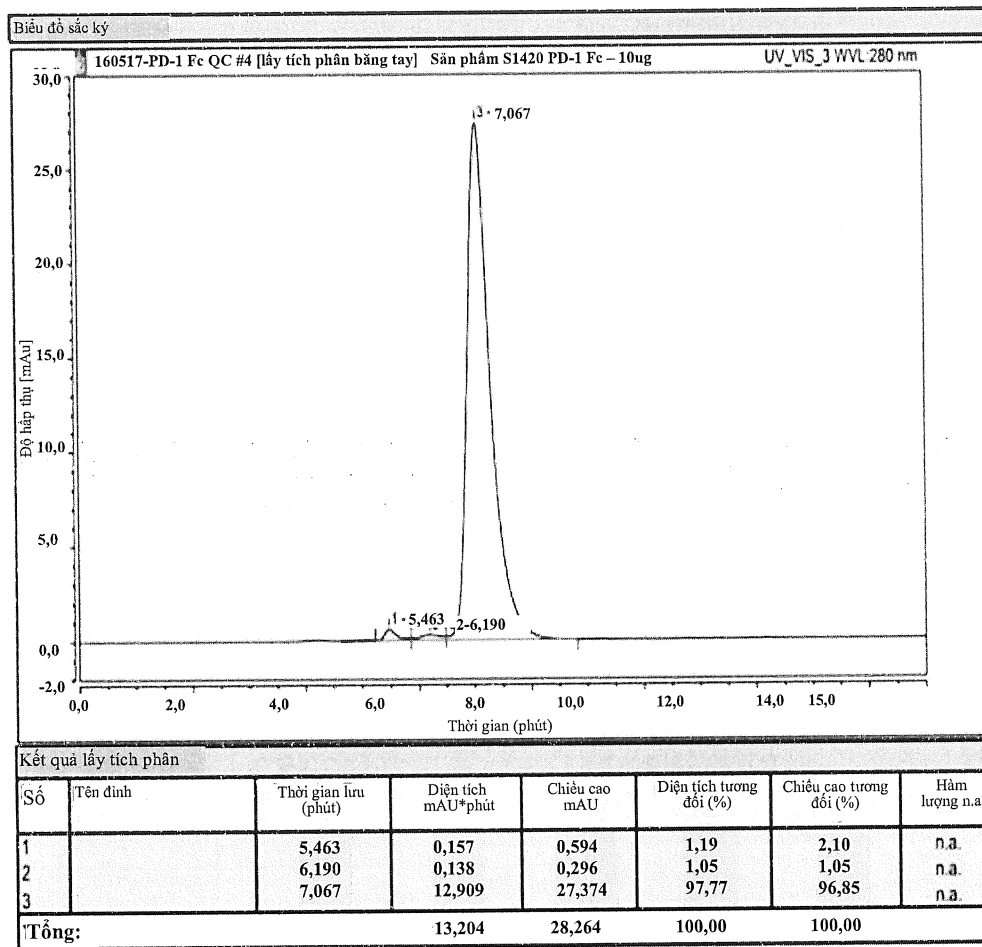
【Fig. 2b】



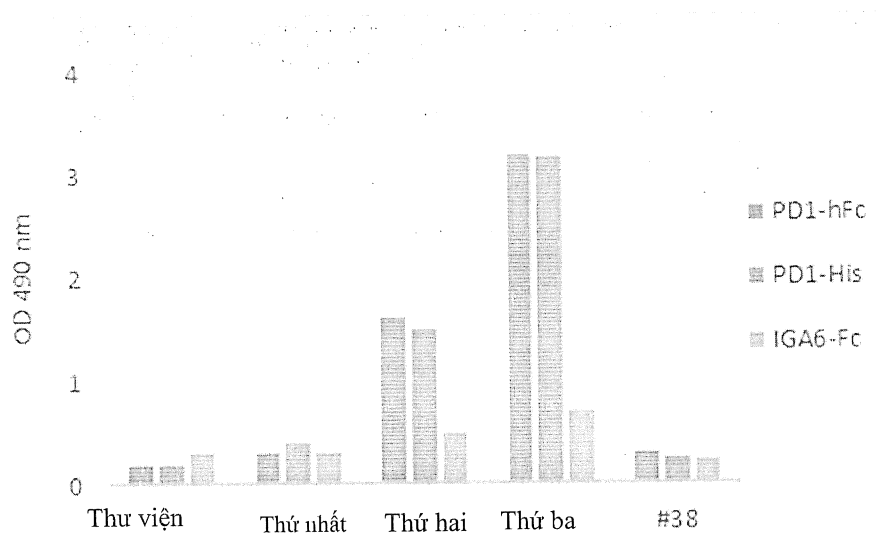
【Fig.2c】



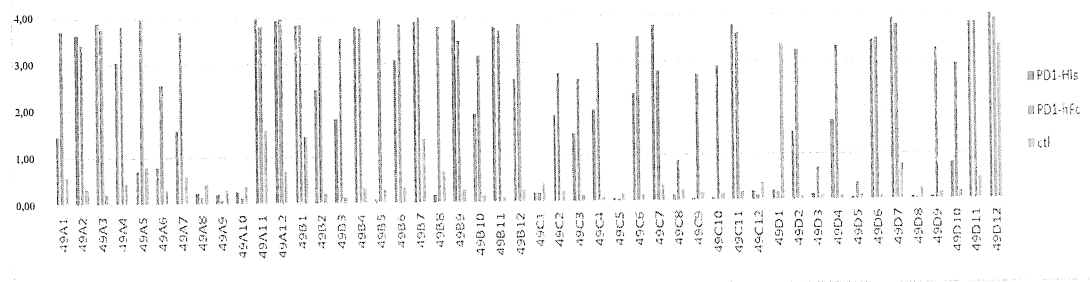
【Fig.2d】



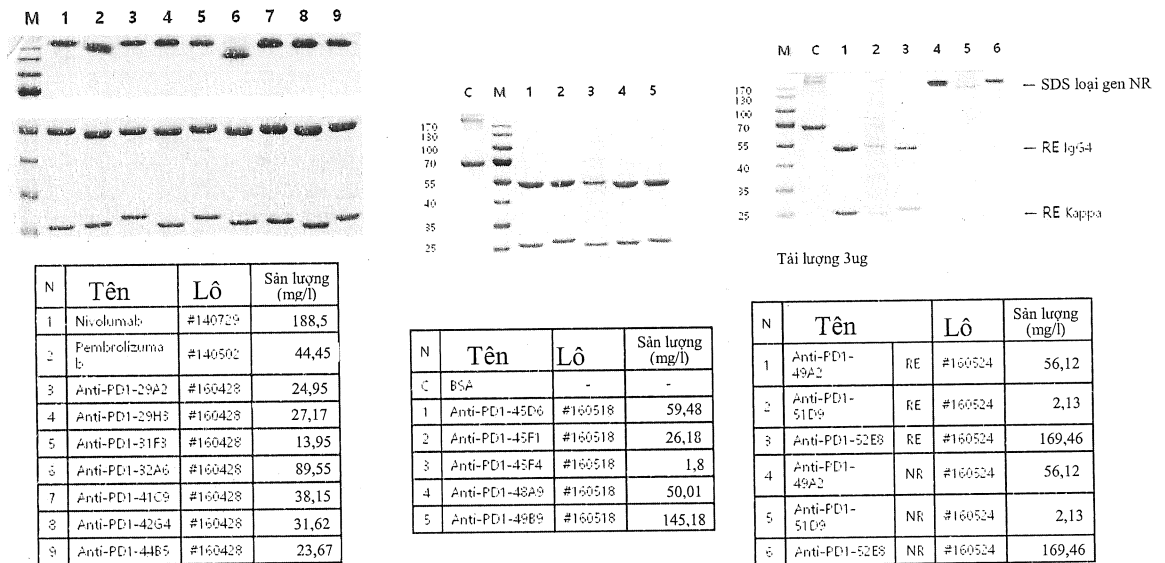
【Fig.3】



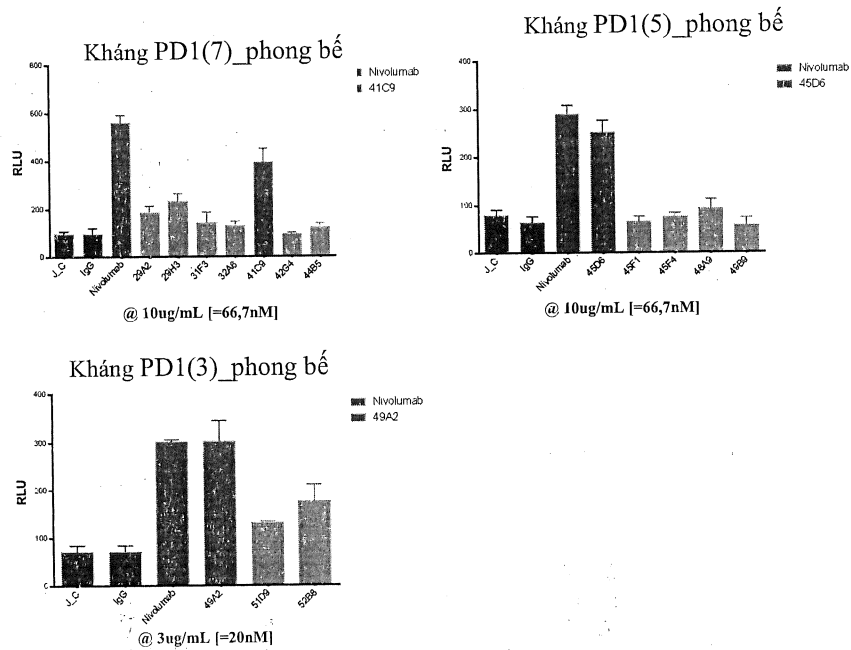
【Fig.4】



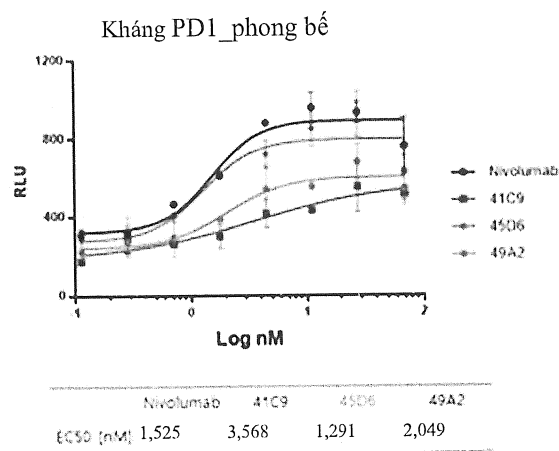
【Fig.5】



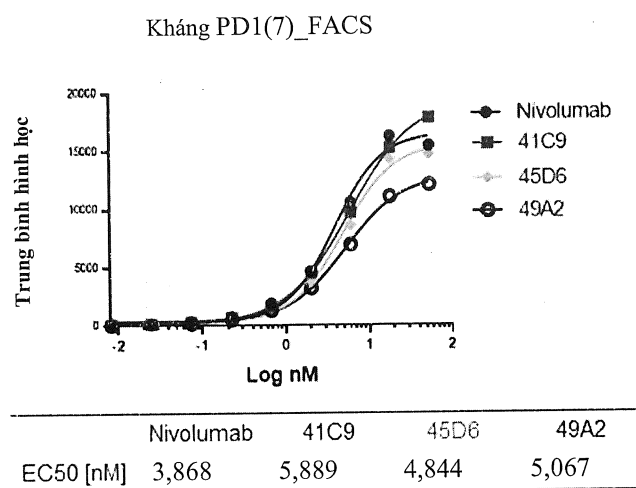
【Fig.6】



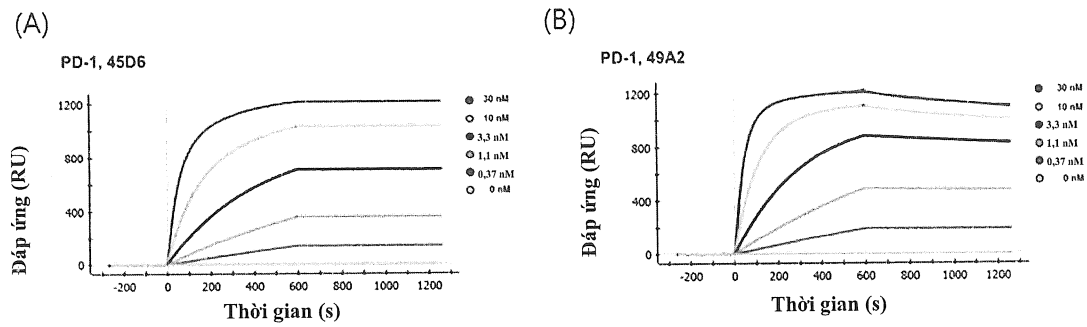
【Fig.7】



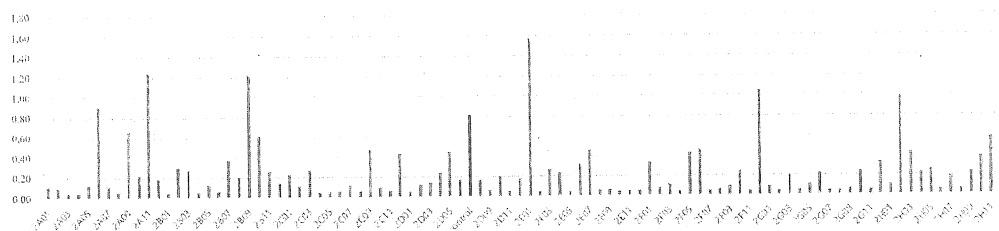
【Fig.8】



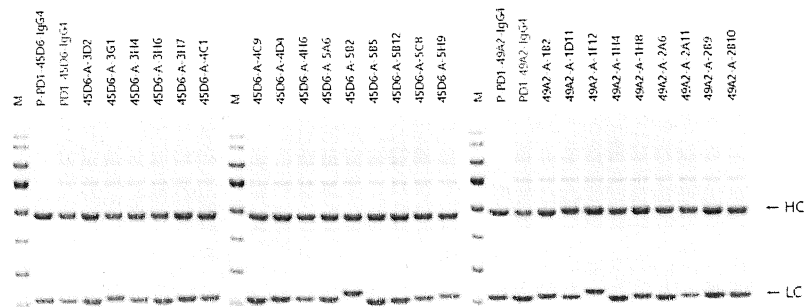
【Fig.9】



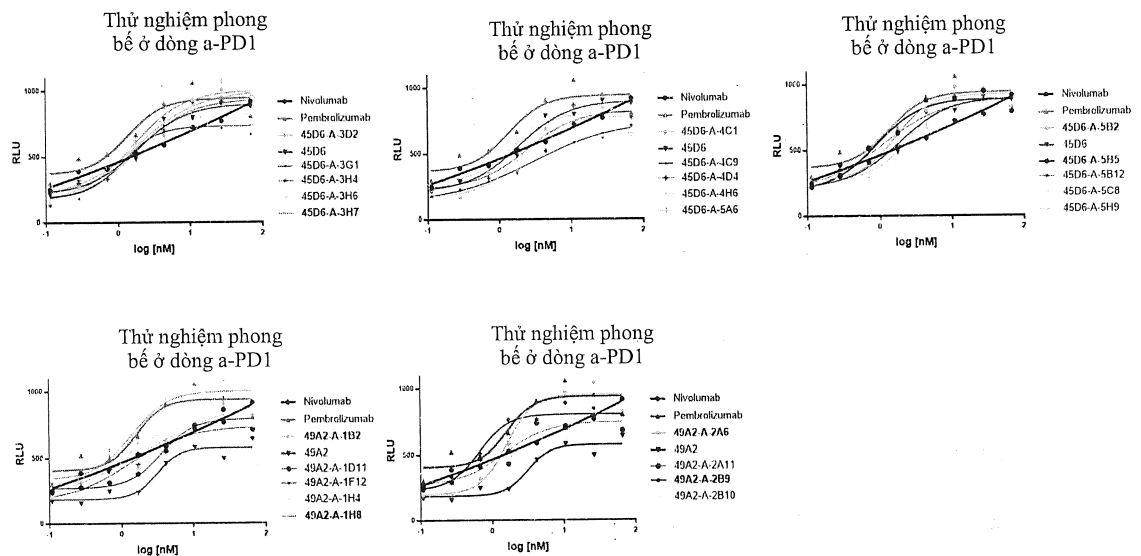
【Fig.10】



【Fig.11】

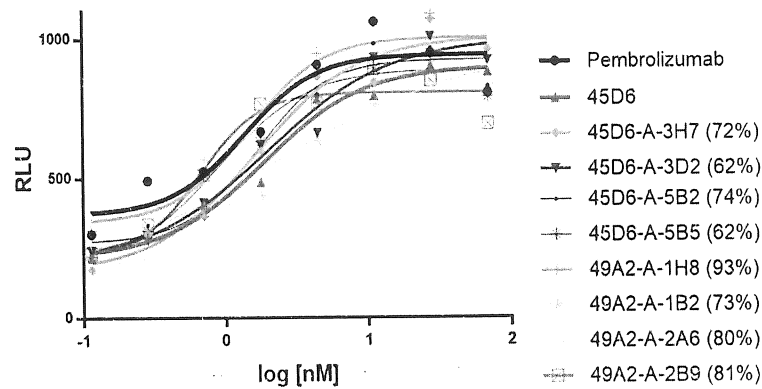


【Fig.12】



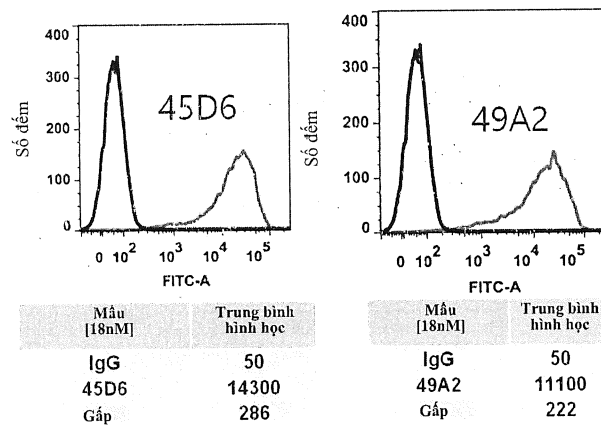
【Fig.13】

Thử nghiệm phong bế ở dòng α-PD1



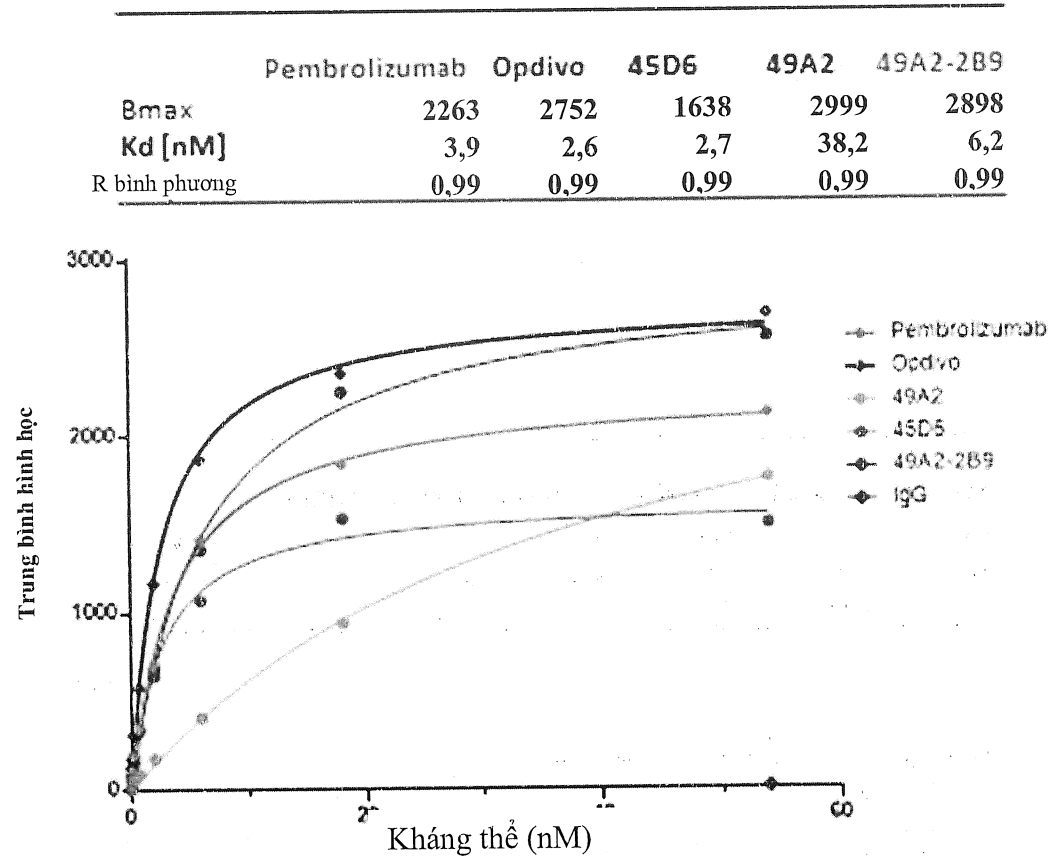
	Pembrolizumab	45D6	45D6-A-3D2	45D6-A-3H7	45D6-A-5B2	45D6-A-5B5	49A2-A-1B2	49A2-A-1H8	49A2-A-2A6	49A2-A-2B9
Đáy	370,3	216,1	198	167,1	270,5	193,6	121,5	341,3	198,6	236,5
Đỉnh	943,9	900,7	1002	1006	925,8	891,3	968,9	1006	957,3	807,4
EC50	1,367	1,876	2,005	1,635	1,66	0,9064	2,033	1,454	1,669	0,6888
R bình phương	0,8881	0,9796	0,9687	0,9702	0,9656	0,9583	0,928	0,8804	0,9708	0,9406
Năng suất			100,3	141	124,6	144,6	106,3	67,3	3,6	128

【Fig.14】



Kháng thể	Gắn kết ở : 2 ~ 10 ug/ml
	Có (Y)/Không(N)/không xác định (nd)
PD1-29A2	Y
PD1-29H3	Y
PD1-31F3	Y
PD1-32A6	N
PD1-42G4	Y
PD1-44B5	Y
PD1-45D6	Y
PD1-45D6-A-3D2	nd
PD1-45D6-A-3H7	nd
PD1-45D6-A-5B2	nd
PD1-45D6-A-5B5	nd
PD1-45F1	N
PD1-45F4	N
PD1-48A9	Y
PD1-49A2	Y
PD1-49A2-A-1B2	nd
PD1-49A2-A-1H8	nd
PD1-49A2-A-2B9	Y
PD1-49B9	N
PD1-51D9	Y
PD1-52E8	Y
PD1-72D10	Y
PD1-74A11	Y
PD1-75C10	Y
PD1-74A01	Y
PD1-74H12	Y

【Fig.15】



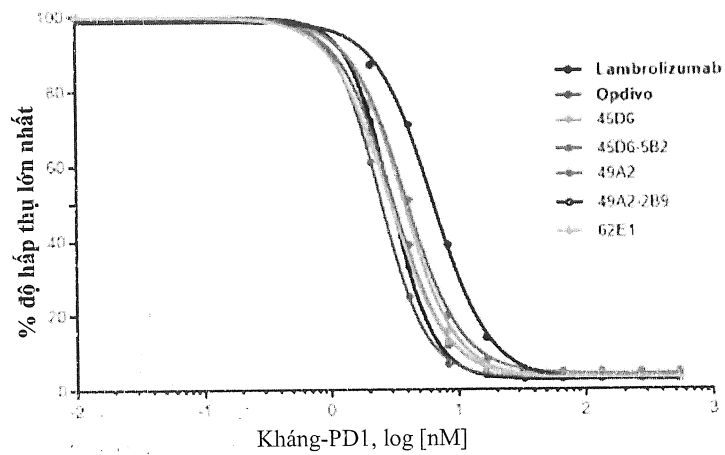
【Fig.16】

ELISA cạnh tranh

Phủ: PDL1-Fc

Gắn kết: PDL1-His

Cạnh tranh: kháng PD1



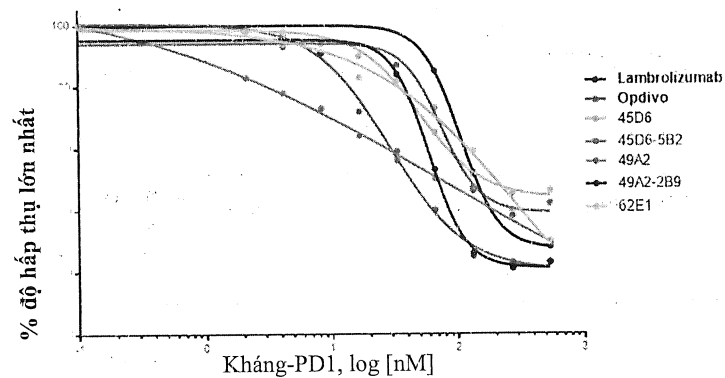
	Lambrolizumab	Opdivo	45D6	45D6-5B2	49A2	49A2-2B9	62E1
IC50 [nM]	3,01	2,46	3,72	3,09	3,92	6,38	2,89
R bình phương	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

ELISA cạnh tranh

Phủ: PD-L2-Fc

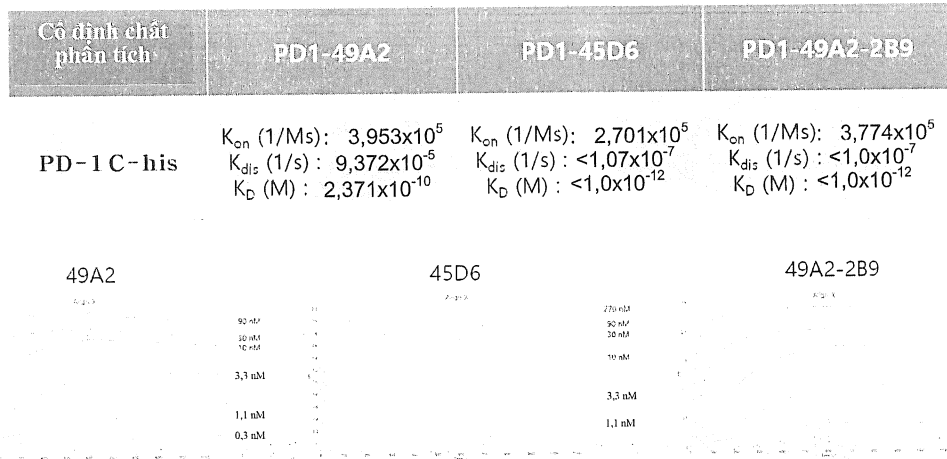
Gắn kết: PD-1-His

Cạnh tranh: kháng PD1



	Lambrolizumab	Opdivo	45D6	45D6-5B2	49A2	49A2-2B9	62E1
IC50 [nM]	104,7	28,5	49,6	75,4	59,7	59,0	314,2
R bình phương	1,00	0,99	1,00	0,99	1,00	0,99	0,99

【Fig.17】



【Fig.18】

LPO-1
 FSWELSGEGRNHEFTTQALLVVEGSHATPTCSFNTTSESEFLUM/SHSPINDDILAAFEEDHSCQCCCPFRVTOLNGRLPHNIVVKAHNDSTYIATLSIAEPAQCKSLRAELK/TERRAEVPTANPSKSPAPACQCTIVVGVV
 M1-1
 S L
 M1-2
 EV DIB
 M1
 S A B
 M2-1
 EGHIL
 M2-2
 EV
 M3
 Q P P A
 M4
 FDEKKA
 M11
 H L E Q
 M5
 P G C R
 M5-1
 CQSL
 M5-2
 VR
 M6
 P S E
 M12
 PH
 M13
 HILDT
 M14
 Z V
 M7-1
 Y P
 M7-2
 TE
 M7
 Y P T
 M8
 HQ E E
 M9
 V L E
 M10
 CP E HL

*Axit amin đột biến được đánh dấu màu đỏ

【Fig.19】

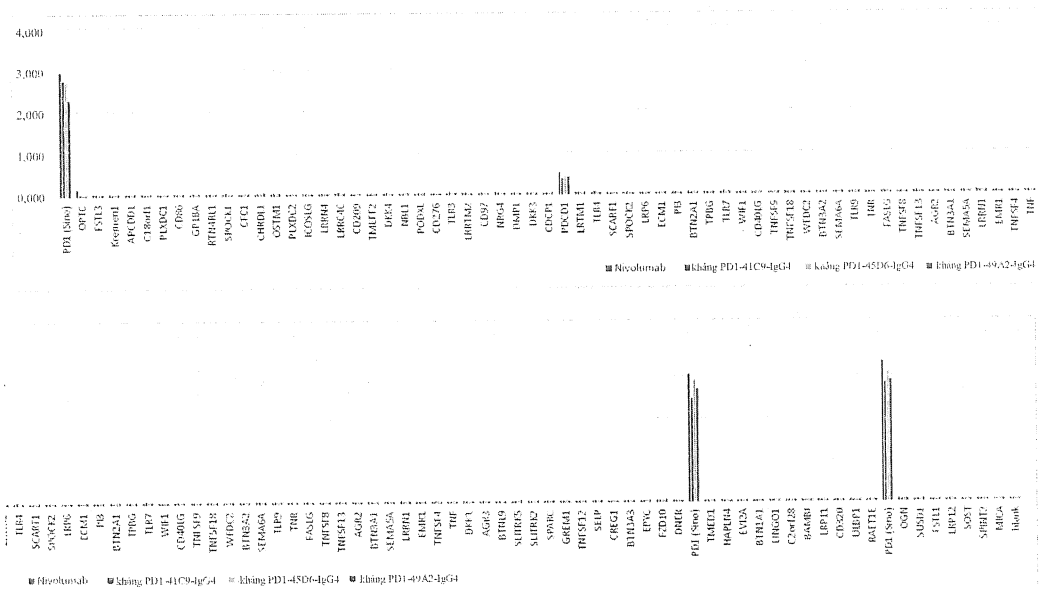
	WT	M1	M1-1	M1-2	M2	M2-1	M2-2	M3	M4	M11	M5	M5-1	M5-2	M6	M12	M13	M14	M7	M7-1	M7-2	M8	M9	M10	ITGA6
PDL1-FC	3.9	3.9	3.8	3.9	0.4	3.9	3.9	3.9	4.0	1.4	0.4	3.8	4.0	4.0	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	0.3
Nivolumab	3.5	3.3	3.3	2.5	1.4	3.3	3.4	3.4	3.4	2.3	3.2	3.2	3.5	3.2	3.0	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.2	3.3	3.2	0.3
Pembrolizumab	3.3	2.8	2.8	3.1	0.1	3.1	2.8	2.3	3.0	0.3	1.1	0.1	3.5	3.1	2.9	3.2	2.7	2.6	2.6	2.9	3.5	2.8	2.5	0.1
29A2	2.2	2.7	2.7	3.2	0.6	3.2	3.1	1.7	2.8	0.6	1.6	1.9	3.3	3.4	3.0	3.4	3.4	1.1	1.4	3.3	1.9	3.2	2.8	0.4
29H3	3.6	1.5	3.2	0.6	0.7	2.8	3.2	2.3	3.3	1.0	2.0	2.0	3.7	3.5	3.0	3.5	3.5	1.4	1.5	3.1	2.2	3.4	3.0	0.3
31F3	2.0	3.0	3.0	3.2	0.7	3.5	3.3	1.9	2.7	0.0	1.1	1.3	3.4	3.3	2.6	3.3	3.4	0.7	0.6	1.5	1.7	3.2	3.0	0.4
32A6	3.5	2.4	2.6	2.8	3.2	2.8	2.7	3.0	2.4	3.3	2.9	3.6	2.9	2.9	2.7	0.5	1.7	3.2	3.1	2.8	3.1	2.4	2.5	0.3
41C9	3.2	3.2	3.1	3.2	0.6	3.4	3.2	2.3	3.2	0.9	2.3	2.8	3.6	3.6	3.1	3.6	3.5	0.8	1.2	3.0	2.5	3.3	3.4	0.5
42G4	2.8	1.8	2.9	0.6	0.6	3.0	2.0	1.3	1.3	1.6	1.9	3.5	3.9	2.7	3.7	3.7	2.5	2.8	2.7	2.1	3.4	3.1	0.4	
44B5	3.8	3.8	3.6	0.3	3.7	3.6	3.7	3.7	3.6	3.8	3.7	3.7	3.8	3.7	3.6	3.7	3.7	3.6	3.7	3.7	3.5	3.7	3.7	0.3
45D6	3.8	4.0	3.8	3.9	0.4	3.9	3.8	3.8	3.9	0.7	3.6	3.8	3.9	3.9	3.9	4.0	3.9	0.5	1.3	4.0	3.8	3.8	3.9	0.5
45F1	4.0	3.9	3.9	3.9	3.8	3.9	4.0	3.8	3.9	3.8	3.8	3.9	3.9	4.0	0.4	2.2	3.8	3.8	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	0.1
45F4	3.8	2.6	2.5	3.6	2.9	3.0	2.5	3.7	2.7	0.3	0.1	0.1	3.1	3.7	3.7	3.5	1.8	3.5	3.5	3.4	3.6	3.3	3.3	0.1
48A9	2.1	3.7	3.8	3.9	0.3	3.8	3.9	2.0	3.9	0.3	1.3	0.6	3.9	3.9	3.9	4.0	4.0	0.3	0.4	0.4	1.7	3.9	3.8	0.3
49B9	3.9	3.9	3.8	3.9	3.9	3.8	3.5	3.9	3.8	1.4	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	0.3
49A2	3.6	3.0	3.1	3.8	0.3	3.7	3.8	3.4	3.9	0.4	1.2	0.7	3.8	3.9	3.9	3.9	3.9	0.4	0.5	2.2	3.0	3.7	2.6	0.2
51D9	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.4	0.6	0.3	1.1	0.1	0.1	0.1	0.6	0.3	0.3	0.7	0.8	0.1	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.1
52E8	0.4	1.4	1.5	3.6	0.2	2.9	3.4	1.5	3.7	0.2	0.5	0.3	3.5	3.4	3.2	3.9	2.6	1.0	1.1	3.9	0.6	2.4	1.0	0.1

【Fig.20】

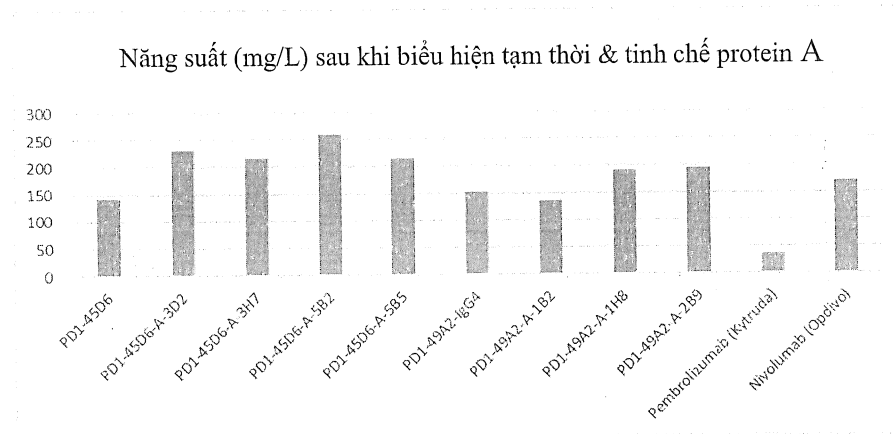
Fig. 20

	PD1-His (Sir cunSPD)	M1	M1-1	M1-2	M2-1	M2-2	M3	V-4	M11	M5	M5-1	M5-2	M6	M12	M13	M14	M7	M7-1	V7-2	V8	M9	M10	ITGA6-FC	
PD1-FC	3.9		3.9	3.8	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	1.4	0.4	3.8	4.0	4.0	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	0.3	
mPDLL2-mFC	3.1		3.6	3.6	3.6	3.5	3.5	3.5	1.7	3.4	3.7	3.7	3.6	3.5	3.5	3.6	3.4	0.4	3.3	3.2	3.2	3.0	0.3	
Nivolumab	3.5	3.9	3.3	3.3	2.5	3.3	3.4	3.4	3.4	2.3	3.2	3.2	3.5	3.2	3.0	3.3	3.3	3.1	3.3	3.3	3.2	3.3	0.3	
Pembrolizumab	3.3	3.9	2.8	2.8	2.1	3.1	2.8	2.3	2.0	0.3	1.1	0.1	3.5	3.1	2.9	3.2	2.7	2.6	2.6	2.9	1.9	2.3	2.5	0.1
41C9	3.2	4.0	3.2	3.1	3.2	3.4	3.2	2.3	3.2	0.9	2.3	2.8	3.6	3.6	3.1	3.6	3.5	0.8	1.2	3.0	2.5	3.3	0.5	
45D6	3.8	3.8	4.0	3.8	3.9	3.9	3.8	3.8	3.9	0.7	3.6	3.8	3.9	3.9	3.9	4.0	3.9	0.5	1.3	4.0	3.8	3.8	0.5	
49A2	3.6	3.9	3.0	3.4	3.8	3.7	3.8	3.4	3.9	0.4	1.2	0.7	3.8	3.9	3.9	3.9	3.9	0.4	0.5	2.2	3.0	3.7	0.2	
52E8	0.4	3.7	1.4	1.5	3.6	2.9	3.4	1.5	3.7	0.2	0.5	0.3	3.5	3.4	3.2	3.9	2.6	1.0	1.1	3.9	0.6	2.4	0.1	
45D6-5B2	0.084	2.575	2.649	2.403	2.258	2.081	2.256	2.094	2.185	0.446	2.313	2.242	2.695	2.314	2.492	2.300	2.333	0.238	1.892	2.327	2.322	2.667	2.741	0.124
49A2-2B9	0.067	2.300	1.905	1.975	2.284	2.254	2.212	1.982	2.128	0.433	2.015	1.945	2.282	2.294	2.265	2.065	2.051	0.083	1.808	2.833	2.520	2.650	2.433	0.100

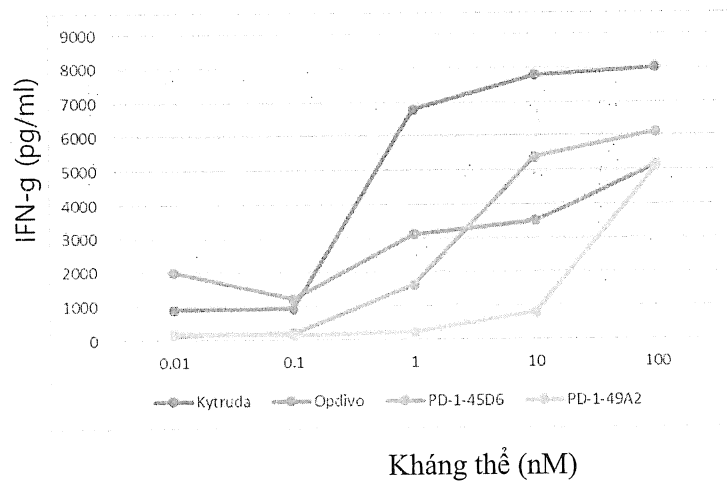
【Fig.21】



【Fig.22】



【Fig.23】



Danh mục trình tự

<110> Y-BIOLOGICS INC.

<120> KHÁNG THỂ GẮN KẾT VỚI PROTEIN GÂY CHẾT TẾ BÀO THEO CHƯƠNG TRÌNH 1 (PD-1), VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

<130> PF-B2149

<140> PCT/KR2017/008494

<141> 2017-08-07

<150> KR10-2016-0100210

<151> 2016-08-05

<160> 420

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 2

Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Ala

1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 3

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 4

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 5

Gly Asp Thr Phe Thr Arg Asn Ala

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 6

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 7

Gly Tyr Thr Phe Asn Ser Tyr Tyr

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo
<400> 8
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
1 5
<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 9
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asp
1 5
<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 10
Gly Phe Thr Val Ser Arg Asn Ser
1 5
<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 11
Gly Asp Thr Phe Thr Arg Tyr Ile
1 5
<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 12
Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr Ala
1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Glu Asp Tyr Ala

1

5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 14

Gly Leu Ser Phe Ser Ser Tyr Trp

1

5

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 15

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp

1

5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 16

Gly Phe Thr Phe Gly Asp His Pro

1

5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 17

Gly Phe Thr Phe Leu Arg Tyr Ala

1 5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 18

Gly Phe Thr Phe Lys Asn Asn Ala

1 5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 19

Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr Ala

1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 20

Gly Phe Thr Phe Pro Ile Tyr Ala

1 5

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 21

Gly Phe Thr Phe Lys Thr Tyr Ala

1 5
<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 22

Gly Phe Thr Phe Lys Tyr Tyr Ala

1 5
<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 23

Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Ala

1 5
<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 24

Gly Phe Thr Phe Leu Val Tyr Ala

1 5
<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 25

Gly Phe Thr Phe Arg Leu Tyr Ala

1 5
<210> 26
<211> 8
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 26

Gly Phe Thr Phe Ser Phe Tyr Ala

1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 27

Gly Phe Thr Phe Arg Thr Tyr Ala

1 5

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 28

Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr Ala

1 5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 29

Gly Phe Thr Phe Met Arg Tyr Ala

1 5

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 30

Gly Phe Thr Phe Trp Thr Tyr Ala

1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 31

Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys

1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 32

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys

1 5

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 33

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile

1 5

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 34

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile

1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 35
Ile Ile Pro Leu Phe Ser Thr Ala
1 5
<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 36
Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ser Ala
1 5
<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 37
Ile Ser Ala Ser Gly Asn Ser Ile
1 5
<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 38
Ile Asn Pro Ser Asp Gly Ser Ala
1 5
<210> 39
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo

<400> 39
Ile Ser Trp Asn Ser Asn Asn Ile
1 5
<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 40
Leu His Ala Asp Ser Gly Lys Thr
1 5
<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 41
Ile Phe Ser Gly Gly Thr Thr Lys
1 5
<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 42
Val Ile Pro Thr Leu Gly Leu Thr
1 5
<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 43
Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Lys Ile
1 5
<210> 44

<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 44
Ile Ser Trp Asn Ser His Asn Ile
1 5
<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 45
Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys
1 5
<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 46
Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr
1 5
<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 47
Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Pro
1 5
<210> 48
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 48

Ile Arg Ser Lys Ala Tyr Gly Glu

1 5

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 49

Ile Ser Tyr Asp Gly Gln Asp Lys

1 5

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 50

Ile Ser Tyr Asp Gly Arg His Lys

1 5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 51

Ile Ser Tyr Asp Gly Gln His Lys

1 5

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 52

Ile Ser Tyr Asp Gly Ala His Lys

1 5

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 53

Ile Ser Tyr Asp Gly Gln Tyr Lys

1 5

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 54

Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Tyr Lys

1 5

<210> 55
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 55

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser His Lys

1 5

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 56

Ile Ser His Asp Gly Asn Asp Lys

1 5

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 57

Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr

1 5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 58

Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser

1 5

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 59

Ala Arg Ser Gln Gln Gln Ile Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 60

Ala Arg Ser Ile Arg Gln Ile Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 61

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> misc_feature

```

<222> (6)..(6)
<223> Xaa có thể là axit amin có trong tự nhiên bất kỳ
<400> 61
Ala Arg Ser Leu Pro Xaa Ser Arg Ser Arg Leu Asp Val
1          5          10
<210> 62
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa có thể là axit amin có trong tự nhiên bất kỳ
<400> 62
Ala Arg Ala Xaa Thr Ser Pro Leu Asp Met Ser Leu Asp Tyr
1          5          10
<210> 63
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 63
Ala Arg Leu Leu His Gln Met Asn Glu His Glu Phe Met Asp Val
1          5          10          15
<210> 64
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 64
Ala Lys His Lys Gly Leu Pro Phe Asp Trp Ser Pro Asp Gly Phe Asp
1          5          10          15
Thr
<210> 65
<211> 10
<212> PRT

```

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 65

Ala Arg Thr Ile Glu Gly Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 66

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 66

Val Thr Ser Gly Pro Phe Gly Glu Phe Arg Asn

1 5 10

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 67

Ala Arg Leu Met His Thr Phe Ser Val Gln Tyr Phe Leu Asp Val

1 5 10 15

<210> 68

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 68

Ala Arg Asp Gly Asn Tyr Tyr Asp Ser Arg Gly Tyr Tyr Tyr Asp Thr

1 5 10 15

Phe Asp Met

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 69

Ala Arg Gly Ala Leu Thr Pro Leu Asp Val

1 5 10

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 70

Ala Arg Gly Thr His Trp Leu Asp Ser

1 5

<210> 71

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 71

Ala Arg Glu Glu Gln Phe Leu Ile Ala Leu Ala Gly Arg Tyr Phe Asp

1 5 10 15

Tyr

<210> 72

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 72

Ala Arg Gly Tyr Gly Ser Gly Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 73

Ala Arg Ile Gly Tyr Lys Asp Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 74

Ser Thr Ser Gly Leu Gly Val His Ala

1 5

<210> 75

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 75

Ala Arg Asp Ser Phe Gly Gly His Leu Asp Leu

1 5 10

<210> 76

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 76

Ala Arg Glu Gly Asp Gly Ser Tyr Trp Gly Tyr Phe Asp Ser

1 5 10

<210> 77

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 77

Ala Arg Gly His Asn Tyr Leu Asp Ser Ser Tyr Tyr Asp Tyr

1 5 10

<210> 78

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 78

Ala Ser Val Ser Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Gln Gly Thr Phe

1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 79

Ala Arg Thr Thr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 80

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 80

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 81

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 81

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 82

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 82

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 83

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 83

Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asn Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 84

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 84

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 85

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 85

Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 86
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 86
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25
 <210> 87
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 87
 Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 88
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 88
 Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25
 <210> 89
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 89

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 90

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 90

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 91

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 91

Gln 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

20 25

<210> 92

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 92

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 93

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 93

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Asn Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 94

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 94

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly Ser

20 25

<210> 95

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 95

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 96

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 96

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

1 5 10 15

Val

<210> 97

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 97

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

1 5 10 15

Val

<210> 98

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 98

Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

1 5 10 15

Gly

<210> 99

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 99

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

1 5 10 15

Ser

<210> 100

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 100

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

1 5 10 15

Gly

<210> 101

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 101

Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met Ala

1 5 10 15

Asp

<210> 102

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 102

Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

1 5 10 15

Asp

<210> 103

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 103

Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

1 5 10 15

Ile

<210> 104

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 104

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Ser

1 5 10 15

Gly

<210> 105

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 105

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Gln Ala Pro Glu Trp Met Gly

1 5 10 15

Trp

<210> 106

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 106

Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser

1 5 10 15

Leu

<210> 107

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 107

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

1 5 10 15

Arg

<210> 108

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 108

Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10 15

Ser

<210> 109

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 109

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

Asn

<210> 110

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 110

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15

Glu

<210> 111

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 111

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

Gly

<210> 112

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 112

Leu Thr Trp Val Arg Gln Ile Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 1 5 10 15

Phe

<210> 113

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 113

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Thr
 1 5 10 15

Val

<210> 114

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 114

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

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 115

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 115

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

Pro Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 116

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 116

Val Tyr Ala Asp Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

1

5

10

15

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

20

25

30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 117

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 117

Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

1

5

10

15

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp

20

25

30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 118

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 118

His Ser Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu

1

5

10

15

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp

20

25

30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 119

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 119

Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Leu Thr Leu Thr Ala Asp Val

1 5 10 15

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 120

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 120

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

1 5 10 15

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ser Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 121

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 121

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

1 5 10 15

Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 122

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 122

Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr

1 5 10 15

Ser Thr Ser Ser Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 123

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 123

Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

1 5 10 15

Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 124

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 124

Gly Tyr Ala Gln Thr Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr

1 5 10 15

Ser Ile Asp Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 125

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 125

Tyr Lys Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser

1

5

10

15

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr

20

25

30

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

35

<210> 126

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 126

Thr Tyr Ala Gln Asn Phe Gln Asp Thr Val Thr Ile Ile Ala Asp Lys

1

5

10

15

Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Asn Leu Arg Ser Glu Asp

20

25

30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 127

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 127

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn

1

5

10

15

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

20

25

30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 128

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 128

Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

1 5 10 15

Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 129

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 129

Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

1 5 10 15

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 130

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 130

Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys

1 5 10 15

Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 131

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 131

Gly Tyr Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

1 5 10 15

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 132

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 132

Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg

1 5 10 15

Asp Asp Ser Lys Ser Ile Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala

20 25 30

Glu Asp Thr Ala Val Tyr

35

<210> 133

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 133

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn

1 5 10 15

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 134

<211> 38

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 134

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

Ser Lys Asn Met Leu Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 135

Trp Gly Gln Gly Ser Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 136

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 136

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 137

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 137

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 138

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 138

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 139

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 139

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 140

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 140

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Ile Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 141

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 141

Trp Gly Leu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 142

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 142

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 143

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 143

Trp Gly Gln Gly Thr Met Ile Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 144

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 144

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Ile Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 145

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 145

Trp Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 146

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 146

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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
 Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Gln Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 147

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 147

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

Ser Ser

<210> 148

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 148

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile Val Tyr Ala Asp Ser Met
 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 Ser Gln Gln Gln Ile Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 149

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 149

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

<210> 150

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> misc_feature

<222> (102)..(102)

<223> Xaa có thể là axit amin có trong tự nhiên bất kỳ

<400> 150

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile Val Tyr Ala Asp Ser Met

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 Ser Leu Pro Xaa Ser Arg Ser Arg Leu Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 151

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> misc_feature

<222> (100)..(100)

<223> Xaa có thể là axit amin có trong tự nhiên bất kỳ

<400> 151

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile Val Tyr Ala Asp Ser Met

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 Ala Xaa Thr Ser Pro Leu Asp Met Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 152
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 152
 Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asn Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Leu His Gln Met Asn Glu His Glu Phe Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 153
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 153
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

```

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

```

<210> 154

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 154

```

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

```

<210> 155

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 155

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

<210> 156

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 156

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

```

100                      105                      110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 157
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 157
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1                      5                      10                      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20                      25                      30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35                      40                      45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50                      55                      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Leu Met His Thr Phe Ser Val Gln Tyr Phe Leu Asp Val Trp
100                      105                      110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115                      120
<210> 158
<211> 114
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 158
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1                      5                      10                      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20                      25                      30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35                      40                      45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

```

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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
 Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Gln Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 159

<211> 126

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 159

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Ser Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Gly Asn Tyr Tyr Asp Ser Arg Gly Tyr Tyr Tyr Asp Thr
 100 105 110

Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Leu Ile Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 160

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 160

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

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

115

<210> 161

<211> 116

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 161

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

115

<210> 162

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 162

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

<210> 163

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 163

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

100 105 110
 Met Ile Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 164
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 164
 Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Lys Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ile Gly Tyr Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Met Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 165
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 165
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

115 120

 $\langle 211 \rangle$ 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 169

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Asn Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Pro Gly Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Gln 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 Gly His Asn Tyr Leu Asp Ser Ser Tyr Tyr Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 170

<211> 127

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 170

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asp His

20 25 30

Pro Leu Thr Trp Val Arg Gln Ile Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Phe Ile Arg Ser Lys Ala Tyr Gly Glu Thr Thr Glu Tyr Ala Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Ala Ser Val Ser Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Gln Gly
 100 105 110

Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 171

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 171

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Gln Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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

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

Ser Ser

<210> 172

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 172

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Arg His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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
 Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 173

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 173

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

Ser Ser

<210> 174

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 174

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

20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ala His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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
 Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 175

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 175

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

Ser Ser

<210> 176

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 176

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

Ser Ser

<210> 177

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 177

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

Ser Ser

<210> 178

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 178

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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

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

Ser Ser

<210> 179

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 179

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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

Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100 105 110
 Ser Ser
 <210> 180
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 180
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Gln His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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
 Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser
 <210> 181
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 181
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

Ser Ser

<210> 182

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 182

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

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

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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

Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 183

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 183

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

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

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser His Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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
 Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

<210> 184

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 184

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

<210> 185

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 185

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

<210> 186

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 186

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

<210> 187

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 187

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Met Arg Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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

Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 188

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 188

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

<210>	189
<211>	114
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo
<220>	
<223>	Trình tự nhân tạo
<400>	189

<210>	190
<211>	114
<212>	PRT
<213>	Trình tự nhân tạo
<220>	
<223>	Trình tự nhân tạo
<400>	190

62

20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Thr Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Ile Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

<210> 191

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 191

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

<210> 192

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 192

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

<210> 193

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 193

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

Ser Ser

<210> 194

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 194

ccaggatggg tcttagactc ccc

23

<210> 195

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 195

caccaggggt tggaactggc

20

<210> 196

<211> 232

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 196

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 Glu Glu Met 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> 197
<211> 233
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 197
Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro
1              5              10              15
Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
20              25              30
Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val
35              40              45
Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe
50              55              60
Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu
65              70              75              80
Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His
85              90              95
Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys
100             105             110
Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser
115             120             125
Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met
130             135             140

```

Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro
 145 150 155 160
 Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn
 165 170 175
 Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met
 180 185 190
 Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser
 195 200 205
 Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr
 210 215 220
 Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 198
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 198
 Arg Asp Ile Ser Arg Trp
 1 5
 <210> 199
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 199
 Gln Ser Leu Val His
 1 5
 <210> 200
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 200
 Gln Ala Ile Ser Asn Trp
 1 5
 <210> 201

<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 201
Ala Leu Ser Lys Gln Tyr
1 5
<210> 202
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 202
Thr Ser Asn Ile Gly Thr Asn Ala
1 5
<210> 203
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 203
Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp
1 5
<210> 204
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 204
Gln Gly Ile Val Ser Trp
1 5
<210> 205
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 205

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Glu Asp Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 206

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 206

Gln Gly Ile Ser Ser Tyr

1 5

<210> 207

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 207

Thr Phe Asn Ile Gly Thr Thr Thr

1 5

<210> 208

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 208

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Asp Gly Lys Thr Tyr

1 5 10

<210> 209

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 209

Ser Leu Arg Thr Tyr Tyr

1 5

<210> 210

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 210

Asn Leu Arg Thr Lys Tyr

1 5

<210> 211

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 211

Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr

1 5

<210> 212

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo.....

<400> 212

Arg Ser Asn Phe Gly Ala Gly His Asp

1 5

<210> 213

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 213

Gln Ser Leu Leu Asp Ser His Asp Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 214

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 214

Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn Thr

1 5

<210> 215

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 215

Gln Ser Leu Phe Asp Ser Asp Asp Gly Asn Thr Tyr

1 5 10

<210> 216

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 216

Gln Ser Leu Leu Tyr Ile Asp Gly Glu Thr Tyr

1 5 10

<210> 217

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 217

Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Asn Tyr

1 5 10

<210> 218

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 218

Ala Leu Ser Lys Glu Tyr

1 5
<210> 219
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 219

Gln Ser Val Thr Ser Asp

1 5
<210> 220
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 220

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Asp Gly Asn Thr Tyr

1 5 10
<210> 221
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 221

Gln Ser Leu Leu Asp Arg Asp Gly Gly His Thr Tyr

1 5 10
<210> 222
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 222

Gln Ser Leu Leu Asp Arg Gly Gly Gly His Thr Tyr

1 5 10
<210> 223
<211> 3
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 223

Gly Ala Ser

1

<210> 224

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 224

Lys Ile Ser

1

<210> 225

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 225

Ala Thr Ser

1

<210> 226

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 226

Lys Asp Thr

1

<210> 227

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 227

Tyr Asp Asp

1

<210> 228

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 228

Gly Asn Ser

1

<210> 229

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 229

Arg Ala Ser

1

<210> 230

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 230

Thr Leu Ser

1

<210> 231

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 231

Ala Ala Ser

1

<210> 232

<211> 3

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 232
Asn Tyr Asp
1
<210> 233
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 233
Gly Lys Asn
1
<210> 234
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 234
Gln Asp Thr
1
<210> 235
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo
<400> 235
Asp Val Ser
1
<210> 236
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự nhân tạo

<400> 236

Gly Asn Asn

1

<210> 237

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 237

Arg Asp Asp

1

<210> 238

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 238

Glu Val Ser

1

<210> 239

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 239

Leu Gly Ser

1

<210> 240

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 240

Lys Asp Ser

1

<210> 241

<211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>

<223> Trình tự nhân tạo
 <400> 241

Asp Ala Ser

1

<210> 242
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 242

Gln Gln Gly Lys Ser Phe Pro Tyr Thr

1

5

<210> 243
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 243

Met Gln Ser Thr Gln Phe Pro Tyr Thr

1

5

<210> 244
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 244

Gln Gln Thr Asp Ser Phe Pro Leu Thr

1

5

<210> 245
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 245

Gln Ser Ile Thr Asp Lys Ser Gly Thr Asp Val Ile

1 5 10

<210> 246

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 246

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Trp Val

1 5 10

<210> 247

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 247

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Tyr Val

1 5 10

<210> 248

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 248

Gln Gln Ala Asp Ser Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 249

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 249

Leu Gln Arg Met Gly Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 250

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 250

Gln Gln Ser Tyr Thr Ser Pro Arg Thr

1 5

<210> 251

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 251

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Ala Trp Leu

1 5 10

<210> 252

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 252

Met Gln Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr

1 5

<210> 253

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 253

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Lys Ser Leu Val

1 5 10

<210> 254

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 254

Met Thr Trp Asp Val Asp Thr Thr Ser Met Ile

1 5 10

<210> 255

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 255

Ser Ser Phe Thr Ser Ser Ser Thr Val Val

1 5 10

<210> 256

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 256

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp Gly

1 5 10

<210> 257

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 257

Met Gln Arg Ile Asp Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 258

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 258

Ala Ser Trp Asp Asp Thr Leu Asn Gly Trp Val

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

<210> 259
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 259
 Ser Ser Phe Ala Arg Asn Ser Asn Tyr Val

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

<210> 260
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 260
 Met Gln Gly Ile His Leu Pro Leu Thr

1	5	
---	---	--

<210> 261
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 261
 Met Gln Gly Leu Gln Ile Pro Ser Thr

1	5	
---	---	--

<210> 262
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 262
 Gln Ser Val Asp Ser Ser Asp Thr Ser Val Val

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

<210> 263
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 263

Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 264

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 264

Met Gln Arg Ile Glu Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 265

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 265

Met Gln Arg Val Glu Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 266

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 266

Met Gln Arg Ile Glu Phe Pro Phe Thr

1 5

<210> 267

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 267

Met Gln Arg Arg Asp Phe Pro Phe Thr

1 5

<210> 268

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 268

Met Gln Arg Lys Glu Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 269

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 269

Met Gln Arg Ile His Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 270

<211> 26

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 270

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

20 25

<210> 271

<211> 26

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 271

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

20

25

<210> 272

<211> 26

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 272

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Leu Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

20

25

<210> 273

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 273

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Met Ser Pro Gly Gln

1

5

10

15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp

20

25

<210> 274

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 274

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

1

5

10

15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly

20

25

<210> 275

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 275

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

1 5 10 15

Arg Val Ile Ile Ser Cys Thr Gly Ser

20 25

<210> 276

<211> 26

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 276

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

20 25

<210> 277

<211> 26

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 277

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Thr Thr Cys Arg Ala Ser

20 25

<210> 278

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> QFVLTSQPSA SGTPGQNIVI SCSAS

<400> 278

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

1 5 10 15

Asn Ile Val Ile Ser Cys Ser Ala Ser

20 25

<210> 279

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 279

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln

1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp

20 25

<210> 280

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 280

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

1 5 10 15

Thr Ala Asn Ile Ile Cys Ser Gly Asp

20 25

<210> 281

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 281

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

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr

20 25

<210> 282

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 282

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser
 20 25

<210> 283

<211> 26

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 283

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25

<210> 284

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 284

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Thr Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Arg
 20 25

<210> 285

<211> 26

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 285

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25

<210> 286

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 286

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

1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr

20 25

<210> 287

<211> 26

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 287

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser

20 25

<210> 288

<211> 25

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 288

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

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp

20 25

<210> 289

<211> 26

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 289

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 20 25
 <210> 290
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 290
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro His Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25
 <210> 291
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 291
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25
 <210> 292
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 292
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Pro Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25
 <210> 293
 <211> 26
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 293

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Met Pro Gly

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

20 25

<210> 294

<211> 26

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 294

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

20 25

<210> 295

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 295

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile

1 5 10 15

Tyr

<210> 296

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 296

Leu Asn Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile

1 5 10 15

His

<210> 297

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 297

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

1

5

10

15

Tyr

<210> 298

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 298

Ala Ser Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Met

1

5

10

15

Tyr

<210> 299

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 299

Val Asn Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Lys Ala Pro Thr Leu Leu Ile

1

5

10

15

Tyr

<210> 300

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 300

Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Val Leu Ile

1	5	10	15
---	---	----	----

Tyr

<210> 301

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 301

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile

1	5	10	15
---	---	----	----

Tyr

<210> 302

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 302

Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile

1	5	10	15
---	---	----	----

Tyr

<210> 303

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 303

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

1	5	10	15
---	---	----	----

Tyr

<210> 304

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 304

Val Asn Trp Tyr Gln Arg Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 1 5 10 15

Tyr

<210> 305

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 305

Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ile Leu Val Ile
 1 5 10 15

Tyr

<210> 306

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 306

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Leu Leu Val Ile
 1 5 10 15

Tyr

<210> 307

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 307

Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile
 1 5 10 15

Tyr

<210> 308

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 308

Val His Trp Cys Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile

1 5 10 15

Tyr

<210> 309

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 309

Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Val Leu Met

1 5 10 15

Tyr

<210> 310

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 310

Leu Phe Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile

1 5 10 15

Tyr

<210> 311

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 311

Ser Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met

1 5 10 15

Tyr

<210> 312

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 312

Val Ala Trp Tyr Gln His Ile Arg Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

1 5 10 15

Tyr

<210> 313

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 313

Val Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile

1 5 10 15

Tyr

<210> 314

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 314

Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile

1 5 10 15

Tyr

<210> 315

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 315

Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile

1 5 10 15

Tyr

<210> 316

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 316

Ser Leu Arg Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala

20 25 30

Thr Tyr Phe Cys

35

<210> 317

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 317

Asn Arg Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly

20 25 30

Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 318

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 318

Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys

35

<210> 319

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 319

Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly

1 5 10 15

Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu Asp Gly Ala

20 25 30

Asp Tyr Tyr Cys

35

<210> 320

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 320

Arg Leu Thr Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly

1 5 10 15

Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Arg Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala

20 25 30

Asp Tyr Tyr Cys

35

<210> 321

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 321

Asp Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser Lys Ser Ala

1 5 10 15

Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala

20 25 30

Asp Tyr Tyr Cys

35

<210> 322

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 322

Asp Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys

35

<210> 323

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 323

His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Val Gly

20 25 30

Leu Tyr Tyr Cys

35

<210> 324

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 324

Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala

20 25 30

Thr Tyr Phe Cys

35

<210> 325

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 325

Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly

1 5 10 15

Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala

20 25 30

Asp Tyr Tyr Cys

35

<210> 326

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 326

Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Glu Phe Asn Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly

20 25 30

Ile Tyr Tyr Cys

35

<210> 327

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 327

Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly

1 5 10 15

Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala

20 25 30

Asp Tyr Tyr Cys

35

<210> 328

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 328

Arg Arg Pro Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly
 1 5 10 15
 Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Arg Asp Glu Ser
 20 25 30
 Thr Tyr Tyr Cys
 35

<210> 329

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 329

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

<210> 330

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 330

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

<210> 331

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 331

His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly

20 25 30

Leu Tyr Tyr Cys

35

<210> 332

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 332

Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly

1 5 10 15

Ile Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala

20 25 30

Asp Tyr Tyr Cys

35

<210> 333

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 333

His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly

20 25 30

Ile Tyr Tyr Cys

35

<210> 334

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 334

Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly

1 5 10 15

Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala

20 25 30

Asp Tyr Tyr Cys

35

<210> 335

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 335

Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly

20 25 30

Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 336

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 336

Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly

20 25 30

Leu Tyr Tyr Cys

35

<210> 337

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 337

Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly

1 5 10 15

Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala

20 25 30

Asp Tyr Tyr Cys

35

<210> 338

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 338

Asn Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 339

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 339

His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Glu Phe Asn Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly

20 25 30

Ile Tyr Tyr Cys

35

<210> 340

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 340

Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1

5

10

15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly

20

25

30

Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 341

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 341

His Arg Ala Leu Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1

5

10

15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ser Gly

20

25

30

Ile Tyr Tyr Cys

35

<210> 342

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 342

His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1

5

10

15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ser Gly

20

25

30

Ile Tyr Tyr Cys

35

<210> 343

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 343

His Arg Ala Leu Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly

20 25 30

Leu Tyr Tyr Cys

35

<210> 344

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 344

His Arg Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Glu Phe Asn Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly

20 25 30

Ile Tyr Tyr Cys

35

<210> 345

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 345

His Arg Ala Leu Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Val Gly

20 25 30

Leu Tyr Tyr Cys

35

<210> 346

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 346

His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1

5

10

15

Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly

20

25

30

Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 347

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 347

His Arg Ala Leu Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1

5

10

15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Asp Asn Val Gly

20

25

30

Leu Tyr Tyr Cys

35

<210> 348

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 348

His Arg Ala Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1

5

10

15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ser Gly

20

25

30

Ile Tyr Tyr Cys

35

<210> 349

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 349

His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly

20 25 30

Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 350

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 350

His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Val Gly

20 25 30

Ile Tyr Tyr Cys

35

<210> 351

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 351

His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly

20 25 30

Ile Tyr Tyr Cys

35

<210> 352

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 352

His Arg Ala Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly

20 25 30

Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 353

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 353

Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Val Gly

20 25 30

Ile Tyr Tyr Cys

35

<210> 354

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 354

His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly

20 25 30

Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 355

<211> 36

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 355

His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser His

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Val Gly

20 25 30

Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 356

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 356

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

1 5 10

<210> 357

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 357

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

1 5 10

<210> 358

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 358

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

1 5 10

<210> 359

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 359

Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

1 5 10

<210> 360

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 360

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 361

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 361

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys

1 5 10

<210> 362

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 362

Val Arg Arg Arg Asp Gln Ala Asp Arg Pro

1 5 10

<210> 363

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 363

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 364

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 364

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 365

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 365

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

1 5 10

<210> 366

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 366

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 367

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 367

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 368

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 368

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Asp Ile Ser Arg Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Arg Ser Gly Val Ser 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 Phe Cys Gln Gln Gly Lys Ser Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 369

<211> 106

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 369

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Leu

20 25 30

Asn Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile His

35 40 45

Lys Ile Ser Asn Arg Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Thr Gln Phe Pro Tyr Thr

	85	90	95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys			
	100	105	
<210>	370		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Trình tự nhân tạo		
<400>	370		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Ser Asn Trp			
	20	25	30
Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asp Ser Phe Pro Leu			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys			
	100	105	
<210>	371		
<211>	109		
<212>	PRT		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Trình tự nhân tạo		
<400>	371		
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Met Ser Pro Gly Gln			
1	5	10	15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Ser Lys Gln Tyr Ala			
	20	25	30
Ser Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Met Tyr			
	35	40	45
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser			
	50	55	60

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

<210> 372

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 372

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

<210> 373

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 373

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

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

<210> 374

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 374

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

<210> 375

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 375

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

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

<210> 376

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 376

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Thr Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala 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 Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Ser Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
 100 105

<210> 377

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 377

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

<210> 378

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 378

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

<210> 379

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 379

```

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

```

<210> 380

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 380

```

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

```

Asp Glu Ser Thr Tyr Tyr Cys Met Thr Trp Asp Val Asp Thr Thr Ser
 85 90 95

Met Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 381

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 381

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30

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

Met Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Thr Ser Ser
 85 90 95

Ser Thr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 382

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 382

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Arg Ser Asn Phe Gly Ala Gly
 20 25 30

His Asp Val His Trp Cys Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95
 Leu Ser Ala Trp Gly Val Arg Arg Arg Asp Gln Ala Asp Arg Pro
 100 105 110
 <210> 383
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 383
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 His Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 Arg Ile Asp Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 384
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 384
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Thr Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn

20 25 30
 Thr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Val Leu
 35 40 45
 Met Tyr Arg Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Arg Ser Gly Ile Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Thr Leu
 85 90 95
 Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 <210> 385
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo
 <400> 385
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asp Ser
 20 25 30
 Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln
 85 90 95
 Arg Met Gly Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 386
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nhân tạo

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

<400> 387

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

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 388

```

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

```

<210> 389

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 389

```

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

```

<210> 390

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 390

```

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

```

<210> 391

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 391

```

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

```

	85	90	95
Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile			
100	105	110	

Lys

<210> 392

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 392

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asp Ser
20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

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

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

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95

Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 393

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 393

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

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

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

Lys

<210> 394

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 394

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

Lys

<210> 395

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 395

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

```

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

```

Lys

<210> 396

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 396

```

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

```

Lys

<210> 397

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 397

```

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

```

Lys

<210> 398

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 398

```

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

```

100 105 110

Lys

<210> 399

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 399

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys

65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Gln

85 90 95

Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile

100 105 110

Lys

<210> 400

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 400

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Arg

20 25 30

Asp Gly Gly His Thr Tyr Val Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Leu Gly Val

50 55 60

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

Lys

<210> 401

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 401

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

Lys

<210> 402

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 402

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

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

Lys

<210> 403

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 403

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

Lys

<210> 404

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 404

```

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

```

Lys

<210> 405

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 405

```

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

```

Lys

<210> 406

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 406

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys

65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln

85 90 95

Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile

100 105 110

Lys

<210> 407

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 407

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys

65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95

Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 408

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 408

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

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

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

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

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95

Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110

Lys

<210> 409

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 409

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asp Ser
 20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

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

Lys

<210> 410

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 410

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

Lys

<210> 411

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 411

```

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

```

Lys

<210> 412

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 412

```

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

```

Lys

<210> 413

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 413

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys

65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln

85 90 95

Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys

<210> 414

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 414

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys

65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln

85 90 95

Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile
 100 105 110

Lys

<210> 415

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 415

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

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

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

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95

Arg Arg Asp Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 416

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 416

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

Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

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

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val

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

Lys

<210> 417

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 417

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

Lys

<210> 418

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 418

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

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

Lys

<210> 419

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 419

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

Lys

<210> 420

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nhân tạo

<400> 420

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