



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

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

(11)



1-0044677

(51)⁷ C12N 15/13; C12P 21/08; A61P 31/04; (13) B
A61P 31/10; A61P 33/02; A61P 35/00;
A61P 35/02; C07K 16/18; C07K 16/46;
C12N 1/15; C12N 1/19; C12N 1/21;
C12N 15/63; C12N 5/10; A61K 39/395;
A61P 31/00

(21) 1-2019-01345

(22) 10/08/2017

(86) PCT/JP2017/029055 10/08/2017

(87) WO2018/034225 22/02/2018

(30) 2016-159088 15/08/2016 JP; 2016-159089 15/08/2016 JP; 2017-061454 27/03/2017 JP; 2017-110723 05/06/2017 JP

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/07/2019 376A

(71) 1. NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY (JP)
Kita 8-jyo Nishi 5-chome, Kita-ku, Sapporoshi, Hokkaido 0600808, Japan

2. FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD. (JP)

7-10, Dosho-machi 1-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 5410045, Japan

(72) KONNAI, Satoru (JP); OHASHI, Kazuhiko (JP); MURATA, Shiro (JP);
OKAGAWA, Tomohiro (JP); NISHIMORI, Asami (JP); MAEKAWA, Naoya (JP);
SUZUKI, Yasuhiko (JP); NAKAJIMA, Chie (JP).

(74) Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG PHỐI TỬ GÂY CHẾT TẾ BÀO THEO CHƯƠNG TRÌNH
1 (PD-L1), DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO
RA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2019-01345

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD-L1 có khả năng sử dụng lắp đi lắp lại ngay cả cho động vật khác ngoài chuột cống. Kháng thể kháng PD-L1 chứa (a) chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1 có trình tự axit amin QSLLYSENQKDY (SEQ ID NO.: 37), CDR2 có trình tự axit amin WAT và CDR3 có trình tự axit amin GQYLVYPFT (SEQ ID NO.: 38) và vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống; và (b) chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR1 có trình tự axit amin GYTFTSNF (SEQ ID NO.: 39), CDR2 có trình tự axit amin IYPEYGNT (SEQ ID NO.: 40) và CDR3 có trình tự axit amin ASEEAVISLVY (SEQ ID NO.: 41) và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống. Dược phẩm chứa kháng thể kháng PD-L1 trên làm thành phần hoạt tính. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra kháng thể kháng PD-L1 nêu trên.

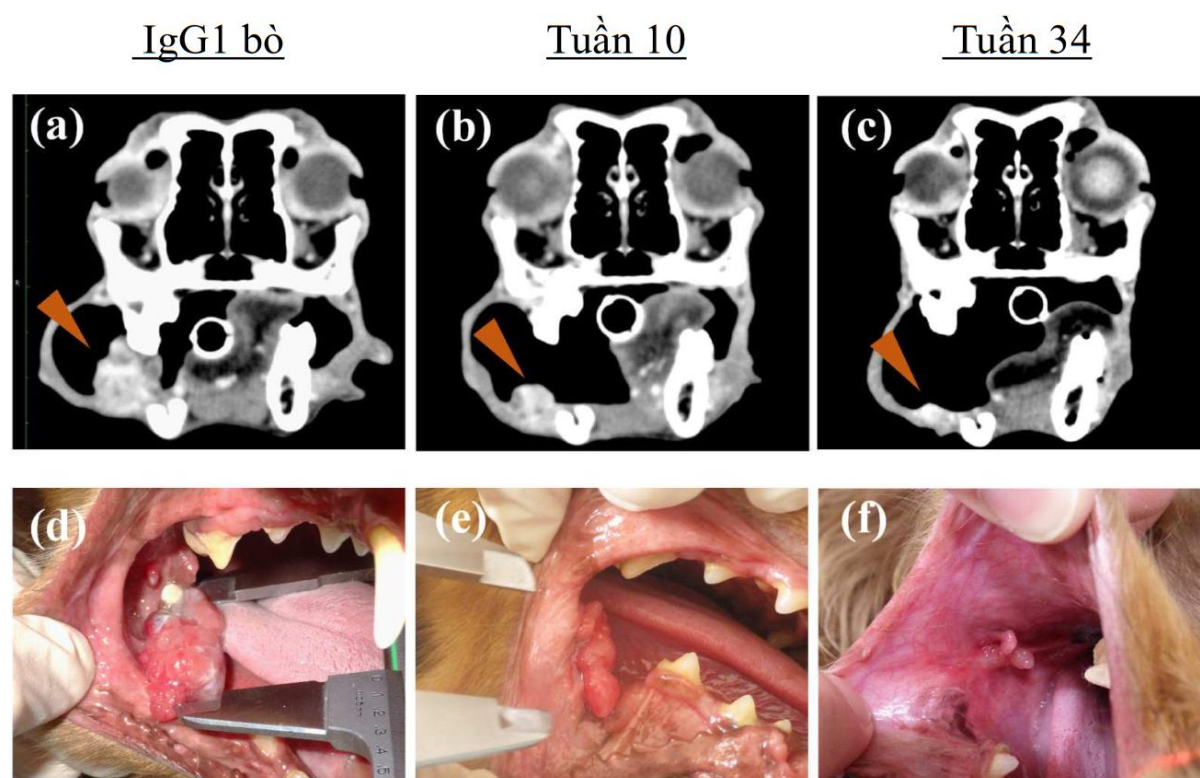


FIG.10

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD-L1. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng PD-L1 chứa vùng biến đổi bao gồm các vùng quyết định bổ sung (CDR) trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và vùng hằng định trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Protein gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-1), thụ thể ức chế miễn dịch, và phối tử của nó, phối tử gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-L1), là các phân tử đã được xác định bởi Giáo sư Tasuku Honjo và cộng sự, trường Kyoto University, là các tác nhân ức chế đáp ứng miễn dịch quá mức và liên quan sâu tới khả năng dung nạp miễn dịch (Tài liệu phi sáng chế số 1: Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T The EMBO Journal. Tháng 11 năm 1992; 11(11):3887-3895). Gần đây, các phân tử này đã được chứng minh là cũng liên quan tới sự ức chế miễn dịch ở các khối u. Trong lĩnh vực chăm sóc y tế con người, thuốc kháng thể ức chế tác dụng của PD-1 đã được phát triển và đưa vào sử dụng trong thực tế (Opdivo™, Ono Pharmaceutical Co., Ltd.)

Cho tới thời điểm hiện tại, các tác giả sáng chế đã và đang phát triển liệu pháp miễn dịch đối với bệnh khó chữa ở động vật gắn đích PD-1 hoặc PD-L1, và cho thấy liệu pháp miễn dịch mới này có thể áp dụng cho nhiều bệnh và nhiều động vật. (Tài liệu phi sáng chế số 2: Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology. Tháng 08 năm 2014; 142(4):551-61; Tài liệu phi sáng chế số 3: Maekawa N, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Adachi M, Takagi S, Kagawa Y, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. PLoS One. Ngày 10 tháng 06 năm 2014; 9(6):e98415; Tài liệu phi sáng chế số 4: Mingala CN, Konnai S, Ikebuchi R, Ohashi K. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. Tháng 01 năm 2011; 34(1):55-63.)

Tuy nhiên, các kháng thể mà các tác giả sáng chế đã tạo ra cho tới thời điểm hiện tại là kháng thể của chuột cống, và do đó không thể cho các động vật khác ngoài chuột cống sử dụng các kháng thể đó lặp đi lặp lại.

Tài liệu viện dẫn

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế số 1: Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T The EMBO Journal. Tháng 11 năm 1992; 11(11):3887-3895.

Tài liệu phi sáng chế số 2: Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology. Tháng 08 năm 2014; 142(4):551-61.

Tài liệu phi sáng chế số 3: Maekawa N, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Adachi M, Takagi S, Kagawa Y, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. PLoS One. Ngày 10 tháng 06 năm 2014; 9(6):e98415.

Tài liệu phi sáng chế số 4: Mingala CN, Konnai S, Ikebuchi R, Ohashi K. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. Tháng 01 năm 2011; 34(1):55-63.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần giải quyết

Mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể kháng PD-L1 có khả năng sử dụng lặp đi lặp lại ngay cả cho động vật khác ngoài chuột cống.

Giải pháp kỹ thuật

Các tác giả sáng chế đã xác định các vùng biến đổi trên kháng thể đơn dòng chuột cống kháng PD-L1 bò (4G12) có khả năng ức chế liên kết giữa PD-1 chó và PD-L1, và sau đó kết hợp gen mã hoá các vùng biến đổi thu được với gen mã hoá các vùng hằng định trên globulin miễn dịch chó (IgG-D tương đương với IgG4 người) để từ đó thu được gen kháng thể dạng khảm, được đưa vào tế bào buồng trứng ở chuột đồng Trung Quốc (tế bào CHO). Bằng cách nuôi cấy/tăng sinh tế bào CHO thu được, các tác giả sáng chế đã thành công trong việc tạo ra kháng thể dạng khảm chuột cống-chó kháng PD-L1. Các tác giả sáng chế còn xác định các CDR thuộc vùng biến đổi trên kháng thể đơn dòng chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò.

Hơn nữa, các tác giả sáng chế đã xác định các vùng biến đổi trên kháng thể đơn dòng chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò có khả năng ức chế liên kết giữa PD-1 bò và PD-L1, và sau đó kết hợp gen mã hoá các vùng biến đổi thu được với gen mã hoá các vùng hằng định trên globulin miễn dịch bò (IgG1 bò, với các đột biến đã được đưa vào vị trí liên kết giả định của thụ thể Fcγ trên miền CH2 để ức chế hoạt tính ADCC; xem Fig.19 về số axit amin và các đột biến: 250 E→P, 251 L→V, 252 P→A, 253 G→đột biến mất đoạn, 347 A→S, 348 P→S; Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K,

Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology Tháng 08 năm 2014; 142(4):551-561) để từ đó thu được gen kháng thể dạng khảm. Gen này được đưa vào tế bào buồng trứng ở chuột đồng Trung Quốc (tế bào CHO). Bằng cách nuôi cấy/tăng sinh các tế bào thu được, các tác giả sáng chế đã thành công trong việc tạo ra kháng thể dạng khảm chuột công-bò kháng PD-L1. Sáng chế đã đạt được dựa trên các phát hiện này.

Bản chất của sáng chế là như được mô tả dưới đây.

- (1) Kháng thể kháng PD-L1 chứa (a) chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1 có trình tự axit amin QSLLYSENQKDY (SEQ ID NO.: 37), CDR2 có trình tự axit amin WAT và CDR3 có trình tự axit amin GQYLVYPFT (SEQ ID NO.: 38) và vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống; và (b) chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR1 có trình tự axit amin GYTFTSNF (SEQ ID NO.: 39), CDR2 có trình tự axit amin IYPEYGNT (SEQ ID NO.: 40) và CDR3 có trình tự axit amin ASEEAVISLVY (SEQ ID NO.: 41) và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống.
- (2) Kháng thể theo mục (1) nêu trên, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng thu được từ chuột cống.
- (3) Kháng thể theo mục (2) nêu trên, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ là vùng biến đổi chuỗi nhẹ trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và vùng biến đổi chuỗi nặng là vùng biến đổi chuỗi nặng trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò.
- (4) Kháng thể theo mục (3) nêu trên, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO.: 1 và vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO.: 2.
- (5) Kháng thể theo mục bất kỳ trong các mục từ (1) đến (4) nêu trên, trong đó vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống có trình tự axit amin của vùng hằng định trên chuỗi lamda hoặc chuỗi kapa.
- (6) Kháng thể theo mục bất kỳ trong các mục từ (1) đến (5) nêu trên, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống có trình tự axit amin của vùng hằng định trên globulin miễn dịch tương đương với IgG4 người.

- (7) Kháng thể theo mục bất kỳ trong các mục từ (1) đến (5) nêu trên, trong đó động vật khác ngoài chuột cống là bò và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của bò có các đột biến được đưa vào làm giảm hoạt tính ADCC và/hoặc hoạt tính CDC.
- (8) Kháng thể theo mục (6) nêu trên, trong đó động vật khác ngoài chuột cống là chó; vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của chó có trình tự axit amin của vùng hằng định trên chuỗi lamda; và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của chó có trình tự axit amin của vùng hằng định trên globulin miễn dịch tương đương với IgG4 người.
- (9) Kháng thể theo mục (7) nêu trên, trong đó vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của bò có trình tự axit amin của vùng hằng định trên chuỗi lamda và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của bò có các đột biến được đưa vào làm giảm hoạt tính ADCC và/hoặc hoạt tính CDC.
- (10) Kháng thể theo mục (8) nêu trên, trong đó vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của chó có trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO.: 3 và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của chó có trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO.: 4.
- (11) Kháng thể theo mục (9) nêu trên, trong đó vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của bò có trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO.: 100 và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của bò có trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO.: 102.
- (12) Kháng thể theo mục bất kỳ trong các mục từ (1) đến (11) nêu trên có cấu trúc bốn chuỗi gồm hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng.
- (13) Dược phẩm chứa kháng thể theo mục bất kỳ trong các mục từ (1) đến (12) nêu trên làm thành phần hoạt tính.
- (14) Dược phẩm (13) nêu trên để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ung thư và/hoặc bệnh lây nhiễm.
- (15) Dược phẩm (14) nêu trên, trong đó bệnh ung thư và/hoặc bệnh lây nhiễm này được chọn từ nhóm gồm các bệnh tạo u, bệnh bạch cầu, bệnh Johne, bệnh nhiễm Anaplasma, viêm vú do vi khuẩn, viêm vú do nấm, bệnh nhiễm trùng do mycoplasma (như viêm vú do mycoplasma, viêm phổi do mycoplasma hoặc

tương tự), bệnh lao, bệnh nhiễm trùng do *Theileria orientalis*, bệnh do cryptosporidia, bệnh coccidia, bệnh do Trypanosoma và bệnh do Leishmania.

- (16) ADN di truyền nhân tạo bao gồm (a') ADN mã hoá chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1 có trình tự axit amin QSLLYSENQKDY (SEQ ID NO.: 37), CDR2 có trình tự axit amin WAT và CDR3 có trình tự axit amin GQYLVYPFT (SEQ ID NO.: 38) và vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống và (b') ADN mã hoá chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR1 có trình tự axit amin GYTFTSNF (SEQ ID NO.: 39), CDR2 có trình tự axit amin IYPEYGNT (SEQ ID NO.: 40) và CDR3 có trình tự axit amin ASEEAVISLVY (SEQ ID NO.: 41) và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống.
- (17) Vector chứa ADN di truyền nhân tạo theo mục (16) nêu trên.
- (18) Tế bào chủ được biến nạp bằng vector theo mục (17) nêu trên.
- (19) Phương pháp tạo ra kháng thể, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo mục (18) nêu trên và thu kháng thể kháng PD-L1 từ môi trường nuôi cấy thu được.
- (20) ADN mã hoá chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1 có trình tự axit amin QSLLYSENQKDY (SEQ ID NO.: 37), CDR2 có trình tự axit amin WAT và CDR3 có trình tự axit amin GQYLVYPFT (SEQ ID NO.: 38) và vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống.
- (21) ADN mã hoá chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR1 có trình tự axit amin GYTFTSNF (SEQ ID NO.: 39), CDR2 có trình tự axit amin IYPEYGNT (SEQ ID NO.: 40) và CDR3 có trình tự axit amin ASEEAVISLVY (SEQ ID NO.: 41) và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống.

Bản mô tả bao gồm các nội dung được bộc lộ trong phần mô tả và/hoặc các hình vẽ của các đơn sáng chế Nhật Bản số 2016-159088, số 2016-159089, số 2017-110723 và số 2017-61454 mà đơn sáng chế này yêu cầu được hưởng quyền ưu tiên.

Hiệu quả có thể đạt được của sáng chế

Theo sáng chế, đã thu được kháng thể kháng PD-L1 mới. Kháng thể này có thể sử dụng được ngay cả cho các động vật khác ngoài chuột cống.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Tác dụng ức chế liên kết giữa PD-L1 chó tái tổ hợp và PD-1 chó tái tổ hợp. Sự liên kết giữa PD-L1-Ig chó và PD-1-Ig chó được phát hiện trên đĩa ELISA. Mật độ quang (O.D.) khi không bổ sung kháng thể được lấy làm 100% O.D. theo từng nồng độ kháng thể được thể hiện dưới dạng giá trị tương đối. Trong số các kháng thể đơn dòng chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò (IgG2a (κ) chuột cống), 5A2 (IgG1 (κ) chuột cống) và 6G7 (IgM (κ) chuột cống) thể hiện phản ứng chéo với PD-L1 chó, các dòng vô tính 4G12 và 6G7 biểu hiện khả năng ức chế liên kết cao.

Fig.2: Giảm đồ biểu diễn vectơ pDC6 và kháng thể dạng khảm chuột cống-chó kháng PD-L1.

Fig.3: Sự biểu hiện và tinh chế các kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 và c6G7 kháng PD-L1. SDS-PAGE được thực hiện trong các điều kiện không khử, sau đó là quan sát vạch nhờ phương pháp nhuộm CBB. a: tinh chế với chỉ riêng protein A. b: a + sắc ký lọc gel.

Fig.4: Hoạt tính ức chế liên kết PD-1/PD-L1 của các kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 và c6G7 kháng PD-L1.

Fig.5: Chứng minh các dòng tế bào vô tính có khả năng biểu hiện kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1 ở mức cao.

Fig.6: Các ảnh SDS-PAGE của kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1. Kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò và kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1 được điện di trong các điều kiện khử và các điều kiện không khử, sau đó là quan sát vạch nhờ phương pháp nhuộm CBB. Trong các điều kiện khử, vạch thể hiện chuỗi nặng trên kháng thể được phát hiện vào khoảng 50 kDa và vạch thể hiện chuỗi nhẹ trên kháng thể vào khoảng 25 kDa. Không phát hiện được vạch nào ngoài các vạch cần quan tâm.

Fig.7: Các hoạt tính ức chế của kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò và kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1 đối với liên kết PD-1/PD-L1 chó và liên kết CD80/PD-L1. Kháng thể đơn dòng chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò và kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1 làm giảm số lượng liên kết giữa PD-L1-Ig và CD80-Ig và PD-1-Ig chó. Không quan sát được thay đổi nào về hoạt tính ức chế liên kết do việc khảm kháng thể này.

Fig.8: Tác dụng hoạt hoá tế bào miễn dịch chó do kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1. PBMC chó được nuôi cấy trong điều kiện kích thích

trong 3 ngày, sau đó là bước xác định các nồng độ IL-2 và IFN- γ trong dịch nổi bằng ELISA. Hơn nữa, hợp chất tương tự về cấu trúc với axit nucleic EdU được bổ sung vào môi trường nuôi cấy vào ngày 2 của quá trình nuôi cấy trong điều kiện kích thích, sau đó là bước xác định sự hấp thu EdU bằng phân tích tế bào theo dòng chảy. Kháng thể dạng khảm chuột công-chó c4G12 kháng PD-L1 gia tăng việc tạo ra IL-2 và IFN- γ từ PBMC chó và tăng cường sự tăng sinh của các tế bào lympho CD4⁺ và CD8⁺.

Fig.9: Biểu hiện của PD-L1 ở bệnh ung thư hắc tố miệng (A) và sacôm không biệt hoá (B)

Fig.10: Các hình ảnh CT và vẽ bề ngoài của khối u trong thử nghiệm điều trị bằng cách cho chó mắc bệnh ung thư hắc tố miệng sử dụng kháng thể dạng khảm chuột công-chó c4G12 kháng PD-L1. (a,d) Trước khi bắt đầu quá trình điều trị, (b,e) vào tuần 10 của quá trình điều trị, và (c,f) vào tuần 34 của quá trình điều trị. Nhận thấy tác dụng kháng u nổi bật sau năm lần sử dụng kháng thể này (vào tuần 10 tính từ khi bắt đầu quá trình điều trị). Vào tuần 34, khối u đã được xác nhận còn giảm tiếp.

Fig.11: Các thay đổi phụ thuộc vào thời gian về đường kính dài nhất của khối u ở chó mắc bệnh ung thư hắc tố miệng được thể hiện trên Fig.10. Sự giảm 30% hoặc nhiều hơn so với đường kính dài nhất đường cơ sở được coi là đáp ứng một phần (PR).

Fig.12: Các hình ảnh CT trong thử nghiệm điều trị bằng cách cho chó mắc sacôm không biệt hoá sử dụng kháng thể dạng khảm chuột công-chó c4G12 kháng PD-L1. (a,c) Trước khi bắt đầu quá trình điều trị, (b,d) vào tuần 3 của quá trình điều trị. Có thể nhận thấy khối u bị giảm kích cỡ đáng kể sau hai lần sử dụng kháng thể này.

Fig.13: Các hình ảnh CT trong thử nghiệm điều trị bằng cách cho chó mắc bệnh ung thư hắc tố miệng sử dụng kháng thể dạng khảm chuột công-chó c4G12 kháng PD-L1 (các trường hợp di căn phổi). (a,d,g) Trước khi bắt đầu quá trình điều trị, (b,e,h) vào tuần 6 của quá trình điều trị, và (c,f,i) vào tuần 18 của quá trình điều trị. Nhiều tổn thương di căn phổi biến mất sau chín lần sử dụng kháng thể này.

Fig.14: Các thay đổi phụ thuộc vào thời gian về tỷ lệ sống sót của chó mắc bệnh ung thư hắc tố miệng sau khi xuất hiện tình trạng di căn phổi. Trong nhóm sử dụng kháng thể, thời gian sống sót có thể được kéo dài so với nhóm đối chứng.

Fig.15: Các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng trên kháng thể của chuột công 4G12 kháng PD-L1 đã được minh hoạ.

Fig.16: Khả năng phản ứng chéo của kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò. Kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò được xác nhận là có liên kết với PD-L1 cừu và PD-L1 lợn.

Fig.17: Khả năng phản ứng của kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò với tế bào bạch cầu ở trâu. Kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò liên kết mạnh với đại thực bào máu (tế bào $CD14^+ CD11b^+$) của trâu, trong khi đó kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò liên kết yếu với các tế bào lympho (tế bào $CD14^- CD11b^-$) của trâu. Sự khác biệt về liên kết này được tin là phản ánh mức biểu hiện của PD-L1 ở đại thực bào và các tế bào lympho.

Fig.18: Thử nghiệm ức chế trên kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò đối với liên kết PD-1/PD-L1 lợn hoặc cừu. Kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò được chứng minh là có khả năng ức chế liên kết PD-1/PD-L1 lợn và cừu theo kiểu phụ thuộc nồng độ.

Fig.19: Trình tự axit amin của kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò. Các vùng CDR1, CDR2 và CDR3 thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng trên kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò được thể hiện. Hơn nữa, các axit amin được đưa vào IgG1 bò (miền CH2) dưới dạng đột biến cũng được thể hiện (số axit amin và các đột biến: 250 E→P, 251 L→V, 252 P→A, 253 G →đột biến mất đoạn, 347 A→S, 348 P→S).

Fig.20: Giản đồ biểu diễn vector pDC6 và kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò.

Fig.21: Xác nhận độ tinh khiết của kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò đã tinh chế.

Fig.22: Tính đặc hiệu liên kết của kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò.

Fig.23: Hoạt tính ức chế của kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò đối với liên kết PD-1/PD-L1 bò (kết quả thử nghiệm về tác dụng ức chế liên kết giữa tế bào biểu hiện PD-L1 bò và PD-1 bò hòa tan).

Fig.24 Hoạt tính ức chế của kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò đối với liên kết PD-1/PD-L1 bò (kết quả thử nghiệm về tác dụng ức chế liên kết giữa tế bào biểu hiện PD-1 bò và PD-L1 bò hòa tan).

Fig.25: Tác dụng hoạt hoá của kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò đối với đáp ứng tế bào lympho ở bò (về sự tăng sinh tế bào).

Fig.26: Tác dụng hoạt hoá của kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò đối với đáp ứng tế bào lympho ở bò với kháng nguyên BLV (về sự sản sinh IFN- γ).

Fig.27: Đáp ứng tăng sinh của tế bào T đối với kháng nguyên BLV ở bê được gây nhiễm BLV bằng thí nghiệm qua việc sử dụng kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò.

Fig.28: Các thay đổi về các lượng tải tiền virus BLV ở bê được gây nhiễm BLV bằng thí nghiệm qua việc sử dụng kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây.

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng PD-L1 chứa (a) chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1 có trình tự axit amin QSLLYSENQKDY (SEQ ID NO.: 37), CDR2 có trình tự axit amin WAT và CDR3 có trình tự axit amin GQYLVYPFT (SEQ ID NO.: 38) và vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống; và (b) chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR1 có trình tự axit amin GYTFTSNF (SEQ ID NO.: 39), CDR2 có trình tự axit amin IYPEYGNT (SEQ ID NO.: 40) và CDR3 có trình tự axit amin ASEEAVISLVY (SEQ ID NO.: 41) và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống.

CDR1, CDR2 và CDR3 thuộc vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) trên kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò lần lượt là vùng gồm trình tự axit amin QSLLYSENQKDY (SEQ ID NO.: 37), vùng gồm trình tự axit amin WAT và vùng gồm trình tự axit amin GQYLVYPFT (SEQ ID NO.: 38) (xem Fig.15).

Hơn nữa, CDR1, CDR2 và CDR3 thuộc vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) trên kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò lần lượt là vùng gồm trình tự axit amin GYTFTSNF (SEQ ID NO.: 39), vùng gồm trình tự axit amin IYPEYGNT (SEQ ID NO.: 40) và vùng gồm trình tự axit amin ASEEAVISLVY (SEQ ID NO.: 41) (xem Fig.15).

Trên các trình tự axit amin QSLLYSENQKDY (SEQ ID NO.: 37), WAT và GQYLVYPFT (SEQ ID NO.: 38), cũng như các trình tự axit amin GYTFTSNF (SEQ

ID NO.: 39), IYPEYGNT (SEQ ID NO.: 40) và ASEEAVISLVY (SEQ ID NO.: 41), có thể làm mất, thay thế hoặc bổ sung một, hai, ba, bốn hoặc năm axit amin.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể” là định nghĩa không chỉ bao gồm các kháng thể có độ dài đầy đủ mà còn cả các kháng thể có kích thước phân tử nhỏ hơn như Fab, F(ab)₂, ScFv, kháng thể dime, V_H, V_L, Sc(Fv)₂, sc(Fv)₂ có tính đặc hiệu kép, kháng thể nhỏ, monome scFv-Fc và dime scFv-Fc.

Trên kháng thể kháng PD-L1 theo sáng chế, VL và VH trên kháng thể này có thể thu được từ chuột cống. Ví dụ, VL trên kháng thể này có thể là VL trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò, và VH trên kháng thể này có thể là VH trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò.

Trình tự axit amin của VL và trình tự axit amin của VH trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò lần lượt được thể hiện ở các SEQ ID NO.: 1 và 2. Các trình tự axit amin như được thể hiện ở các SEQ ID NO.: 1 và 2 có thể có (các) đột biến mất đoạn, (các) đột biến thế hoặc (các) đột biến bổ sung một hoặc một vài (ví dụ, lên đến năm, tối đa là khoảng 10) axit amin. Ngay cả khi các đột biến này đã được đưa vào, các trình tự axit amin thu được có thể có chức năng như VL hoặc VH trên kháng thể PD-L1.

VL và VH trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống có thể thu được từ động vật sản sinh ra PD-L1 mà phản ứng chéo với kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò.

Có hai loại chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, được gọi là chuỗi Kapa (κ) và chuỗi Lamda (λ). Trên kháng thể kháng PD-L1 theo sáng chế, vùng hằng định chuỗi nhẹ (CL) trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống có thể có trình tự axit amin của vùng hằng định trên chuỗi Kapa hoặc chuỗi Lamda. Tuy nhiên, độ phổ biến tương đối của chuỗi Lamda là cao hơn ở cừu, mèo, chó, ngựa và bò, và độ phổ biến tương đối của chuỗi Kapa là cao hơn ở chuột nhắt, chuột cống, người và lợn. Do chuỗi có độ phổ biến tương đối cao hơn được coi là ưu tiên, kháng thể của cừu, mèo, chó, ngựa hoặc bò tốt hơn nếu có trình tự axit amin của vùng hằng định trên chuỗi Lamda trong khi đó kháng thể của chuột nhắt, chuột cống, người hoặc lợn tốt hơn nếu có trình tự axit amin của vùng hằng định trên chuỗi Kapa.

Vùng hằng định chuỗi nặng (CH) trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống có thể có trình tự axit amin của vùng hằng định trên globulin miễn dịch tương đương với IgG4 người. Chuỗi nặng globulin miễn dịch được phân loại thành chuỗi γ ,

chuỗi μ , chuỗi α , chuỗi δ và chuỗi ϵ phụ thuộc vào sự khác biệt về vùng hằng định. Theo loại chuỗi nặng sẵn có, năm lớp (isotyp) của globulin miễn dịch được tạo thành; đó là IgG, IgM, IgA, IgD và IgE.

Globulin miễn dịch G (IgG) chiếm 70-75% lượng globulin miễn dịch ở người và là kháng thể dạng monome được phát hiện nhiều nhất trong huyết tương. IgG có cấu trúc bốn chuỗi gồm hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng. IgG1, IgG2 và IgG4 ở người có phân tử lượng khoảng 146.000, trong khi đó IgG3 người có vùng bản lề dài nối vùng Fab với vùng Fc và có phân tử lượng lớn hơn 170.000. IgG1 người chiếm khoảng 65%, IgG2 người chiếm khoảng 25%, IgG3 người chiếm khoảng 7%, và IgG4 người chiếm khoảng 3% lượng IgG người. Các kháng thể này được phân phối một cách đồng đều bên trong và bên ngoài của các mạch máu. Có ái lực mạnh với các thụ thể Fc và các yếu tố bổ thể trên bề mặt tế bào hiệu ứng, IgG1 người gây ra tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC) và còn hoạt hoá các bổ thể để gây ra tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể (CDC). IgG2 và IgG4 người có hoạt tính ADCC và CDC thấp do ái lực của chúng với các thụ thể Fc và các yếu tố bổ thể là nhỏ.

Globulin miễn dịch M (IgM), chiếm khoảng 10% lượng globulin miễn dịch ở người, là kháng thể dạng pentamer gồm năm cấu trúc bốn chuỗi cơ bản nối với nhau. Nó có phân tử lượng là 970.000. Thường chỉ xảy ra trong máu, IgM được tạo ra chống lại vi sinh vật truyền nhiễm và chịu trách nhiệm về miễn dịch trong giai đoạn sớm.

Globulin miễn dịch A (IgA) chiếm 10-15% lượng globulin miễn dịch ở người. Nó có phân tử lượng là 160.000. IgA được tiết ra là kháng thể dạng đime gồm hai phân tử IgA nối với nhau. IgA1 được tìm thấy trong huyết thanh, nước mũi, nước bọt và sữa mẹ. Trong dịch ruột, IgA2 được tìm thấy rất nhiều.

Globulin miễn dịch D (IgD) là kháng thể dạng monome chiếm không quá 1% lượng globulin miễn dịch ở người. IgD được tìm thấy trên bề mặt tế bào B và tham gia vào quá trình sản sinh kháng thể.

Globulin miễn dịch E (IgE) là kháng thể dạng monome có mặt với lượng rất nhỏ, chỉ chiếm 0,001% lượng globulin miễn dịch ở người hoặc ít hơn. Globulin miễn dịch E được coi là liên quan đến đáp ứng miễn dịch với ký sinh trùng nhưng tại các nước phát triển hiếm gặp ký sinh trùng, IgE lại chủ yếu liên quan đến bệnh hen phế quản và dị ứng hơn so với các bệnh khác.

Đối với chó, các trình tự của IgG-A (tương đương với IgG2 người), IgG-B (tương đương với IgG1 người), IgG-C (tương đương với IgG3 người) và IgG-D (tương đương với IgG4 người) đã được xác định là chuỗi nặng trên IgG. Trên kháng thể theo sáng chế, ưu tiên vùng hằng định chuỗi nặng trên IgG không có hoạt tính ADCC hay hoạt tính CDC (IgG4 ở người). Trong trường hợp mà chưa nhận biết được vùng hằng định trên globulin miễn dịch tương đương với IgG4 người, có thể sử dụng vùng hằng định đã mất cả hoạt tính ADCC và hoạt tính CDC do đã đưa các đột biến vào vùng liên quan của globulin miễn dịch tương đương với IgG4 người.

Đối với bò, các trình tự của IgG1, IgG2 và IgG3 đã được nhận biết là chuỗi nặng trên IgG. Trên kháng thể theo sáng chế, ưu tiên vùng hằng định chuỗi nặng trên IgG không có hoạt tính ADCC hay hoạt tính CDC (IgG4 ở người). Mặc dù vùng hằng định trên IgG1 người kiểu đại có hoạt tính ADCC và hoạt tính CDC, được biết là có thể giảm các hoạt tính này bằng cách đưa các đột biến thế hoặc đột biến mất đoạn axit amin vào các vị trí cụ thể. Ở bò, chưa nhận biết được vùng hằng định trên globulin miễn dịch tương đương với IgG4 người, nên đột biến có thể được thêm vào ở vùng liên quan của globulin miễn dịch tương đương với IgG1 người và vùng hằng định thu được sau đó được sử dụng. Theo một ví dụ, trình tự axit amin CH của kháng thể của bò (chuỗi IgG1, Ngân hàng gen: X62916) có đột biến được đưa vào miền CH2 và trình tự nucleotit cho trình tự axit amin này (sau bước tối ưu hoá codon) được thể hiện lần lượt ở các SEQ ID NO.: 102 và 102.

Khi động vật khác ngoài chuột cống là chó, kháng thể kháng PD-L1 được ưu tiên hơn trong đó (i) CL trên kháng thể của chó có trình tự axit amin của vùng hằng định trên chuỗi Lambda và (ii) CH của kháng thể của chó có trình tự axit amin của vùng hằng định trên globulin miễn dịch tương đương với IgG4 người.

Khi động vật khác ngoài chuột cống là bò, kháng thể kháng PD-L1 được ưu tiên hơn trong đó (i) CL trên kháng thể của bò có trình tự axit amin của vùng hằng định trên chuỗi Lambda và (ii) CH của kháng thể của bò có các đột biến được đưa vào làm giảm hoạt tính ADCC và/hoặc hoạt tính CDC.

Kháng thể kháng PD-L1 theo sáng chế bao gồm kháng thể dạng khảm chuột cống-chó, kháng thể được làm tương thích với chó, kháng thể thuộc loài chó hoàn toàn, kháng thể dạng khảm chuột cống-bò, kháng thể được làm tương thích với bò và kháng thể thuộc loài bò hoàn toàn. Tuy nhiên, động vật không bị giới hạn ở chó và bò và có

thể lấy ví dụ từ người, lợn, khi, chuột nhắt, mèo, ngựa, dê, cừu, trâu, thỏ, chuột đồng, chuột lang và tương tự.

Ví dụ, kháng thể kháng PD-L1 theo sáng chế có thể là kháng thể kháng PD-L1 trong đó CL trên kháng thể của chó có trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO.: 3 và CH của kháng thể của chó có trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO.: 4.

Theo một ví dụ khác, kháng thể kháng PD-L1 theo sáng chế có thể là kháng thể kháng PD-L1 trong đó CL trên kháng thể của bò có trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO.: 100 và CH của kháng thể của bò có trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO.: 102.

Các trình tự axit amin như được thể hiện ở các SEQ ID NO.: 3 và 4 cũng như các SEQ ID NO.: 100 và 102 có thể có (các) đột biến mất đoạn, (các) đột biến thế hoặc (các) đột biến bổ sung một hoặc một vài (ví dụ, lên đến năm, tối đa là khoảng 10) axit amin. Ngay cả khi các đột biến này đã được đưa vào, các trình tự axit amin thu được có thể có chức năng như CL hoặc CH của kháng thể PD-L1.

Kháng thể kháng PD-L1 theo sáng chế có thể có cấu trúc bốn chuỗi gồm hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng.

Kháng thể kháng PD-L1 theo sáng chế có thể được tạo như được mô tả dưới đây. Ngắn gọn lại, gen nhân tạo được tổng hợp gồm (i) trình tự vùng biến đổi đã nhận biết của kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và (ii) trình tự vùng hằng định trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống (ví dụ, chó hoặc bò) (tốt hơn nếu là kháng thể IgG4 người; kháng thể tương đương với kháng thể IgG4 người; hoặc globulin miễn dịch tương đương với IgG1 người, trong đó đột biến đã được đưa vào vùng liên quan để làm giảm hoạt tính ADCC và/hoặc hoạt tính CDC). Gen thu được được gắn xen vào vector (ví dụ, plasmit), sau đó được đưa vào tế bào chủ (ví dụ, tế bào động vật có vú như tế bào CHO). Tế bào chủ này được nuôi cấy, và kháng thể cần quan tâm được thu lại từ môi trường nuôi cấy.

Trình tự axit amin và trình tự nucleotit của VL trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò đã nhận biết bởi các tác giả sáng chế được thể hiện ở các SEQ ID NO.: 1 và 5. Hơn nữa, trình tự nucleotit sau bước tối ưu hoá codon được thể hiện ở SEQ ID NO.: 15.

Trình tự axit amin và trình tự nucleotit của VH trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò đã nhận biết bởi các tác giả sáng chế được thể hiện ở các SEQ ID NO.: 2 và 6. Hơn nữa, trình tự nucleotit sau bước tối ưu hoá codon được thể hiện ở SEQ ID NO.: 16.

Trình tự axit amin và trình tự nucleotit của CL (chuỗi Lambda, Ngân hàng gen: E02824.1) trên kháng thể của chó được thể hiện ở các SEQ ID NO.: 3 và 7. Hơn nữa, trình tự nucleotit sau bước tối ưu hoá codon được thể hiện ở SEQ ID NO.: 17.

Trình tự axit amin và trình tự nucleotit của CL (chuỗi Lambda, Ngân hàng gen: X62917) trên kháng thể của bò được thể hiện ở các SEQ ID NO.: 100 và 101. Hơn nữa, trình tự nucleotit sau bước tối ưu hoá codon được thể hiện ở SEQ ID NO.: 104.

Trình tự axit amin và trình tự nucleotit của CH (chuỗi IgG-D, Ngân hàng gen: AF354267.1) trên kháng thể của chó được thể hiện ở các SEQ ID NO.: 4 và 8. Hơn nữa, trình tự nucleotit sau bước tối ưu hoá codon được thể hiện ở SEQ ID NO.: 18.

Trình tự axit amin và trình tự nucleotit (sau bước tối ưu hoá codon) của CH (chuỗi IgG1, được biến đổi từ Ngân hàng gen: X62916) trên kháng thể của bò được thể hiện ở các SEQ ID NO.: 102 và 103.

Hơn nữa, SEQ ID NO.: 9 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ dạng khảm gồm VL trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và CL (chuỗi Lambda, Ngân hàng gen: E02824.1) trên kháng thể của chó. Trình tự nucleotit (sau bước tối ưu hoá codon) của chuỗi nhẹ dạng khảm gồm VL trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và CL (chuỗi Lambda, Ngân hàng gen: E02824.1) trên kháng thể của chó được thể hiện ở SEQ ID NO.: 19.

Hơn nữa, SEQ ID NO.: 105 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ dạng khảm gồm VL trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và CL (chuỗi Lambda, Ngân hàng gen: X62917) trên kháng thể của bò. Trình tự nucleotit (sau bước tối ưu hoá codon) của chuỗi nhẹ dạng khảm gồm VL trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và CL (chuỗi Lambda, Ngân hàng gen: X62917) trên kháng thể của bò được thể hiện ở SEQ ID NO.: 107.

SEQ ID NO.: 10 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng dạng khảm gồm VH trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và CH (chuỗi IgG-D, Ngân hàng gen: AF354267.1) trên kháng thể của chó. Trình tự nucleotit (sau bước tối ưu hoá codon) của chuỗi nặng dạng khảm gồm VH trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và CH

(chuỗi IgG-D, Ngân hàng gen: AF354267.1) trên kháng thể của chó được thể hiện ở SEQ ID NO.: 20.

SEQ ID NO.: 106 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng dạng khảm gồm VH trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và CH (chuỗi IgG1, được biến đổi từ Ngân hàng gen: X62916) trên kháng thể của bò. Trình tự nucleotit (sau bước tối ưu hoá codon) của chuỗi nặng dạng khảm gồm VH trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và CH (chuỗi IgG1, được biến đổi từ Ngân hàng gen: X62916) trên kháng thể của bò được thể hiện ở SEQ ID NO.: 108.

Các trình tự axit amin và các trình tự nucleotit của CL và CH ở nhiều loại động vật ngoài các động vật nêu trên có thể thu được từ các kho dữ liệu đã biết để sử dụng theo sáng chế.

Các trình tự axit amin và các trình tự nucleotit của CL và CH ở chó, cừu, lợn, trâu, người và bò được tóm tắt trong bảng dưới đây.

Bảng

(Bảng)

Loài	Miền Ig	Trình tự nucleotit	Trình tự axit amin	Số truy cập Ngân hàng gen	Kho dữ liệu IMGT	Tài liệu viện dẫn
Chó (Tên khoa học: <i>Canis lupus familiaris</i>)	Vùng hằng định chuỗi nặng Ig chó (CH1~CH3)	GCCTCCACGACGGCCCTCGGTTTTCGCACTGGCC CCAGGTGCGGGTCCACTTCCGGGTCCACGGTGGCC CTGGGCTGCGGTGGTCCAGGCTACTTCCGCGAGCCT GTAAGTGTGTCTGGAATTCGGGTCTGACACAGC GGTGTGCACACCTTCCGCTCCGCTGAGTCTCTCA GGGCTCTACTGCTGAGGAGCAGGTTGACAGTGGCC TCCAGGAGGTGGCCAGGAGAGCTTCAACCTGCAAG GTGGTCCACCGGCGCAAGCACTAAAGTAGACAAG CCAGTGCCCAAGAGTCCACCTGCAAGTGTATATCC CCATGCCAGTCCCTGAATCACTGGGAGGGCCTTGG GTCTTCATCTTCCGCGCAACCCAGGAGATCTCTC AGGATTACCGGAACACCGGAGATCACTGTGTGGTG TTAGATCTGGGCGGTGAGGACCTGAGGTGCAGATC AGGTGGTCTGTGGATGGTAAGGAGGTGCACACAGCC AAGACGCGAGCTGCTGAGCAGGAGTTCAACAGCACCT TACGCTGTGTGAGGCTCTTCCGATTGAGCAGCAG GACTGGGTGACCGGAGGAGTTCGAAGTGCAGAGTC AACCACATAGGCTCCGCTCCGCTGAGAGGAGCT ATOTCCAAAGCCAGAGGCAAGCCATCAGCCAGT GTGTATGTCTGCAACCATCCCAAGGAGTTGTCA TCCAGTGACACGGTCAACCTGACCTGCTGATCAAA GACTTCTTCCACCTGAGATTGATGTGAGTGGCAG AGCAATGGACAGCCGAGCCGAGAGCAAGTACCAG ACGACTGCGGCCAGGTGAGCAGGAGCGGCTCTAC TTCTGTAGAGCAAGCTCTGTGGACAAGAGCGGC TGGCAGCAGGAGACACCTTCAACATGTGCGGTGATG CATGAGCTGTACAGAACCACTACACAGATGTATCC TOTCCGATTCTCGGGTAATGA (SEQ ID NO: 8)	ASTTAPSVFPLAPSGSGTSGSTVALAC LVSGYFPEVTVSWNSGLTSGVHTFP SVLQSSGLYSLSTVTPSSRWPSETF TCNVVHPASNTKVDKVPKESTCKCIS POPVPESLGGPSVFPPPKDILRITRT PEITGVVLDLGRDPEVQISWFDGKEV HTAKTOPREGQFNSTYRVSVLPIEHQ DWLTGKEFKCRVNHGLPSPIRTISKA RGAHQPSVYVLPSPKELSSDVTVL TGLKDFFPEDVEWQNGQPEPEISKY HTTAPQLDEGYSFLYSLVDKSRWQ QGDFTTCAVMHEALQNHYTDLSLSHS PQK* (SEQ ID NO: 4)	AF354267	http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=locusGenes&repertoire=genetab&species=dog&group=IGHG	Teng L. et al. Vet. Immunol. Immunopathol. 80 (3-4), 259-270 (2001). PMID: 11457479
	Vùng hằng định chuỗi nhẹ Ig chó	CAGCCCAAGGCTCCGCTCGGTGACACTCTTCCG CCCTCTCTGAGGAGCTCGGCGCAACAAGGCCAGC CTGGTGTGCTCATCAGGACTTCTACCCAGCGGC GTGACGGTGGCTGGAAGGCAAGCGGAGCCCGT CAGCCAGGGGCTGAGACCCAGCCCTCCAAAGCA GAGCAACAACAAGTACGGGCGCAGCAGCTACCTGAG CCTGACGCTGACAAAGTGAATCTGACAGCAGCTT CAGCTGCTGCTGACGCAAGGAGGAGCAGCGTGG AGAAGAAGGTGGCCCGCAGAGTGTCTTAG (SEQ ID NO: 7)	QPKASPSVTLFPPSSEELGANKATLVC LISDFYPSGVTVAWKASGSPVTGGVET TKPSKQSNKYYAASSYSLTPDKWKSH SSFSQVTHGEGSTVEKKVPAECS* (SEQ ID NO: 3)	E02824	Chưa đăng ký	Không có

Loại	Miền Ig	Trình tự nucleotit	Trình tự axit amin	Số truy cập Ngân hàng gen	Kho dữ liệu IMGT	Tài liệu viện dẫn
Cừu (Tên khoa học: <i>Ovis aries</i>)	Vùng hằng định chuỗi nặng Ig cừu (CH1~CH3)	GGCTCAACAAACACCCGGAAGGTGTACCGTGTGACTTGTGTGTCGGGGACACAGTCCAGCTCCATCGTGACCTGGGCTGCTGTGCTCCAGGTATATGCCCGAGCCGGTACCGTGAACCTCTGGTGCGCTGACGAGCGGCGTGCACACCTTCCGGGCCATCCTGCAGTCTCTCCGGGTCTACTCTCTCAGACGCGTGGTGACCGTGCCGGCCAGCACTTCCAGACCTTCTATCTGCAGAGGTAGCGCCACCGCGCCAGCAGCCACCAAGGTGGACAAGCGTGTGGAGCGGATGCCCGGACCCATGCACAACATTCGCCGATGCCACCCCTGAGCTCCCGGAGGAGCGTGTGTCTTCTTCCCAACGGAACCGAAGGACACCTTACAATCTCTGGAAACGCCGAGGTCACTGTGTGGTGGTGACGTGGCGCAGGATGACCCCGAGGTGGAGTTCTCTGCTGTGTTGGACAACGTTGGAGGTGGCGACCGCCAGCAACCGGAGGAGGAGGAGCTTCAACAGCACCTTCGGCTGTCAGCGCCTGCCCATCCAGCACCAGAAAGGAGTTCAGTGCAAGTCCACAAAGAGCGCTCCCGGCCCATCGTGAGGACCATCTCCAGGACCAAGGGGAGGCCCGGAGCCGCAAGGTGACGTCTGGCCCAACCGGAAAGAGCTCAGGAAAGAGCTCAGGAAAGGAGCGGTGAGCGTCAAGTGTGCTCACCGGTTCTACCCAGCTACATCCCGGTGGAGTGCAGAAAAATGGGAGCGGTGAGTGGGAGCAAGTACGGCACGACACATCCAGGTGAGCGCCGACGGCTCTACTTCTGTACAGCAGGCTCAGGTTGGACAAGAACAGTGGCAAGAGGAGACACCTACGGCTGTGTGTGTATGACAGGCTCTGCACAAACCTACACACAGAAGTGGATCTTAAGCGTCCGGTAAATGA (SEQ ID NO: 43)	ASTTPPKVYPLTSCGGDTSSSVTLGCLVSSYMPEPVTVTWSGALTSQVHTFPAILQSSGLYLSVVTVPASTSGAQTFCIONVAHPASSTKVDKRVPEGPDPCKHCRPPPELPGPSVFIFPPKPDLTISGTPEVTCVVVDVGGDDPEVGFSHFVDNVEVTRARTKPREEQFNSTFRVVSALPIQHODWTGGKEFKCKVHNEALPAPVRTISRTKGQAREPQVYVLAPPQEELSKSTLSVTCLVTGFYPDYIAVEWQKNGQPESEDKYGTTSQLDADGSYFLYSRLRVDKNSWQEGDTYACVVMHEALHNHYTQKSISKPPGK* (SEQ ID NO: 42)	X69797	http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocusGenes&repertoire=genes&le&species=sheep&ero=IGHG	Dufour V. et al., J. Immunol., 156, 2163-2170 (1996), PMID: 8890905
		GGCTCAACAAACACCCGGAAGGTGTACCGTGTGACTTGTGTGTCGGGGACACAGTCCAGCTCCATCGTGACCTGGGCTGCTGTGCTCCAGGTATATGCCCGAGCCGGTACCGTGAACCTCTGGTGCGCTGACGAGCGGCGTGCACACCTTCCGGGCCATCCTGCAGTCTCTCCGGGTCTACTCTCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGGCGCCAGCACCTCAGGAGCCGACCTTCTATCTGCAACGTTAGCCCAACCGCGGCAAGCGTCAAGTGTGCTCACCGGTTCTACCCAGCTACATCCCGGTGGAGTGCAGAAAAATGGGAGCGGTGAGTGGGAGCAAGTACGGCACGACACATCCAGGTGAGCGCCGACGGCTCTACTTCTGTACAGCAGGCTCAGGTTGGACAAGAACAGTGGCAAGAGGAGACACCTACGGCTGTGTGTGTATGACAGGCTCTGCACAAACCTACACACAGAAGTGGATCTTAAGCGTCCGGTAAATGA (SEQ ID NO: 45)	ASTTAPKVYPLTSCGGDTSSSVTLGCLVSSYMPEPVTVTWSGALTSQVHTFPAILQSSGLYLSVVTVPASTSGAQTFCIONVAHPASSTKVDKRVPEGPDPCKHCRPPPELPGPSVFIFPPKPDLTISGTPEVTCVVVDVGGDDPEVGFSHFVDNVEVTRARTKPREEQFNSTFRVVSALPIQHODWTGGKEFKCKVHNEALPAPVRTISRTKGQAREPQVYVLAPPQEELSKSTLSVTCLVTGFYPDYIAVEWQKNGQPESEDKYGTTSQLDADGSYFLYSRLRVDKNSWQEGDTYACVVMHEALHNHYTQKSISKPPGK* (SEQ ID NO: 44)	X70983		Clarkson C.A. et al., Mol. Immunol., 30, 1195-1204 (1993), PMID: 8413324
	Vùng hằng định chuỗi nhẹ Ig cừu	CCATCCGTCTTCTCTTCAAACCATGTGAGGAACAGCTGAGGACCGGAACTGTCTGTGCTGTGCTGTGGTGAATGATTTCACCCCAAGATATCAATGTCAAGGTGAAGTGGATGGGTTACCCAGACAGCACTTCCAGCAACAGCTTCCAGACAGGAGACAGCACTACAGCTCAGACGACCTGACACTGTCCAGCTCAGAGTACCAGAGCCATAACGCTATGCGTGTGAGGTGACGCCAAGAGGCTGCCACCGCCCTCGTCAAGAGGTTCAATAAGAATGAATGTTAG (SEQ ID NO: 47)	PSVFLFKPSEELRTGTGVSVVLVNDIFYPKDINVKVKVDGVTQNSNFQNSFTDQDSKSTYSLSSTLTLSSEYQSHNAYA CEVSHKSLPTALVKSFNKNEC* (SEQ ID NO: 46)	X54110	Chưa đăng ký	Jenne C.N. et al., Dev. Comp. Immunol., 30 (1-2), 165-174 (2006), PMID: 16083958
		GGTACGCCAAGTCCGCAACCTCGGTCACCGCTGTTCCGCTTCCAGCGGAGCTCAGTACCAACAAGGCGACCGTGGTGTGTCTCAACGACTTCTACCCGGTACCGTGAACGTGGTGTGAAGGCGAGTGGCAGGCAACATCAATCAAGAACGTGAAGACCCAGGCTCCAAAAGAGCAACAGCAAGTACCGCGCCAGCAGTACCTGACCGTGAACGAGGAGTGGAAAGTCTAAGAGCAGTACACCTGGGAGGTACGCGACGAGGAGCAGCAGGTGACGAAAGACAGTGAAGCCCTCAGAGTGTCTTACG (SEQ ID NO: 48)	GQPKSAPSVTLFPPSTELSTNKATVCLINDFYPGSVNVVWADGSTINQNVKTTQASKQSNKYAASSYLTLTGSEWKS KSSYTCEVTHEGSTVTKTVKPECS* (SEQ ID NO: 48)	AY734681		

17

[illegible]

Loại	Miền Ig	Trình tự nucleotit	Trình tự axit amin	Số truy cập Ngân hàng gen	Kho dữ liệu IMGT	Tài liệu viện dẫn
Trâu (Tên khoa học: Bubalus bubalis)	Vùng hằng định chuỗi nặng Ig trâu (CH1~CH3)	lgG1? GAGCGGGGTGGACACGCTTCCGGGCGGCTGCTTCAGTCC TCCGGGCTCTACTGTCTTCAGCAGCAGCGGTGACCGGGC CGCGCAGCGGCCAGAAAAGGCCAGACGTTCAAGCTGGAA CGTAGCGCCACCGCGGCGAGCAGGCCAAGGTGGACAGAG GCTGTGTTTCCCGCATGCGAGCCGAAACCGCTGTGATTG GTGCGCAGCCCGCTGAGCTTCCCGGAGGACGCTCTGTGTG TTGATCTTCCGACCAAAACCCAGGACACCGCTCAACAAT CTCTGGAACTGCTGAGGTCAAGTGTGTGTGGTGGAC GTGGGCGACGATGACCGCGAGGTGAAAGTTCTCTGGT TCGTGGACGATGTGGAGGTAAACACAGCCAGGACGAA GCCAAGAGAGGAGCGAGTTCAACAGCACCTACCGCGTG GTACGCGCGCTGCCCATCCAGCAACGACTGGACTG GAGGAAAGGAGGTGAAAGTGAAGGTGTACAATGAAGGCG CTCCGAGCCCGCATCGTGAGGACCATCTCCAGGACCA AAGCGCAGGCGCGGAGGCCAGAGGTGTACGTCTGGG CCGACCCCGAGGACGAGCTCAGCAAAAAGCAGCGTCAAGC ATCACTTGCATGGTCACTGGCTGTTCTACCCAGACTACAT CGCGCTAGAGTGGCGAGAAAGATGGGCGACGCTGAGTCA GAGGACAAATATGGCAGCAGCCCGCCCGAGCTGGAGA CGCATGGCTGCTACTTCTGTACAGCAGGCGTCAAGGT GAACAAGAACAGCTGGCAAGAAAGGAGGGCGCTACAGC TGTGTAGTGAATGAGTAGGG (SEQ ID NO: 73)	SGVHTFPAVLQSSGLYSLSTVTAPAS ATKSQTFITCNVAHPASSTKVDAKVVP PCRPKPCDCOPPELPGLPGSPVFIFPK PKDITLISGTPETVTCVVVDVGHDDPEV KFSWFVDDVEVNTARTKPREEQFNSTY RVVSALPIQHNDWTGKFEKOKVYNEG LPAPVIRITISRTKGAREPQVYVLAPP QDELSKSTVSTCMVTFGYFDYIAVEW QKDGQPESEDKYGTTPQLDSDGSYF LYSRLRVNKNISWQEGGAYTCVVMHE (SEQ ID NO: 72)	NW_00569090 3	Chưa đăng ký	Không có
	lgG2?	GCCTGCATGACAGCCCGGAAAGTCTACCGTCTGACTCT TTGCCGCGGGGAAAGCTCCAGCTCCACCGTGACCGCTG GGCTGCCTGGTCTCCAGCTACATGCCGAGGCGCGGTGA CGGTGACCTGGAACTCGGGTGGCCCTGAAGAGCGGGGT GCACACCTTCCCGCGCGTCTGTTGACCTCTGGGCTG TACTCTCTCAAGAGCAGGTGACCGCGCGCGCCGACGG CCACAAAAGCGACAGCTTCAACCTGCAACGTAGCCCA CCGCGCAGCAGCACCAAGGTGGACACGGCTGTTGGGT TCTCAGTGACTGOTGCAAGTTTCTTAAGCCTTGTGTG AGGGGACCATGTGTGTTCTATCTTCCGCGCGAAACCCAA AGACACCGTGTATGATCAGAGGAAATCCGAGGTGCAT GTGTGGTGGTGGAGCTGGGCGGGGATAAOCOCGAGGT GCAGTCTCTCGTGGTTCGTTGGGTGATGTGGAGGTGCAC ACGGGCGAGGTCCAGAGCGAGAGAGAGCAGTTCACACA GCACCTACCGCTGATGACAGCAGCGTGGCCATCGAGCA CAATGACTGCACTGGAGGAAAGGAGTTCAAGTGCAG GTCAACAACAAGGCGCTCCACCGCCCATCGTGAGGA CCATCTCCAGGACCAAAAGGCGAGCGCGGGAGCGCGGA GGTGTACGTCTGTGGCCCGACCCCGAGGAAGAGCTCAGG AAAAGCAGCGTCAAGCGTCACTTGCATGGTCACTGGCTT GTACCCGAGCTACATCGCGCTAGAGTGGCATAGAGACG GGCAGGCTGAGTTCGGAGGACAGTACCGGACGACCCCG GCCCGAGCTGGAGAGGAGTGGCTCTACTGTTCTGTAC AGCAGGCTCAAGGTGGAACAAGAACAGCTGGCAAGAG GAGCGCGCTACACGTGTGTAGTGTGATGATGAGG (SEQ ID NO: 75)	ASITAPKVYPLTSCRGETSSSTVTLGG LVSSYMEPEVTVTWNSGALKSGVHTF PAVLQSSGLYSLSTVTAPASATKSQT FTCNVAHPASSTKVDTAVGFSSDCK FPMPCVRGSPVFIFPKPKDITLMTGNP EVTQVVVDVGRDNPVQFSWFVGDOE VHTGRSKPREEQFNSTYRVVSTLPIQH NDWTGKFEKOKVNNKGLPAPVIRITS RTKGQAREPQVYVLAPPOEELSKSTVS VTCMVTGFYPDYIAVEWHDRQAESE KYRTTPPQLDSDGSYFLYSRLKVNKNS WQEGGAYTCVVMHE (SEQ ID NO: 74)	NW_00576614 3		
	lgG3?	GCCTCCACACAGCCCGGAAAGTCTACCGTCTGGCAT CCAGCTTGGGGGAGCAGCTCCAGCTGCCACGTTGACCGT GGGTGCCTGGTCTCCAGCTACATGCCGAGCGCGGTG ACCGTGCCTGGAACTCGGGTGCCTGAAAGAACCGGG TGGACACCTTCCCGCGCGTCCGGAGTCTCCCGGGCT CTACTGTTCCAGCAGCATGGTGCATGCCGACCGACGA CCGCGAGGAACCCAGACCTTCACTGCAACGTAGCCCA CCCGGCCAGAGCCACCAAGGTGGACACGGGTGTCACT GCAAGGCATCCGCTCCGCAAGACACGAGACACCTA TCCATCTGTAAAACCCCAACCCAGGAGCCGAGAGAT GAAAAGACACCGCTGCAGGTGTCCCAATGCCGAGAAGC TCTGGGAGGACTGTCTGTCTTCACTTCCACAGCGCAAC CCAAAGCCCGCATGCAAGTGTGGAAAGCGCGGAGGT CAGCTGTGTGGTGGAGCTGGCGCAGGATGACCCG GAAGTGCAGTCTCTCGTGGTTCGTGGATGACCTGGAGG TGCAACACAGCCAGGATGAAGCGCAAGAGGAGGACGTT CAACAGCACCTACCGCGTGGTCAAGCGCGCTGCCCATC CAGCACACAGGACTGGCTGGGGAAAAGGAGTTCAAGT GCAAGGTCAACAACAAGGCGCTCCCGGCGCCCATCGT GAGGACCATCTCCAGGACCAAGGCGAGCGCGGGAG CCACAGGTGTATGCTGTGGCGCCACCGCGGAGAGC TCAGCAAAAGCAGGCTCAGCGCTCAGCTGGCTAATCAG GGTCTACACCAAGAGAGGTAGACGTGGAGTGGCAGA GAAATGGGACGCGTGAAGTCAGAGGACAAGTACCAAC GACCCCAACCCAGCTGGACGCTGAAGGCTCTCACTTC CTGTACAGCAGGCTCAGGGTGAACAGGAGGAGCTGGC AGGAAGGAGACCACTACAGCTGTGCGAGTGAATGATGAA GCTTTACGGAATCACTACAAAGAGAAGCCCATCGAG GTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 77)	ASTTAPKVYPLASSCGDTSSSTVTLGCG LVSSYMEPEVTVTWNSGALKNGVHTF PAVRQSSGLYSLSSMVTMTPTSTAGTQ TFTCNVAHPASSTKVDTAVTARHPVP KTPETPIHPVPKPTQEPREDEKTPCQGP KCEPLGGLSVFIFPKPKDITLISGTP EVTQVVVDVGGDDPEVQFSWFVDVE VHTARMKPREEQFNSTYRVVSALPIQH QDWLREKEFKCKVNKGLPAPVIRITIS TKGQAREPQVYVLAPPREELSKSTLSL TCLITGFYPEEVDEWQRNGQPESEDK YHTTTPQLDADGSYFLYSRLRVNRSSW GEGDHYTCAMHEALRNHYKEKPIRS PK* (SEQ ID NO: 76)	NW_00578420 6		
Vùng hằng định chuỗi nhẹ Ig trâu (CH1~CH3)	lg lamda?	GAGCCCAAGTCCGCAAGCTCAGTCAAGCTGTTCCCA CCTCCACGAGGAGGCTGAGCGCCAAACAGGCGACCGT GGTGTGTCTCATCAGCGCACTTCAACCGGTGAGATGA CCGTGGCCAGGAAGGACAGCGGACGACCATCACCCG GAAAGTGGAGGACCAACCGGGCCTCCAAACAGAGCAAC AGCAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCGTGAAG GCAGCGAGTGGAAATCGAAAGGAGTACAGCTGGCA GGTCAAGCAGGAGGGGAGCAGCTGACAAAGACAGTGT AAGCCCTCAGAGTGTCTTAG (SEQ ID NO: 79)	OPKSAPSVTLFPPSTEELSANKATLVC LISDFYPSMTYARKADQSTITRNVTET RASQNSKSYAASSYLSLTGSEWKSQ SYSCEVTHEGSTVTKTVKPSQCS* (SEQ ID NO: 78)	NW_00569078 6	Chưa đăng ký	Không có

Loại	Miền Ig	Trình tự nucleotit	Trình tự axit amin	Số truy cập Ngân hàng gen	Kho dữ liệu IMGT	Tài liệu viện dẫn	
Người (Tên khoa học: Homo sapiens)	Vùng hằng định chuỗi nặng Ig người (CH1~CH3)	Biến thể IgG4 1	GAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCATCATGCCCA GCACCTGAGTTCTCGGGGGGACCATGAGTCTTCTCGT TTCCGCCCAAAACCCCAAGGACACTGTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTGACGTGCGTGGTGGTGACGTG AGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACG GTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCGAGTTCAACAGCAGTACCGGTGTG GTACGCGTCTCAGCGTCTGTCACAGGAGTACCGGTGT AAGCGCAAGGAGTACAAAGTGCAGGTCTCCAAACAAA GGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATGTCCAAA GCCAAGGGCAGGCCCGGAGGCCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCCAG GTACGCTGACGCTGCTGCTGTTCAAAGGCTTCTACGCC AGCGACATCGCGCTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAGAGCCAGCCTCCCGTGGTG GACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAGGCTA ACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGT TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTGTGCACAAC CACTACACACAGAAAGGCTCTCCGTGTCTGTGGGT AAATGA (SEQ ID NO: 14)	ESKYGPPCPSCPAPFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTL PSQEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL HNHYTQKLSLSLGK* (SEQ ID NO: 12)	K01316	http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocustGenes&repertoire=genetab&species=human&group=IGHC	Ellison J. et al, DNA, 1, 11-18 (1981). PMID: 6299662
	Biến thể IgG4 2	GAGTCCAAATATGGTCCCCCGTGCCCATCATGCCCA GCACCTGAGTTCTCGGGGGGACCATGAGTCTTCTCGT TTCCGCCCAAAACCCCAAGGACACTGTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTGACGTGCGTGGTGGTGACGTG AGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACG GTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCGAGTTCAACAGCAGTACCGGTGTG GTACGCGTCTCAGCGTCTGTCACAGGAGTACCGGTGT AAGCGCAAGGAGTACAAAGTGCAGGTCTCCAAACAAA GGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATGTCCAAA GCCAAGGGCAGGCCCGGAGGCCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCCAG GTACGCTGACCTGCTGCTGTTCAAAGGCTTCTACGCC AGCGACATCGCGCTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAGAGCCAGCCTCCCGTGGTG GACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAGGCTA ACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGT TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTGTGCACAAC CACTACACGCGAAGAGGCTCTCCGTGTCTGTGGGT AAATGA (SEQ ID NO: 81)	ESKYGPPCPSCPAPFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTL PSQEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL HNHYTQKLSLSLGK* (SEQ ID NO: 80)	AJ001563		Brusco A. et al, Eur. J. Immunogenet., 25, 349-355 (1998). PMID: 9805657	
	Biến thể IgG4 3	GCACCTGAGTTCTCGGGGGGACCATGAGTCTTCTCGT TTCCGCCCAAAACCCCAAGGACACTGTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTGACGTGCGTGGTGGTGACGTG AGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACG GTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCGAGTTCAACAGCAGTACCGGTGTG GTACGCGTCTCAGCGTCTGTCACAGGAGTACCGGTGT AAGCGCAAGGAGTACAAAGTGCAGGTCTCCAAACAAA GGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATGTCCAAA GCCAAGGGCAGGCCCGGAGGCCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCCAG GTACGCTGACGCTGCTGCTGTTCAAAGGCTTCTACCCC AGCGACATCGCGCTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAGAGCCAGCCTCCCGTGGTG GACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAGGCTA ACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGT TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTGTGCACAAC CACTACACGCGAAGAGGCTCTCCGTGTCTGTGGGT AAATGA (SEQ ID NO: 83)	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV HNKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAK KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFLLYKLTVDKSRWQEG NVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLG K* (SEQ ID NO: 82)	AJ001564			
Vùng hằng định chuỗi nhẹ Ig người (CH1~CH3)	Ig kappa (CK)	ACTGTGGGTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGGCA TOTGATGAGAGATTGAAATCTGGAATGCGCTGTGTT GTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGAGGCC AAAGTACAGTGGAAGTGGATAACGCGCTCCAACTG GTTAACTCCAGGAGAGGTGTCAACAGAGAGGAGAGAG AAGGACAGCACTACAGCCTCAGACAGACCCCTGAGC CTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTGTAC GCTCGGAGTACCCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCG GTCAACAAAGAGGTTCAACAGGGGAGAGTGTAA (SEQ ID NO: 13)	TVAAPSFIFFPPSDEQLKSGTASVVL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ SVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 11)	X96754	http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/index.php?section=LocustGenes&repertoire=genetab&species=human&group=IGKC	Không có	

21

(tiếp theo)

Biến thể lg2 2	GGGTCCACGACGACGCGGAAAGTGTACCCCTGTGAGTTTGTGCT GGGGGAAAGTGTGACGCTGACCGTGGGCTGGCTGGCTGG TGTCAGAGTACATGCCGAGCGCGGTGACCGTGAACCTGGAAC CGGCTGCCCTGAAGAGCGGCGTGCACACCTTCCCGCGCGCTGC TTGAGTCTCCGGGCTGTACTGTCTCAGCAGGATGTTGACCGGT GCCCGGACGAGCTCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG CCAGCGCGGACGACGACGACGACGAGGTGGAAAGGCTGTGGCT CTCAGTGAAGTGTGCAAGCTTAATACCAAGCATGGCTGAGG GAACCATGTGTGTTTATGTTTCCGACGAAACCAAGACACCC TGATGATCAGAGGAACGCCCGGAGGTGACGTTGTTGGTGGTGA CTGGGCGACGATTAACCGGAGGTGGAGTTCTCTGGTTCGT GGAGAGCTGGAGGTGGACAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GGAGAGCTTCAACAGCAGCTACCGCGCTGGTGAAGCGGCTGCC CATCCAGACGAGGAGTGGAGTGGAGGAAAGGAGTTCAAGTG CAAGGTCAACATCAAGGCGCTCTCGGCTCCATGTTGAGGATC ATCTCAGGAGCAAAAGCGGCGGCGGAGGCGGCGAGGTTGAT GTCTGGAGCCGACCGCAAGGAAGAGCTGAGCAAAAGCAGCGGT AGCGTCACTGATGCTGATCGATCGGCTTCTACCGCAAGAGTGTAG ACGTGGAGTGGAGAGAGAGCGGCGAGAGCTGAGTGGAGGAGCA AGTACCGGACGACGCGCGCGGAGCTGGAGCGGCGGAGCTGCT ACTTCTGTACAGGAGCTCAGGCTGGAGTGGACAGGACAGCTCGA GAGAGGAGAGACACTACAGCTGTGTGGTGTATGACAGAGGCGCT GCAACATCACTACATGCAAGAACTGCAAGCTTAAGTGTGGCGGT AAATGA (SEQ ID NO: 96)	ASTTAPKVVPLSSCGDGKSSSTVTLGCLVSSYMPPEVPT VTWNSGALKSGVHTFPVAVLQSSGLYLSMVTVPASS GTQFTCNVHPASSTKYDKAVGVSSDSCKPNQNHQVR REPSVFIFPPKPKDLMITGTPETVTVVNVGHDPVEQF FSWFVDDVEVHTARTKPREQFNSTYRVVSLPIQHODW WTGKFEKCKVNNKLSASIVRBSRSGKGFAREPQVYVLD PKKEELSKSTVSTCMVGFYPEDVDVEWQRDQTESE KYRTTTPQLDADRSYFLSKLRVDRNSWQRDQTYTCV MHEALHNHYMKSTSKSAGK* (SEQ ID NO: 88)	X38946 (X08703)		
Biến thể lg2 3	GGGTCCACGACGACGCGGAAAGTGTACCCCTGTGAGTTTGTGCT GGGGGAAAGTGTGACGCTGACCGTGGGCTGGCTGGCTGG TGTCAGAGTACATGCCGAGCGCGGTGACCGTGAACCTGGAAC CGGCTGCCCTGAAGAGCGGCGTGCACACCTTCCCGCGCGCTGC TTGAGTCTCCGGGCTGTACTGTCTCAGCAGGATGTTGACCGGT GCCCGGACGAGCTCAGGAAACCGAGCTTCACTGCAAGCTGGA AGCGGCGCGGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GGTCTGAGTGAOTGTGCAAGCTTAATACCAAGCATGGCTGAG AGGGAACCATGTGTGTTTATCTTCCGACCGAAACCAAGAGCA CCCTGATGATCAGAGGAACGCCCGGAGGTGACGTTGTGTGGT TGAAAGTGGCGGACGATAACCGCGAGGTGAGCTTCTCTGGT CGTGGAGGAGTGGAGGTGGACAGCGGCGAGGAGGAGGAGGAG AGAGGAGGAGTTCAGAGGAGGAGTACCGGCTGGTGAAGCGCT CGGCTGACGAGCAGGAGTGGAGTGGAGGAGGAGGAGTTCAG GTGGAGGAGTTCAGAGGAGGAGTTCAGAGGAGGAGTTCAG ATCATCTCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG TATGCTGTCGACGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG TCAGGCTGAGTGGAGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG AGAGTGGAGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GAGTGGAGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG CTACTTCTGTGACAGGAGGAGTCAAGGTGGAGAGGAGAGAGCTGG GAGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GTGCAATCACTACATGCGAGAGTGCAGCTTAAGTGTGGCGG GTAATGA (SEQ ID NO: 97)	ASTTAPKVVPLSSCGDGKSSSTVTLGCLVSSYMPPEVPT VTWNSGALKSGVHTFPVAVLQSSGLYLSMVTVPASS GTQFTCNVHPASSTKYDKAVGVSSDSCKPNQNHQVR REPSVFIFPPKPKDLMITGTPETVTVVNVGHDPVEQF FSWFVDDVEVHTARTKPREQFNSTYRVVSLPIQHODW WTGKFEKCKVNNKLSASIVRBSRSGKGFAREPQVYVLD PKKEELSKSTVSTCMVGFYPEDVDVEWQRDQTESE KYRTTTPQLDADRSYFLSKLRVDRNSWQRDQTYTCV MHEALHNHYMKSTSKSAGK* (SEQ ID NO: 89)	X16702 (M2579)		
Biến thể lg3 1	GGGTCCACGACGACGCGGAAAGTGTACCCCTGTGAGTTTGTGCT GGGGGAAAGTGTGACGCTGACCGTGGGCTGGCTGGCTGG TGTCAGAGTACATGCCGAGCGCGGTGACCGTGAACCTGGAAC CGGCTGCCCTGAAGAGCGGCGTGCACACCTTCCCGCGCGCTGC TTGAGTCTCCGGGCTGTACTGTCTCAGCAGGATGTTGACCGGT GCCCGGACGAGCTCAGGAAACCGAGCTTCACTGCAAGCTGGA AGCGGCGCGGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GGTCTGAGTGAOTGTGCAAGCTTAATACCAAGCATGGCTGAG AGGGAACCATGTGTGTTTATCTTCCGACCGAAACCAAGAGCA CCCTGATGATCAGAGGAACGCCCGGAGGTGACGTTGTGTGGT TGAAAGTGGCGGACGATAACCGCGAGGTGAGCTTCTCTGGT CGTGGAGGAGTGGAGGTGGACAGCGGCGAGGAGGAGGAGGAG AGAGGAGGAGTTCAGAGGAGGAGTACCGGCTGGTGAAGCGCT CGGCTGACGAGCAGGAGTGGAGTGGAGGAGGAGGAGTTCAG GTGGAGGAGTTCAGAGGAGGAGTTCAGAGGAGGAGTTCAG ATCATCTCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG TATGCTGTCGACGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG TCAGGCTGAGTGGAGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG AGAGTGGAGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GAGTGGAGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG CTACTTCTGTGACAGGAGGAGTCAAGGTGGAGAGGAGAGAGCTGG GAGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GTGCAATCACTACATGCGAGAGTGCAGCTTAAGTGTGGCGG GTAATGA (SEQ ID NO: 98)	ASTTAPKVVPLSSCGDTSSSTVTLGCLVSSYMPPEVPT VTWNSGALKSGVHTFPVAVRQSSGLYLSMVTVPASS ETQFTCNVHPASSTKYDKAVTARRPVTTPKTTIPP QKPTTPKSEVEKTPCQSKCPKPELGLSVFFIPPKPKD LTSIGTPEVTVVVDVGDDPEVQFSWFVDDVEVHTAR TKPREQFNSTYRVVSLPIQHODWQKFEKCKVNNK GLPAPVIRTSRTKGGAREPQVYVLPAPREELSKSTLSLT CLTGFYPEEIDVEWQRNGQPESEDKYHTAPQLDADGS YFLSKLRVNNKSSWQEGDHYTCAMVHEALRNHYKEKSI RSPGK* (SEQ ID NO: 90)	U63638		
Biến thể lg3 2	GGGTCCACGACGACGCGGAAAGTGTACCCCTGTGAGTTTGTGCT GGGGGAAAGTGTGACGCTGACCGTGGGCTGGCTGGCTGG TGTCAGAGTACATGCCGAGCGCGGTGACCGTGAACCTGGAAC CGGCTGCCCTGAAGAGCGGCGTGCACACCTTCCCGCGCGCTGC TTGAGTCTCCGGGCTGTACTGTCTCAGCAGGATGTTGACCGGT GCCCGGACGAGCTCAGGAAACCGAGCTTCACTGCAAGCTGGA AGCGGCGCGGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GGTCTGAGTGAOTGTGCAAGCTTAATACCAAGCATGGCTGAG AGGGAACCATGTGTGTTTATCTTCCGACCGAAACCAAGAGCA CCCTGATGATCAGCGGTTTTCATCCGCAAGAGGATAGACCTGGA GTGCGAGAGAAATGGGACAGCTGAGTGGAGAGGAGAGTACCA CAGCAGCGGACCGGAGGTGGAGTGGTGAAGGCTGCTACTTCT GTACAGAGGCTCAGGCTGAGGAGTGAACAGGAGGAGTGGAGGAG AGACGAGTACAGCTGTGCGAGTGAACAGCAGGCTTAAGGAAAT CACTCAAGAGGAAAGTCACTGTGAGGCTGTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 98)	ASTTAPKVVPLASRGDTSSSTVTLGCLVSSYMPPEVPT VTWNSGALKSGVHTFPVAVLQSSGLYLSMVTVPASTS ETQFTCNVHPASSTKYDKAVTARRPVTTPKTTIPP QKPTTQSEVEKTPCQDSCKPEPLGLSVFFIPPKPKD LTSIGTPEVTVVVDVGDDPEVQFSWFVDDVEVHTAR TKPREQFNSTYRVVSLPIQHODWQKFEKCKVNNK GLPAPVIRTSRTKGGAREPQVYVLPAPREELSKSTLSLT CLTGFYPEEIDVEWQRNGQPESEDKYHTAPQLDADGS YFLSKLRVNNKSSWQEGDHYTCAMVHEALRNHYKEKSI RSRPOK* (SEQ ID NO: 81)	U63639		
Vùng hàng định chủ nhệ lg bô (CL)	lg lamda CAGCGCAAGTGGGAGGCTGGTGAAGCTGTTCGCGGCTGCG ACGGAGGAGGTGACGCGCAACGAGGCGACCGTGGTGTGCTC ATCAGGAGCTTGTACCGGCTGAGCTGACCGTGGTGTGGAAG GCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GGGTCCACGACGACGCGGAAAGTGTACCCCTGTGAGTTTGTGCT GGGGGAAAGTGTGACGCTGACCGTGGGCTGGCTGGCTGG TGTCAGAGTACATGCCGAGCGCGGTGACCGTGAACCTGGAAC CGGCTGCCCTGAAGAGCGGCGTGCACACCTTCCCGCGCGCTGC TTGAGTCTCCGGGCTGTACTGTCTCAGCAGGATGTTGACCGGT GCCCGGACGAGCTCAGGAAACCGAGCTTCACTGCAAGCTGGA AGCGGCGCGGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GGTCTGAGTGAOTGTGCAAGCTTAATACCAAGCATGGCTGAG AGGGAACCATGTGTGTTTATCTTCCGACCGAAACCAAGAGCA CCCTGATGATCAGAGGAACGCCCGGAGGTGACGTTGTGTGGT TGAAAGTGGCGGACGATAACCGCGAGGTGAGCTTCTCTGGT CGTGGAGGAGTGGAGGTGGACAGCGGCGAGGAGGAGGAGGAG AGAGGAGGAGTTCAGAGGAGGAGTACCGGCTGGTGAAGCGCT CGGCTGACGAGCAGGAGTGGAGTGGAGGAGGAGGAGTTCAG GTGGAGGAGTTCAGAGGAGGAGTTCAGAGGAGGAGTTCAG ATCATCTCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG TATGCTGTCGACGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG TCAGGCTGAGTGGAGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG AGAGTGGAGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG GAGTGGAGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG CTACTTCTGTGACAGGAGGAGTCAAGGTGGAGAGGAGAGAGTGA CAGTCAAGAGGAGGAGTCAAGGTGGAGTGTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 98)	QPKSPSVTLFPSPSTELNGKATLVCLISDFPGSVTV WMKAGSTITRNVETTRASKGNSKYAASLYLSLSSD WKSGKSYSEVTHEGSTVTKVPSKES* (SEQ ID NO: 100)	X62917	Chưa đăng ký	Chen L. et al., Vet. Immunol. Immunopathol., 124, 284-294 (2008). PMID: 18538861

Trình tự axit amin như được thể hiện ở các SEQ ID NO.: 4, 3, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 12, 80, 82, 84-91, 100, 102 và 11 có thể có (các) đột biến mất đoạn, (các) đột biến thế hoặc (các) đột biến bổ sung một hoặc vài (ví dụ, lên đến năm, tối đa là khoảng 10) axit amin. Ngay cả khi các đột biến này đã được đưa vào, các trình tự axit amin thu được có thể có chức năng như vùng hằng định trên chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ Ig.

Mặc dù vùng hằng định trên IgG1 người kiểu đại có hoạt tính ADCC và hoạt tính CDC, được biết là có thể giảm các hoạt tính này bằng cách đưa các đột biến thế axit amin và đột biến mất đoạn axit amin vào các vị trí cụ thể. Trong trường hợp động vật khác ngoài người trong đó chưa phát hiện được vùng hằng định trên globulin miễn dịch tương đương với IgG4 người, đột biến có thể được đưa vào vùng liên quan của globulin miễn dịch tương đương với IgG1 người để vùng hằng định thu được đã giảm hoạt tính ADCC và hoạt tính CDC có thể được sử dụng.

Sáng chế đề xuất ADN di truyền nhân tạo bao gồm (a') ADN mã hoá chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa CDR1 có trình tự axit amin QSLLYSENQKDY (SEQ ID NO.: 37), CDR2 có trình tự axit amin WAT và CDR3 có trình tự axit amin GQYLVYPFT (SEQ ID NO.: 38) và vùng hằng định chuỗi nhẹ (CL) trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống và (b') ADN mã hoá chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa CDR1 có trình tự axit amin GYTFTSNF (SEQ ID NO.: 39), CDR2 có trình tự axit amin IYPEYGNT (SEQ ID NO.: 40) và CDR3 có trình tự axit amin ASEEAVISLVY (SEQ ID NO.: 41) và vùng hằng định chuỗi nặng (CH) trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống. Sáng chế cũng đề xuất ADN mã hoá chuỗi nhẹ bao gồm VL chứa CDR1 có trình tự axit amin QSLLYSENQKDY (SEQ ID NO.: 37), CDR2 có trình tự axit amin WAT và CDR3 có trình tự axit amin GQYLVYPFT (SEQ ID NO.: 38) và CL trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống (tức là ADN của (a') nêu trên). Hơn nữa, sáng chế cũng đề xuất ADN mã hoá chuỗi nặng bao gồm VH chứa CDR1 có GYTFTSNF (SEQ ID NO.: 39), CDR2 có trình tự axit amin IYPEYGNT (SEQ ID NO.: 40) và CDR3 có trình tự axit amin ASEEAVISLVY (SEQ ID NO.: 41) và CH của kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống (tức là ADN của (b') nêu trên).

Đối với (a) chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1 có trình tự axit amin QSLLYSENQKDY (SEQ ID NO.: 37), CDR2 có trình tự axit amin WAT và CDR3 có trình tự axit amin GQYLVYPFT (SEQ ID NO.: 38) và vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống; và (b) chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR1 có trình tự axit amin GYTFTSNF (SEQ ID NO.: 39), CDR2 có trình tự axit amin IYPEYGNT (SEQ ID NO.: 40) và CDR3 có trình tự axit amin ASEEAVISLVY (SEQ ID NO.: 41) và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống, nên tham khảo phần mô tả nêu trên. ADN của (a') là ADN (gen) mã hoá chuỗi nhẹ của (a); và ADN của (b') là ADN (gen) mã hoá chuỗi nặng của (b). ADN di truyền nhân tạo bao gồm ADN của (a') và ADN của (b') có thể được tổng hợp trên thiết bị tổng hợp có bán trên thị trường. Vị trí nhận biết enzym giới hạn, trình tự KOZAK, trình tự tín hiệu bổ sung poly-A, trình tự khởi động, trình tự intron hoặc tương tự có thể được bổ sung vào ADN di truyền nhân tạo.

Sáng chế cũng đề xuất vector chứa ADN di truyền nhân tạo đã đề cập.

Để làm vector, plasmit thu được từ *Escherichia coli* (ví dụ, pBR322, pBR325, pUC12 hoặc pUC13); plasmit thu được từ *Bacillus subtilis* (ví dụ, pUB110, pTP5 hoặc pC194), plasmit thu được từ nấm men (ví dụ, pSH19 hoặc pSH15); thể thực khuẩn như thể thực khuẩn λ ; virus động vật như virus retro hoặc virus vaccinia; hoặc virus gây bệnh ở côn trùng như baculovirus có thể được sử dụng. Theo các ví dụ được mô tả sau đây, pDC6 (patent Nhật Bản số 5704753, patent Hoa Kỳ số 9096878, patent châu Âu số 2385115, patent Hong Kong (Trung Quốc) số HK1163739 và patent Úc số 2009331326) được sử dụng.

Vector này có thể gồm trình tự khởi động, gen tăng cường, tín hiệu cắt nối, tín hiệu bổ sung poly-A, trình tự intron, chỉ thị chọn lọc, gốc sao chép SV40, và dạng tương tự.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào chủ được biến nạp bằng vector nêu trên. Có thể tạo kháng thể kháng PD-L1 theo sáng chế bằng cách nuôi cấy tế bào chủ này và thu kháng thể cần quan tâm từ môi trường nuôi cấy thu được. Do đó, sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ đã mô tả ở trên và bước thu kháng thể kháng PD-L1 theo sáng chế từ môi trường nuôi cấy. Theo phương pháp của sáng chế để tạo ra kháng thể, vector chứa ADN di truyền nhân tạo bao gồm ADN mã hoá

chuỗi nhẹ và ADN mã hoá chuỗi nặng có thể được chuyển nhiễm sang tế bào chủ. Ngoài ra, vectơ chứa ADN mã hoá chuỗi nhẹ và vectơ chứa ADN mã hoá chuỗi nặng có thể được đồng chuyển nhiễm sang tế bào chủ.

Các ví dụ về tế bào chủ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào vi khuẩn (như vi khuẩn *Escherichia*, vi khuẩn *Bacillus* hoặc *Bacillus subtilis*), tế bào nấm (như nấm men hoặc *Aspergillus*), tế bào côn trùng (như tế bào S2 hoặc tế bào Sf), tế bào động vật (như tế bào CHO, tế bào COS, tế bào HeLa, tế bào C127, tế bào 3T3, tế bào BHK hoặc tế bào HEK 293) và tế bào thực vật. Trong số các tế bào này, tế bào CHO-DG44 (CHO-DG44(dfhr^{-/-})), là tế bào thiếu dihydrofolat reductaza, được ưu tiên.

Bước đưa vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ có thể được thực hiện bằng các phương pháp được bộc lộ trong tài liệu *Molecular Cloning 2nd Edition*, J. Sambrook và cộng sự, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989 (ví dụ, phương pháp canxi phosphat, phương pháp DEAE-dextran, chuyển nhiễm, vi tiêm, chuyển nhiễm dựa trên liposom, xung điện, tải nạp, kỹ thuật đưa thuốc nhuộm huỳnh quang khối lượng phân tử thấp vào tế bào trong môi trường nuôi cấy (scrape loading), phương pháp giải trình tự từng đoạn ngẫu nhiên (shotgun), v.v.) hoặc bằng cách gây nhiễm.

Thể biến nạp thu được có thể được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy, sau đó là bước thu kháng thể kháng PD-L1 theo sáng chế từ môi trường nuôi cấy. Khi kháng thể được tiết vào môi trường nuôi cấy, môi trường nuôi cấy này có thể được phục hồi, sau đó là bước phân lập và tinh chế kháng thể từ môi trường nuôi cấy. Khi kháng thể được tạo ra trong tế bào biến nạp, tế bào này có thể được dung giải, sau đó là bước phân lập và tinh chế kháng thể này từ dịch dung giải tế bào.

Các ví dụ về môi trường nuôi cấy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, môi trường nuôi cấy OptiCHO, môi trường nuôi cấy Dynamis, môi trường nuôi cấy CD CHO, môi trường nuôi cấy ActiCHO, môi trường nuôi cấy FortiCHO, môi trường nuôi cấy CD CHO Ex-Cell, môi trường nuôi cấy BalanCD CHO, môi trường nuôi cấy ProCHO 5 và môi trường nuôi cấy Cellvento CHO-100.

Độ pH của môi trường nuôi cấy thay đổi phụ thuộc vào tế bào sẽ được nuôi cấy. Thông thường sử dụng khoảng pH từ 6,8 đến 7,6; phần lớn là khoảng pH từ 7,0 đến 7,4 là phù hợp.

Khi tế bào sẽ được nuôi cấy là tế bào CHO, bước nuôi cấy có thể được thực hiện bằng các phương pháp đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ, thường có thể thực hiện nuôi cấy trong khí quyển pha khí có nồng độ CO₂ là 0-40%, tốt hơn nếu là 2-10%, ở 30-39°C, tốt hơn nếu ở khoảng 37°C.

Thời gian nuôi cấy thích hợp thường là từ một ngày đến ba tháng, tốt hơn nếu là từ một ngày đến ba tuần.

Bước phân lập và tinh chế kháng thể này có thể được thực hiện bằng các phương pháp đã biết. Các phương pháp phân lập/tinh chế đã biết mà có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp sử dụng sự chênh lệch độ tan (như tách muối hoặc kết tủa trong dung môi); phương pháp sử dụng chênh lệch về phân tử lượng (như thẩm tách, siêu lọc, lọc gel hoặc điện di gel SDS-polyacrylamit); các phương pháp sử dụng chênh lệch về điện tích (như sắc ký trao đổi ion); các phương pháp sử dụng ái lực đặc hiệu (như sắc ký ái lực); các phương pháp sử dụng chênh lệch về tính không ưa nước (như sắc ký lỏng hiệu năng cao đảo pha); và các phương pháp sử dụng chênh lệch về điểm đẳng điện (như hội tụ đẳng điện).

Kháng thể kháng PD-L1 theo sáng chế có thể được sử dụng làm thuốc kháng thể cho động vật hoặc người. Do đó, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể kháng PD-L1 đã mô tả ở trên làm thành phần hoạt tính.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ung thư và/hoặc bệnh truyền nhiễm. Các ví dụ về bệnh ung thư và/hoặc bệnh truyền nhiễm này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các bệnh tạo u (ví dụ, bệnh ung thư hắc tố ác tính, bệnh ung thư phổi, ung thư dạ dày, ung thư thận, ung thư vú, ung thư bàng quang, ung thư thực quản, ung thư buồng trứng và bệnh tương tự), bệnh bạch cầu, bệnh Johne, bệnh nhiễm Anaplasma, viêm vú do vi khuẩn, viêm vú do nấm, bệnh nhiễm trùng do mycoplasma (như viêm vú do mycoplasma, viêm phổi do mycoplasma hoặc tương tự), bệnh lao, bệnh nhiễm trùng do *Theileria orientalis*, bệnh do cryptosporidia, bệnh coccidia, bệnh do Trypanosoma và bệnh do Leishmania.

Kháng thể kháng PD-L1 theo sáng chế có thể được hoà tan vào dung dịch đệm như PBS, nước muối sinh lý hoặc nước vô trùng, được lọc khử trùng tùy chọn bằng bộ lọc hoặc dụng cụ tương tự, và sau đó cho đối tượng động vật sử dụng (bao gồm cả người) bằng cách tiêm. Chất phụ gia (như chất tạo màu, chất nhũ hoá, chất tạo hỗn dịch, chất

hoạt động bề mặt, chất hoà tan, chất ổn định, chất bảo quản, chất chống oxy hoá, chất đệm, chất làm đẳng trương, chất điều chỉnh độ pH và các chất tương tự) có thể được thêm vào dung dịch chứa kháng thể này. Các đường sử dụng có thể chọn được là sử dụng qua tĩnh mạch, trong cơ, trong màng bụng, dưới da hoặc trong da và đường dùng tương tự. Sử dụng qua mũi hoặc qua đường miệng cũng có thể được sử dụng.

Liều và số lần sử dụng và tần suất sử dụng kháng thể kháng PD-L1 theo sáng chế có thể thay đổi phụ thuộc vào triệu chứng, tuổi tác và thể trọng của đối tượng động vật, phương pháp sử dụng, dạng liều và v.v. Ví dụ, 0,1-100 mg/kg thể trọng, tốt hơn nếu là 1-10 mg/kg thể trọng, cho mỗi động vật trưởng thành thường có thể được sử dụng ít nhất một lần, với tần số mà cho phép xác nhận tác dụng mong muốn.

Mặc dù được phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng một mình, nó có thể được sử dụng kết hợp với phẫu thuật, liệu pháp phóng xạ, các liệu pháp miễn dịch khác như vaccin ung thư, hoặc thuốc đích phân tử. Tác dụng hiệp đồng có thể được mong đợi từ việc kết hợp như vậy.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn với các ví dụ sau đây. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1. Kháng thể dạng khảm chuột cống-chó kháng PD-L1

1. Giới thiệu

Protein gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-1), thụ thể ức chế miễn dịch, và phối tử của nó, phối tử gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-L1) là các phân tử được phát hiện bởi Giáo sư Tasuku Honjo và cộng sự, trường Kyoto University, là các yếu tố ức chế đáp ứng miễn dịch quá mức và liên quan sâu sắc tới khả năng dung nạp miễn dịch. Gần đây, các phân tử này đã được chứng minh là cũng tham gia vào sự ức chế miễn dịch ở các khối u. Theo ví dụ này, để tạo ra liệu pháp mới đối với các bệnh tạo u ở chó, gen kháng thể dạng khảm được tạo ra, trong đó gen vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng chuột cống kháng PD-L1 bò (4G12) có khả năng ức chế liên kết giữa PD-1 chó và PD-L1, được liên kết với gen vùng hằng định của globulin miễn dịch chó (IgG4). Gen kháng thể dạng khảm thu được được đưa vào tế bào buồng trứng ở chuột đồng Trung Quốc (tế bào CHO), được nuôi cấy để tạo ra kháng thể dạng khảm chuột cống-

chó c4G12 kháng PD-L1. Tác dụng của kháng thể dạng khảm này được xác nhận *in vitro* và *in vivo*.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1 Tế bào tạo kháng thể đơn dòng PD-L1 bò

Trình tự nucleotit của PD-L1 bò được phát hiện (Ikebuchi R, Konnai S, Shirai T, Sunden Y, Murata S, Onuma M, Ohashi K. Vet Res. Ngày 26 tháng 09 năm 2011;42:103). PD-L1 bò tái tổ hợp được tạo ra dựa trên thông tin trình tự. Chuột cống được gây miễn dịch bằng protein tái tổ hợp này để tạo ra kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò (Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology. Tháng 08 năm 2014;142(4):551-61; Dòng vô tính 4G12 sau đó có vai trò làm vùng biến đổi trên kháng thể dạng khảm ở chó cần quan tâm được mô tả trong tài liệu này).

2.2 Nhận biết các gen PD-1 và PD-L1 có độ dài đầy đủ ở chó

Để xác định độ dài đầy đủ của cADN PD-1 và PD-L1 ở chó, đoạn môi PCR được thiết kế dựa trên các trình tự nucleotit giả định của PD-1 và PD-L1 chó đã được đăng ký tại Trung tâm Thông tin Công nghệ Sinh học Quốc gia (NCBI: The National Center for Biotechnology Information) (số truy cập Ngân hàng gen: XM_543338 và XM_541302). Ngắn gọn là các đoạn môi để khuếch đại trình tự bên trong của khung đọc mở (ORF) của mỗi gen được thiết kế (cPD-1 bên trong F và R, cPD-L1 bên trong F và R), và PCR được thực hiện. Đối với các sản phẩm khuếch đại, các trình tự nucleotit được xác định bằng máy giải trình tự điện di mao quản theo các phương pháp thông thường. Hơn nữa, để xác định các trình tự nucleotit của cADN PD-1 và PD-L1 có độ dài đầy đủ, các đoạn môi (cPD-1 5' GSP và 3' GSP; cPD-L1 5' GSP và 3'GSP) được thiết kế dựa trên các trình tự cADN PD-1 và PD-L1 ở chó được xác định ở trên. 5'-RACE và 3'-RACE sau đó được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống 5'-RACE để khuếch đại nhanh các đầu cADN và hệ thống 3'-RACE để lần lượt khuếch đại nhanh các đầu cADN (Invitrogen). Các đoạn gen cần quan tâm thu được có trình tự như được mô tả (Maekawa N, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Adachi M, Takagi S, Kagawa Y, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. PLoS One. Ngày 10 tháng 06 năm 2014;9(6):e98415).

Đoạn môi (cPD-1 bên trong F): AGGATGGCTCCTAGACTCCC (SEQ ID NO.: 21)

Đoạn mồi (cPD-1 bên trong R): AGACGATGGTGGCATACTCG (SEQ ID NO.: 22)

Đoạn mồi (cPD-L1 bên trong F): ATGAGAATGTTTAGTGTCTT (SEQ ID NO.: 23)

Đoạn mồi (cPD-L1 bên trong R): TTATGTCTCTTCAAATTGTATATC (SEQ ID NO.: 24)

Đoạn mồi (cPD-1 5'GSP): GTTGATCTGTGTGTTG (SEQ ID NO.: 25)

Đoạn mồi (cPD-1 3'GSP): CGGGACTTCCACATGAGCAT (SEQ ID NO.: 26)

Đoạn mồi (cPD-L1 5'GSP): TTTTAGACAGAAAGTGA (SEQ ID NO.: 27)

Đoạn mồi (cPD-L1 3'GSP): GACCAGCTCTTCTTGGGGAA (SEQ ID NO.: 28)

2.3 Tạo ra các tế bào COS-7 biểu hiện PD-1 và PD-L1 chó

Để tạo plasmit biểu hiện PD-1-EGFP và PD-L1-EGFP ở chó, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cADN thu được từ PBMC chó sẵn có tổng hợp làm khuôn và các đoạn mồi được thiết kế bằng cách bổ sung các vị trí nhận biết *XhoI* và *BamHI* (PD-1) và *BglII* và *EcoRI* (PD-L1) vào đầu 5' (cPD-1-EGFP F và R; cPD-L1-EGFP F và R). Các sản phẩm PCR thu được được cắt bằng *XhoI* (Takara) và *BamHI* (Takara) (PD-1) và bằng *BglII* (New England Biolabs) và *EcoRI* (Takara) (PD-L1), và sau đó được tinh chế bằng kit FastGene Gel/PCR Extraction (NIPPON Genetics), sau đó là tách dòng vào vector pEGFP-N2 (Clontech) đã xử lý bằng enzym giới hạn theo cách tương tự. Plasmit biểu hiện thu được cần quan tâm được chiết tách bằng kit QIAGEN Plasmid Midi (Qiagen) và được bảo quản ở -30°C đến khi được sử dụng trong thí nghiệm. Sau đây, plasmit biểu hiện đã tạo ra như vậy được ký hiệu là pEGFP-N2-cPD-1 và pEGFP-N2-cPD-L1.

Đoạn mồi (cPD-1-EGFP F): CCGCTCGAGATGGGGAGCCGGCGGGGGCC (SEQ ID NO.: 29)

Đoạn mồi (cPD-1-EGFP R): CGCGGATCCTGAGGGGCCACAGGCCGGGTC (SEQ ID NO.: 30)

Đoạn mồi (cPD-L1-EGFP F): GAAGATCTATGAGAATGTTTAGTGTGTC (SEQ ID NO.: 31)

Đoạn mồi (cPD-L1-EGFP R): GGAATTCTGTCTCTTCAAATTGTATATC (SEQ ID NO.: 32)

Tế bào COS-7 được cấy chuyển với mật độ 5×10^4 tế bào/cm² trên đĩa 6 giếng, và sau đó được nuôi cấy qua đêm trong môi trường nuôi cấy RPMI 1640 chứa huyết thanh thai bò bất hoạt 10% và L-glutamin 0,01% ở 37°C khi có mặt CO₂ 5%. pEGFP-N2-cPD-1, pEGFP-N2-cPD-L1 hoặc pEGFP-N2 (đối chứng âm) được đưa vào tế bào COS-7 với mật độ 0,4 µg/cm² bằng cách sử dụng Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Tế bào này được nuôi cấy trong 48 giờ (tế bào biểu hiện cPD-1-EGFP và tế bào biểu hiện cPD-L1-EGFP). Để xác định sự biểu hiện của PD-1 và PD-L1 chỏ ở tế bào biểu hiện đã được tạo ra như vậy, sự khu trú nội bào của protein huỳnh quang xanh lá cây tăng cường (EGFP) được quan sát bằng kính hiển vi laze đồng tiêu cự ngược (inverted confocal laser microscope) LSM700 (ZEISS) (Maekawa N, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Adachi M, Takagi S, Kagawa Y, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. PLoS One. Ngày 10 tháng 06 năm 2014;9(6):e98415).

2.4 Tạo ra PD-1, PD-L1 và CD80 chỏ tái tổ hợp

Để khuếch đại vùng ngoại bào trên PD-1, PD-L1 và CD80 chỏ được dự đoán từ các trình tự axit amin giả định của chúng, các đoạn môi được thiết kế. Ngắn gọn là, các đoạn môi có trình tự nhận biết *NheI* hoặc *EcoRV*t (PD-1 và PD-L1) đã bổ sung vào đầu 5' (cPD-1-Ig F và R; cPD-L1-Ig F và R) hoặc có trình tự nhận biết *EcoRV* hoặc *KpnI* (CD80) đã bổ sung vào đầu 5' (cCD80-Ig F và R) được thiết kế. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cADN thu được từ PBMC chỏ sẵn có tổng hợp làm khuôn. Các sản phẩm PCR được cắt bằng *NheI* (Takara) và *EcoRV* (Takara) hoặc bằng *EcoRV* (Takara) và *KpnI* (New England Biolabs) và được tinh chế bằng kit FastGene Gel/PCR Extraction (NIPPON Genetics). Các ADN được tinh chế như vậy được tách dòng riêng lẻ vào vector pCXN2.1-IgG Fc thỏ (Niwa và cộng sự, 1991; Zettlmeissl và cộng sự, 1990; được cung cấp bởi Tiến sĩ T. Yokomizo, trường Juntendo University Graduate School of Medicine, và được biến đổi trong phòng thí nghiệm của tác giả sáng chế) đã xử lý bằng enzym giới hạn theo cách tương tự. Plasmid biểu hiện được tinh chế bằng kit QIAGEN Plasmid Midi (Qiagen) và được bảo quản ở -30°C đến khi được sử dụng trong thí nghiệm. Sau đây, plasmid biểu hiện đã tạo ra như vậy được ký hiệu lần lượt là pCXN2.1-cPD-1-Ig, pCXN2.1-cPD-L1-Ig và pCXN2.1-cCD80-Ig.

Đoạn môi (cPD-1-Ig F): CGCGGCTAGCATGGGGAGCCGGCGGGGGCC (SEQ ID NO.: 33)

Đoạn mồi (cPD-1-Ig R): CGCGGATATCCAGCCCCTGCAACTGGCCGC (SEQ ID NO.: 34)

Đoạn mồi (cPD-L1-Ig F): CGCGGCTAGCATGAGAATGTTTAGTGTCTT (SEQ ID NO.: 35)

Đoạn mồi (cPD-L1-Ig R): CGCGGATATCAGTCCTCTCACTTGCTGGAA (SEQ ID NO.: 36)

Đoạn mồi (cCD80-Ig F): CGCGGATATCATGGATTACACAGCGAAGTG (SEQ ID NO.: 129)

Đoạn mồi (cCD80-Ig R): CGGGGTACCCAGAGCTGTTGCTGGTTAT (SEQ ID NO.: 130)

Từng vector biểu hiện này được chuyển nhiễm sang tế bào Expi293F (Life Technologies) để thu được dịch nuôi cấy chứa protein dung hợp Ig tái tổ hợp. Protein tái tổ hợp đã tạo ra được tinh chế từ dịch nuôi cấy này bằng Ab Capcher Extra (thể đột biến protein A; ProteNova). Sau khi trao đổi đệm bằng nước muối sinh lý đệm phosphat (PBS; độ pH = 7,4) bằng cách sử dụng PD-MidiTrap G-25 (GE Healthcare), mỗi protein tái tổ hợp được bảo quản ở -30°C đến khi được sử dụng trong thí nghiệm (cPD-1-Ig, cPD-L1-Ig và cCD80-Ig). Nồng độ của từng protein được đo bởi kit thử nghiệm protein Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific) trước khi sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

2.5 Nhận biết kháng thể đơn dòng chuột chống kháng PD-L1 bò thể hiện khả năng phản ứng chéo với PD-L1 chó

Để nhận biết kháng thể đơn dòng chuột chống kháng PD-L1 bò thể hiện khả năng phản ứng chéo với PD-L1 chó, phân tích tế bào theo dòng chảy được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể kháng PD-L1 bò được tạo ra trong mục 2.1 nêu trên. Kháng thể kháng PD-L1 bò ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$) được cho phản ứng với 2×10^5 - 1×10^6 tế bào ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau khi rửa, kháng thể kháng PD-L1 bò được phát hiện nhờ kháng thể dê kháng Ig chuột chống đã đánh dấu allophycocyanin (Beckman Coulter). FACS Verse (Becton, Dickinson và Company) được sử dụng để phân tích. Đối chứng isotyp IgG2a (κ) chuột chống (BD Biosciences), đối chứng isotyp IgG1 (κ) chuột chống (BD Biosciences) và đối chứng isotyp IgM (κ) chuột chống (BD Biosciences) được sử dụng làm các đối chứng âm. PBS đã bổ sung huyết thanh dê bất hoạt 10% được sử dụng cho

mỗi lần rửa và pha loãng kháng thể (Maekawa N, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Adachi M, Takagi S, Kagawa Y, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. PLoS One. Ngày 10 tháng 06 năm 2014;9(6):e98415 là tài liệu mô tả việc sử dụng ba kháng thể đơn dòng PD-L1 bò: 4G12 (IgG2a (κ) chuột cống), 5A2 (IgG1 (κ) chuột cống) và 6G7 (IgM (κ) chuột cống).

2.6 Thử nghiệm chọn lọc vùng biến đổi để tạo ra kháng thể dạng khảm chuột cống-chó kháng PD-L1

Trong số 10 dòng kháng thể đơn dòng chuột cống kháng PD-L1 bò thể hiện khả năng phản ứng chéo với PD-L1 chó, 4G12 (IgG2a (κ) chuột cống), 5A2 (IgG1 (κ) chuột cống) và 6G7 (IgM (κ) chuột cống) được chọn và được kiểm tra được tạo ra để xem các kháng thể này có ức chế liên kết PD-1/PD-L1 chó hay không. Ngắn gọn là, PD-1-Ig chó (được tạo ra trong mục 2.4 nêu trên) được cố định trên đĩa 96 giếng đáy bằng và được phong bế bằng BSA 1% và PBS chứa Tween 20 0,05%. PD-L1-Ig chó (được tạo ra trong mục 2.4 nêu trên) được biotin hoá bằng cách sử dụng kit tiếp hợp biotin Lightning-Link (Innova Bioscience) và được cho phản ứng với nhiều nồng độ (0, 2,5, 5 và 10 μ g/ml) kháng thể của chuột cống 4G12, 5A2 và 6G7 kháng PD-L1 bò ở 37°C trong 30 phút, sau đó là bổ sung vào đĩa 96 giếng. Sự liên kết giữa cPD-L1-Ig và cPD-1-Ig được đo bởi phản ứng màu bằng cách sử dụng Neutravidin-HRP (Thermo Fisher Scientific) và cơ chất một thành phần TMB (Bethyl Laboratories). Kết quả là các kháng thể đơn dòng chuột cống 4G12 và 6G7 kháng PD-L1 bò thể hiện hoạt tính ức chế tốt đối với liên kết PD-1/PD-L1 chó, trong khi đó 5A2 không thể hiện hoạt tính ức chế liên kết (Fig.1).

2.7 Tạo vector biểu hiện kháng thể dạng khảm chuột cống-chó kháng PD-L1 (Fig.2)

Bằng cách sử dụng các kháng thể đơn dòng chuột cống 4G12 và 6G7 kháng PD-L1 bò thể hiện hoạt tính ức chế tốt đối với liên kết PD-1/PD-L1 chó (Fig.1) làm vùng biến đổi, hai loại kháng thể dạng khảm chuột cống-chó kháng PD-L1 được tạo ra.

Ngắn gọn là các gen vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được nhận biết từ tế bào lai tạo ra các kháng thể đơn dòng chuột cống 4G12 và 6G7 kháng PD-L1 bò. Hơn nữa, các gen vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể của chuột cống nêu trên được liên kết lần lượt với vùng hằng định trên chuỗi nặng IgG4 và vùng hằng định trên chuỗi nhẹ lamda của kháng thể của chó đã biết, để tạo các trình tự nucleotit, sau đó là tối ưu hoá codon (các SEQ ID NO.: 9 và 10 (trình tự axit amin), các SEQ ID

NO.: 19 và 20 (trình tự nucleotit sau bước tối ưu hoá codon). Sau đó, bước tổng hợp các gen được thực hiện để vị trí nhận biết enzym giới hạn *NotI*, (trình tự KOZAK, trình tự chuỗi nhẹ trên kháng thể dạng khảm, trình tự tín hiệu bổ sung poly-A (PABGH), trình tự khởi động (PCMV), vị trí nhận biết enzym giới hạn *SacI*, trình tự intron (INRBG), trình tự KOZAK, trình tự chuỗi nặng trên kháng thể dạng khảm và vị trí nhận biết enzym giới hạn *XbaI* sẽ được định vị theo thứ tự này. Sợi gen tổng hợp được đưa riêng vào vị trí tách dòng (trình tự nhận biết enzym giới hạn *NotI* và *XbaI* nằm xuôi dòng so với PCMV và nằm giữa INRBG và PABGH) của vector biểu hiện pDC6 (được cung cấp bởi Giáo sư S. Suzuki, Trung tâm nghiên cứu về kiểm soát bệnh truyền nhiễm từ động vật của trường Hokkaido University) bằng cách sử dụng trình tự nhận biết enzym giới hạn nhờ đó các trình tự được liệt kê ở trên sẽ được định vị theo thứ tự đã đề cập ở trên (Fig.2). Bởi vậy, vector biểu hiện kháng thể dạng khảm chuột cống-chó kháng PD-L1 được tạo ra. Mỗi vector biểu hiện được chuyển nhiễm vào tế bào Expi293F (Life Technologies) để thu được dịch nổi nuôi cấy chứa kháng thể dạng khảm. Kháng thể dạng khảm được tinh chế từ dịch nổi này bằng Ab Capcher Extra (thể đột biến protein A; ProteNova) và còn được tinh chế bằng sắc ký lọc gel. SDS-PAGE được thực hiện trong các điều kiện không khử bằng cách sử dụng gel acrylamit 10%. Các vạch được nhuộm bằng kit Quick-CBB (Wako Pure Chemical) và làm mất màu trong nước cất. Mặc dù protein tạp chất được quan sát sau khi tinh chế riêng protein A, kháng thể đã tinh chế rất kỹ có thể thu được bằng cách thực hiện sắc ký lọc gel (Fig.3). Đã xác định bằng phân tích tế bào theo dòng chảy rằng kháng thể đã tinh chế thu được liên kết đặc hiệu với tế bào biểu hiện PD-L1 chó (dữ liệu không được thể hiện). Khi hoạt tính ức chế của hai kháng thể dạng khảm đối với liên kết PD-1/PD-L1 chó được kiểm tra bằng phương pháp được mô tả theo mục 2.6 nêu trên, kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1 thể hiện hoạt tính ức chế liên kết tương tự với hoạt tính ức chế của kháng thể đơn dòng chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò ban đầu của kháng thể trên, trong khi đó khả năng ức chế liên kết bị làm giảm rõ rệt ở kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c6G7 kháng PD-L1 (Fig.4). Do đó, kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1 được chọn làm kháng thể trị liệu, chứa các trình tự vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò (các SEQ ID NO.: 2 và 1 (trình tự axit amin) và các SEQ ID NO.: 16 và 15 (trình tự nucleotit sau bước tối ưu hoá codon)). Trình tự axit amin và trình tự nucleotit (sau bước tối ưu hoá codon) của chuỗi nhẹ của c4G12 được thể hiện ở

các SEQ ID NO.: 9 và 19, và trình tự axit amin và trình tự nucleotit (sau bước tối ưu hoá codon) của chuỗi nặng trên c4G12 được thể hiện ở các SEQ ID NO.: 10 và 20.

2.8 Biểu hiện kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1

Vector pDC6 biểu hiện kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1 như được sử dụng theo mục 2.7 nêu trên được chuyển nhiễm sang tế bào CHO-DG44 (CHO-DG44(dfhr^{-/-})) là tế bào thiếu dihydrofolat reductaza và dòng vô tính biểu hiện tốt được chọn bằng thẩm tách điểm. Hơn nữa, bước xử lý khuếch đại gen được thực hiện bằng cách thêm tải lên tế bào trong môi trường nuôi cấy chứa 60 nM methotrexate (Mtx). Tế bào biểu hiện ổn định kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1 (tên dòng vô tính: 4.3F1) sau khi khuếch đại gen được chuyển sang môi trường nuôi cấy Opti-CHO không Mtx và được nuôi cấy trong điều kiện lắc trong 14 ngày (125 vòng/phút, 37°C, CO₂ 5%). Tỷ lệ sống sót của tế bào được tính toán bằng phương pháp nhuộm xanh trypan (Fig.5). Sự tạo kháng thể dạng khảm trong dịch nổi nuôi cấy được đo bởi ELISA (Fig.5). Dịch nổi nuôi cấy vào ngày 14 được ly tâm 10000 g trong 10 phút để loại bỏ tế bào, sau đó đi qua bộ lọc 0,22 µm trước khi quy trình này tiếp tục các bước tinh chế đối với kháng thể này.

Lưu ý rằng bằng cách trao đổi môi trường nuôi cấy với môi trường nuôi cấy Dynamis và thực hiện bước cấp phù hợp, phương pháp tạo ra kháng thể được cải thiện khoảng hai lần so với phương pháp tạo ra kháng thể thông thường (dữ liệu không được thể hiện).

2.9 Tinh chế kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1

Dịch nổi nuôi cấy theo sáng chế như đã mô tả ở trên được tinh chế bằng Ab Capcher Extra (ProteNova). Phương pháp cột mở được sử dụng để liên kết với nhựa; PBS có độ pH = 7,4 được sử dụng làm dung dịch đệm cân bằng và dung dịch đệm rửa. IgG Elution Buffer (Thermo Scientific) được sử dụng làm dung dịch đệm rửa giải. Tris 1 M được sử dụng làm dung dịch đệm trung hoà. Kháng thể đã tinh chế được cô và trao đổi đệm bằng PBS bằng cách siêu lọc sử dụng Amicon Ultra-15 (50 kDa, Millipore). Kháng thể thu được được cho đi qua bộ lọc 0,22 µm để sử dụng trong các thí nghiệm tương ứng.

Protein kháng thể được phát hiện nhờ SDS-PAGE và phương pháp nhuộm CBB để xác nhận độ tinh khiết của kháng thể đã tinh chế. Bằng cách sử dụng gel gradient SuperSep Ace 5-20% (Wako), kháng thể đơn dòng chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò và kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1 được điện di trong các điều kiện khử và các điều kiện không khử. Các vạch được nhuộm bằng kit Quick-CBB (Wako) và làm mất màu trong nước cất. Các vạch được quan sát ở vị trí phân tử lượng tương ứng với kháng thể. Vạch protein tạp chất không nhận thấy được bằng mắt thường.

2.11 Phương pháp đo ái lực liên kết với cPD-L1-His của kháng thể đơn dòng chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò và kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1

Vector biểu hiện được chuyển nhiễm sang tế bào Expi293F (Life Technologies) để thu được dịch nuôi cấy chứa protein tái tổ hợp. Protein tái tổ hợp đã tạo ra được

tinh chế từ dịch nổi này bằng cách sử dụng nhựa có ái lực với kim loại TALON (Clontech), và dung dịch đệm được trao đổi với PBS bằng cách sử dụng Amicon Ultra-4 Ultracel-3 (Merck Millipore). Protein tái tổ hợp thu được như vậy được bảo quản ở 4°C đến khi được sử dụng trong thí nghiệm (cPD-L1-His). Nồng độ protein được đo bởi kit thử nghiệm protein Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific) để sử dụng trong các thí nghiệm sau đó.

Bằng cách sử dụng máy phân tích tương tác mức phân tử sinh học (Biacore X100), khả lực liên kết với cPD-L1-His của kháng thể đơn dòng chuột công 4G12 kháng PD-L1 bò và kháng thể dạng khảm chuột công-chó c4G12 kháng PD-L1 được đánh giá. Ngắn gọn là kháng thể kháng histidin được cố định trên chip cảm biến CM5, sau đó là bắt giữ cPD-L1-His. Sau đó, kháng thể đơn dòng được bổ sung dưới dạng chất phân tích để quan sát khả năng liên kết đặc hiệu. Cả hai kháng thể đều biểu hiện khả năng liên kết đặc hiệu và khả lực của chúng gần như là tương đương (Bảng 1). Hơn nữa, khả lực liên kết của CD80-Ig và PD-1-Ig chó với cPD-L1-His được đo theo cách tương tự và được thấy rõ là thấp hơn khả lực liên kết của kháng thể dạng khảm chuột công-chó c4G12 kháng PD-L1 (Bảng 1).

Bảng 1. Khả lực liên kết của từng kháng thể và protein tái tổ hợp với PD-L1-His chó

	$k_a (\times 10^6/\text{Ms})$	$k_d (\times 10^{-3}/\text{s})$	KD (nM)
4G12	$2,42 \pm 0,10$	$4,54 \pm 0,19$	$1,88 \pm 0,06$
c4G12	$3,14 \pm 0,19$	$7,19 \pm 0,26$	$2,30 \pm 0,07$
cPD-1			$25,4 \pm 4,89$
cCD80			$24,3 \pm 0,89$

2.12 Hoạt tính ức chế của kháng thể dạng khảm chuột công-chó c4G12 kháng PD-L1 đối với liên kết PD-1/PD-L1 chó và liên kết CD80/PD-L1 (Fig.7)

Bằng cách sử dụng CD80-Ig, PD-L1-Ig và PD-1-Ig chó (đã mô tả ở trên), kháng thể kháng PD-L1 được thử nghiệm về khả năng ức chế liên kết PD-1/PD-L1 chó và liên kết CD80/PD-L1. Ngắn gọn là CD80-Ig hoặc PD-1-Ig chó được cố định trên đĩa 96 giếng đáy bằng. PD-L1-Ig chó được cho phản ứng với nhiều nồng độ (0, 2,5, 5 và 10 $\mu\text{g/ml}$) của kháng thể của chuột công 4G12 kháng PD-L1 bò hoặc kháng thể dạng khảm

chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1 theo quy trình tương tự đã mô tả theo mục 2.6 nêu trên, và khả năng liên kết của PD-L1-Ig chó được đánh giá. Không quan sát được thay đổi về hoạt tính ức chế liên kết do sự khảm kháng thể.

2.13 Tác dụng hoạt hoá tế bào miễn dịch chó của kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1 (Fig.8)

PBMC chó được nuôi cấy trong điều kiện kích thích bằng siêu kháng nguyên Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) trong ba ngày, và các thay đổi về sự sản sinh xytokin bằng cách bổ sung kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1 được đo bởi ELISA bằng cách sử dụng IFN- γ hoặc IL-2 chó DuoSet ELISA (hệ thống R&D). kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1 gia tăng sự sản sinh IL-2 và IFN- γ từ PBMC chó. Hơn nữa, hợp chất tương tự axit nucleic EdU được bổ sung vào môi trường nuôi cấy vào ngày 2 của quá trình nuôi cấy trong điều kiện kích thích SEB. Sau hai giờ, sự hấp thu EdU được đo bởi phân tích tế bào theo dòng chảy bằng cách sử dụng bộ thử nghiệm phân tích tế bào theo dòng chảy Click-iT Plus EdU (Life Technologies). Kết quả là sự hấp thu EdU ở các tế bào lympho CD4⁺ và CD8⁺ của chó được tăng cường bằng cách bổ sung kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1, thể hiện khả năng tăng sinh tế bào được gia tăng.

2.14 Chọn chó có khối u để sử dụng trong thử nghiệm nuôi cấy ở chó

Do việc điều trị đối tượng được mong đợi là có hiệu quả cao hơn khi PD-L1 được biểu hiện ở các khối u, phân tích biểu hiện PD-L1 ở vị trí khối u của chó được thực hiện bằng phương pháp nhuộm hoá mô miễn dịch. Ngắn gọn là các mẫu mô khối u được cố định bằng formaldehyt và được nhúng trong parafin được cắt thành các phần dày 4 μ m bằng thiết bị vi phẫu, gắn với và được làm khô trên phiến kính phủ silan (Matsunami Glass) và được loại bỏ parafin bằng xylen/rượu. Trong khi các phần thu được được ngâm trong dung dịch đệm xitrat [axit xitric (Wako Pure Chemical) 0,37 g, trinati xitrat dihydrat (Kishida Chemical) 2,4 g, nước cất 1000 ml], việc xử lý phục hồi kháng nguyên được thực hiện trong 10 phút bằng vi sóng, sau đó là nhuộm bằng cách sử dụng thiết bị nhuộm miễn dịch tự động Nichirei. Để xử lý sơ bộ, các phần mẫu được ngâm trong dung dịch metanol chứa hydro peroxit 0,3% ở nhiệt độ phòng trong 15 phút và được rửa bằng PBS. Sau đó, kháng thể đơn dòng kháng PD-L1 bò được bổ sung và phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau khi rửa bằng PBS, (chuột cống) MAX-PO

nhuộm đơn giản histofine (Nichirei Bioscience) được bổ sung và phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, sau đó là được tạo màu bằng 3,3'-diaminobenzidin tetrahydroclorua và quan sát bằng kính hiển vi ánh sáng. Chó mắc bệnh ung thư hắc tố miệng hoặc sacôm không biệt hoá trong đó tế bào khối u dương tính với PD-L1 được sử dụng trong thử nghiệm chủng (thử nghiệm lâm sàng) sau đây. Kháng thể đơn dòng kháng PD-L1 bò được tạo ra từ kháng thể đơn dòng chuột chống kháng PD-L1 bò tạo ra tế bào lai (Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology. Tháng 08 năm 2014; 142(4):551-61.

2.15 Thử nghiệm nuôi cấy lên chó

Đối với kháng thể dạng khảm chuột chống-chó c4G12 kháng PD-L1 sẽ được chủng vào chó theo thử nghiệm lâm sàng, dịch nổi nuôi cấy thu được nhờ quy trình đã mô tả theo mục 2.8 nêu trên được tinh chế bằng sắc ký ái lực bằng cách sử dụng MabSelect SuRe LX (GE Healthcare) và sau đó bằng sắc ký trên nền hydroxyapatit bằng cách sử dụng cột đóng sẵn BioScale CHT20-I (Bio-Rad) để loại bỏ tạp chất và protein dạng polyme. Các phân đoạn chứa kết tụ còn được tinh chế bằng sắc ký trao đổi anion bằng cách sử dụng cột đã gói sẵn HiScreen Q-Sepharose HP (GE Healthcare).

(1) Thử nghiệm độ an toàn: Kháng thể dạng khảm chuột chống-chó c4G12 kháng PD-L1 đã tạo ra được sử dụng qua tĩnh mạch cho chó (chó săn thỏ, con cái đã bị cắt buồng trứng, 13 tuổi, thể trọng khoảng 10 kg) theo liều 2 mg/kg, mỗi 2 tuần một lần, tổng cộng 3 lần. Không quan sát thấy tính phản vệ hoặc các tác dụng gây hại khác mà có thể gây vấn đề trong thử nghiệm lâm sàng. (2) Thử nghiệm lâm sàng 1: Kháng thể dạng khảm chuột chống-chó c4G12 kháng PD-L1 đã tạo ra được sử dụng qua tĩnh mạch cho chó dương tính với PD-L1 mắc bệnh ung thư hắc tố miệng tái phát (Fig.9A) (chó chồn cỡ nhỏ, con đực, 11 tuổi, thể trọng khoảng 7,5 kg) theo liều 2 mg/kg hoặc 5 mg/kg, mỗi 2 tuần một lần, tổng cộng 22 lần. Vào tuần 10 sau khi bắt đầu quá trình điều trị, có thể nhận thấy khối u bị giảm kích cỡ đáng kể. Vào tuần 34 sau khi bắt đầu quá trình điều trị, xác định được còn giảm tiếp (Fig.10). Trong quá trình quan sát dài 44 tuần, không quan sát thấy di căn lên hạch bạch huyết hoặc phổi. Khi giảm 30% về đường kính dài nhất của khối u hoặc giảm nhiều hơn so với đường cơ sở được gọi là PR (đáp ứng một phần), tiêu chí của PR đã được thỏa mãn vào các tuần 16-20 và vào tuần 34 và sau đó (Fig.11).

(3) Thử nghiệm lâm sàng 2: Kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1 được sử dụng qua tĩnh mạch cho chó mắc sarcoma không biệt hoá có tổn thương sơ cấp dương tính với PD-L1 (Fig.9B) và có nhiều tổn thương di căn ở cơ bắp trong toàn bộ cơ thể (chó sẫm lông trắng ở vùng cao nguyên phía Tây, con đực đã bị thiến, 12 tuổi, thể trọng khoảng 8 kg) theo lượng 5 mg/kg, cách 2 tuần một lần, tổng cộng 2 lần. Vào tuần 3 tính từ khi bắt đầu điều trị, nhận thấy giảm khối u rõ rệt (Fig.12).

(4) Thử nghiệm lâm sàng 3: Kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1 được sử dụng qua tĩnh mạch cho chó mắc bệnh ung thư hắc tố miệng mà tổn thương sơ cấp đã được loại bỏ bằng phẫu thuật (chó sẫm lông, con cái đã hoạn, 11 tuổi, thể trọng khoảng 10 kg) theo lượng 2 mg/kg hoặc 5 mg/kg, cách 2 tuần một lần, tổng cộng 9 lần. Vào tuần 18 sau khi bắt đầu quá trình điều trị, nhiều tổn thương di căn phổi đã biến mất (Fig.13),

(5) Thử nghiệm lâm sàng 4: Kháng thể dạng khảm chuột cống-chó c4G12 kháng PD-L1 được sử dụng qua tĩnh mạch cho 4 con chó mắc bệnh ung thư hắc tố miệng với di căn phổi theo lượng 2 mg/kg hoặc 5 mg/kg, cách 2 tuần một lần. Mặc dù không quan sát thấy sự giảm rõ về kích cỡ khối u trong quá trình quan sát, thời gian sống sót của chó đã điều trị sau khi xác định bệnh di căn phổi thường dài hơn so với ở nhóm đối chứng (kháng thể không được sử dụng, các nhóm đối chứng trong quá khứ: n=15) (Fig.14). Do đó, thời gian sống sót có thể được kéo dài bằng cách sử dụng kháng thể.

2.16 Phân tích CDR trên kháng thể kháng PD-L1

Các vùng quyết định bổ sung (CDR) trên kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 đã được xác định bằng cách sử dụng NCBI IGBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). Kết quả được thể hiện trên Fig.15.

Ví dụ 2. Ứng dụng của kháng thể kháng PD-L1 vào các loài động vật khác

1.1 Nhận biết các gen PD-L1 cừu, lợn và trâu

Để xác định độ dài đầy đủ của các trình tự mã hoá (CDS) của PD-L1 cừu, lợn và trâu, các đoạn môi để khuếch đại độ dài đầy đủ của CDS từ trình tự nucleotit của các gen PD-L1 cừu, lợn và trâu (số truy cập Ngân hàng gen; XM_004004362, NM_001025221 và XM_613366) được thiết kế đầu tiên (ovPD-L1 CDS F và R; poPD-L1 CDS F và R; buPD-L1 CDS F1, R1, F2 và R2), và sau đó PCR

được thực hiện. Đối với các sản phẩm khuếch đại thu được, các trình tự nucleotit được xác định bằng máy giải trình tự điện di mao quản theo các phương pháp thông thường (Mingala CN, Konnai S, Ikebuchi R, Ohashi K. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* Tháng 11 năm 2011; 34(1):55-63; gen PD-L1 trâu được phát hiện trong bài báo này).

Đoạn mồi (ovPD-L1 CDS F): ATGAGGATATATAGTGTCTTAACAT (SEQ ID NO.: 109)

Đoạn mồi (ovPD-L1 CDS R): TTACGTCTCCTCAAATGTG (SEQ ID NO.: 110)

Đoạn mồi (poPD-L1 CDS F): ATGAGGATATGTAGTATCTTTACAT (SEQ ID NO.: 111)

Đoạn mồi (poPD-L1 CDS R): TTACGTCTCCTCAAATTGTG (SEQ ID NO.: 112)

Đoạn mồi (buPD-L1 CDS F1): ATGAGGATATATAGTGTCTT (SEQ ID NO.: 113)

Đoạn mồi (buPD-L1 CDS R1): GCCACTCAGGACTTGGTGAT (SEQ ID NO.: 114)

Đoạn mồi (buPD-L1 CDS F2): GGGGGTTTACTGTTGCTTGA (SEQ ID NO.: 115)

Đoạn mồi (buPD-L1 CDS R2): TTACGTCTCCTCAAATTGT (SEQ ID NO.: 116)

1.2 Tạo ra tế bào COS-7 biểu hiện PD-1 cừu, PD-L1 cừu, PD-1 lợn và PD-L1 lợn

Để tạo các plasmid biểu hiện PD-1 cừu, PD-L1 cừu, PD-1 lợn và PD-L1 lợn, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cADN thu được từ PBMC cừu hoặc lợn tổng hợp làm mẫu và các đoạn mồi được thiết kế bằng cách bổ sung các vị trí nhận biết *Bgl*II và *Sma*I (PD-1 cừu), *Hind*III và *Sma*I (PD-1 lợn), hoặc *Xho*I và *Sma*I (PD-L1 lợn và cừu) ở đầu 5' (ovPD-1-EGFP F và R; ovPD-L1-EGFP F và R; poPD-1-EGFP F và R; hoặc poPD-L1-EGFP F và R). Các sản phẩm PCR thu được được phân giải bằng *Bgl*II (Takara) và *Sma*I (Takara) (PD-1 cừu), *Hind*III (Takara) và *Sma*I (Takara) (PD-1 lợn), và *Xho*I (Takara) và *Sma*I (Takara) (PD-L1 lợn và cừu), sau đó được tinh chế bằng kit FastGene Gel/PCR Extraction (NIPPON Genetics) và được tách dòng vào vector pEGFP-N2 (Clontech) đã xử lý bằng enzym giới hạn theo cách tương tự. Plasmid biểu hiện được chiết tách bằng cách sử dụng kit FastGene Xpress Plasmid PLUS (NIPPON Genetics) và được bảo quản ở -30°C đến khi được sử dụng trong thí nghiệm. Sau đây, plasmid được tạo từ đó được gọi là pEGFP-N2-ovPD-1, pEGFP-N2-ovPD-L1, pEGFP-N2-poPD-1 hoặc pEGFP-N2-poPD-L1.

Đoạn mồi (ovPD-1-EGFP F): GAAGATCTATGGGGACCCCGCGGGCGCCG (SEQ ID NO.: 117)

Đoạn mồi (ovPD-1-EGFP R): GACCCGGGGAGGGGCCAGGAGCAGTGTCC (SEQ ID NO.: 118)

Đoạn mồi (ovPD-L1-EGFP F): CCGCTCGAGATGAGGATATATAGTGTCT (SEQ ID NO.: 119)

Đoạn mồi (ovPD-L1-EGFP R): ATCCCGGGCGTCTCCTCAAATGTGTAG (SEQ ID NO.: 120)

Đoạn mồi (poPD-1-EGFP F): ACTAAGCTTATGGGGACCCCGCGGG (SEQ ID NO.: 121)

Đoạn mồi (poPD-1-EGFP R): ACTCCCGGGGAGGGGCCAAGAGCAGT (SEQ ID NO.: 122)

Đoạn mồi (poPD-L1-EGFP F): CCGCTCGAGATGAGGATATGTAGTATCTT (SEQ ID NO.: 123)

Đoạn mồi (poPD-L1-EGFP R): ATCCCGGGCGTCTCCTCAAATTGTGTATC (SEQ ID NO.: 124)

Tế bào COS-7 được cấy chuyển với mật độ 5×10^4 tế bào/cm² trên đĩa 6 giếng, và sau đó được nuôi cấy qua đêm trong môi trường nuôi cấy RPMI 1640 chứa huyết thanh thai bò bất hoạt 10% và L-glutamin 0,01% ở 37°C khi có mặt CO₂ 5%. pEGFP-N2-ovPD-1, pEGFP-N2-ovPD-L1, pEGFP-N2-poPD-1, pEGFP-N2-poPD-L1 hoặc pEGFP-N2 (đối chứng âm) được đưa vào tế bào COS-7 với mật độ 0,4 µg/cm² bằng cách sử dụng Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Các tế bào này được nuôi cấy trong 48 giờ (tế bào biểu hiện ovPD-1-EGFP, tế bào biểu hiện ovPD-L1-EGFP, poPD-1-EGFP tế bào biểu hiện, và tế bào biểu hiện poPD-L1-EGFP). Để xác định sự biểu hiện của PD-1 cừu, PD-L1 cừu, PD-1 lợn và PD-L1 lợn ở tế bào biểu hiện đã được tạo ra như vậy, sự khu trú nội bào của EGFP được quan sát bằng kính hiển vi laze đồng tiêu cự ngược LSM700 (ZEISS) hoặc kính hiển vi huỳnh quang tất cả trong một BZ-9000 (KEYENCE).

1.3 Tạo ra PD-L1 cừu và PD-L1 lợn tái tổ hợp

Các đoạn mồi được thiết kế để khuếch đại vùng ngoại bào trên PD-L1 cừu hoặc PD-L1 lợn đã ước định từ trình tự axit amin giả định của chúng. Ngắn gọn là các đoạn mồi có trình tự nhận biết *NheI* hoặc *EcoRV* được thêm vào đầu 5' (ovPD-L1-Ig F và R, hoặc poPD-L1-Ig F và R) được thiết kế. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cADN thu được từ PBMC cừu hoặc lợn tổng hợp làm mẫu. Các sản phẩm PCR được phân giải bằng *NheI* (Takara) và *EcoRV* (Takara) và được tinh chế bằng kit FastGene Gel/PCR Extraction (NIPPON Genetics). Các ADN đã được tinh chế như vậy được tách dòng riêng lẻ vào vector pCXN2.1-IgG Fc thỏ (Niwa và cộng sự, 1991; Zettlmeissl và cộng sự, 1990; được cung cấp bởi Tiến sĩ T. Yokomizo, trường Juntendo University Graduate School of Medicine, và được biến đổi trong phòng thí nghiệm của tác giả sáng chế) đã xử lý bằng enzym giới hạn theo cách tương tự. Plasmid biểu hiện được tinh chế bằng kit FastGene Xpress Plasmid PLUS (NIPPON Genetics) và được bảo quản ở -30°C đến khi được sử dụng trong thí nghiệm. Sau đây, plasmid biểu hiện đã được tạo ra như vậy được gọi lần lượt là pCXN2.1-ovPD-L1-Ig và pCXN2.1-poPD-L1-Ig.

Đoạn mồi (ovPD-L1-Ig F): GACGCTAGCATGAGGATATATAGTGTCT (SEQ ID NO.: 125)

Đoạn mồi (ovPD-L1-Ig R): GCTCTGATATCCCTCGTTTTTGCTGGAT (SEQ ID NO.: 126)

Đoạn mồi (poPD-L1-Ig F): GACGCTAGCATGAGGATATGTAGTATCTT (SEQ ID NO.: 127)

Đoạn mồi (poPD-L1-Ig R): AGCTTGATATCCCTCTTTCTTGCTGGATC (SEQ ID NO.: 128)

Ba mươi microgam pCXN2.1-ovPD-L1-Ig hoặc pCXN2.1-poPD-L1-Ig được đưa vào $7,5 \times 10^7$ tế bào Expi293F (Life Technologies) bằng cách sử dụng Expifectamin (Life Technologies). Sau 6 ngày nuôi cấy trong điều kiện lắc, dịch nổi nuôi cấy được thu lại. Dịch nổi nuôi cấy chứa protein tái tổ hợp dung hợp Fc. Protein tái tổ hợp Fc đã tạo ra được tinh chế từ dịch nổi này bằng cách sử dụng Ab-Capcher Extra (ProteNova). Sau khi tinh chế, dung dịch đậm được trao đổi với PBS (độ pH = 7,4) bằng cách sử dụng cột tách muối PD-10 (GE Healthcare). Protein tái tổ hợp thu được được bảo quản ở -30°C đến khi được sử dụng trong thí nghiệm (PD-L1-Ig cừu). Nồng độ của PD-L1-Ig cừu và PD-L1-Ig lợn đã tinh chế được đo bởi bộ định lượng ELISA IgG thỏ (BETHYL). Auto

Palte Washer BIO WASHER 50 (DS Pharma Biomedical) được sử dụng cho mỗi lần rửa trong ELISA. Độ hấp thụ được đo bởi thiết bị đọc vi đĩa MTP-650FA (Corona Electric).

1.4 Khả năng phản ứng của kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò với PD-L1 lợn và cừu

Đã xác định bằng phân tích tế bào theo dòng chảy là kháng thể đơn dòng chuột cống kháng PD-L1 bò phản ứng chéo với PD-L1 lợn và cừu. Tế bào COS-7 biểu hiện PD-L1-EGFP cừu hoặc lợn được phong bế bằng PBS đã bổ sung huyết thanh dê bất hoạt 10% ở nhiệt độ phòng trong 15 phút và phản ứng với 10 µg/ml kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau khi rửa, tế bào này được cho phản ứng với kháng thể dê kháng Ig chuột cống đã đánh dấu allophycoyanin (Beckman Coulter) ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. FACS Verse (BD Bioscience) được sử dụng để phân tích. Đối chứng isotyp IgG2a (κ) chuột cống (BD Bioscience) được sử dụng làm kháng thể đối chứng âm. PBS đã bổ sung albumin huyết thanh bò 1% được sử dụng cho mỗi lần rửa và pha loãng kháng thể.

Kết quả thí nghiệm được thể hiện trên Fig.16. Kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò được xác định có liên kết với PD-L1 lợn và cừu.

1.5 Khả năng phản ứng của kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò với tế bào bạch cầu ở trâu

Máu ngoại vi của trâu (*Bubalus bubalis*; trâu châu Á) được làm tan huyết bằng dung dịch đệm ACK để phân lập tế bào bạch cầu. Sau khi phong bế bằng PBS đã bổ sung huyết thanh dê bất hoạt 10% ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, phản ứng với kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò, phức peridinin-chất diệt lục-protein/kháng thể kháng CD14 bò đã đánh dấu xyanin 5.5 (IgG1 chuột nhắt, CAM36A, VMRD) và kháng thể kháng CD11b bò (IgG2b chuột nhắt, CC126, AbD Serotec) được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau khi rửa, phản ứng với kháng thể dê kháng Ig chuột cống đã đánh dấu allophycoyanin (Beckman Coulter) và kháng thể dê kháng IgG2 chuột nhắt đã đánh dấu florescein isothiocyanat (Beckman Coulter) được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. FACS Calibur (BD Biosciences) được sử dụng để phân tích. Đối chứng isotyp IgG2a (κ) chuột cống (BD Biosciences) được sử dụng làm kháng thể đối chứng âm. PBS đã bổ sung huyết thanh dê bất hoạt 10% được sử dụng cho mỗi lần rửa và pha loãng kháng thể.

Kết quả thí nghiệm được thể hiện trên Fig.17. Kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò liên kết mạnh với đại thực bào máu (tế bào CD14⁺ CD11b⁺) của trâu. Mặt khác, kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò liên kết yếu với các tế bào lympho (tế bào CD14⁻ CD11b⁻) của trâu. Sự chênh lệch về đặc tính liên kết này được tin là phản ánh mức độ biểu hiện của PD-L1 ở đại thực bào và các tế bào lympho.

1.6 Thử nghiệm ức chế đối với liên kết PD-1/PD-L1 lợn hoặc cừu với kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò

Bằng cách sử dụng tế bào COS-7 biểu hiện PD-1-EGFP cừu và protein tái tổ hợp PD-L1-Ig cừu, hoặc tế bào COS-7 biểu hiện PD-1-EGFP lợn và protein tái tổ hợp PD-L1-Ig lợn, sự ức chế liên kết PD-1/PD-L1 lợn hoặc cừu do kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò (4G12) được kiểm tra. Ngăn gọn là kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò theo nhiều nồng độ (0, 1, 5, 10, 20, 50 µg/ml) được cho phản ứng trước với PD-L1-Ig cừu (nồng độ cuối cùng là 1 µg/ml) hoặc PD-L1-Ig lợn (nồng độ cuối cùng là 5 µg/ml) ở 37°C trong 30 phút. Sau đó, kháng thể 4G12 được cho phản ứng với 2x10⁵ tế bào COS-7 biểu hiện PD-1-EGFP cừu hoặc tế bào COS-7 biểu hiện PD-1-EGFP lợn ở 37°C trong 30 phút. Sau khi rửa, PD-L1-Ig cừu hoặc PD-L1-Ig lợn đã liên kết với bề mặt tế bào được phát hiện nhờ F(ab')₂ dê kháng IgG thỏ (H+L) đã đánh dấu Alexa Fluor 647 (Life Technologies). FACS Verse (BD Biosciences) được sử dụng để phân tích. Đối chứng isotyp IgG2a (κ) chuột cống (BD Biosciences) được sử dụng làm kháng thể đối chứng âm. Coi tỷ lệ thành phần của tế bào được liên kết với PD-L1-Ig mà không bổ sung kháng thể là 100%, tỷ lệ thành phần của tế bào được liên kết với PD-L1-Ig theo từng nồng độ kháng thể được thể hiện dưới dạng giá trị tương đối.

Kết quả cho thấy kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò có khả năng ức chế liên kết PD-1/PD-L1 cừu và liên kết PD-1/PD-L1 lợn dựa theo nồng độ (Fig.18).

Ví dụ 3

1. Giới thiệu

Kháng thể gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-1), thụ thể ức chế miễn dịch, và phối tử của nó, phối tử gây chết tế bào theo chương trình 1 (PD-L1) là các phân tử được phát hiện bởi Giáo sư Tasuku Honjo và cộng sự, trường Kyoto University, làm các yếu tố ức chế đáp ứng miễn dịch quá mức và liên quan sâu sắc tới khả năng dung nạp

miễn dịch. Gần đây, các phân tử này đã được chứng thực là cũng liên quan tới sự ức chế miễn dịch ở các khối u. Theo ví dụ này, để tạo ra liệu pháp mới đối với bệnh truyền nhiễm ở bò, các tác giả sáng chế đã tạo ra gen kháng thể dạng khảm bằng cách liên kết gen vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng chuột chống kháng PD-L1 bò (4G12) có khả năng ức chế liên kết giữa PD-1 và PD-L1 bò với gen vùng hằng định của globulin miễn dịch bò (IgG1) với các đột biến đã được đưa vào vị trí liên kết giả định của thụ thể Fc γ trên miền CH2 để ức chế hoạt tính ADCC; xem Fig.19 về số axit amin và các đột biến: 250 E→P, 251 L→V, 252 P→A, 253 G→đột biến mất đoạn, 347 A→S, 348 P→S; Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology Tháng 08 năm 2014; 142(4):551-561). Gen kháng thể dạng khảm này được đưa vào tế bào buồng trứng ở chuột đồng Trung Quốc (tế bào CHO). Bằng cách nuôi cấy/tăng sinh các tế bào thu được, các tác giả sáng chế đã thu được kháng thể dạng khảm chuột đồng-chống PD-L1 bò (ch4G12) và tác dụng *in vitro* và *in vivo* của nó được xác định.

2. Nguyên liệu và phương pháp

Tạo ra tế bào biểu hiện PD-1 và PD-L1 bò

Trình tự nucleotit của các cADN có đầy đủ độ dài của gen PD-1 bò (số truy cập Ngân hàng gen AB510901; Ikebuchi R, Konnai S, Sunden Y, Onuma M, Ohashi K. Microbiol. Immunol. Tháng 05 năm 2010; 54(5):291-298) và gen PD-L1 bò (số truy cập Ngân hàng gen AB510902; Ikebuchi R, Konnai S, Shirai T, Sunden Y, Murata S, Onuma M, Ohashi K. Vet. Res. 26 Tháng 09 năm 2011; 42:103) được xác định. Dựa trên thông tin di truyền thu được, tế bào biểu hiện màng PD-1 bò và PD-L1 bò được tạo ra. Đầu tiên, để tạo plasmit biểu hiện PD-1 hoặc PD-L1 bò, PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cADN thu được từ PBMC bò tổng hợp làm mẫu và thiết kế các đoạn mồi có các vị trí nhận biết *NotI* và *HindIII* (PD-1 bò) và các vị trí nhận biết *NheI* và *XhoI* (PD-L1 bò) ở đầu 5' (boPD-1-myc F và R; boPD-L1-EGFP F và R). Các sản phẩm PCR được phân giải bằng *NotI* (Takara) và *HindIII* (Takara; PD-1 bò), *NheI* (Takara) và *XhoI* (Takara; PD-L1 bò), được tinh chế bằng kit FastGene Gel/PCR Extraction (NIPPON Genetics) và được tách dòng vào vector pCMV-Tag1(Agilent Technologies; PD-1 bò) hoặc vector pEGFP-N2 (Clontech; PD-L1 bò) đã xử lý bằng enzym giới hạn theo cách tương tự. Plasmit biểu hiện thu được cần quan tâm được chiết tách bằng kit QIAGEN

Plasmid Midi (Qiagen) và được bảo quản ở -30°C đến khi được sử dụng trong thí nghiệm. Sau đây, plasmid biểu hiện đã được tạo ra như vậy được gọi là pCMV-Tag1-boPD-1.

Đoạn mồi (boPD-1-myc F): ATATGCGGCCGCATGGGGACCCCGCGGGCGCT
(SEQ ID NO.: 133)

Đoạn mồi (boPD-1-myc R): GCGCAAGCTTTCAGAGGGGCCAGGAGCAGT (SEQ ID NO.: 134)

Đoạn mồi (boPD-L1-EGFP F):
CTAGCTAGCACCATGAGGATATATAGTGTCTTAAC (SEQ ID NO.: 135)

Đoạn mồi (boPD-L1-EGFP R): CAATCTCGAGTTACAGACAGAAGATGACTGC
(SEQ ID NO.: 136)

Tế bào biểu hiện màng PD-1 bò được tạo ra nhờ quy trình được mô tả dưới đây. Đầu tiên, 2,5 μg pCMV-Tag1-boPD-1 được đưa vào 4×10^6 tế bào CHO-DG44 bằng cách sử dụng Lipofectamine LTX (Invitrogen). Bốn mươi tám giờ sau, môi trường nuôi cấy này được trao đổi với môi trường nuôi cấy CD DG44 (Life Technologies) chứa G418 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Enzo Life Science), phụ gia GlutaMAX 20 ml/L (Life Technologies), và Pluronic F-68 10% 18 ml/L (Life Technologies), sau đó là bước chọn lọc. Tế bào biểu hiện thu được được cho phản ứng với kháng thể của chuột chống 5D2 kháng PD-1 bò ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa, tế bào này còn được cho phản ứng với kháng thể đã đánh dấu vi hạt kháng IgG chuột chống (Miltenyi Biotec) ở nhiệt độ phòng. Tế bào biểu hiện PD-1 bò ở mức cao được phân lập bằng Auto MACS (Miltenyi Biotec). Sau đó, bước phân lập lại được thực hiện theo cách tương tự để thu được độ tinh khiết cao hơn nữa. Tế bào biểu hiện thu được được tách dòng bằng cách giới hạn pha loãng để từ đó thu được dòng tế bào vô tính CHO DG44 biểu hiện PD-1 bò ở mức cao (tế bào biểu hiện PD-1 bò).

Tế bào biểu hiện màng PD-L1 bò được tạo ra nhờ quy trình được mô tả dưới đây. Đầu tiên, 2,5 μg pEGFP-N2-boPD-L1 hoặc pEGFP-N2 (đối chứng âm) được đưa vào 4×10^6 tế bào CHO-DG44 bằng cách sử dụng Lipofectamine LTX (Invitrogen). Bốn mươi tám giờ sau, môi trường nuôi cấy được trao đổi với môi trường nuôi cấy CD DG44 (Life Technologies) chứa G418 (Enzo Life Science) 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$, phụ gia GlutaMAX (Life Technologies) 20 ml/L, và Pluronic F-68 10% (Life Technologies) 18 ml/L, sau đó

là chọn lọc và tách dòng bằng cách giới hạn pha loãng (dòng tế bào biểu hiện PD-L1 bò). Để xác định sự biểu hiện của PD-L1 bò ở dòng tế bào biểu hiện đã được tạo ra như vậy, sự khu trú nội bào của EGFP được quan sát bằng kính hiển vi laze đồng tiêu cự ngược LSM700 (ZEISS).

Tạo ra PD-L1 và PD-1 bò hòa tan

Plasmid biểu hiện PD-1-Ig bò được tạo ra nhờ quy trình được mô tả dưới đây. Ngắn gọn là peptit tín hiệu và vùng ngoại bào trên PD-1 bò (số truy cập Ngân hàng gen AB510901) được liên kết với miền Fc của vùng hằng định trên IgG1 bò đã biết (số truy cập Ngân hàng gen X62916) để tạo trình tự gen. Sau khi các codon được tối ưu hoá ở tế bào CHO, bước tổng hợp gen được thực hiện theo cách mà trình tự nhận biết *NotI*, (trình tự KOZAK, trình tự peptit tín hiệu PD-1 bò, trình tự vùng ngoại bào gen PD-1 bò, trình tự vùng IgG1 Fc bò, và trình tự nhận biết *XbaI* sẽ có vị trí trên gen theo thứ tự này. Cần lưu ý ở đây là IgG1 bò được tạo đột biến để ức chế hoạt tính ADCC; cụ thể hơn, đột biến được đưa vào vị trí liên kết giả định đối với thụ thể Fc γ trên miền CH2 (các vị trí đột biến: 185 E $\rightarrow$ P, 186 L $\rightarrow$ V, 187 P $\rightarrow$ A, 189 G $\rightarrow$ đột biến mất đoạn, 281 A $\rightarrow$ S, 282 P $\rightarrow$ S; Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology Tháng 08 năm 2014; 142(4):551-561; trình tự axit amin của PD-1-Ig và các vị trí đột biến được bộc lộ trên Fig.2 của tài liệu này). Sợi gen tổng hợp được phân giải bằng *NotI* (Takara) và *XbaI* (Takara), được tinh chế bằng kit FastGene Gel/PCR Extraction (NIPPON Genetics), và được đưa vào vị trí tách dòng (trình tự nhận biết enzym giới hạn *NotI* và *XbaI* nằm xuôi dòng so với PCMV và nằm giữa INRBG và PABGH) của vector biểu hiện pDN11 (được cung cấp bởi Giáo sư S. Suzuki, Trung tâm nghiên cứu về kiểm soát bệnh truyền nhiễm từ động vật của trường Hokkaido University) đã xử lý bằng enzym giới hạn theo cách tương tự, từ đó vector biểu hiện PD-1-Ig bò được tạo ra. Plasmid biểu hiện được tinh chế bằng kit QIAGEN Plasmid Midi (Qiagen) và được bảo quản ở -30°C đến khi được sử dụng trong thí nghiệm. Sau đây, plasmid biểu hiện đã được tạo ra như vậy được gọi là pDN11-boPD-1-Ig.

Plasmid biểu hiện PD-L1-Ig bò được tạo ra nhờ quy trình được mô tả dưới đây. Để khuếch đại peptit tín hiệu và vùng ngoại bào trên PD-L1 bò (số truy cập Ngân hàng gen AB510902), các đoạn mồi được thiết kế mà có các vị trí nhận biết *NheI* và *EcoRV* được thêm vào đầu 5' (boPD-L1-Ig F và R). PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cADN thu được từ PBMC bò tổng hợp làm mẫu. Các sản phẩm PCR được phân giải

bằng NheI (Takara) và EcoRV (Takara), được tinh chế bằng kit FastGene Gel/PCR Extraction (NIPPON Genetics) và được tách dòng vào vector pCXN2.1-IgG1 Fc thô (Niwa và cộng sự, 1991; Zettlmeissl và cộng sự, 1990; được cung cấp bởi Tiến sĩ T. Yokomizo, Juntendo University Graduate School of Medicine, và được biến đổi trong phòng thí nghiệm của tác giả sáng chế) đã xử lý bằng enzym giới hạn theo cách tương tự. Plasmid biểu hiện được tinh chế bằng kit QIAGEN Plasmid Midi (Qiagen) hoặc bộ kit FastGene Xpress Plasmid PLUS (NIPPON Genetics) và được bảo quản ở -30°C đến khi được sử dụng trong thí nghiệm. Sau đây, plasmid biểu hiện đã được tạo ra như vậy được gọi là pCXN2.1-boPD-L1-Ig.

Đoạn môi (boPD-L1-Ig F): GCTAGCATGAGGATATATAGTGTCTTAAC (SEQ ID NO.: 137)

Đoạn môi (boPD-L1-Ig R): GATATCATTCCTCTTTTTTGCTGGAT (SEQ ID NO.: 138)

Tế bào biểu hiện PD-1-Ig bò hòa tan được tạo ra nhờ quy trình được mô tả dưới đây. Ngắn gọn là 2,5 µg pDN11-boPD-1-Ig được đưa vào 4×10^6 tế bào CHO-DG44 bằng cách sử dụng Lipofectamine LTX (Invitrogen). Bốn mươi tám giờ sau, môi trường nuôi cấy được trao đổi với môi trường nuôi cấy OptiCHO AGT (Life Technologies) chứa G418 800 µg/ml (Enzo Life Science) và phụ gia GlutaMAX 20 ml/L (Life Technologies). Sau khi được nuôi cấy trong 3 tuần, tế bào này được chọn lọc. Ngắn gọn là nồng độ của protein tái tổ hợp dung hợp Fc trong dịch nổi nuôi cấy của các dòng tế bào vô tính thu được được đo bởi ELISA bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng thô kháng IgG F(c) bò (Rockland) để từ đó chọn lọc các dòng tế bào vô tính mà biểu hiện protein tái tổ hợp dung hợp Fc ở mức cao. Dòng tế bào biểu hiện ở mức cao thu được được chuyển sang môi trường nuôi cấy không chứa G418 và được nuôi cấy trong điều kiện lắc trong 14 ngày, sau đó là bước thu dịch nổi nuôi cấy. Dịch nổi nuôi cấy chứa protein tái tổ hợp dung hợp Fc được siêu lọc bằng Centricon Plus-70 (Millipore). Sau đó, protein tái tổ hợp dung hợp Fc được tinh chế bằng Ab-Capcher Extra (ProteNova). Sau khi tinh chế, dung dịch đệm được trao đổi với nước muối sinh lý đệm phosphat (PBS; độ pH = 7,4) bằng cách sử dụng cột tách muối PD-10 (GE Healthcare). Protein thu được được bảo quản ở -30°C đến khi được sử dụng trong thí nghiệm (PD-1-Ig bò). Nồng độ của PD-1-Ig bò đã tinh chế được đo bởi ELISA bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng thô IgG F(c) (Rockland). Thiết bị rửa đĩa tự động BIO WASHER 50 (DS

Pharma Biomedical) được sử dụng cho mỗi lần rửa trong ELISA. Độ hấp thụ được đo bởi thiết bị đọc vi đĩa MTP-650FA (Corona Electric).

Tế bào biểu hiện PD-L1-Ig bò hòa tan được tạo ra nhờ quy trình được mô tả dưới đây. Ngắn gọn là 30 μg pCXN2.1-boPD-L1-Ig được đưa vào $7,5 \times 10^7$ tế bào Expi293F (Life Technologies) bằng cách sử dụng Expifectamine (Life Technologies). Sau 7 ngày nuôi cấy trong điều kiện lác, dịch nổi nuôi cấy được thu lại. Protein tái tổ hợp được tinh chế từ dịch nổi này bằng cách sử dụng Ab-Capcher Extra (ProteNova; PD-L1-Ig bò). Sau khi tinh chế, dung dịch đậm được trao đổi với PBS (độ pH = 7,4) bằng cách sử dụng PD MiniTrap G-25 (GE Healthcare). Protein thu được được bảo quản ở -30°C đến khi được sử dụng trong thí nghiệm (PD-L1-Ig bò). Nồng độ của PD-L1-Ig bò đã tinh chế được đo bằng cách sử dụng bộ định lượng ELISA IgG thô (Bethyl). Thiết bị rửa đĩa tự động BIO WASHER 50 (DS Pharma Biomedical) được sử dụng cho mỗi lần rửa trong ELISA. Độ hấp thụ được đo bởi thiết bị đọc vi đĩa MTP-650FA (Corona Electric).

Phương pháp tạo ra tế bào tạo kháng thể đơn dòng chuột cống kháng PD-L1 bò

Chuột cống được gây miễn dịch ở chân bằng PD-L1-Ig bò (Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology Tháng 08 năm 2014.; 142(4):551-561; PD-L1-Ig bò được tạo ra bằng phương pháp đã bộc lộ trong tài liệu này và được sử dụng để gây miễn dịch). Các tế bào lai được tạo ra bởi phương pháp hạch bạch huyết chậu hông để từ đó thu được tế bào lai 4G12 tạo kháng thể đơn dòng chuột cống kháng PD-L1 bò. Đối với phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng chuột cống kháng PD-L1 bò, chi tiết được bộc lộ trong tài liệu phi sáng chế sau đây (Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Vet. Res. Ngày 22 tháng 07 năm 2013; 44:59; Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology Tháng 08 năm 2014; 142(4):551-561).

Phương pháp tạo ra vector biểu hiện kháng thể dạng khảm chuột cống-bò kháng PD-L1 bò

Kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò được tạo ra bằng cách dung hợp vùng hằng định kháng thể trên IgG1 bò và Ig λ với kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò được sử dụng làm vùng biến đổi kháng thể.

Đầu tiên, các gen của các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được nhận biết từ tế bào lai sẽ tạo kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò. Sau đó, trình tự

gen được tạo ra, trong đó các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trên kháng thể 4G12 được liên kết với các vùng hằng định đã biết lần lượt trên IgG1 bò (chuỗi nặng; được biến đổi từ số truy cập Ngân hàng gen X62916) và Igλ bò (chuỗi nhẹ; số truy cập Ngân hàng gen X62917), và bước tối ưu hoá codon được tiến hành [kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò: các SEQ ID NO.: 105 và 106 (trình tự axit amin), các SEQ ID NO.: 107 và 108 (trình tự nucleotit sau bước tối ưu hoá codon)]. Lưu ý rằng để áp chế hoạt tính ADCC ở IgG1 bò, đột biến được thêm vào vị trí liên kết giả định của thụ thể Fcγ trên miền CH2 (xem Fig.19 về số axit amin và các đột biến: 250 E→P, 251 L→V, 252 P→A, 253 G→đột biến mất đoạn, 347 A→S, 348 P→S; Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Yokoyama K, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Immunology Tháng 08 năm 2014; 142(4):551-561). Sau đó, gen được tổng hợp nhân tạo theo cách mà trình tự nhận biết *NotI*, (trình tự KOZAK, trình tự chuỗi nhẹ kháng thể dạng khảm, trình tự tín hiệu bổ sung poly-A (PABGH), trình tự khởi động (PCMV), trình tự nhận biết *SacI*, trình tự intron (INRBG), (trình tự KOZAK, trình tự chuỗi nặng kháng thể dạng khảm và trình tự nhận biết *XbaI* sẽ có vị trí theo thứ tự này. Sợi gen tổng hợp được phân giải bằng *NotI* (Takara) và *XbaI* (Takara), được tinh chế bằng kit FastGene Gel/PCR Extraction (NIPPON Genetics) và được tách dòng vào vị trí tách dòng (trình tự nhận biết enzym giới hạn *NotI* và *XbaI* nằm xuôi dòng so với PCMV và nằm giữa INRBG và PABGH) ở plasmid biểu hiện pDC6 (được cung cấp bởi Giáo sư S. Suzuki, Trung tâm nghiên cứu về kiểm soát bệnh truyền nhiễm từ động vật của trường Hokkaido University) đã xử lý bằng enzym giới hạn theo cách tương tự (Fig.20). Plasmid thu được được chiết tách bằng kit QIAGEN Plasmid Midi (Qiagen) và được bảo quản ở -30°C đến khi được sử dụng trong thí nghiệm. Sau đây, plasmid biểu hiện đã tạo từ đó được gọi là pDC6-boPD-L1ch4G12.

Biểu hiện kháng thể dạng khảm chuột cống-bò kháng PD-L1 bò

pDC6-boPD-L1ch4G12 được chuyển nhiễm sang tế bào CHO-DG44 (CHO-DG44 (d^{hfr}⁻)) là tế bào thiếu dihydrofolat reductaza. Bốn mươi tám giờ sau, môi trường nuôi cấy được trao đổi với môi trường nuôi cấy OptiCHO AGT (Life Technologies) chứa phụ gia GlutaMAX 20 ml/L (Life Technologies). Sau khi được nuôi cấy trong 3 tuần, tế bào này được chọn lọc và tách dòng bằng cách giới hạn pha loãng. Sau đó, nồng độ của kháng thể dạng khảm trong các dịch nuôi cấy được đo bởi thẩm tách dạng điểm và ELISA bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng thử kháng IgG F(c) bò (Rockland)

để từ đó chọn lọc dòng vô tính biểu hiện tốt. Hơn nữa, các dòng vô tính đã chọn biểu hiện kháng thể dạng khảm chuột công-bò kháng PD-L1 bò ở mức cao được xử lý khuếch đại gen bằng cách thêm tải gồm môi trường nuôi cấy chứa methotrexate (Mtx) 60 nM. Dòng tế bào vô tính đã được tạo ra như vậy, biểu hiện kháng thể dạng khảm chuột công-bò kháng PD-L1 bò một cách ổn định, được chuyển sang môi trường nuôi cấy Opti-CHO AGT không chứa Mtx và được nuôi cấy trong điều kiện lắc trong 14 ngày (125 vòng/phút, 37°C, CO₂ 5%). Sự tạo thành kháng thể dạng khảm trong dịch nổi nuôi cấy được đo bởi ELISA bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng thử kháng IgG F(c) bò (Rockland). Thiết bị rửa đĩa tự động BIO WASHER 50 (DS Pharma Biomedical) được sử dụng cho mỗi lần rửa trong ELISA. Độ hấp thụ được đo bởi thiết bị đọc vi đĩa MTP-650FA (Corona Electric). Dịch nổi nuôi cấy vào ngày 14 được ly tâm 10000 g trong 10 phút để loại tế bào, và dịch nổi ly tâm được cho đi qua bộ lọc Steritop-GP 0,22 µm (Millipore) để khử trùng và sau đó được bảo quản ở 4°C đến khi được tinh chế.

Tinh chế kháng thể dạng khảm chuột công-bò kháng PD-L1 bò

Từ dịch nổi nuôi cấy được tạo ra như đã mô tả ở trên, mỗi kháng thể dạng khảm được tinh chế bằng cách sử dụng Ab Capcher Extra (ProteNova). Phương pháp cột mở được sử dụng để liên kết với nhựa; PBS có độ pH = 7,4 được sử dụng làm dung dịch đệm cân bằng và dung dịch đệm rửa. Dung dịch đệm rửa giải IgG (Thermo Fisher Scientific) được sử dụng làm dung dịch đệm rửa giải. Tris 1M (độ pH = 9,0) được sử dụng làm dung dịch đệm trung hoà. Kháng thể đã tinh chế được trao đổi đệm bằng PBS (độ pH = 7,4) bằng cách sử dụng cột tách muối PD-10 (GE Healthcare) và được cô bằng cách sử dụng Amicon Ultra-15 (50 kDa, Millipore). Kháng thể dạng khảm được tinh chế như vậy được cho đi qua bộ lọc dạng xylan 0,22 µm (Millipore) để khử trùng và được bảo quản ở 4°C đến khi được sử dụng trong thí nghiệm.

Xác nhận độ tinh khiết của kháng thể dạng khảm chuột công-bò kháng PD-L1 bò đã tinh chế (Fig.21)

Protein kháng thể được phát hiện nhờ SDS-PAGE và phương pháp nhuộm CBB để xác định độ tinh khiết của kháng thể dạng khảm chuột công-bò kháng PD-L1 bò đã tinh chế. Bằng cách sử dụng gel acrylamit 10%, kháng thể dạng khảm chuột công-bò đã tinh chế được điện di trong các điều kiện khử (khử bằng 2-mercaptoetanol của Sigma-Aldrich) và các điều kiện không khử. Các vạch được nhuộm bằng kit Quick-CBB (Wako) và làm mất màu trong nước cất. Kết quả được thể hiện trên Fig.21. Các vạch

được quan sát tại các vị trí dự đoán, nghĩa là tại 25 kDa và 50 kDa trong các điều kiện khử và tại 150 kDa trong các điều kiện không khử.

Tính đặc hiệu liên kết của kháng thể dạng khảm chuột cống-bò kháng PD-L1 bò (Fig.22)

Đã xác nhận bằng phân tích tế bào theo dòng chảy rằng kháng thể dạng khảm chuột cống-bò kháng PD-L1 bò liên kết đặc hiệu với tế bào biểu hiện PD-L1 bò (đã mô tả ở trên). Đầu tiên, kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò hoặc kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò được cho phản ứng với tế bào biểu hiện PD-L1 bò ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau khi rửa, kháng thể dê kháng Ig chuột cống đã đánh dấu APC (Southern Biotech) hoặc F(ab')₂ dê kháng IgG (H+L) bò đã đánh dấu Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch) được cho phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đối chứng isotyp IgG2a (κ) chuột cống (BD Biosciences) hoặc kháng thể IgG1 bò (Bethyl) được sử dụng làm kháng thể đối chứng âm. Sau khi rửa, mỗi kháng thể của chuột cống hoặc kháng thể dạng khảm chuột cống-bò đã liên kết với bề mặt tế bào được phát hiện bằng FACS Verse (BD Biosciences). PBS đã bổ sung albumin huyết thanh bò 1% (Sigma-Aldrich) được sử dụng cho mỗi lần rửa và pha loãng kháng thể.

Kết quả thí nghiệm được thể hiện trên Fig.22. Kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò đã bộc lộ là liên kết với tế bào biểu hiện PD-L1 bò theo cách tương tự với kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò.

Hoạt tính ức chế của kháng thể dạng khảm chuột cống-bò kháng PD-L1 đối với liên kết PD-1/PD-L1 bò

(1) Thử nghiệm ức chế liên kết đối với tế bào biểu hiện PD-L1 bò và PD-1 bò hòa tan (Fig.23)

Bằng cách sử dụng tế bào biểu hiện PD-L1 bò (đã mô tả ở trên) và PD-1-Ig bò (đã mô tả ở trên), sự ức chế liên kết PD-1/PD-L1 bò do kháng thể kháng PD-L1 bò được kiểm tra. Đầu tiên, 2×10^5 tế bào biểu hiện PD-L1 bò được cho phản ứng theo nhiều nồng độ (0, 0,32, 0,63, 1,25, 2,5, 5 hoặc 10 µg/ml) của kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò hoặc kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đối chứng isotyp IgG2a (κ) chuột cống (BD Biosciences) hoặc kháng thể IgG1 bò (Bethyl) được sử dụng làm kháng thể đối chứng âm. Sau khi rửa, PD-1-Ig bò đã đánh dấu bằng biotin bằng cách sử dụng kit đánh dấu biotin loại A Lightning-Link (Innova Bioscience) được bổ sung để có nồng độ cuối cùng là 2 µg/ml, sau đó là phản ứng trong 30 phút nữa ở nhiệt độ phòng. Sau đó, sau khi rửa, PD-1-Ig bò

đã liên kết với bề mặt tế bào được phát hiện nhờ streptavidin đã đánh dấu APC (BioLegend). FACS Verse (BD Biosciences) được sử dụng để phân tích. PBS đã bổ sung albumin huyết thanh bò 1% (Sigma-Aldrich) được sử dụng cho mỗi lần rửa và pha loãng kháng thể. Coi tỷ lệ thành phần của tế bào đã liên kết với PD-1-Ig mà không bổ sung kháng thể là 100%, tỷ lệ thành phần của tế bào đã liên kết với PD-1-Ig theo từng nồng độ kháng thể được thể hiện dưới dạng giá trị tương đối.

Kết quả thí nghiệm được thể hiện trên Fig.23. Như kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò, kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò đã bộc lộ là có khả năng ức chế liên kết PD-1/PD-L1 bò dựa theo nồng độ.

(2) Thử nghiệm ức chế liên kết đối với tế bào biểu hiện PD-1 bò và PD-L1 bò hòa tan (Fig.24)

Bằng cách sử dụng tế bào biểu hiện PD-1 bò (đã mô tả ở trên) và PD-L1-Ig bò (đã mô tả ở trên), sự ức chế liên kết PD-1/PD-L1 bò do kháng thể kháng PD-L1 bò được kiểm tra. Đầu tiên, kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò hoặc kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò theo nồng độ cuối cùng là 0, 0,32, 0,63, 1,25, 2,5, 5 hoặc 10 $\mu\text{g/ml}$ và PD-L1-Ig bò theo nồng độ cuối cùng là 1 $\mu\text{g/ml}$ được cho vào đĩa 96 giếng, tại đây chúng được cho phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Hỗn hợp thu được được cho phản ứng với 2×10^5 tế bào biểu hiện PD-1 bò ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đối chứng isotyp IgG2a (κ) chuột cống (BD Biosciences) hoặc kháng thể IgG1 bò (Bethyl) được sử dụng làm kháng thể đối chứng âm. Sau khi rửa, F(ab')₂ dê kháng IgG thô (H+L) đã đánh dấu Alexa Fluor (Life Technologies) được cho phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 30 phút để từ đó phát hiện PD-L1-Ig bò đã liên kết với bề mặt tế bào. FACS Verse (BD Biosciences) được sử dụng để phân tích. PBS đã bổ sung albumin huyết thanh bò 1% (Sigma-Aldrich) được sử dụng cho mỗi lần rửa và pha loãng kháng thể. Coi tỷ lệ thành phần của tế bào được liên kết với PD-L1-Ig mà không bổ sung kháng thể là 100%, tỷ lệ thành phần của tế bào được liên kết với PD-L1-Ig theo từng nồng độ kháng thể được thể hiện dưới dạng giá trị tương đối.

Kết quả thí nghiệm được thể hiện trên Fig.24. Như kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò, kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò đã bộc lộ là có khả năng ức chế liên kết PD-1/PD-L1 bò dựa theo nồng độ.

Thử nghiệm hoạt tính sinh học bằng cách sử dụng kháng thể dạng khảm chuột cống-bò kháng PD-L1 bò

(1) Tác dụng lên sự tăng sinh tế bào (Fig.25)

Để xác nhận rằng sự ức chế liên kết PD-1/PD-L1 bởi kháng thể dạng khảm chuột cống-bò kháng PD-L1 hoạt hoá các tế bào lympho, thử nghiệm hoạt tính sinh học được thực hiện bằng cách sử dụng sự tăng sinh tế bào làm chỉ thị. Ngắn gọn là PBMC bò được phân lập từ máu ngoại vi của gia súc khoẻ mạnh được tạo huyền phù trong PBS để có nồng độ 10×10^6 tế bào/ml, và được cho phản ứng với carboxyfluorescein succinimidyl este (CFSE) ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Sau khi rửa hai lần bằng môi trường nuôi cấy RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) chứa huyết thanh thai bò bất hoạt 10% (Cell Culture Technologies), kháng sinh (streptomycin 200 μ g/ml, penicillin 200 U/ml) (Life Technologies) và L-glutamin 0,01% (Life Technologies), PBMC được cho phản ứng với kháng thể của chuột nhất kháng CD3 bò (WSU Monoclonal Antibody Center) ở 4°C trong 30 phút. Sau khi rửa, PBMC được cho phản ứng với vi hạt kháng IgG1 chuột nhất (Miltenyi Biotec) ở 4°C trong 15 phút, sau đó là bước phân lập tế bào T dương tính với CD3 bằng cách sử dụng autoMACS™ Pro (Miltenyi Biotec). Kháng thể của chuột nhất kháng CD3 bò (WSU Monoclonal Antibody Center) và kháng thể của chuột nhất kháng CD28 bò (Bio-Rad) được thêm vào tế bào T dương tính với CD3 đã phân lập. Sau đó, tế bào này được nuôi cấy đồng thời với tế bào biểu hiện PD-L1 bò (tế bào T dương tính với CD3: tế bào biểu hiện PD-L1 bò = 10:1) khi có mặt hoặc không có mặt kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò 10 μ g/ml. IgG bò thu được từ huyết thanh (Sigma-Aldrich) được sử dụng làm đối chứng cho kháng thể; tế bào biểu hiện EGFP đã chuyển nhiễm với pEGFP-N2 được sử dụng làm đối chứng cho tế bào biểu hiện PD-L1. Sau 6 ngày nuôi cấy đồng thời, các tế bào được thu gom và được cho phản ứng với kháng thể của chuột nhất kháng CD4 bò và kháng thể của chuột nhất kháng CD8 bò (Bio-Rad) ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Bộ đánh dấu IgG1 chuột nhất Zenon (Life Technologies) hoặc kit Lightning-Link (Innova Biosciences) được sử dụng để đánh dấu kháng thể. FACS Verse (BD Biosciences) được sử dụng để phân tích. PBS đã bổ sung albumin huyết thanh bò 1% (Sigma-Aldrich) được sử dụng để rửa sau khi nuôi cấy và pha loãng kháng thể.

Kết quả thí nghiệm được thể hiện trên Fig.25. Sự tăng sinh của tế bào T dương tính với CD4 và CD8 được áp chế đáng kể bằng cách nuôi cấy với tế bào biểu hiện PD-L1 bò. kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò đã bộc lộ là gây ức chế lên sự áp chế này ở tế bào T dương tính với CD4.

(2) Tác dụng lên sự tạo thành IFN- γ (Fig.26)

Để xác nhận rằng sự ức chế liên kết PD-1/PD-L1 bỏ do kháng thể dạng khảm chuột cống-bò kháng PD-L1 hoạt hoá các tế bào lympho, thử nghiệm hoạt tính sinh học được thực hiện bằng cách sử dụng sự tạo thành IFN- γ làm chỉ thị. Ngắn gọn là PBMC được phân lập từ máu ngoại vi của gia súc nhiễm BLV được tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy RPMI (Sigma-Aldrich) chứa huyết thanh thai bò bất hoạt 10% (Cell Culture Technologies), kháng sinh (streptomycin 200 μ g/ml, penicillin 200 U/ml) (Life Technologies) và L-glutamin 0,01% (Life Technologies) để có nồng độ 4×10^6 tế bào/ml. 10 μ g/ml kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò hoặc kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò, và dịch nổi nuôi cấy tế bào thận thai cừu nhiễm BLV 2% (FLK-BLV) được thêm vào PBMC; bước nuôi cấy sau đó được thực hiện ở 37°C trong điều kiện CO₂ 5% trong 6 ngày. Ig chuột cống thu được từ huyết thanh (Sigma-Aldrich) và Ig bò thu được từ huyết thanh (Sigma-Aldrich) được sử dụng làm kháng thể đối chứng. Sau 6 ngày nuôi cấy, dịch nổi nuôi cấy được thu lại, và sự tạo thành IFN- γ được đo bởi kit ELISA IFN- γ bò (BETYL). Thiết bị rửa đĩa tự động BIO WASHER 50 (DS Pharma Biomedical) được sử dụng cho mỗi lần rửa trong ELISA. Độ hấp thụ được đo bởi thiết bị đọc vi đĩa MTP-650FA (Corona Electric).

Kết quả thí nghiệm được thể hiện trên Fig.26. kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò đã bộc lộ là gia tăng đáp ứng IFN- γ của PBMC bò với kháng nguyên BLV theo cách tương tự như kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò (n=10).

Phân tích CDR trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò

Các vùng quyết định bổ sung (CDR) trên kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò được xác định bằng cách sử dụng NCBI IGBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). Kết quả được thể hiện trên Fig.19.

Thử nghiệm nuôi cấy ở gia súc

Kháng thể dạng khảm chuột cống-bò ch4G12 kháng PD-L1 bò đã tạo ra (khoảng 260 mg; 1 mg/kg) được sử dụng qua tĩnh mạch cho bê nhiễm BLV theo thử nghiệm (giống bò Holstein, con đực, 7 tháng tuổi, 267 kg). Các mẫu máu được thu theo thời gian từ bê bị nhiễm, sau đó là bước phân lập PBMC bằng phương pháp ly tâm gradien theo mật độ (density gradient centrifugation).

(1) Sự đáp ứng tăng sinh tế bào của tế bào T đối với kháng nguyên BLV (Fig.27)

PBMC bò được tạo huyền phù trong PBS và phản ứng với CFSE ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Sau khi rửa hai lần bằng môi trường nuôi cấy RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) chứa huyết thanh thai bò bất hoạt 10% (Cell Culture Technologies), kháng sinh (streptomycin 200 µg/ml, penicillin 200 U/ml) (Life Technologies) và L-glutamin 0,01% (Life Technologies), nồng độ tế bào được điều chỉnh thành 4×10^6 tế bào/ml bằng cách sử dụng môi trường nuôi cấy giống hệt. Dịch nổi nuôi cấy gồm tế bào thận thai cừu nhiễm BLV 2% (FLK-BLV) được bổ sung vào PBMC, sau đó được nuôi cấy ở 37°C trong điều kiện CO₂ 5% trong 6 ngày. Dịch nổi nuôi cấy gồm tế bào thận thai cừu không nhiễm BLV 2% (FLK) được sử dụng làm đối chứng. Sau 6 ngày nuôi cấy, PBMC được thu lại và phản ứng với kháng thể của chuột nhất kháng CD4 bò, kháng thể của chuột nhất kháng CD8 bò và kháng thể của chuột nhất kháng IgM bò (Bio-Rad) ở 4°C trong 20 phút. Bộ đánh dấu IgG1 chuột nhất Zenon (Life Technologies) hoặc kit Lightning-Link (Innova Biosciences) được sử dụng để đánh dấu kháng thể. FACS Verse (BD Biosciences) được sử dụng để phân tích. PBS đã bổ sung albumin huyết thanh bò 1% (Sigma-Aldrich) được sử dụng cho mỗi lần rửa và pha loãng kháng thể.

Kết quả thí nghiệm được thể hiện trên Fig.27. Kết quả của việc sử dụng kháng thể là đáp ứng tăng sinh tế bào đặc hiệu BLV của tế bào T dương tính với CD4 tăng so với đáp ứng trước khi sử dụng kháng thể.

(2) Thay đổi về lượng tải tiền virus (Fig.28)

ADN được chiết tách từ PBMC bò đã phân lập bằng cách sử dụng kit tinh chế ADN Wizard (Promega). Nồng độ của ADN đã chiết tách được xác định theo định tính, coi độ hấp thụ (260 nm) đã đo bởi máy đo ảnh phổ Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific) là đối chứng. Để đo lượng tải tiền virus BLV ở PBMC, PCR thời gian thực được thực hiện bằng cách sử dụng Cycleave PCR Reaction Mix SP (TaKaRa) và mẫu dò/đoạn mồi/đối chứng dương để phát hiện virus bệnh bạch cầu ở bò (TaKaRa). Light Cycler 480 System II (Roche Diagnosis) được sử dụng để đo.

Kết quả thí nghiệm được thể hiện trên Fig.28. Lượng tải tiền virus BLV bị giảm đáng kể đến tận cuối quá trình thử nghiệm so với lượng tải trước khi đưa vào.

Tất cả các công bố, bằng độc quyền sáng chế và đơn sáng chế ở đây được viện dẫn toàn bộ để tham khảo.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Kháng thể kháng PD-L1 theo sáng chế có thể áp dụng để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ung thư và bệnh truyền nhiễm ở động vật.

Phần văn bản mô tả tự do về danh mục trình tự

<SEQ ID NO.: 1>

SEQ ID NO.: 1 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò.

MESQTHVLISLLLSVSGTYGDIATQSPSSVAVSVGETVTLSCKSSQSLLYSENQKDY
LGWYQQKPGQTPKPLIYWATNRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLIISVQAEDLADYYCGQ
YLVYPFTFGPGTKLELK

<SEQ ID NO.: 2>

SEQ ID NO.: 2 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò.

MGWSQIILFLVAAATCVHSQVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTSNFMHWVKQ
QPGNGLEWIGWIYPEYGNTKYNQKFDGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCA
SEEAVISLVYWGQGLVTVSS

<SEQ ID NO.: 3>

SEQ ID NO.: 3 thể hiện trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ (CL) trên kháng thể của chó.

QPKASPSVTLEFPPSSEELGANKATLVCLISDFYPSGVTVAWKASGSPVTQGVETTKPS
KQSNNKYAASSYLSLTPDKWKSHSSFSCLVTHEGSTVEKKVAPAECS

<SEQ ID NO.: 4>

SEQ ID NO.: 4 thể hiện trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng (CH) trên kháng thể của chó.

ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQ
SSGLYSLSSSTVTVPPSSRWPSETFTCNVHPASNTKVDKVPKESTCKCISPCVPESL
GGPSVFIFPPKPKDILRITRTPEITCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQPRE
QQFNSTYRVVSVLPPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIGLPSPIERTISKARGQAHQPSVYVL
PPSPKELSSSDTVTLTCLIKDFFPPEIDVEWQSNQPEPEESKYHTTAPQLDEDGSYFL
YSKLSVDKSRWQQGDTFTCAVMHEALQNHYTDLSLSHSPGK

<SEQ ID NO.: 5>

SEQ ID NO.: 5 thể hiện trình tự nucleotit của VL trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò.

ATGGAATCACAGACGCATGTCCTCATTTCCCTTCTGCTCTCGGTATCTGGTACCTATG
GGGACATTGCGATAACCCAGTCTCCATCCTCTGTGGCTGTGTCAGTAGGAGAGACGGT
CACTCTGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTTTTATACAGTGAAAACCAAAGGACTAT
TTGGGCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGACTCCTAAACCCCTTATCTACTGGGCAA
CCAACCGGCACACTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGTAGTGGATCCGGGACAGACTT
CACTCTGATCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCTGATTATTACTGTGGGCAG
TACCTTGTCTATCCGTTACGTTTGGACCTGGGACCAAGCTGGAAGTAAA

Trình tự nucleotit của SEQ ID NO.: 5 sau bước tối ưu hoá codon được thể hiện ở <SEQ ID NO.: 15>.

ATGGAATCTCAAACATGTTTTGATTTCACTTCTGAGTGTTTCCGGAACCTACG
GTGATATCGCTATCACTCAATCTCCCTCCTCTGTTGCTGTGTCTGTGGGCGAAACCGT
TACCCTGTCCTGCAAGTCCAGTCAGTCTCTTCTCTACTCCGAGAATCAAAGGACTAC
CTGGGCTGGTACCAACAGAAGCCCGGCCAGACCCCAAAGCCACTGATATACTGGGCAA
CCAACAGGCACACCGGAGTGCCCGACAGGTTACAGGCAGTGGATCTGGCACCGACTT
TACCTTGATCATTTCAAGCGTGCAGGCTGAAGATCTGGCCGACTACTACTGTGGTCAG
TATCTGGTGTATCCTTTCACTTTCGGGCCAGGGACAAAATTGGAATTGAAG

<SEQ ID NO.: 6>

SEQ ID NO.: 6 thể hiện trình tự nucleotit của VH trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò.

ATGGGATGGAGCCAGATCATCCTCTTTCTGGTGGCAGCAGCTACATGTGTTCACTCCC
AGGTACAGCTGCAGCAATCTGGGGCTGAATTAGTGAAGCCTGGGTCTCAGTGAAAAT
TTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGTAACTTTATGCACTGGGTAAAGCAG
CAGCCTGGAAATGGCCTTGAGTGGATTGGGTGGATTTATCCTGAATATGGTAATACTA
AGTACAATCAAAGTTCGATGGGAAGGCAACACTCACTGCAGACAAATCCTCCAGCAC
AGCCTATATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCA
AGTGAGGAGGCAGTTATATCCCTTGTTTACTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCT
CTTCA

Trình tự nucleotit của SEQ ID NO.: 6 sau bước tối ưu hoá codon được thể hiện ở <SEQ ID NO.: 16>.

ATGGGTTGGTCTCAAATTATCTTGT TTTTGGTTGCTGCAGCCACTTGTGTTTATTCTC
AGGTGCAGCTGCAACAAAGCGGCGCAGAACTGGTGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAAAT
ATCTTGTAAGGCCAGCGGATATACTTTACCTCCAATTTTCATGCATTGGGTCAAACAG
CAGCCCGGCAACGGACTCGAGTGGATCGGCTGGATCTACCCCGAGTATGGCAACACAA
AATATAACCAAAAATTTGATGGAAAGGCTACCCTGACTGCCGATAAGTCCTCCAGCAC
CGCATAACATGCAACTCTCCTCCCTGACCTCCGAGGATAGCGCTGTCTACTTCTGTGCT
TCCGAAGAGGCTGTCATATCCTTGGTCTATTGGGGCCAAGGAACCTCTGGTGACCGTCT
CATCT

<SEQ ID NO.: 7>

SEQ ID NO.: 7 thể hiện trình tự nucleotit của CL trên kháng thể của chó.

CAGCCCAAGGCCTCCCCCTCGGTCACTCTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCGGCG
CCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTCATCAGCGACTTCTACCCAGCGGCGTGACGGT
GGCCTGGAAGGCAAGCGGCAGCCCCGTACCCAGGGCGTGGAGACCACCAAGCCCTCC
AAGCAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGACAAGT
GGAAATCTCACAGCAGCTTCAGCTGCCTGGTCACGCACGAGGGGAGCACCGTGGAGAA
GAAGGTGGCCCCCGCAGAGTGCTCTTAG

Trình tự nucleotit của SEQ ID NO.: 7 sau bước tối ưu hoá codon được thể hiện ở <SEQ ID NO.: 17>.

CAGCCCAAAGCCTCTCCCAGCGTCACCCTCTTCCCACCTTCCAGTGAGGAGCTGGGGG
CAAACAAGCCACTTTGGTGTGTCTCATCTCCGATTTTACCCCTCCGGGGTCACAGT
CGCATGGAAGGCCTCCGGATCCCCTGTGACACAGGGAGTGGAGACAACAAAACCTAGC
AAGCAGAGTAACAATAAGTATGCCGCCTCAAGCTATCTCAGCCTTACTCCTGATAAGT
GGAAGTCACATAGCAGTTTTAGTTGCCTCGTAACACATGAGGGTTCAACTGTGGAGAA
AAAAGTAGCTCCAGCTGAGTGCTCATGA

<SEQ ID NO.: 8>

SEQ ID NO.: 8 là trình tự nucleotit của CH trên kháng thể của chó.

GCCTCCACCACGGCCCCCTCGGTTTTCCeCACTGGCCCCCAGCTGCGGGTCCACTTCC
GGCTCCACGGTGGCCCTGGCCTGCCTGGTGTGAGGCTACTTCCCCGAGCCTGTAACTG
TGTCTTGAATTCCGGCTCCTTGACCAGCGGTGTGCACACCTTCCCGTCCGTCTGCA

GTCCTCAGGGCTCTACTCCCTCAGCAGCACGGTGACAGTGCCCTCCAGCAGGTGGCCC
 AGCGAGACCTTCACCTGCAACGTGGTCCACCCGGCCAGCAACACTAAAGTAGACAAGC
 CAGTGCCCCAAAGAGTCCACCTGCAAGTGTATATCCCCATGCCCAGTCCCTGAATCACT
 GGGAGGGCCTTCGGTCTTCATCTTTCCCCCGAAACCCAAGGACATCCTCAGGATTACC
 CGAACACCCGAGATCACCTGTGTGGTGTAGATCTGGGCCGTGAGGACCCTGAGGTGC
 AGATCAGCTGGTTCGTGGATGGTAAGGAGGTGCACACAGCCAAGACGCAGCCTCGTGA
 GCAGCAGTTCAACAGCACCTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCATTGAGCACCAGGAC
 TGGCTCACCGGAAAGGAGTTCAAGTGCAGAGTCAACCACATAGGCCTCCCGTCCCCCA
 TCGAGAGGACTATCTCCAAAGCCAGAGGGCAAGCCCATCAGCCCAGTGTGTATGTCCT
 GCCACCATCCCCAAAGGAGTTGTCATCCAGTGACACGGTCACCCTGACCTGCCTGATC
 AAAGACTTCTTCCCACCTGAGATTGATGTGGAGTGGCAGAGCAATGGACAGCCGGAGC
 CCGAGAGCAAGTACCACACGACTGCGCCCCAGCTGGACGAGGACGGGTCTACTTCCT
 GTACAGCAAGCTCTCTGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGAGACACCTTCACATGT
 GCGGTGATGCATGAAGCTCTACAGAACCACTACACAGATCTATCCCTCTCCCATTCTC
 CGGGTAAATGA

Trình tự nucleotit của SEQ ID NO.: 8 sau bước tối ưu hoá codon được thể hiện ở <SEQ ID NO.: 18>.

GCTAGCACAACCGCTCCCTCCGTTTTTCCCCTCGCCCCATCCTGCGGGTCAACCAGCG
 GATCCACCGTCGCTCTGGCTTGTCTGGTGTGTCAGGATACTTCCCCGAGCCTGTCACCGT
 TTCTTGGAATAGCGGCAGCCTTACTTCCGGCGTGCATACCTTCCCTAGCGTGCTTCAG
 TCCTCCGGTCTGTATTCCCTCAGCTCCACCGTAACTGTCCCAAGCTCAAGGTGGCCCT
 CTGAGACATTTACCTGCAATGTGGTCCATCCTGCTTCAAATACCAAAGTGGACAAGCC
 CGTCCCCAAAAGAGTCTACCTGCAAATGTATCAGTCCTTGTCCCGTGCCCGAGTCTCTG
 GGCGGACCCTCAGTCTTTATCTTCCCACCCAAGCCAAAGGACATATTGCGCATTACAC
 GGACACCCGAAATCACCTGTGTTGTGTTGGATCTCGGCCGGGAAGATCCTGAGGTGCA
 GATTAGTTGGTTTGTGTTGATGGCAAGGAGGTGCACACAGCAAAAACACAGCCCAGAGAA
 CAGCAGTTCAACAGTACTTATAGAGTAGTGAGTGTGTTGCCTATAGAGCATCAGGACT
 GGCTGACAGGCAAAGAATTCAAATGTAGGGTTAACCACATTGGCCTCCCTAGTCCAAT
 CGAGAGGACAATCTCTAAAGCCCGAGGCCAGGCTCATCAGCCTTCTGTGTACGTTCTG
 CCTCCTAGTCCTAAGGAAGTGTCTTCTTCAGACACAGTAACACTCACTTGCCTGATTA
 AGGACTTTTTTTCCTCCAGAGATTGATGTGGAATGGCAGTCTAACGGGCAGCCAGAGCC
 AGAATCTAAGTACCACACTACTGCACCACAGCTGGATGAGGATGGGTCTTACTTCCTG

TACAGTAAGCTGAGTGTGGACAAGTCTCGATGGCAGCAGGGGGATACTTTTACTTGCG
CAGTAATGCACGAAGCATTGCAGAACCACTACACTGACCTGTCACTTAGTCACTCACC
AGGGAAGTAA

<SEQ ID NO.: 9>

SEQ ID NO.: 9 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ dạng khảm gồm VL trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và CL trên kháng thể của chó.

MESQTHVLISLLLSVSGTYGDIAITQSPSSVAVSVGETVTLSCKSSQSLLYSENQKDY
LGWYQQKPGQTPKPLIYWATNRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLIISVQAEDLADYYCGQ
YLVYPFTFGPGTKLELKQPKASPSVTLFPPSSEELGANKATLVCLISDFYPSGVTVAW
KASGSPVTQGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPDKWKSHSSFCLVTHEGSTVEKKV
APAECS

<SEQ ID NO.: 10>

SEQ ID NO.: 10 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng dạng khảm gồm VH trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và CH trên kháng thể của chó.

MGWSQIILFLVAAATCVHSQVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTSNFMHWVKQ
QPGNGLEWIGWIYPEYGNTKYNQKFDGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCA
SEEAVISLVYWGQGLTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPV
TVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSSTVTVPSRWPSETFTCNVVHPASNTKVD
KPVPKESTCKCISPCVPESLGGPSVFIFPPKPKDILRITRTPEITCVVLDLGREDPE
VQISWFDVGKEVHTAKTQPREQQFNSTYRVVSVLPPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIGLPS
PIERTISKARGQAHQPSVYVLPSPKELSSSDTVTLTCLIKDFFPPEIDVEWQSNQGP
EPESKYHTTAPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDTFTCAVMHEALQNHYTDLSSLH
SPGK

<SEQ ID NO.: 19>

Trình tự này thể hiện trình tự nucleotit (sau bước tối ưu hoá codon) của chuỗi nhẹ dạng khảm gồm VL trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và CL trên kháng thể của chó.

ATGGAATCTCAAACCTCATGTTTTGATTTTCACTTCTGAGTGTTTCCGGAACCTACG
GTGATATCGCTATCACTCAATCTCCCTCCTCTGTTGCTGTGTCTGTGGGCGAAACCGT
TACCCTGTCCTGCAAGTCCAGTCAGTCTCTTCTCTACTCCGAGAATCAAAGGACTAC

CTGGGCTGGTACCAACAGAAGCCCCGGCCAGACCCCAAAGCCACTGATATACTGGGCAA
 CCAACAGGCACACCGGAGTGCCCGACAGGTTACAGGCAGTGGATCTGGCACCGACTT
 TACCTTGATCATTTCAAGCGTGCAGGCTGAAGATCTGGCCGACTACTACTGTGGTCAG
 TATCTGGTGTATCCTTTCACCTTCGGGCCAGGGACAAAATTGGAATTGAAGCAGCCCA
 AAGCCTCTCCCAGCGTCACCCTCTTCCCACCTTCCAGTGAGGAGCTGGGGGCAAACAA
 AGCCACTTTGGTGTGTCTCATCTCCGATTTTTTACCCCTCCGGGGTCACAGTCGCATGG
 AAGGCCTCCGGATCCCCTGTGACACAGGGAGTGGAGACAACAAAACCTAGCAAGCAGA
 GTAACAATAAGTATGCCGCCTCAAGCTATCTCAGCCTTACTCCTGATAAGTGGAAGTC
 ACATAGCAGTTTTAGTTGCCTCGTAACACATGAGGGTTCAACTGTGGAGAAAAAAGTA
 GCTCCAGCTGAGTGCTCATGA

<SEQ ID NO.: 20>

SEQ ID NO.: 20 thể hiện trình tự nucleotit (sau bước tối ưu hoá codon) của chuỗi nặng
 thể khảm gồm VH trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và CH trên kháng thể
 của chó.

ATGGGTTGGTCTCAAATTATCTTGTTTTTGGTTGCTGCAGCCACTTGTGTTTATTCTC
 AGGTGCAGCTGCAACAAAGCGGCGCAGAACTGGTGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAAAT
 ATCTTGTAAGGCCAGCGGATATACTTTCACCTCCAATTTTCATGCATTGGGTCAAACAG
 CAGCCCCGGCAACGGACTCGAGTGGATCGGCTGGATCTACCCCGAGTATGGCAACACAA
 AATATAACCAAAAATTTGATGGAAAGGCTACCCTGACTGCCGATAAGTCCTCCAGCAC
 CGCATACATGCAACTCTCCTCCCTGACCTCCGAGGATAGCGCTGTCTACTTCTGTGCT
 TCCGAAGAGGCTGTCATATCCTTGGTCTATTGGGGCCAAGGAACTCTGGTGACCGTCT
 CATCTGCTAGCACAAACCGCTCCCTCCGTTTTTCCCCTCGCCCCATCCTGCGGGTCAAC
 CAGCGGATCCACCGTCGCTCTGGCTTGTCTGGTGTGAGGATACTTCCCCGAGCCTGTC
 ACCGTTTCTTGGAATAGCGGCAGCCTTACTTCCGGCGTGCATACCTTCCCTAGCGTGC
 TTCAGTCCTCCGGTCTGTATTCCCTCAGCTCCACCGTAACTGTCCCAAGCTCAAGGTG
 GCCCTCTGAGACATTTACCTGCAATGTGGTCCATCCTGCTTCAAATACCAAAGTGGAC
 AAGCCCGTCCCAAAAGAGTCTACCTGCAAATGTATCAGTCCTTGTCCCGTGCCCGAGT
 CTCTGGGCGGACCCTCAGTCTTTATCTTCCCACCCAAGCCAAAGGACATATTGCGCAT
 TACACGGACACCCGAAATCACCTGTGTTGTGTTGGATCTCGGCCGGGAAGATCCTGAG
 GTGCAGATTAGTTGGTTTGTGATGGCAAGGAGGTGCACACAGCAAAAACACAGCCCA
 GAGAACAGCAGTTCAACAGTACTTATAGAGTAGTGAGTGTGTTGCCTATAGAGCATCA
 GGAAGTGGCTGACAGGCAAAGAATTCAAATGTAGGGTTAACCACATTGGCCTCCCTAGT

CCAATCGAGAGGACAATCTCTAAAGCCCGAGGCCAGGCTCATCAGCCTTCTGTGTACG
 TTCTGCCTCCTAGTCCTAAGGAACTGTCTTCTTCAGACACAGTAACACTCACTTGCCT
 GATTAAGGACTTTTTTTCCTCCAGAGATTGATGTGGAATGGCAGTCTAACGGGCAGCCA
 GAGCCAGAATCTAAGTACCACACTACTGCACCACAGCTGGATGAGGATGGGTCTTACT
 TCCTGTACAGTAAGCTGAGTGTGGACAAGTCTCGATGGCAGCAGGGGGATACTTTTAC
 TTGCGCAGTAATGCACGAAGCATTGCAGAACCCTACACTGACCTGTCACTTAGTCAC
 TCACCAGGGAAGTAA

<SEQ ID NO.: 11>

SEQ ID NO.: 11 thể hiện trình tự axit amin của CL trên kháng thể của người.

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVADNLQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

<SEQ ID NO.: 12>

SEQ ID NO.: 12 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của người (biến thể IgG4 1).

STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPSPCPAPEFLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPP
 SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT
 VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

<SEQ ID NO.: 13>

SEQ ID NO.: 13 thể hiện trình tự nucleotit của CL trên kháng thể của người.

ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
 GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA
 GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG
 GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT
 ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGT
 CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

<SEQ ID NO.: 14>

SEQ ID NO.: 14 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của người (biến thể IgG4 1).

TCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGA
GCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTC
GTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCC
TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGA
AGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT
TGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCATCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGA
CCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAA
CTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
TTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAA
AACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA
TCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT
ACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAA
GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG
CTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

<Các SEQ ID NO.: 21-36>

Các SEQ ID NO.: 21-36 thể hiện trình tự nucleotit của các đoạn mỗi theo thứ tự là cPD-1 bên trong F, cPD-1 bên trong R, cPD-L1 bên trong F, cPD-L1 bên trong R, cPD-1 5' GSP, cPD-1 3' GSP, cPD-L1 5' GSP, cPD-L1 3' GSP, cPD-1-EGFP F, cPD-1-EGFP R, cPD-L1-EGFP F, cPD-L1-EGFP R, cPD-1-Ig, cPD-1-Ig R, cPD-L1-Ig F và cPD-L1-Ig R.

<SEQ ID NO.: 37>

SEQ ID NO.: 37 thể hiện trình tự axit amin (QSLLYSENQKDY) của CDR1 của VL trên kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò.

<SEQ ID NO.: 38>

SEQ ID NO.: 38 thể hiện trình tự axit amin (QSLLYSENQKDY) của CDR3 của VL trên kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò.

<SEQ ID NO.: 39>

SEQ ID NO.: 39 thể hiện trình tự axit amin (GYTFTSNF) của CDR1 của VH trên kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò.

<SEQ ID NO.: 40>

SEQ ID NO.: 40 thể hiện trình tự axit amin (IYPEYGNT) của CDR2 của VH trên kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò.

<SEQ ID NO.: 41>

SEQ ID NO.: 41 thể hiện trình tự axit amin (ASEEAVISLVY) của CDR3 của VH trên kháng thể của chuột cống 4G12 kháng PD-L1 bò.

<SEQ ID NO.: 42>

SEQ ID NO.: 42 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của cừu (IgG1).

<SEQ ID NO.: 43>

SEQ ID NO.: 43 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của cừu (IgG1).

<SEQ ID NO.: 44>

SEQ ID NO.: 44 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của cừu (IgG2).

<SEQ ID NO.: 45>

SEQ ID NO.: 45 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của cừu (IgG2).

<SEQ ID NO.: 46>

SEQ ID NO.: 46 thể hiện trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ (Ig kappa(CK)) trên kháng thể của cừu.

<SEQ ID NO.: 47>

SEQ ID NO.: 47 thể hiện trình tự nucleotit của vùng hằng định chuỗi nhẹ (Ig kappa(CK)) trên kháng thể của cừu.

<SEQ ID NO.: 48>

SEQ ID NO.: 48 thể hiện trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ (Ig lambda(CL)) trên kháng thể của cừu.

<SEQ ID NO.: 49>

SEQ ID NO.: 49 thể hiện trình tự nucleotit của vùng hằng định chuỗi nhẹ (Ig lambda(CL)) trên kháng thể của cừu.

<SEQ ID NO.: 50>

SEQ ID NO.: 50 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG1^a).

<SEQ ID NO.: 51>

SEQ ID NO.: 51 thể hiện trình tự axit nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG1^a).

<SEQ ID NO.: 52>

SEQ ID NO.: 52 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG1^b).

<SEQ ID NO.: 53>

SEQ ID NO.: 53 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG1^b).

<SEQ ID NO.: 54>

SEQ ID NO.: 54 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG2^a).

<SEQ ID NO.: 55>

SEQ ID NO.: 55 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG2^a).

<SEQ ID NO.: 56>

SEQ ID NO.: 56 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG2^b).

<SEQ ID NO.: 57>

SEQ ID NO.: 57 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG2^b).

<SEQ ID NO.: 58>

SEQ ID NO.: 58 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG3).

<SEQ ID NO.: 59>

SEQ ID NO.: 59 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG3).

<SEQ ID NO.: 60>

SEQ ID NO.: 60 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG4^a).

<SEQ ID NO.: 61>

SEQ ID NO.: 61 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG4^a).

<SEQ ID NO.: 62>

SEQ ID NO.: 62 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG4^b).

<SEQ ID NO.: 63>

SEQ ID NO.: 63 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG4^b).

<SEQ ID NO.: 64>

SEQ ID NO.: 64 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG5^a).

<SEQ ID NO.: 65>

SEQ ID NO.: 65 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG5^a).

<SEQ ID NO.: 66>

SEQ ID NO.: 66 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG5^b).

<SEQ ID NO.: 67>

SEQ ID NO.: 67 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG5^b).

<SEQ ID NO.: 68>

SEQ ID NO.: 68 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG6^a).

<SEQ ID NO.: 69>

SEQ ID NO.: 69 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG6^a).

<SEQ ID NO.: 70>

SEQ ID NO.: 70 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG6^b).

<SEQ ID NO.: 71>

SEQ ID NO.: 71 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của lợn (IgG6^b).

<SEQ ID NO.: 72>

SEQ ID NO.: 72 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể trâu (ước lượng là IgG1).

<SEQ ID NO.: 73>

SEQ ID NO.: 73 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể trâu (ước lượng là IgG1).

<SEQ ID NO.: 74>

SEQ ID NO.: 74 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể trâu (ước lượng là IgG2).

<SEQ ID NO.: 75>

SEQ ID NO.: 75 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể trâu (ước lượng là IgG2).

<SEQ ID NO.: 76>

SEQ ID NO.: 76 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể trâu (ước lượng là IgG3).

<SEQ ID NO.: 77>

SEQ ID NO.: 77 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể trâu (ước lượng là IgG3).

<SEQ ID NO.: 78>

SEQ ID NO.: 78 thể hiện trình tự axit amin của vùng hằng định (CL) chuỗi nhẹ (ước lượng là Ig lamđà) trên kháng thể trâu.

<SEQ ID NO.: 79>

SEQ ID NO.: 79 thể hiện trình tự nucleotit của vùng hằng định (CL) chuỗi nhẹ (ước lượng là Ig lamđà) trên kháng thể trâu.

<SEQ ID NO.: 80>

SEQ ID NO.: 80 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của người (biến thể IgG4 2).

<SEQ ID NO.: 81>

SEQ ID NO.: 81 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của người (biến thể IgG4 2).

<SEQ ID NO.: 82>

SEQ ID NO.: 82 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của người (biến thể IgG4 3).

<SEQ ID NO.: 83>

SEQ ID NO.: 83 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của người (biến thể IgG4 3).

<SEQ ID NO.: 84>

SEQ ID NO.: 84 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của bò (biến thể IgG1 1).

<SEQ ID NO.: 85>

SEQ ID NO.: 85 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của bò (biến thể IgG1 2).

<SEQ ID NO.: 86>

SEQ ID NO.: 86 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của bò (biến thể IgG1 3).

<SEQ ID NO.: 87>

SEQ ID NO.: 87 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của bò (biến thể IgG2 1).

<SEQ ID NO.: 88>

SEQ ID NO.: 88 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của bò (biến thể IgG2 2).

<SEQ ID NO.: 89>

SEQ ID NO.: 89 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của bò (biến thể IgG2 3).

<SEQ ID NO.: 90>

SEQ ID NO.: 90 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của bò (biến thể IgG3 1).

<SEQ ID NO.: 91>

SEQ ID NO.: 91 thể hiện trình tự axit amin của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của bò (biến thể IgG3 2).

<SEQ ID NO.: 92>

SEQ ID NO.: 92 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của bò (biến thể IgG1 1).

<SEQ ID NO.: 93>

SEQ ID NO.: 93 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của bò (biến thể IgG1 2).

<SEQ ID NO.: 94>

SEQ ID NO.: 94 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của bò (biến thể IgG1 3).

<SEQ ID NO.: 95>

SEQ ID NO.: 95 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của bò (biến thể IgG2 1).

<SEQ ID NO.: 96>

SEQ ID NO.: 96 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của bò (biến thể IgG2 2).

<SEQ ID NO.: 97>

SEQ ID NO.: 97 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của bò (biến thể IgG2 3).

<SEQ ID NO.: 98>

SEQ ID NO.: 98 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của bò (biến thể IgG3 1).

<SEQ ID NO.: 99>

SEQ ID NO.: 99 thể hiện trình tự nucleotit của CH (CH1-CH3) trên kháng thể của bò (biến thể IgG3 2).

<SEQ ID NO.: 100>

SEQ ID NO.: 100 thể hiện trình tự axit amin của CL trên kháng thể của bò (Ig lamđà bò, Ngân hàng gen: X62917).

QPKSPPSVTTLFPPSTEELNGNKATLVCLISDFYPGSVTVVWKADGSTITRNVETTRAS
KQNSKYYAASSYLSLTSSDWKSKGSYSCEVTHEGSTVTKTVKPSECS

<SEQ ID NO.: 101>

SEQ ID NO.: 101 thể hiện trình tự nucleotit của CL trên kháng thể của bò (Ig lambda bò, Ngân hàng gen: X62917).

CAGCCCAAGTCCCCACCCTCGGTACCCCTGTTCCCGCCCTCCACGGAGGAGCTCAACG
GCAACAAGGCCACCCTGGTGTGTCTCATCAGCGACTTCTACCCGGGTAGCGTGACCGT
GGTCTGGAAGGCAGACGGCAGCACCATCACCCGCAACGTGGAGACCACCCGGGCCTCC
AAACAGAGCAACAGCAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGAGCAGCGACT
GGAAATCGAAAGGCAGTTACAGCTGCGAGGTACGCACGAGGGGAGCACCGTGACGAA
GACAGTGAAGCCCTCAGAGTGTTCCTTAG

Trình tự nucleotit của SEQ ID NO.: 101 sau bước tối ưu hoá codon được thể hiện ở <SEQ ID NO.: 104>.

CAGCCTAAGAGTCCTCCTTCTGTAACACTCTTTCCCCCTCTACCGAGGAACTCAACG
GCAATAAAGCTACCTTGGTTTGCCTTATTTCTGATTTCTACCCCGGGTCTGTGACCGT
GGTGTGGAAAGCTGATGGGTCCACCATTA CT CGGAATGTGGAAACCACCCGGGCTTCT
AAGCAGTCCA ACTCTAAATACGCAGCATCCTCCTATTTGAGTCTTACTAGTAGTGACT
GGAAGTCAAAGGGTAGTTACAGTTGCGAAGTCACACATGAAGGTTCAACAGTGACAAA
GACAGTCAAGCCCTCAGAGTGCTCATAG

<SEQ ID NO.: 102>

SEQ ID NO.: 102 thể hiện trình tự axit amin của CH trên kháng thể của bò (IgG1 bò, được biến đổi từ Ngân hàng gen: X62916). Vị trí đột biến được gạch chân. Số axit amin và các đột biến: 113E→P, 114L→V, 115P→A, 116G→mất đoạn, 209A→S, 210P→S

ASTTAPKVYPLSSCCGDKSSSTVTGLCLVSSYMPEPVTVTWNSGALKSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSMVTVPGSTSGQTFTCNVAHPASSTKVDKA VDPTCKPSPCDCCPPPPVAG
PSVFIFPPKPKDTLTISGTPEVTCVVVDVGHDDPEVKFSWFVDDVEVNTATTKPREEQ
FNSTYRVVSALRIQH QDWTGGKEFKCKVHNEGLPSSIVRTISR TKGPAREPQVYVLAP
PQEELSKSTVSLTCMVTSFY PDYIAVEWQRNGQPESEDKYGTTPPQLDADSSYFLYSK
LRVDRNSWQEGD TYTCVVMHEALHNHYTQKSTSKSAGK

<SEQ ID NO.: 103>

SEQ ID NO.: 103 thể hiện trình tự nucleotit (sau bước tối ưu hoá codon) của CH trên kháng thể của bò (IgG1 bò, được biến đổi từ Ngân hàng gen: X62916).

GCTAGCACAACTGCTCCTAAGGTGTACCCCTGAGCTCTTGCTGCGGCGACAAGTCTA
GCAGCACCGTGACCCTCGGATGCCTCGTCAGCAGCTATATGCCTGAGCCAGTTACAGT

GACATGGAATTCTGGTGCCCTTAAGTCCGGCGTCCATACCTTCCCTGCTGTGCTGCAG
 TCCTCTGGCCTGTACAGTTTGTCTCTATGGTGACAGTACCCGGTTCCACCTCCGGAC
 AGACCTTTACCTGTAATGTGGCTCATCCCGCCTCCTCCACAAAGGTGGATAAGGCTGT
 TGACCCTACCTGTAAACCCAGTCCATGCGACTGCTGTCCCCCCCCCTCCAGTTGCCGGA
 CCCTCAGTCTTTATTTTCCACCCAAACCCAAAGACACCCTGACAATCTCTGGAACAC
 CAGAAGTCACCTGCGTCGTCTGGATGTGGGCCACGACGATCCTGAGGTAAAATTCTC
 ATGGTTCGTGACGATGTGGAAGTGAATACAGCTACTACAAAACCTCGCGAAGAGCAG
 TTTAACTCTACCTATCGAGTGGTTTCTGCTTTGCGGATTCAGCATCAGGATTGGACAG
 GCGGCAAAGAGTTTAAATGTAAAGTCCATAACGAGGGACTTCCTTCTAGTATCGTGCG
 CACTATCAGTAGAACTAAAGGGCCTGCTCGGGAACCTCAGGTGTACGTCCTGGCACCT
 CCACAGGAAGAGCTGAGTAAGTCTACAGTTTCTCTGACTTGTATGGTAACATCTTTTT
 ATCCAGATTACATCGCAGTTGAATGGCAGAGGAACGGGCAGCCAGAGAGTGAGGATAA
 GTACGGGACTACTCCACCACAGCTGGACGCAGACTCAAGTTACTTCCTGTACTCAAAG
 CTGAGGGTTGACAGAACTCATGGCAGGAGGGGGACACTTACACTTGCGTAGTTATGC
 ACGAGGCACTTCACAACCACTACACTCAGAAGAGTACTTCAAAGAGTGCAGGGAAGTAA

<SEQ ID NO.: 105>

SEQ ID NO.: 105 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ dạng khảm gồm VL trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và CL trên kháng thể của bò.

MESQTHVLISLLLSVSGTYGDIAITQSPSSVAVSVGETVTLSCKSSQSLLYSENQKDY
 LGWYQQKPGQTPKPLIYWATNRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLIISVQAEDLADYYCGQ
 YLVYPFTFGPGTKLELKQPKSPPSVTLPFPSTEELNGNKATLVCLISDFYPGSVTVVW
 KADGSTITRNVETTRASKQSNSKYAASSYLSLTSSDWKSKGSYSCEVTHEGSTVTKTV
 KPSECS

<SEQ ID NO.: 106>

SEQ ID NO.: 106 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng dạng khảm gồm VH trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và CH trên kháng thể của bò (IgG1 bò, được biến đổi từ Ngân hàng gen: X62916).

MGWSQIILFLVAAATCVHSQVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTSNFMHWVKQ
 QPGNGLIEWIGWIYPEYGN TKYNQKFDGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCA
 SEEAVISLVYWGQGTLVTVSSASTTAPKVYPLSSCCGDKSSSTVTLGCLVSSYMPPEPV
 TVTWNSGALKSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSMVTVPGSTSGQTFTCNVAHPASSTKVDK

<SEQ ID NO.: 107>

ATGGAATCTCAAACCTCATGTTTTGATTTCACTTCTGAGTGTTTCCGGAACCTACG
GTGATATCGCTATCACTCAATCTCCCTCCTCTGTTGCTGTGTCTGTGGGCGAAACCGT
TACCCTGTCCTGCAAGTCCAGTCAGTCTCTTCTCTACTCCGAGAATCAAAGGACTAC
CTGGGCTGGTACCAACAGAAGCCCGGCCAGACCCCAAAGCCACTGATATACTGGGCAA
CCAACAGGCACACCGGAGTGCCCGACAGGTTACAGGCAGTGGATCTGGCACCGACTT
TACCTTGATCATTTCAAGCGTGACAGGCTGAAGATCTGGCCGACTACTACTGTGGTCAG
TATCTGGTGTATCCTTTCACTTTCGGGCCAGGGACAAAACCTCGAGCTCAAACAGCCTA
AGAGTCCTCCTTCTGTAACACTCTTTCCCCCTCTACCGAGGAACTCAACGGCAATAA
AGCTACCTTGTTTTGCCTTATTTCTGATTTCTACCCCGGGTCTGTGACCGTGGTGTGG
AAAGCTGATGGGTCCACCATTACTCGGAATGTGGAAACCACCCGGGCTTCTAAGCAGT
CCAACCTCTAAATACGCAGCATCCTCCTATTTGAGTCTTACTAGTAGTGACTGGAAGTC
AAAGGGTAGTTACAGTTGCGAAGTCACACATGAAGGTTCAACAGTGACAAAGACAGTC
AAGCCCTCAGAGTGCTCATAG

<SEQ ID NO.: 108>

ATGGGGTGGTCCCAGATTATATTGTTCTCGTCGCCGCCGCGCCACTTGCGTACACAGCC
AAGTGCAACTTCAACAAAGCGGTGCAGAACTGGTAAAGCCCGGTAGCTCTGTGAAAAT
ATCCTGTAAAGCCAGTGGCTACACATTTACCAGCAACTTTATGCACTGGGTGAAGCAA
CAGCCCGGAAATGGCTTGGAGTGGATTGGCTGGATCTATCCCGAATATGGTAACACCA
AGTATAATCAGAAGTTCGACGGTAAGGCCACCCTCACCGCCGATAAGTCATCCTCCAC
CGCCTATATGCAGCTCAGCAGCCTGACCAGCGAGGATTCCGCTGTGTACTTCTGTGCC

AGCGAAGAGGCTGTGATCTCATTGGTGTATTGGGGACAGGGCACCCCTCGTCACCGTGT
 CCAGCGCTAGCACAACTGCTCCTAAGGTGTACCCCCTGAGCTCTTGCTGCGGCGACAA
 GTCTAGCAGCACCGTGACCCTCGGATGCCTCGTCAGCAGCTATATGCCTGAGCCAGTT
 ACAGTGACATGGAATTCTGGTGCCCTTAAGTCCGGCGTCCATACCTTCCCTGCTGTGC
 TGCAGTCCTCTGGCCTGTACAGTTTGTCTCTATGGTGACAGTACCCGGTTCACCTC
 CGGACAGACCTTTACCTGTAATGTGGCTCATCCCGCCTCCTCCACAAAGGTGGATAAG
 GCTGTTGACCCTACCTGTAAACCCAGTCCATGCGACTGCTGTCCCCCCCCTCCAGTTG
 CCGGACCCTCAGTCTTTATTTTCCACCCCAAACCCAAAGACACCCTGACAATCTCTGG
 AACACCAGAAGTCACCTGCGTCGTCGTGGATGTGGGCCACGACGATCCTGAGGTAAAA
 TTCTCATGGTTCGTCGACGATGTGGAAGTGAATACAGCTACTACAAAACCTCGCGAAG
 AGCAGTTTAACTCTACCTATCGAGTGGTTTCTGCTTTGCGGATTCAGCATCAGGATTG
 GACAGGCGGCAAAGAGTTTAAATGTAAAGTCCATAACGAGGGACTTCCTTCTAGTATC
 GTGCGCACTATCAGTAGAACTAAAGGGCCTGCTCGGGAACCTCAGGTGTACGTCCTGG
 CACCTCCACAGGAAGAGCTGAGTAAGTCTACAGTTTCTCTGACTTGTATGGTAACATC
 TTTTTATCCAGATTACATCGCAGTTGAATGGCAGAGGAACGGGCAGCCAGAGAGTGAG
 GATAAGTACGGGACTACTCCACCACAGCTGGACGCAGACTCAAGTTACTTCCTGTACT
 CAAAGCTGAGGGTTGACAGAACTCATGGCAGGAGGGGGACACTTACACTTGCGTAGT
 TATGCACGAGGCACTTCACAACCACTACACTCAGAAGAGTACTTCAAAGAGTGCAGGG
 AAGTAA

<Các SEQ ID NO.: 109-132>

Các SEQ ID NO.: 109-132 thể hiện trình tự nucleotit của các đoạn mồi theo thứ tự là
 ovPD-L1 CDS F, ovPD-L1 CDS R, poPD-L1 CDS F, poPD-L1 CDS R, buPD-L1 CDS
 F1, buPD-L1 CDS R1, buPD-L1 CDS F2, buPD-L1 CDS R2, ovPD-1-EGFP F, ovPD-
 1-EGFP R, ovPD-L1-EGFP F, ovPD-L1-EGFP R, poPD-1-EGFP F, poPD-1-EGFP R,
 poPD-L1-EGFP F, poPD-L1-EGFP R, ovPD-L1-Ig F, ovPD-L1-Ig R, poPD-L1-Ig F,
 poPD-L1-Ig R, cCD80-Ig F, cCD80-Ig R, cPD-L1-His F và cPD-L1-His R.

<Các SEQ ID NO.: 133-138>

Các SEQ ID NO.: 133-138 thể hiện trình tự nucleotit của các đoạn mồi theo thứ tự là
 boPD-1-myc F, boPD-1-myc R, boPD-L1-EGFP F, boPD-L1-EGFP R, boPD-L1-Ig F
 và boPD-L1-Ig R.

Yêu cầu bảo hộ

1. Kháng thể kháng PD-L1 chứa (a) chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1 có trình tự axit amin QSLLYSENQKDY (SEQ ID NO.: 37), CDR2 có trình tự axit amin WAT và CDR3 có trình tự axit amin GQYLVYPFT (SEQ ID NO.: 38) và vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống; và (b) chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR1 có trình tự axit amin GYTFTSNF (SEQ ID NO.: 39), CDR2 có trình tự axit amin IYPEYGNT (SEQ ID NO.: 40) và CDR3 có trình tự axit amin ASEEAVISLVY (SEQ ID NO.: 41) và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng thu được từ chuột cống.
3. Kháng thể theo điểm 2, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ là vùng biến đổi chuỗi nhẹ trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò và vùng biến đổi chuỗi nặng là vùng biến đổi chuỗi nặng trên kháng thể của chuột cống kháng PD-L1 bò.
4. Kháng thể theo điểm 3, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO.: 1 và vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO.: 2.
5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 4, trong đó vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống có trình tự axit amin của vùng hằng định trên chuỗi lamda hoặc chuỗi kapa.
6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 5, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống có trình tự axit amin của vùng hằng định trên globulin miễn dịch tương đương với IgG4 người.
7. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 5, trong đó động vật khác ngoài chuột cống là bò và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của bò có các đột biến được đưa vào làm giảm hoạt tính ADCC và/hoặc hoạt tính CDC.
8. Kháng thể theo điểm 6, trong đó động vật khác ngoài chuột cống là chó; vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của chó có trình tự axit amin của vùng hằng định trên chuỗi lamda; và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của chó có trình tự axit amin của vùng hằng định trên globulin miễn dịch tương đương với IgG4 người.

9. Kháng thể theo điểm 7, trong đó vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của bò có trình tự axit amin của vùng hằng định trên chuỗi lamda và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của bò có các đột biến được đưa vào làm giảm hoạt tính ADCC và/hoặc hoạt tính CDC.
10. Kháng thể theo điểm 8, trong đó vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của chó có trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO.: 3 và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của chó có trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO.: 4.
11. Kháng thể theo điểm 9, trong đó vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của bò có trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO.: 100 và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của bò có trình tự axit amin như được thể hiện ở SEQ ID NO.: 102.
12. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 11, trong đó kháng thể này có cấu trúc bốn chuỗi gồm hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng.
13. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 12 làm thành phần hoạt tính.
14. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 12 làm thành phần hoạt tính để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ung thư và/hoặc bệnh lây nhiễm.
15. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 12 làm thành phần hoạt tính để ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh ung thư và/hoặc bệnh lây nhiễm được chọn từ nhóm bao gồm các bệnh tạo u, bệnh bạch cầu, bệnh Johnne, bệnh nhiễm Anaplasma, viêm vú do vi khuẩn, viêm vú do nấm, bệnh nhiễm trùng do mycoplasma (như viêm vú do mycoplasma, viêm phổi do mycoplasma hoặc tương tự), bệnh lao, bệnh nhiễm trùng do *Theileria orientalis*, bệnh do cryptosporidia, bệnh coccidia, bệnh do Trypanosoma và bệnh do Leishmania.
16. ADN di truyền nhân tạo bao gồm (a') ADN mã hoá chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1 có trình tự axit amin QSLLYSENQKDY (SEQ ID NO.: 37), CDR2 có trình tự axit amin WAT và CDR3 có trình tự axit amin GQYLVYPFT (SEQ ID NO.: 38) và vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống và (b') ADN mã hoá chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR1 có trình tự axit amin GYTFTSNF (SEQ ID NO.: 39), CDR2 có trình tự axit amin IYPEYGNT (SEQ ID NO.: 40) và CDR3 có trình tự axit amin ASEEAVISLVY (SEQ

ID NO.: 41) và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống.

17. Vector chứa ADN di truyền nhân tạo theo điểm 16.

18. Tế bào chủ được biến nạp bằng vector theo điểm 17.

19. Phương pháp tạo ra kháng thể, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 18 và thu kháng thể kháng PD-L1 từ môi trường nuôi cấy thu được.

20. Tổ hợp của ADN mã hoá chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1 có trình tự axit amin QSLLYSENQKDY (SEQ ID NO.: 37), CDR2 có trình tự axit amin WAT và CDR3 có trình tự axit amin GQYLVYPFT (SEQ ID NO.: 38) và vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống có ADN mã hóa chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR1 có trình tự axit amin GYTFTSNF (SEQ ID NO.: 39), CDR2 có trình tự axit amin IYPEYGNT (SEQ ID NO.: 40) và CDR3 có trình tự axit amin ASEEAVISLVY (SEQ ID NO.: 41) và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống.

21. Tổ hợp của vector chứa ADN mã hoá chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1 có trình tự axit amin QSLLYSENQKDY (SEQ ID NO.: 37), CDR2 có trình tự axit amin WAT và CDR3 có trình tự axit amin GQYLVYPFT (SEQ ID NO.: 38) và vùng hằng định chuỗi nhẹ trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống có vector chứa ADN mã hoá chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa CDR1 có trình tự axit amin GYTFTSNF (SEQ ID NO.: 39), CDR2 có trình tự axit amin IYPEYGNT (SEQ ID NO.: 40) và CDR3 có trình tự axit amin ASEEAVISLVY (SEQ ID NO.: 41) và vùng hằng định chuỗi nặng trên kháng thể của động vật khác ngoài chuột cống.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY

<120> Kháng thể kháng PD-L1

<130> FP-221PCT

<150> JP P2016-159088

<151> 2016-08-15

<150> JP P2016-159089

<151> 2016-08-15

<150> JP P2017-110723

<151> 2017-06-05

<150> JP P2017-61454

<151> 2017-03-27

<160> 138

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 1

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

130

<210> 2

<211> 137

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

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

<210> 3

<211> 105

<212> PRT

<213> Canis lupus

<400> 3

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

<210> 4

<211> 331

<212> PRT

<213> Canis lupus

<400> 4

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

325

330

<210> 5

<211> 399

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 5

atggaatcac agacgcatgt cctcatttcc cttctgctct cggatatctgg tacctatggg 60
gacattgcga taaccagtc tccatcctct gtggctgtgt cagtaggaga gacggtcact 120
ctgagctgca agtccagtca gagtctttta tacagtga aaacaaagga ctatttgggc 180
tggtaccagc agaaaccagg gcagactcct aaaccctta tctactgggc aaccaaccgg 240
cacactgggg tccctgatcg cttcacaggt agtggatccg ggacagactt cactctgatc 300
atcagcagtg tgcaggctga agacctggct gattattact gtgggcagta ccttgtctat 360
ccgttcacgt ttggacctgg gaccaagctg gaactgaaa 399

<210> 6

<211> 411

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 6

atgggatgga gccagatcat cctctttctg gtggcagcag ctacatgtgt tcaactccag 60
gtacagctgc agcaatctgg ggctgaatta gtgaagcctg ggtcctcagt gaaaatttcc 120
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagt aactttatgc actgggtaaa gcagcagcct 180
ggaaatggcc ttgagtggat tgggtggatt tatcctgaat atggtaatac taagtacaat 240
caaaagtctg atgggaaggc aacactcact gcagacaaat cctccagcac agcctatatg 300
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt tctgtgcaag tgaggaggca 360
gttatatccc ttgtttactg gggccaaggc actctgggtca ctgtctcttc a 411

<210> 7

<211> 318

<212> ADN

<213> Canis lupus

<400> 7

cagcccaagg cctccccctc ggtcacactc ttcccgccct cctctgagga gctcggcgcc 60
aacaaggcca ccctggtgtg cctcatcagc gacttctacc ccagcggcgt gacggtggcc 120
tggaaggcaa gcggcagccc cgtcaccagc ggctgtgaga ccaccaagcc ctccaagcag 180
agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac ctgagcctga cgctgacaa gtggaaatct 240
cacagcagct tcagctgcct ggtcacgcac gaggggagca ccgtggagaa gaaggtggcc 300
cccgagaggt gctcttag 318

<210> 8

<211> 996

<212> ADN

<213> Canis lupus

<400> 8

gcctccacca cggccccctc ggttttccca ctggccccca gctgcgggtc cacttccggc 60

tccacggtgg ccctggcctg cctggtgtca ggctacttcc ccgagcctgt aactgtgtcc 120
 tggaattccg gctccttgac cagcgggtgtg cacaccttcc cgtcctgtcct gcagtcctca 180
 gggctctact ccctcagcag cagcgtgaca gtgccctcca gcaggtggcc cagcgagacc 240
 ttcacctgca acgtggtcca cccggccagc aactactaaag tagacaagcc agtgcccaaa 300
 gagtccacct gcaagtgtat atccccatgc ccagtccttg aatcactggg agggccttcg 360
 gtcttcatct ttccccgaa acccaaggac atcctcagga ttaccogaac acccgagatc 420
 acctgtgtgg tggttagatct gggccgtgag gacctgagg tgcagatcag ctggttcgtg 480
 gatggttaagg aggtgcacac agccaagaag cagcctcgtg agcagcagtt caacagcacc 540
 taccgtgtgg tcagcgtcct cccattgag caccaggact ggctcaccgg aaaggagttc 600
 aagtgcagag tcaaccacat aggcctcccg tccccatcg agaggactat ctccaaagcc 660
 agagggcaag cccatcagcc cagtgtgtat gtctgccac catccccaaa ggagttgtca 720
 tccagtgaca cggtcaccct gacctgcctg atcaaagact tcttcccacc tgagattgat 780
 gtggagtggc agagcaatgg acagccggag cccgagagca agtaccacac gactgcgccc 840
 cagctggacg aggacgggtc ctacttcctg tacagcaagc tctctgtgga caagagccgc 900
 tggcagcagg gagacacctt cacatgtgcg gtgatgcatt aagctctaca gaaccactac 960
 acagatctat ccctctccca ttctccgggt aatga 996

<210> 9

<211> 238

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi L dạng khảm

<400> 9

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

145	150										155					160				
Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	Ser	Gly	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala					
165					170					175										
Ser	Gly	Ser	Pro	Val	Thr	Gln	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Lys	Pro	Ser	Lys					
180					185					190										
Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro					
195					200					205										
Asp	Lys	Trp	Lys	Ser	His	Ser	Ser	Phe	Ser	Cys	Leu	Val	Thr	His	Glu					
210					215					220										
Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Lys	Val	Ala	Pro	Ala	Glu	Cys	Ser							
225					230					235										
<210> 10																				
<211> 468																				
<212> PRT																				
<213> Trình tự nhân tạo																				
<220>																				
<223> Chuỗi H dạng khảm																				
<400> 10																				
Met	Gly	Trp	Ser	Gln	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Cys					
1	5					10					15									
Val	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys					
20					25					30										
Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe					
35					40					45										
Thr	Ser	Asn	Phe	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Gln	Pro	Gly	Asn	Gly	Leu					
50					55					60										
Glu	Trp	Ile	Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Glu	Tyr	Gly	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asn					
65	70					75					80									
Gln	Lys	Phe	Asp	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser					
85					90					95										
Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val					
100					105					110										
Tyr	Phe	Cys	Ala	Ser	Glu	Glu	Ala	Val	Ile	Ser	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly					
115					120					125										
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Thr	Ala	Pro	Ser					
130					135					140										
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Cys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Thr	Val					
145	150					155					160									
Ala	Leu	Ala	Cys	Leu	Val	Ser	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val					
165					170					175										
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ser					
180					185					190										

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val Val His
 210 215 220
 Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro Lys Glu Ser Thr
 225 230 235 240
 Cys Lys Cys Ile Ser Pro Cys Pro Val Pro Glu Ser Leu Gly Gly Pro
 245 250 255
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Arg Ile Thr
 260 265 270
 Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys Val Val Leu Asp Leu Gly Arg Glu Asp
 275 280 285
 Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu Val His Thr
 290 295 300
 Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320
 Val Ser Val Leu Pro Ile Glu His Gln Asp Trp Leu Thr Gly Lys Glu
 325 330 335
 Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Gly Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg
 340 345 350
 Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr Val
 355 360 365
 Leu Pro Pro Ser Pro Lys Glu Leu Ser Ser Ser Asp Thr Val Thr Leu
 370 375 380
 Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Phe Pro Pro Glu Ile Asp Val Glu Trp
 385 390 395 400
 Gln Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Ser Lys Tyr His Thr Thr Ala
 405 410 415
 Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser
 420 425 430
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asp Thr Phe Thr Cys Ala Val
 435 440 445
 Met His Glu Ala Leu Gln Asn His Tyr Thr Asp Leu Ser Leu Ser His
 450 455 460
 Ser Pro Gly Lys
 465
 <210> 11
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 11
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

<210> 12

<211> 326

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 12

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

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

<210> 13

<211> 321

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<400> 13

actgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga	60
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatocca gagaggccaa agtacagtgg	120
aagggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc	180
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa	240
cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccggt cacaaagagc	300
ttcaacaggg gagagtgtta g	321

<210> 14

<211> 981

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<400> 14

tccaccaagg gcccatccgt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc	60
acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	120
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	180
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac gaagacctac	240
acctgcaacg tagatcacia gcccgacaac accaagggtgg acaagagagt tgagtccaaa	300
tatggtcccc catgcccata atgccagca cctgagttcc tggggggacc atcagtcttc	360
ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc	420
gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc	480

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt 540
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
 aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 660
 cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac 720
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcg cgtggagtgg 780
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgctgt ggactccgac 840
 ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat 900
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 960
 tccctgtctc tgggtaaagt a 981

<210> 15

<211> 399

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tối ưu hoá codon

<400> 15

atggaatctc aaactcatgt ttgatttca ttacttctga gtgtttccgg aacctacggc 60
 gatatcgcta tcactcaatc tccctcctct gttgctgtgt ctgtgggcga aaccgttacc 120
 ctgtcctgca agtccagtca gtctcttctc tactccgaga atcaaaagga ctacctgggc 180
 tggtagcaac agaagcccgg ccagacccca aagccactga tatactgggc aaccaacagg 240
 cacacoggag tgcccgacag gttcacaggc agtggatctg gcaccgactt taccttgatc 300
 atttcaagcg tgcaggctga agatctggcc gactactact gtggtcagta tctggtgtat 360
 cctttcactt tcgggccagg gacaaaattg gaattgaag 399

<210> 16

<211> 411

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tối ưu hoá codon

<400> 16

atgggttggc ctcaaattat cttgtttttg gttgctgcag ccacttgtgt tcattctcag 60
 gtgcagctgc aacaaagcgg cgcagaactg gtgaaacctg gcagcagcgt gaaaatatct 120
 tgtaaggcca gcgatatac ttccacctcc aatttcatgc attgggtcaa acagcagccc 180
 ggcaacggac tcgagtggat cggctggatc taccocgagt atggcaacac aaaatataac 240
 caaaaatttg atggaaaggc taccctgact gccgataagt cctccagcac cgcatacatg 300
 caactctcct ccctgacctc cgaggatagc gctgtctact tctgtgcttc cgaagaggct 360
 gtcatactct tgggtctattg gggccaagga actctggtga ccgtctcatc t 411

<210> 17

<211> 318

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tối ưu hoá codon

<400> 17

cagcccaaaag cctctcccag cgtcaccctc ttcccacctt ccagtgagga gctgggggca	60
aacaaagcca ctttggtgtg tctcatctcc gatttttacc cctccggggt cacagtcgca	120
tggaaggcct ccggatcccc tgtgacacag ggagtggaga caacaaaacc tagcaagcag	180
agtaacaata agtatgccgc ctcaagctat ctcagcctta ctctgataa gtggaagtca	240
catagcagtt ttagttgcct cgtaacacat gagggttcaa ctgtggagaa aaaagtagct	300
ccagctgagt gctcatga	318

<210> 18

<211> 996

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tối ưu hoá codon

<400> 18

gctagcaciaa ccgctccctc cgtttttccc ctgcgcccat cctgcgggtc aaccagcggga	60
tccaccgtcg ctctggcttg tctggtgtca ggatacttcc ccgagcctgt caccgtttct	120
tggaatagcg gcagccttac ttccggcgtg cataccttcc ctagcgtgct tcagtcctcc	180
ggtctgtatt ccctcagctc caccgtaact gtcccaagct caagggtggcc ctctgagaca	240
tttacctgca atgtggtcca tctgtctca aataccaaag tggacaagcc cgtcccaaaa	300
gagtctacct gcaaagtgtat cagtccttgt cccgtgcccg agtctctggg cggaccctca	360
gtcttttatct tcccacccaa gccaaaggac atattgcgca ttacacggac acccgaaatc	420
acctgtgttg tgttggtatct cggccgggaa gatcctgagg tgcagattag ttggtttggt	480
gatggcaagg aggtgcacac agcaaaaaca cagcccagag aacagcagtt caacagtact	540
tatagagtag tgagtgtgtt gcctatagag catcaggact ggctgacagg caaagaattc	600
aaatgtaggg ttaaccacat tggcctccct agtccaatcg agaggacaat ctctaaagcc	660
cgaggccagg ctcatcagcc ttctgtgtac gttctgcctc ctagtcctaa ggaactgtct	720
tcttcagaca cagtaacact cacttgccctg attaaggact tttttcctcc agagattgat	780
gtggaatggc agtctaacgg gcagccagag ccagaatcta agtaccacac tactgcacca	840
cagctggatg aggatgggtc ttacttcctg tacagtaagc tgagtgtgga caagtctcga	900
tggcagcagg gggatacttt tacttgcgca gtaatgcacg aagcattgca gaaccactac	960
actgacctgt cacttagtca ctaccagggg aagtaa	996

<210> 19

<211> 717

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tối ưu hoá codon

<400> 19

atggaatctc aaactcatgt tttgatttca ttactttctga gtgtttccgg aacctacggt	60
gatatcgcta tcaactcaatc tccctcctct gttgctgtgt ctgtgggcga aaccgttacc	120
ctgtcctgca agtccagtca gtctcttctc tactccgaga atcaaaagga ctacctgggc	180

tggtagcaac agaagcccgg ccagacccca aagccactga tatactgggc aaccaacagg 240
 cacaccggag tgcccgcacag gttcacaggc agtggatctg gcaccgactt taccttgatc 300
 atttcaagcg tgcaggctga agatctggcc gactactact gtggtcagta tctgggtgat 360
 cctttcactt tcggggccagg gacaaaattg gaattgaagc agcccaaagc ctctcccagc 420
 gtcaccctct tcccaccttc cagtgaggag ctggggggcaa acaaagccac tttgggtgtg 480
 ctcatctccg atttttaccc ctccggggtc acagtgcgcat ggaaggcctc cggatcccct 540
 gtgacacagg gagtggagac aacaaaacct agcaagcaga gtaacaataa gtatgccgcc 600
 tcaagctatc tcagccttac tcctgataag tggaagtcac atagcagttt tagttgcctc 660
 gtaacacatg agggttcaac tgtggagaaa aaagtagctc cagctgagtg ctcatga 717

<210> 20

<211> 1407

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tối ưu hoá codon

<400> 20

atgggttggg ctcaaattat cttgtttttg gttgctgcag ccacttgtgt tcattctcag 60
 gtgcagctgc aacaaagcgg cgcagaactg gtgaaacctg gcagcagcgt gaaaatatct 120
 tgtaaggcca gcggatatac ttccacctcc aatttcatgc attgggtcaa acagcagccc 180
 ggcaacggac tcgagtggat cggctggatc taccctcagc atggcaacac aaaatataac 240
 caaaaatttg atggaaaggc taccctgact gccgataagt cctccagcac cgcatacatg 300
 caactctcct cctgacctc cgaggatagc gctgtctact tctgtgcttc cgaagaggct 360
 gtcatactct tgggtctattg gggccaagga actctgggtga ccgtctcatc tgctagcaca 420
 accgctccct ccgtttttcc cctcgcccca tcctgctggg caaccagcgg atccaccgtc 480
 gctctggctt gtctggtgtc aggatacttc cccgagcctg tcaccgtttc ttggaatagc 540
 ggcagcctta cttccggcgt gcataccttc cctagcgtgc ttcagtcctc cgggtctgat 600
 tcctcagct ccaccgtaac tgtcccaagc tcaagggtgg cctctgagac atttacctgc 660
 aatgtgggtc atcctgcttc aaataccaaa gtggacaagc ccgtcccaaa agagtctacc 720
 tgcaaagtga tcagtccttg tcccggtgcc gagtctctgg gcggaccctc agtctttatc 780
 ttcccacca agccaaagga catattgcgc attacacgga cacccgaaat cacctgtgtt 840
 gtgttggtgc tcggccggga agatcctgag gtgcagatta gttggtttgt tgatggcaag 900
 gaggtgcaca cagcaaaaac acagcccaga gaacagcagt tcaacagtac ttatagagta 960
 gtgagtgtgt tgccctataga gcatcaggac tggctgacag gcaaagaatt caaatgtagg 1020
 gtttaaccaca ttggcctccc tagtccaatc gagaggacaa tctctaaagc ccgaggccag 1080
 gctcatcagc cttctgtgta cgttctgcct cctagtccta aggaactgtc ttcttcagac 1140
 acagtaacac tcacttgctt gattaaggac ttttttcttc cagagattga tgtggaatgg 1200
 cagtctaacg ggcagccaga gccagaatct aagtaccaca ctactgcacc acagctggat 1260
 gaggatgggt cttacttcct gtacagtaag ctgagtggtg acaagtctcg atggcagcag 1320
 ggggatactt ttacttgccg agtaatgcac gaagcattgc agaaccaata cactgacctg 1380
 tcacttagtc actcaccagg gaagtaa 1407

<210> 21

<211> 20

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 21
 aggatggctc ctagactccc 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 22
 agacgatggg ggcataactcg 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 23
 atgagaatgt ttagtgtctt 20
 <210> 24
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 24
 ttatgtctct tcaaattgta tatic 24
 <210> 25
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 25
 gttgatctgt gtgttg 16
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 26
 cgggacttcc acatgagcat 20
 <210> 27
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 27
 ttttagacag aaagtga 17
 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 28
 gaccagctct tcttggggaa 20
 <210> 29
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 29
 ccgctcgaga tggggagccg gcgggggcc 29
 <210> 30
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 30
 cgcggtatcct gagggggccac aggccgggtc 30
 <210> 31
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 31
 gaagatctat gagaatgttt agtgtc 26
 <210> 32
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 32
 ggaattctgt ctcttcaaatt tgtatatc 28
 <210> 33
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 33
 cgcggttagc atggggagcc ggcgggggcc 30
 <210> 34
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 34
 cgcggatatc cagcccctgc aactggccgc 30
 <210> 35
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 35
 cgcggttagc atgagaatgt ttagtgtctt 30
 <210> 36
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 36
 cgcggatatc agtcctctca cttgctggaa 30

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 37

Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Glu Asn Gln Lys Asp Tyr

1 5 10

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 38

Gly Gln Tyr Leu Val Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 39

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn Phe

1 5

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 40

Ile Tyr Pro Glu Tyr Gly Asn Thr

1 5

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 41

Ala Ser Glu Glu Ala Val Ile Ser Leu Val Tyr

1 5 10

<210> 42

<211> 331

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 42

Ala Ser Thr Thr Pro Pro Lys Val Tyr Pro Leu Thr Ser Cys Cys Gly

1 5 10 15

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

<210> 43

<211> 996

<212> ADN

<213> Ovis aries

<400> 43

```

gcctcaacaa ccccccgaa agtctaccct ctgacttctt gctgcgggga cacgtccagc      60
tccatcgtga ccctgggctg cctgggtctcc agctatatgc ccgagccggt gaccgtgacc      120
tggaactctg gtgccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggccatcct gcagtcctcc      180
gggctctact ctctcagcag cgtgggtgacc gtgccggcca gcacctcagg agcccagacc      240
ttcatctgca acgtagccca cccggccagc agcaccaagg tggacaagcg tgttgagccc      300
ggatgcccgg acccatgcaa acattgcoga tggccacccc ctgagctccc cggaggaccg      360
tctgtcttca tcttcccacc gaaacccaag gacacctta caatctctgg aacgcccag      420
gtcacgtgtg tgggtggtgga cgtggggccag gatgaccccg aggtgcagtt ctcttggttc      480
gtggacaacg tggaggtgcg cacggccagg acaaagccga gagaggagca gttcaacagc      540
accttccgog tggtcagcgc cctgcccata cagcaccaag actggactgg aggaaaggag      600
ttcaagtgca aggtccacaa cgaagccctc ccggcccccga tcgtgaggac catctccagg      660
accaaagggc aggcccgga gccgcaggtg tacgtctctg cccacccca ggaagagctc      720
agcaaaagca cgctcagcgt cacctgcctg gtcaccggct tctaccaga ctacatcgcc      780
gtggagtggc agaaaaatgg gcagcctgag tcggaggaca agtacggcac gaccacatcc      840
cagctggacg ccgacggctc ctacttctg tacagcaggc tcagggtgga caagaacagc      900
tggcaagaag gagacaccta cgcgtgtgtg gtgatgcacg aggtcttgca caaccactac      960
acacagaagt cgatctctaa gcctccgggt aaatga      996

```

<210> 44

<211> 329

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 44

```

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

```

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

<210> 45

<211> 990

<212> ADN

<213> Ovis aries

<400> 45

gcctccacca cagccccgaa agtctaccct ctgacttctt gctgcgggga cacgtccagc	60
tccagctcca tcgtgaccct gggctgcctg gtctccagct atatgccga gccggtgacc	120
gtgacctgga actctggtgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc catcctgcag	180
tcctccgggc tctactctct cagcagcgtg gtgaccgtgc cggccagcac ctccaggagcc	240
cagacottca tctgcaacgt agcccacccg gccagcagcg ccaaggtgga caagcgtgtt	300
gggatctcca gtgactactc caagtgttct aaaccgcctt gcgtgagccg accgtctgtc	360
ttcatcttcc ccccgaaacc caaggacagc ctcatgatca caggaacgcc cgaggtcacg	420
tgtgtggtgg tggacgtggg ccagggtgac cccgaggtgc agttctcctg gttcgtggac	480
aacgtggagg tgcgcacggc caggacaaag ccgagagagg agcagttcaa cagcaccttc	540
cgcgtggtca gcgccctgcc catccagcac gaccactgga ctggaggaaa ggagttcaag	600
tgcaaggtcc acagcaaagg cctcccggcc cccatcgtga ggaccatctc cagggccaaa	660
gggcaggccc gggagccgca ggtgtacgtc ctggcccccac cccaggaaga gctcagcaaa	720

agcacgctca gcgtcacctg cctggtcacc ggcttctacc cagactacat cgccgtggag 780
 tggcagagag cgcggcagcc tgagtcggag gacaagtacg gcacgaccac atcccagctg 840
 gacgccgacg gctcctactt cctgtacagc aggctcaggg tggacaagag cagctggcaa 900
 agaggagaca cctacgcgtg tgtggtgatg cacgaggctc tgcacaacca ctacacacag 960
 aagtcgatct ctaagcctcc gggtaaata 990

<210> 46

<211> 102

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 46

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

<210> 47

<211> 309

<212> ADN

<213> Ovis aries

<400> 47

ccatccgtct tcctcttcaa accatctgag gaacagctga ggaccggaac tgtctctgtc 60
 gtgtgcttg tgaatgattt ctaccccaaa gatataaatg tcaaggtgaa agtggatggg 120
 gttaccacga acagcaactt ccagaacagc ttcacagacc aggacagcaa gaaaagcacc 180
 tacagcctca gcagcaccct gacactgtcc agctcagagt accagagcca taacgcctat 240
 gcgtgtgagg tcagccacaa gagcctgccc accgcctctg tcaagagctt caataagaat 300
 gaatgttag 309

<210> 48

<211> 106

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 48

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

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

<210> 49

<211> 321

<212> ADN

<213> *Ovis aries*

<400> 49

ggtcagccca agtccgcacc ctcggtcacc ctgttcccgc cttccacgga ggagctcagt 60
 accaacaagg ccaccgtggt gtgtctcatc aacgacttct acccggttag cgtgaacgtg 120
 gtctggaagg cagatggcag caccatcaat cagaacgtga agaccacca ggcttccaaa 180
 cagagcaaca gcaagtacgc ggccagcagc tacctgacct tgacgggcag cgagtgggaag 240
 tctaagagca gttacacctg cgaggtcacg caccagggga gcaccgtgac gaagacagtg 300
 aagccctcag agtgttctta g 321

<210> 50

<211> 328

<212> PRT

<213> *Sus scrofa*

<400> 50

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

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

<210> 51

<211> 987

<212> ADN

<213> Sus scrofa

<400> 51

gcccccaaga cggccccatc ggtctaccct ctggccccct gcggcagggg cactgtctggc 60
 cctaacgtgg ccttgggctg cctggcctca agctacttcc ccgagccagt gaccatgacc 120
 tggaactcgg gcgccttgac cagtggcgtg cataccttcc catccgtcct gcagccgtca 180
 gggctctact ccctcagcag catggtgacc gtgccggcca gcagcctgtc cagcaagagc 240
 tacacctgca atgtcaacca cccggccacc accaccaagg tggacaagcg tgttggaaca 300
 aagaccaaac caccatgtcc catatgccca ggctgtgaag tggccggggc ctcggtcttc 360
 atcttccctc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc agacccccga ggtcacgtgc 420
 gtggtggtgg acgtcagcaa ggagcacgcc gaggtccagt tctcctggta cgtggacggc 480
 gtagaggtgc acacggccga gacgagacca aaggaggagc agttcaacag cacctaccgt 540

gtggtcagcg tcctgcccac ccagcaccag gactggctga aggggaagga gttcaagtgc 600
aaggtcaaca acgtagacct cccagccccc atcacgagga ccatctccaa ggctataggg 660
cagagccggg agccgcaggt gtacaccctg cccccaccg ccgaggagct gtccaggagc 720
aaagtcaccg taacctgcct ggtcattggc ttctaccac ctgacatcca tgttgagtgg 780
aagagcaacg gacagccgga gccagagggc aattaccgca ccaccccgcc ccagcaggac 840
gtggacggga ccttcttcct gtacagcaag ctgcggtgg acaaggcaag atgggacccat 900
ggagaaacat ttgagtgtgc ggtgatgcac gaggtctgc acaaccacta caccagaag 960
tccatctcca agactcaggg taaatga 987

<210> 52

<211> 328

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 52

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

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

<210> 53

<211> 987

<212> ADN

<213> Sus scrofa

<400> 53

gcccccaaga cggccccatc ggtctaccct ctggccccct gcggcaggga cgtgtctggc 60
 cctaacgtgg ccttgggctg cctggcctca agctacttcc ccgagccagt gaccgtgacc 120
 tggaactcgg gcgccttgac cagtggcgtg cacaccttcc catccgtcct gcagccgtca 180
 gggctctact ccctcagcag catggtgacc gtgccggcca gcagcctgtc cagcaagagc 240
 tacacctgca atgtcaacca ccgggccacc accaccaagg tggacaagcg tgttgaata 300
 caccagccgc aaacatgtcc catatgcca ggctgtgaag tggccgggcc ctcggtcttc 360
 atcttccctc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc agacccccga ggtcacgtgc 420
 gtggtggtgg acgtcagcaa ggagcacgcc gaggtccagt tctcctggta cgtggacggc 480
 gtagaggtgc acacggccga gacgagacca aaggaggagc agttcaacag cacctaccgt 540
 gtggtcagcg tcctgccccat ccagcaccag gactggctga aggggaagga gttcaagtgc 600
 aaggtaaca acgtagacct ccagcccc atcacgagga ccatctccaa ggctataggg 660
 cagagccggg agccgcaggt gtacaccctg cccccacccg ccgaggagct gtccaggagc 720
 aaagtcacgc taacctgcct ggtcattggc ttctaccac ctgacatcca tgttgagtgg 780
 aagagcaacg gacagccgga gccagagaac acataccgca ccaccccgcc ccagcaggac 840
 gtggacggga ccttcttcct gtacagcaaa ctgcggtgg acaaggcaag atgggaccat 900
 ggagacaaat ttgagtgtgc ggtgatgcac gaggtctctg acaaccacta caccagaag 960
 tccatctcca agactcaggg taaatga 987

<210> 54

<211> 328

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 54

Ala Pro Lys Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1

5

10

15

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

<210> 55

<211> 987

<212> ADN

<213> Sus scrofa

<400> 55

```

gcccccaaga cggccccatc ggtctaccct ctggccccct gcagcaggga cacgtctggc      60
cctaacgtgg ccttgggctg cctggcctca agctacttcc ccgagccagt gaccgtgacc      120
tggaactcgg gcgccctgtc cagtggcgtg cataccttcc catccgtcct gcagccgtca      180
gggctctact ccctcagcag catgggtgacc gtgccggcca gcagcctgtc cagcaagagc      240
tacacctgca atgtcaacca cccggccacc accaccaagg tggacaagcg tgttggaaca      300
aagaccaaac caccatgtcc catatgocca gcctgtgaat caccagggcc ctccgtcttc      360
atcttccctc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacacccca ggtcacgtgc      420
gtggtggttg atgtgagcca ggagaacccg gaggtccagt tctcctggta cgtggacggc      480
gtagagggtg acacggccca gacgaggcca aaggaggagc agttcaacag cacctaccgc      540
gtggtcagcg tcctacccat ccagcaccag gactggctga acgggaagga gttcaagtgc      600
aaggtcaaca acaaagacct ccagccccc atcacaagga tcatctccaa ggccaaaggg      660
cagaccoggg agccgcaggt gtacaccctg cccccacacg ccgaggagct gtccaggagc      720
aaagtcagca taacctgcct ggtcattggc ttctaccac ctgacatcga tgtcgagtgg      780
caaagaaacg gacagccgga gccagagggc aattaccgca ccaccccgcc ccagcaggac      840
gtggacggga cctacttcct gtacagcaag ttctcgggtg acaaggccag ctggcagggg      900
ggaggcatat tccagtgtgc ggtgatgcac gaggtctctgc acaaccacta caccagaag      960
tctatctcca agactccggg taaatga      987

```

<210> 56

<211> 328

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 56

```

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

```

130	135	140
Val Ser Gln Glu Asn Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly		
145	150	155
Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn		
	165	170
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp		
	180	185
Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro		
	195	200
Ala Pro Ile Thr Arg Ile Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg Glu		
	210	215
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro His Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser		
	225	230
Lys Val Ser Ile Thr Cys Leu Val Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile		
	245	250
Asp Val Glu Trp Gln Arg Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Gly Asn Tyr		
	260	265
Arg Thr Thr Pro Pro Gln Gln Asp Val Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr		
	275	280
Ser Lys Phe Ser Val Asp Lys Ala Ser Trp Gln Gly Gly Gly Ile Phe		
	290	295
Gln Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
	305	310
Ser Ile Ser Lys Thr Pro Gly Lys		
	325	

<210> 57

<211> 987

<212> ADN

<213> Sus scrofa

<400> 57

gcccccaaga cggccccatt ggtctaccct ctggccccct gcggcagggg cactgtctggc	60
cctaactgtg ccttgggctg cctggcctca agctacttcc ccgagccagt gaccgtgacc	120
tggaactcgg gcgcctgac cagtggcgtg cataccttcc catccgtcct gcagccgtca	180
gggctctact ccctcagcag catggtgacc gtgccggcca gcagcctgtc cagcaagagc	240
tacacctgca atgtcaacca cccggccacc accaccaagg tggacaagcg tgttggaaca	300
aagaccaaac caccatgtcc catatgccca gcctgtgaat cgccagggcc ctcggtcttc	360
atcttccttc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacacccca ggtcacgtgc	420
gtggtagttg atgtgagcca ggagaaccg gaggtccagt tctcctggta cgtggacggc	480
gtagagggtgc acacggccca gacgaggcca aaggaggagc agttcaacag cacctaccgc	540
gtggtcagcg tcctgccccat ccagcaccag gactggctga acgggaagga gttcaagtgc	600
aaggtcaaca acaaagacct ccagccccc atcacaagga tcatctccaa ggccaaaggg	660
cagacccggg agccgcaggt gtacaccctg cccccacacg ccgaggagct gtccaggagc	720

aaagtcagca taacctgcct ggtcattggc ttctaccac ctgacatcga tgtcgagtgg 780
 caaagaaacg gacagccgga gccagagggc aattaccgca ccaccccgcc ccagcaggac 840
 gtggacggga cctacttcct gtacagcaag ttctcggtgg acaaggccag ctggcagggg 900
 ggaggcatat tccagtgtgc ggtgatgcac gaggctctgc acaaccacta caccagaag 960
 tctatctcca agactccggg taaatga 987

<210> 58

<211> 333

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 58

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

Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu
 260 265 270
 Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Gln Asp Val Asp Gly
 275 280 285
 Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ala Val Asp Lys Val Arg Trp Gln
 290 295 300
 Arg Gly Asp Leu Phe Gln Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 305 310 315 320
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Lys Thr Gln Gly Lys
 325 330

<210> 59

<211> 1002

<212> ADN

<213> Sus scrofa

<400> 59

gcctacaaca cagctccatc ggtctaccct ctggccccct gtggcagggg cgtgtctgat 60
 cataacgtgg ccttgggctg ccttgtctca agctacttcc ccgagccagt gaccgtgacc 120
 tggaactcgg gtgccctgtc cagagtcgtg cataccttcc catccgtcct gcagccgtca 180
 gggctctact ccctcagcag catggtgatc gtggcggcca gcagcctgtc caccctgagc 240
 tacacgtgca acgtctacca cccggccacc aacaccaagg tggacaagcg tgttgacatc 300
 gaacccccca caccatctg tcccgaatt tgctcatgcc cagctgcaga ggtcctggga 360
 gcaccgtcgg tcttctctt ccttccaaa cccaaggaca tctcatgat ctcccggaca 420
 cccaagggtc cgtgcgtggt ggtggacgtg agccaggagg aggtgaagt ccagttctcc 480
 tggtagctgg acggcgtaca gttgtacacg gccagacga ggccaatgga ggagcagttc 540
 aacagcacct accgcgtggt cagcgtcctg cccatccagc accaggactg gctgaagggg 600
 aaggagtcca agtgcaaggt caacaacaaa gacctccttt ccccatcac gaggaccatc 660
 tccaaggcta cagggccgag ccgggtgccg cagggtgtaca ccctgcccc agcctgggaa 720
 gagctgtcca agagcaaagt cagcataacc tgcttggtca ctggcttcta cccacctgac 780
 atcgatgtcg agtggcagag caacggacaa caagagccag agggcaatta ccgcaccacc 840
 ccgccccagc aggacgtgga tgggacctac ttcctgtaca gcaagctcgc ggtggacaag 900
 gtcaggtggc agcgtggaga cctattccag tgtgcggtga tgcacgaggc tctgcacaa 960
 cactacaccc agaagtccat ctccaagact cagggtaaat ga 1002

<210> 60

<211> 277

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 60

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

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

<210> 61

<211> 834

<212> ADN

<213> Sus scrofa

<400> 61

accttcccat ccgtcctgca gccgtcaggg ctctactccc tcagcagcat ggtgaccgtg	60
ccggccagca gcctgtccag caagagctac acctgcaatg tcaaccaccc ggccaccacc	120
accaaggtgg acaagcgtgt tggaacaaag accaaaccac catgtcccat atgccagcc	180
tgtgaagggc ccggggccctc ggccttcac ttcctccaa aaccaagga caccctcatg	240
atctcccga ccccaaggt cacgtgctg gtggtagatg tgagccagga gaaccggag	300
gtccagttct cctggtacgt ggacggcgta gaggtgcaca cggccagac gaggccaaag	360

gaggagcagt tcaacagcac ctaccgctg gtcagcgtcc tgcccatcca gcaccaggac .420
 tggctgaacg ggaaggagtt caagtgaag gtcaacaaca aagacctccc agccccatc 480
 acaaggatca tctccaaggc caaagggcag acccgggagc cgcaggtgta caccctgccc 540
 ccaccaccg aggagctgtc caggagcaaa gtcacgctaa cctgcctggt cactggcttc 600
 taccacactg acatcgatgt cgagtggcaa agaaacggac agccggagcc agagggcaat 660
 taccgcacca ccccgcccca gcaggacgtg gacgggacct acttcctgta cagcaagctc 720
 gcggtggaca aggccagctg gcagcgtgga gacacattcc agtgtgcggt gatgcacgag 780
 gctctgcaca accactacac ccagaagtcc atcttcaaga ctccgggtaa atga 834

<210> 62

<211> 318

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 62

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

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

<210> 63

<211> 955

<212> ADN

<213> Sus scrofa

<400> 63

gcccccaaga cggccccatc ggtctaccct ctggccccct gcggcaggga cgtgtctggc 60
 cctaacgtgg ccttgggctg cctggcctca agctacttcc ccgagccagt gaccgtgacc 120
 tggaactcgg gcgccctgac cagtggcgtg cacaccttcc catccgtcct gcagccgtca 180
 gggctctact ccctcagcag catggtgacc gtgccggcca gcagcctgtc cagcaagagc 240
 tacacctgca atgtcaacca cccggccacc accaccaagg tggacaagcg tgttggaata 300
 caccagccgc aaacatgtcc catatgccca gcctgtgaag ggcccgggcc ctcggccttc 360
 atcttccctc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccccaa ggtcacgtgc 420
 gtggtggttg atgtgagcca ggagaacccg gaggtccagt tctcctggta cgtggacggc 480
 gtagagggtgc acacggccca gacgaggcca aaggaggagc agttcaacag cacctaccgc 540
 gtggtcagcg tctgtctcat ccagcaccag gactggctga acgggaagga gttcaagtgc 600
 aaggtcaaca acaaagacct cccagcccc atcacaagga tcatctccaa ggccaaaggg 660
 cagaccggg agccgcaggt gtacaccctg cccccacca ccgaggagct gtccaggagc 720
 aaagtcacgc taacctgcct ggtcactggc ttctaccac ctgacatcga tgtcgagtgg 780
 caaagaaacg gacagccgga gccagagggc aattaccgca ccaccccgcc ccagcaggac 840
 gtggacggga cctacttcct gtacagcaag ctgcggtgga acaaggccag ctggcagcgt 900
 ggagacacat tccagtgtgc ggtgatgcac gaggctctgc acaaccacta ccccc 955

<210> 64

<211> 323

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 64

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

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

<210> 65

<211> 975

<212> ADN

<213> Sus scrofa

<220>

<221> Dấu hiệu misc

<222> (748)..(748)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 65

```

gcccccaaga cggccccatc ggtctaccct ctggccccct gcagcagggga cacgtctggc      60
cctaacgtgg ccttgggctg cctgggtctca agctacttcc ccgagccagt gaccgtgacc      120
tggaactcgg gcgccctgac cagtggcgtg cacaccttcc catccgtcct gcagccgtca      180
gggctctact ccctcagcag catggtgacc gtgccggccc acagcttgtc cagcaagcgc      240
tatacgtgca atgtcaacca cccagccacc aaaaccaagg tggacctgtg tgttggacga      300
ccatgtccca tatgcccagg ctgtgaagtg gccggggccct cgggtcttcat cttccctcca      360
aaacccaagg acatcctcat gatctcccgg acccccgagg tcacgtgcgt ggtggtggac      420
gtcagcaagg agcacgccga ggtccagttc tcctggtacg tggacggcga agaggtgcac      480
acggccgaga cgaggccaaa ggaggagcag ttcaacagca cctaccgctg ggtcagcgtc      540
ctgcccatcc agcacgagga ctggctgaag gggaaggagt tcgagtgcaa ggtcaacaac      600
gaagacctcc caggccccat cacgaggacc atctccaagg ccaaaggggt ggtacggagc      660
ccggaggtgt acacctgccc cccaccgccc gaggagctgt ccaagagcat agtcacgcta      720
acctgcctgg tcaaaagcat cttcccgnct ttcattccatg ttgagtggaa aatcaacgga      780
aaaccagagc cagagaacgc atatcgacc accccgcctc aggaggacga ggacaggacc      840
tacttcctgt acagcaagct cgcggtggac aaggcaagat gggaccatgg agaaacatct      900
gagtgtgcgg tgatgcacga ggctctgcac aaccactaca ccagaagtc catctccaag      960
actcagggta aatga                                          975

```

<210> 66

<211> 317

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 66

```

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

```

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

<210> 67

<211> 952

<212> ADN

<213> Sus scrofa

<400> 67

gcctacaaca cagctccatc ggtctaccct ctggccccct gtggcaggga cgtgtctgat 60
 cataacgtgg ccttgggctg cctgggtctca agctacttcc ccgagccagt gaccgtgacc 120
 tggaactggg gcgcccagac cagtggcgtg cacaccttcc catccgtcct gcagccgtca 180
 gggctctact ccctcagcag cacggtgacc gtgccggccc acagcttgtc cagcaagtgc 240
 ttacgtgca atgtcaacca cccggccacc accaccaagg tggacctgtg tgttggaana 300
 aagaccaagc ctcgatgtcc catatgccca ggctgtgaag tggccgggccc ctcggtcttc 360
 atcttccctc caaaacccaa ggacatcctc atgatctccc ggacccccga ggtcacgtgc 420
 gtggtggtgg acgtcagcaa ggagcacgcc gaggtccagt tctcctggta cgtggacggc 480
 gaagaggtgc acacggccga gacgagacca aaggaggagc agttcaacag cacttacgcg 540
 gtggtcagcg tcttgcccat ccagcacgag gactggctga aggggaagga gttcgagtgc 600
 aaggtcaaca acgaagacct cccaggcccc atcacgagga ccatctccaa ggccaaaggg 660
 gtggtacgga gcccgagggt gtacaccctg cccccaccg ccgaggagct gtccaagagc 720
 atagtcacgc taacctgcct ggtcaaaaagc ttcttcccgc ctttcatcca tgttgagtgg 780

aaaatcaacg gaaaaccaga gccagagaac gcataccgca ccaccccgcc ccaggaggac 840
 gaggacggga cctacttcct gtacagcaag ttctcgggtg aaaagttcag gtggcacagt 900
 ggaggcatcc actgtgcggt gatgcacgag gctctgcaca accactacac cc 952

<210> 68

<211> 314

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 68

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

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

<210> 69

<211> 943

<212> ADN

<213> Sus scrofa

<400> 69

gcccccaaga cgcccccatc ggtctaccct ctggccccct gcggcagggg cactgtctggc 60
 cctaacgtgg ccttgggctg cctggcctca agctacttcc ccgagccagt gacctgacc 120
 tggaactcgg gcgccctgac cagtggcgtg cataccttcc catccgtcct gcagccgtca 180
 gggctctact ccctcagcag catggtgacc gtgccggcca gcagcctgtc cagcaagagc 240
 tacacctgca atgtcaacca cccggccacc accaccaagg tggacctgtg tggtggacga 300
 ccatgtccca tatgcccagc ctgtgaaggg cccgggccct cggctctcat cttccctcca 360
 aaacccaagg acacctcat gatctcccg agaccccagg tcacgtgcgt ggtggtagat 420
 gtgagccagg aaaacccgga ggtccagttc tcttggtatg tggacgggtg agaggtgcac 480
 acggcccaga cgaggccaaa ggaggcgag ttcaacagca cctaccgtgt ggtcagcgtc 540
 ctgcccaccc agcacgagga ctggctgaag gggaaggagt tcgagtgcaa ggtcaacaac 600
 aaagacctcc cagcccccat cacaaggatc atctccaagg ccaaagggcc gagccgggag 660
 ccgcaggtgt acacctgtc cccatccgcc gaggagctgt ccaggagcaa agtcagcata 720
 acctgcctgg tcaactggctt ctaccacact gacatcgatg tcgagtggaa gagcaacgga 780
 cagccggagc cagagggcaa ttaccgcacc accccgcccc agcaggacgt ggacgggacc 840
 tacttctgt acagcaagct cgcggtggac aaggccagct ggcagcgtgg agaccattc 900
 cagtgtgcgg tgatgcacga ggctctgcac aaccactaca ccc 943

<210> 70

<211> 320

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 70

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

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

<210> 71

<211> 960

<212> ADN

<213> Sus scrofa

<400> 71

gccccaaga cggcccatc ggtctaccct ctggccccct gcggcagggg cactgtctggc 60
 cctaactgtg ccttgggctg cctggcctca agctacttcc ccgagccagt gaccgtgacc 120
 tggaactcgg gcgccctgac cagtggcggtg cacaccttcc catccgtcct gcagccgtca 180
 gggctctact ccctcagcag cacgggtgacc gtgccggcca ggagctcgtc cagaaagtgc 240
 ttcacgtgca atgtcaacca ccgggccacc accaccaagg tggacctgtg tggttgacga 300
 ccatgtccca tatgccagc ctgtgaaggg aacggggcct cggttttcat cttccctcca 360
 aaaccaagg acaccctcat gatctcccg acccccgagg tcacgtgcgt ggtggtagat 420

gtgagccagg aaaacccgga ggtccagttc tcttggtacg tggacggcga agaggtgcac 480
acggccgaga cgaggccaaa ggaggagcag ttcaacagca cctaccgtgt ggtcagcgtc 540
ctgcccattcc agcaccagga ctggctgaag ggaaaggagt tcgagtgcaa ggtcaacaac 600
aaagacctcc cagcccccat cacaaggatc atctccaagg ccaaagggcc gagccgggag 660
ccgcagggtgt acaccctgtc cccatccgcc gaggagctgt ccaggagcaa agtcagcata 720
acctgcctgg tcaactggctt ctaccacact gacatcgatg tcgagtggaa gagcaacgga 780
cagccggagc cagagggcaa ttaccgtctc accccgcccc aggaggacga ggacgggacc 840
tacttcctgt acagcaaact cgcggtggac aaggcgaggt tgcagagtgg aggcattccac 900
tgtgcggtga tgcacgaggc tctgcacaac cactacaccc agaagtccat ctccaagact 960

<210> 72

<211> 266

<212> PRT

<213> Bubalus bubalis

<400> 72

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

Asp Lys Tyr Gly Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr
 225 230 235 240
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Arg Val Asn Lys Asn Ser Trp Gln Glu Gly
 245 250 255
 Gly Ala Tyr Thr Cys Val Val Met His Glu
 260 265

<210> 73

<211> 801

<212> ADN

<213> Bubalus bubalis

<400> 73

gagcggcgtg cacaccttcc cggccgtcct tcagtcctcc gggctctact ctctcagcag 60
 cacggtgacc gcgcccgccca gcgccacaaa aagccagacc ttcacctgca acgtagccca 120
 cccggccagc agcaccaagg tggacaaggc tgttggttccc ccatgcagac cgaaaccctg 180
 tgattgctgc ccaccccctg agtcccccg aggaccctct gtcttcatct tcccaccaa 240
 acccaaggac accctcacia tctctggaac tcctgaggtc acgtgtgtgg tgggtggacgt 300
 gggccacgat gaccccgagg tgaagttctc ctggttcgtg gacgatgtgg aggtaaacac 360
 agccaggacg aagccaagag aggagcagtt caacagcacc taccgcgtgg tcagcgcct 420
 gcccatccag cacaacgact ggactggagg aaaggagttc aagtgaagg tctacaatga 480
 aggctccca gcccccatcg tgaggaccat ctccaggacc aaagggcagg cccgggagcc 540
 gcaggtgtac gtcttgccc caccacagga cgagctcagc aaaagcacgg tcagcatcac 600
 ttgcatggtc actggcttct acccagacta catcgccgta gagtggcaga aagatgggca 660
 gcctgagtca gaggacaaat atggcacgac cccgccccag ctggacagcg atggctccta 720
 cttcctgtac agcaggctca ggggtgaaca gaacagctgg caagaaggag gcgcctacac 780
 gtgtgtagtg atgcatgagg c 801

<210> 74

<211> 309

<212> PRT

<213> Bulalus bubalis

<400> 74

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

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

<210> 75

<211> 929

<212> ADN

<213> Bubalus bubalis

<400> 75

gcctccatca cagccccgaa agtctaccct ctgacttctt gccgcgggga aacgtccagc 60
 tccaccgtga ccctgggctg cctggtctcc agctacatgc ccgagccggt gaccgtgacc 120
 tggaactcgg gtgccctgaa gagcggcggtg cacaccttcc cggccgtcct tcagtcctct 180
 gggctctact ctctcagcag cacgggtgacc gcgcccgcga gcgccacaaa aagccagacc 240
 ttcacctgca acgtagccca cccggccagc agcaccaagg tggacacggc tgttgggttc 300
 tccagtgaact gctgcaagtt tcctaagcct tgtgtgaggg gaccatctgt cttcatcttc 360
 ccgccgaaac ccaaagacac cctgatgatc acaggaaatc ccgaggtcac atgtgtggtg 420
 gtggacgtgg gccgggataa ccccgagggtg cagttctcct ggttcgtggg tgatgtggag 480
 gtgcacacgg gcaggtcgaa gccgagagag gagcagttca acagcaccta ccgctgtggtc 540

agcaccctgc ccatccagca caatgactgg actggaggaa aggagttcaa gtgcaaggtc 600
 aacaacaaaag gcctcccagc ccccatcgtg aggaccatct ccaggaccaa agggcaggcc 660
 cgggagccgc aggtgtacgt cctggcccca cccaggaag agctcagcaa aagcacggtc 720
 agcgtcactt gcatggtcac tggcttctac ccagactaca tcgccgtaga gtggcataga 780
 gaccggcagg ctgagtcgga ggacaagtac cgcacgacct cgccccagct ggacagcgat 840
 ggctcctact tcctgtacag caggctcaag gtgaacaaga acagctggca agaaggaggc 900
 gcctacacgt gtgtagtgat gcatgaggc 929

<210> 76

<211> 352

<212> PRT

<213> Bubalus bubalis

<400> 76

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

Asp Thr Ser Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

Phe Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Thr
 85 90 95

Ala Val Thr Ala Arg His Pro Val Pro Lys Thr Pro Glu Thr Pro Ile
 100 105 110

His Pro Val Lys Pro Pro Thr Gln Glu Pro Arg Asp Glu Lys Thr Pro
 115 120 125

Cys Gln Cys Pro Lys Cys Pro Glu Pro Leu Gly Gly Leu Ser Val Phe
 130 135 140

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Pro
 145 150 155 160

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Gly Gln Asp Asp Pro Glu Val
 165 170 175

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Arg Met
 180 185 190

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Ala
 195 200 205

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Arg Glu Lys Glu Phe Lys Cys
 210 215 220

Lys Val Asn Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Val Arg Thr Ile Ser
 225 230 235 240

Arg Thr Lys Gly Gln Ala Arg Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Ala Pro
 245 250 255
 Pro Arg Glu Glu Leu Ser Lys Ser Thr Leu Ser Leu Thr Cys Leu Ile
 260 265 270
 Thr Gly Phe Tyr Pro Glu Glu Val Asp Val Glu Trp Gln Arg Asn Gly
 275 280 285
 Gln Pro Glu Ser Glu Asp Lys Tyr His Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp
 290 295 300
 Ala Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Arg Val Asn Arg Ser
 305 310 315 320
 Ser Trp Gln Glu Gly Asp His Tyr Thr Cys Ala Val Met His Glu Ala
 325 330 335
 Leu Arg Asn His Tyr Lys Glu Lys Pro Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 340 345 350

<210> 77

<211> 1059

<212> ADN

<213> Bubalus bubalis

<400> 77

gcctccacca cagccccgaa agtctaccct ctggcatcca gctgcgggga cacgtccagc 60
 tccaccgtga cctgggctg cctggtctcc agctacatgc ccgagccggt gaccgtgacc 120
 tggaactcgg gtgccctgaa gaacggcgtg cacaccttcc cggccgtccg gcagtcctcc 180
 gggctctact ctctcagcag catggtgacc atgccacca gcaccgcagg aaccagacc 240
 ttcacctgca acgtagccca cccggccagc agcaccaagg tggacacggc tgctactgca 300
 aggcatccgg tcccgaagac accagagaca cctatccatc ctgtaaaacc cccaaccag 360
 gagccagag atgaaaagac accctgccag tgtcccaaat gccagaacc tctgggagga 420
 ctgtctgtct tcatcttccc accgaaacc aaggacacc tcacaatctc tggaacgccc 480
 gaggtcacgt gtgtggtggt ggacgtgggc caggatgacc ccgaagtgca gttctcctgg 540
 ttcgtggatg acgtggaggt gcacacagcc aggatgaagc caagagagga gcagttcaac 600
 agcacctacc gcgtggtcag cgccctgccc atccagcacc aggactggct gcgggaaaag 660
 gagttcaagt gcaaggtcaa caacaaaggc ctcccggccc ccacgtgag gaccatctcc 720
 aggaccaaag ggcaggcccg ggagccacag gtgtatgtcc tggccccacc ccgggaagag 780
 ctacagcaaaa gcacgtcag cctcacctgc ctaatcaccg gcttctaccc agaagaggta 840
 gacgtggagt ggcagagaaa tgggcagcct gagtcagagg acaagtacca cacgaccca 900
 cccagctgg acgtgacgg ctctacttc ctgtacagca ggctcagggt gaacaggagc 960
 agctggcagg aaggagacca ctacacgtgt gcagtgatgc atgaagcttt acggaatcac 1020
 taaaaagaga agcccatctc gaggtctccg ggtaaatga 1059

<210> 78

<211> 105

<212> PRT

<213> Bubalus bubalis

<400> 78

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

<210> 79

<211> 318

<212> ADN

<213> Bubalus bubalis

<400> 79

cagcccaagt ccgcaccctc agtcaccctg ttcccaccct ccacggagga gctcagcgcc 60
 aacaaggcca ccttggtgtg tctcatcagc gacttctacc cgggtagcat gaccgtggcc 120
 aggaaggcag acggcagcac catcaccctg aacgtggaga ccaccgggc ctccaaacag 180
 agcaacagca agtacgcggc cagcagctac ctgagcctga cgggcagcga gtggaaatcg 240
 aaaggcagtt acagctgcga ggtcacgcac gaggggagca ccgtgacaaa gacagtgaag 300
 ccctcagagt gttcttag 318

<210> 80

<211> 229

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 80

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

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 81

<211> 690

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<400> 81

gagtccaaat atggtccccc gtgcccatca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca 60
 tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gacccctgag 120
 gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 180
 gtggatggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 240
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacccgc gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 300
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 360
 gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg 420
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 480
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 540
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag 600
 gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 660
 aagagcctct ccctgtctct gggtaaatga 690

<210> 82

<211> 217

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 82

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

1

5

10

15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215
 <210> 83
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại
 <400> 83
 gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact 60
 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac 120
 cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 180
 ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 240
 caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc 300
 tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc 360
 ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa 420
 ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 480
 tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctta cagcaagctc 540
 accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 600
 gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctctgggtaa atga 654

<210> 84

<211> 329

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 84

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

290 295 300
 Tyr Thr Cys Val Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 305 310 315 320
 Lys Ser Thr Ser Lys Ser Ala Gly Lys
 325
 <210> 85
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
 <400> 85
 Ala Ser Thr Thr Ala Pro Lys Val Tyr Pro Leu Ser Ser Cys Cys Gly
 1 5 10 15
 Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Met Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Lys Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Gly Ser Thr Ser Gly Gln Thr Phe
 65 70 75 80
 Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Ala
 85 90 95
 Val Asp Pro Thr Cys Lys Pro Ser Pro Cys Asp Cys Cys Pro Pro Pro
 100 105 110
 Glu Leu Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Gly His Asp Asp Pro Glu Val Lys Phe Ser Trp Phe Val Asp
 145 150 155 160
 Asp Val Glu Val Asn Thr Ala Thr Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Ala Leu Arg Ile Gln His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Thr Gly Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Glu Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ala Pro Ile Val Arg Thr Ile Ser Arg Thr Lys Gly Pro Ala Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Ala Pro Pro Gln Glu Glu Leu Ser Lys
 225 230 235 240
 Ser Thr Val Ser Leu Thr Cys Met Val Thr Ser Phe Tyr Pro Asp Tyr
 245 250 255

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

<210> 86

<211> 329

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 86

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

```

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

```

<210> 87

<211> 326

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 87

```

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

```

Tyr Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Thr Gly
 180 185 190
 Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Gly Leu Ser Ala Pro
 195 200 205
 Ile Val Arg Ile Ile Ser Arg Ser Lys Gly Pro Ala Arg Glu Pro Gln
 210 215 220
 Val Tyr Val Leu Asp Pro Pro Lys Glu Glu Leu Ser Lys Ser Thr Leu
 225 230 235 240
 Ser Val Thr Cys Met Val Thr Gly Phe Tyr Pro Glu Asp Val Ala Val
 245 250 255
 Glu Trp Gln Arg Asn Arg Gln Thr Glu Ser Glu Asp Lys Tyr Arg Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Gln Leu Asp Thr Asp Arg Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Arg Val Asp Arg Asn Ser Trp Gln Glu Gly Asp Ala Tyr Thr Cys
 290 295 300
 Val Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Met Gln Lys Ser Thr
 305 310 315 320
 Ser Lys Ser Ala Gly Lys
 325
 <210> 88
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
 <400> 88
 Ala Ser Thr Thr Ala Pro Lys Val Tyr Pro Leu Ser Ser Cys Cys Gly
 1 5 10 15
 Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Met Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ala Leu Lys Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Gly Ser Thr Ser Gly Gln Thr Phe
 65 70 75 80
 Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Ala
 85 90 95
 Val Gly Val Ser Ser Asp Cys Ser Lys Pro Asn Asn Gln His Cys Val
 100 105 110
 Arg Glu Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 115 120 125
 Met Ile Thr Gly Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asn Val Gly

```

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

```

<210> 89

<211> 327

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 89

```

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

```

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

<210> 90

<211> 352

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 90

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

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

<210> 91
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
 <400> 91

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

Leu Arg Asn His Tyr Lys Glu Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys

340

345

350

<210> 92

<211> 990

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 92

```
gcctccacca cagccccgaa agtctaccct ctgagttctt gctgcgggga caagtccagc      60
tccaccgtga ccctgggctg cctggtctcc agctacatgc ccgagccggt gaccgtgacc      120
tggaactcgg gtgccctgaa gagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct tcagtcctcc      180
gggctgtact ctctcagcag catggtgacc gtgcccggca gcacctcagg acagaccttc      240
acctgcaacg tagccccacc ggccagcagc accaaggtgg acaaggctgt tgatcccaca      300
tgcaaaccat caccctgtga ctgttgccca cccctgagc tccccggagg accctctgtc      360
ttcatcttcc caccgaaacc caaggacacc ctcaaatct cgggaacgcc cgaggtcacg      420
tgtgtggtgg tggacgtggg ccacgatgac ccgaggtga agttctcctg gttcgtggac      480
gacgtggagg taaacacagc cacgacgaag ccgagagagg agcagttcaa cagcacctac      540
cgcggtggtc gcgccctgcg catccagcac caggactgga ctggaggaaa ggagttcaag      600
tgcaaggtcc acaacgaagg cctcccggcc cccatcgtga ggaccatctc caggaccaaa      660
gggccggccc gggagccgca ggtgtatgtc ctggccccac cccaggaaga gctcagcaaa      720
agcacggtca gcctcacctg catggtcacc agcttctacc cagactacat cgccgtggag      780
tggcagagaa acgggcagcc tgagtcggag gacaagtacg gcacgacccc gcccagctg      840
gacgccgaca gctcctactt cctgtacagc aagctcaggg tggacaggaa cagctggcag      900
gaaggagaca cctacacgtg tgtggtgatg caggaggccc tgcacaatca ctacacgcag      960
aagtccacct ctaagtctgc gggtaaatga                                990
```

<210> 93

<211> 990

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 93

```
gcctccacca cagccccgaa agtctaccct ctgagttctt gctgcgggga caagtccagc      60
tccaccgtga ccctgggctg cctggtctcc agctacatgc ccgagccggt gaccgtgacc      120
tggaactcgg gtgccctgaa gagcggcgtg cacaccttcc cggccgtcct tcagtcctcc      180
gggctgtact ctctcagcag catggtgacc gtgcccggca gcacctcagg acagaccttc      240
acctgcaacg tagccccacc ggccagcagc accaaggtgg acaaggctgt tgatcccaca      300
tgcaaaccat caccctgtga ctgttgccca cccctgagc tccccggagg accctctgtc      360
ttcatcttcc caccgaaacc caaggacacc ctcaaatct cgggaacgcc cgaggtcacg      420
tgtgtggtgg tggacgtggg ccacgatgac ccgaggtga agttctcctg gttcgtggac      480
gacgtggagg taaacacagc cacgacgaag ccgagagagg agcagttcaa cagcacctac      540
cgcggtggtc gcgccctgcg catccagcac caggactgga ctggaggaaa ggagttcaag      600
tgcaaggtcc acaacgaagg cctcccggcc cccatcgtga ggaccatctc caggaccaaa      660
gggccggccc gggagccgca ggtgtatgtc ctggccccac cccaggaaga gctcagcaaa      720
agcacggtca gcctcacctg catggtcacc agcttctacc cagactacat cgccgtggag      780
```

tggcagagaa acgggcagcc tgagtcggag gacaagtacg gcacgacccc gcccagctg 840
 gacgccgaca gctcctactt cctgtacagc aagctcaggg tggacaggaa cagctggcag 900
 gaaggagaca cctacacgtg tgtggtgatg cacgaggccc tgcacaatca ctacacgcag 960
 aagtccacct ctaagtctgc gggtaaatga 990

<210> 94

<211> 990

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 94

gcctccacca cagccccgaa agtctaccct ctgagttctt gctgcgggga caagtccagc 60
 tccaccgtga ccctgggctg cctggtctcc agctacatgc ccgagccggt gaccgtgacc 120
 tggaactcgg gtgccctgaa gagcggcgtg cacaccttcc cggccgtcct tcagtcctcc 180
 gggctctact ctctcagcag catggtgacc gtgcccgga gcacctcagg aaccagacc 240
 ttcacctgca acgtagccca ccgggccagc agcaccaagg tggacaaggc tgttgatccc 300
 agatgcaaaa caacctgtga ctggtgccca ccgcctgagc tccttgagg accctctgtc 360
 ttcattcttc caccgaaacc caaggacacc ctcaaatct cgggaacgcc cgaggtcacg 420
 tgtgtggtgg tggacgtggg ccacgatgac ccgaggtga agttctcctg gttcgtggac 480
 gacgtggagg taaacacagc cacgacgaag ccgagagagg agcagttcaa cagcacctac 540
 cgctggtca gcgccctgcg catccagcac caggactgga ctggaggaaa ggagttcaag 600
 tgcaagggtcc acaacgaagg cctcccagcc cccatcgtga ggaccatctc caggacccaa 660
 gggccggccc gggagccgca ggtgtatgtc ctggccccac ccaggaaga gctcagcaaa 720
 agcacggtca gcctcacctg catggtcacc agcttctacc cagactacat cgccgtggag 780
 tggcagagaa atgggcagcc tgagtcagag gacaagtacg gcacgacccc tcccagctg 840
 gacgccgacg gctcctactt cctgtacagc aggtcaggg tggacaggaa cagctggcag 900
 gaaggagaca cctacacgtg tgtggtgatg cacgaggccc tgcacaatca ctacacgcag 960
 aagtccacct ctaagtctgc gggtaaatga 990

<210> 95

<211> 981

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 95

gcctccacca cagccccgaa agtctaccct ctggcatcca gctgcggaga cacatccagc 60
 tccaccgtga ccctgggctg cctggtgtcc agctacatgc ccgagccggt gaccgtgacc 120
 tggaactcgg gtgccctgaa gagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct tcagtcctcc 180
 gggctctact ctctcagcag catggtgacc gtgcccgcca gcagctcagg acagaccttc 240
 acctgcaacg tagccacccc ggccagcagc accaagggtg acaaggctgt tggggtctcc 300
 attgactgct ccaagtgtca taaccagcct tgcgtagagg aaccatctgt cttcatcttc 360
 ccaccgaaac ccaaagacac cctgatgatc acaggaacgc ccgaggtcac gtgtgtggtg 420
 gtgaacgtgg gccacgataa ccccgaggtg cagttctcct ggttcgtgga tgacgtggag 480
 gtgcacacgg ccaggtcgaa gccaaagagag gagcagttca acagcacgta ccgcgtggtc 540
 agcgccctgc ccatccagca ccaggactgg actggaggaa aggagttcaa gtgcaaggtc 600
 aacaacaaag gcctctcggc ccccatcgtg aggatcatct ccaggagcaa agggccggcc 660

cgggagccgc aggtgtatgt cctggaccca cccaaggaag agctcagcaa aagcacgctc 720
 agcgtcacct gcatgggtcac cggcttctac ccagaagatg tagccgtgga gtggcagaga 780
 aaccggcaga ctgagtcgga ggacaagtac cgcacgaccc cgccccagct ggacaccgac 840
 cgctcctact tcctgtacag caagctcagg gtggacagga acagctggca ggaaggagac 900
 gcctacacgt gtgtggtgat gcacgaggcc ctgcacaatc actacatgca gaagtccacc 960
 tctaagtctg cgggtaaattg a 981

<210> 96

<211> 981

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 96

gcctccacca cagccccgaa agtctaccct ctgagttctt gctgcgggga caagtccagc 60
 tccaccgtga ccctgggctg cctggtgtcc agctacatgc ccgagccggt gaccgtgacc 120
 tggaactcgg gtgccctgaa gagcggcgtg cacaccttcc cggccgtcct tcagtcctcc 180
 gggctctact ctctcagcag catggtgacc gtgcccgga gcacctcagg acagaccttc 240
 acctgcaacg tagccccccc gccagcagc accaagggtg acaaggctgt tggggtctcc 300
 agtgactgct ccaagcctaa taaccagcat tgcgtgaggg aaccatctgt ctccatcttc 360
 ccaccgaaac ccaaagacac cctgatgatc acaggaacgc ccgaggtcac gtgtgtggtg 420
 gtgaacgtgg gccacgataa ccccaggtg cagttctcct ggttcgtgga cgacgtggag 480
 gtgcacacgg ccaggacgaa gccgagagag gagcagttca acagcacgta ccgctgggtc 540
 agcgccctgc ccatccagca ccaggactgg actggaggaa aggagttcaa gtgcaaggtc 600
 aacatcaaag gcctctcggc ctccatcgtg aggatcatct ccaggagcaa agggccggcc 660
 cgggagccgc aggtgtatgt cctggaccca cccaaggaag agctcagcaa aagcacggtc 720
 agcgtcacct gcatgggtcat cggcttctac ccagaagatg tagacgtgga gtggcagaga 780
 gaccggcaga ctgagtcgga ggacaagtac cgcacgaccc cgccccagct ggacgcccac 840
 cgctcctact tcctgtacag caagctcagg gtggacagga acagctggca gagaggagac 900
 acctacacgt gtgtggtgat gcacgaggcc ctgcacaatc actacatgca gaagtccacc 960
 tctaagtctg cgggtaaattg a 981

<210> 97

<211> 984

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 97

gcctccacca cagccccgaa agtctaccct ctgagttctt gctgcgggga caagtccagc 60
 tcgggggtga ccctgggctg cctggtctcc agctacatgc ccgagccggt gaccgtgacc 120
 tggaactcgg gtgccctgaa gagcggcgtg cacaccttcc cggccgtcct tcagtcctcc 180
 gggctctact ctctcagcag catggtgacc gtgcccgcca gcagctcagg aaccagacc 240
 ttcaactgca acgtagccca cccggccagc agcaccaagg tggacaaggc tgttggggtc 300
 tccagtgaact gctccaagcc taataaccag cattgcgtga gggaaaccatc tgtcttcac 360
 ttccaccaga aaccctaaaga caccctgatg atcacaggaa cggccgaggt cacgtgtgtg 420
 gtggtgaacg tgggcccaga taaccccgag gtgcagttct cctggttcgt ggacgacgtg 480
 gagggtgcaca cggccaggac gaagccgaga gaggagcagt tcaacagcac gtaccgcgtg 540

gtcagcgccc tgcccatcca gcaccaggac tggactggag gaaaggagtt caagtgcaag 600
 gtcaacatca aaggcctctc ggctccatc gtgaggatca tctccaggag caaagggccg 660
 gccggggagc cgcaggtgta tgtcctggac ccaccaagg aagagctcag caaagcacg 720
 gtcagcctca cctgcatggt catcggttc taccagaag atgtagacgt ggagtggcag 780
 agagaccggc agactgagtc ggaggacaag taccgcacga ccccgccca gctggacgcc 840
 gaccgctcct acttcctgta cagcaagctc aggggtggaca ggaacagctg gcagagagga 900
 gacacctaca cgtgtgtggt gatgcacgag gccctgcaca atcactacat gcagaagtcc 960
 acctctaagt ctgcgggtaa atga 984

<210> 98

<211> 1059

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 98

gcctccacca cagccccgaa agtctaccct ctggcatcca gctgcggaga cacatccagc 60
 tccaccgtga ccctgggctg cctgggtctcc agctacatgc ccgagccggt gaccgtgacc 120
 tggaactcgg gtgccctgaa gagcggcgtg cacaccttcc cggccgtccg gcagtctctt 180
 gggctgtact ctctcagcag catggtgact gtgcccgcga gcagctcaga aaccagacc 240
 ttcacctgca acgtagccca cccggccagc agcaccaagg tggacaaggc tgtcactgca 300
 aggcgctccag tcccgacgac gccaaagaca actatccctc ctggaaaacc cacaacccca 360
 aagtctgaag ttgaaaagac accctgccag tgttccaaat gccagaacc tctgggagga 420
 ctgtctgtct tcatcttccc accgaaaccc aaggacaccc tcacaatctc gggaacgccc 480
 gaggtcacgt gtgtgggtgt ggacgtgggc caggatgacc ccgaggtgca gttctcctgg 540
 ttcgtggacg acgtggaggt gcacacggcc aggacgaagc cgagagagga gcagttcaac 600
 agcacctacc gcgtgggtcag cgccttgcgc atccagcacc aggactgggt gcagggaaag 660
 gagttcaagt gcaagggtcaa caacaaaggc ctcccgccc ccattgtgag gaccatctcc 720
 aggaccaaag ggcaggcccg ggagccgcag gtgtatgtcc tggccccacc ccgggaagag 780
 ctacgcaaaa gcacgctcag cctcacctgc ctgatcaccg gtttctaccc agaagagata 840
 gacgtggagt ggcagagaaa tgggcagcct gagtcggagg acaagtacca cacgaccgca 900
 cccagctgg atgctgacgg ctctacttcc ctgtacagca agctcagggg gaacaagagc 960
 agctggcagg aaggagacca ctacacgtgt gcagtgtatgc acgaagcttt acggaatcac 1020
 taaaagaga agtccatctc gaggtctccg ggtaaata 1059

<210> 99

<211> 1059

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 99

gcctccacca cagccccgaa agtctaccct ctggcatccc gctgcggaga cacatccagc 60
 tccaccgtga ccctgggctg cctgggtctcc agctacatgc ccgagccggt gaccgtgacc 120
 tggaactcgg gtgccctgaa gagtggcgtg cacaccttcc cggccgtcct tcagtctctc 180
 gggctgtact ctctcagcag catggtgacc gtgcccgcga gcacctcaga aaccagacc 240
 ttcacctgca acgtagccca cccggccagc agcaccaagg tggacaaggc tgtcactgca 300
 aggcgctccag tcccgacgac gccaaagaca accatccctc ctggaaaacc cacaaccag 360

gagtctgaag ttgaaaagac accctgccag tgttccaaat gcccagaacc tctgggagga 420
 ctgtctgtct tcatcttccc accgaaaccc aaggacaccc tcacaatctc gggaacgccc 480
 gaggtcacgt gtgtgggtgt ggacgtgggc caggatgacc ccgaggtgca gttctcctgg 540
 ttcgtggacg acgtggaggt gcacacggcc aggacgaagc cgagagagga gcagttcaac 600
 agcacctacc gcgtgggtcag cgccctgcmc atccagcacc aggactggct gcagggaaag 660
 gagttcaagt gcaaggtcaa caacaaaggc ctcccggccc ccattgtgag gaccatctcc 720
 aggaccaaag ggcaggcccc ggagccgcag gtgtatgtcc tggccccacc ccgggaagag 780
 ctcagcaaaa gcacgctcag cctcacctgc ctgatcaccg gtttctaccc agaagagata 840
 gacgtggagt ggcagagaaa tgggcagcct gagtcggagg acaagtacca cacgaccgca 900
 ccccagctgg atgctgacgg ctctacttct ctgtacagca ggctcagggt gaacaagagc 960
 agctggcagg aaggagacca ctacacgtgt gcagtgatgc atgaagcttt acggaatcac 1020
 taaaagaga agtccatctc gaggtctccg ggtaaatga 1059

<210> 100

<211> 105

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 100

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

<210> 101

<211> 318

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 101

cagcccaagt cccaccctc ggtcaccctg ttcccgccct ccacggagga gctcaacggc 60
 aacaaggcca ccctgggtgtg tctcatcagc gacttctacc cgggtagcgt gaccgtggtc 120
 tggaaggcag acggcagcac catcaccgcg aacgtggaga ccacccgggc ctccaaacag 180
 agcaacagca agtacgggc cagcagctac ctgagcctga cgagcagcga ctggaaatcg 240
 aaaggcagtt acagctgcga ggtcacgcac gaggggagca ccgtgacgaa gacagtgaag 300
 ccctcagagt gttcttag 318

<210> 102

<211> 328

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 102

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

290	295	300	
Thr Cys Val Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys			
305	310	315	320
Ser Thr Ser Lys Ser Ala Gly Lys			
	325		

<210> 103
 <211> 987
 <212> ADN
 <213> Bos taurus
 <400> 103

gctagcacaa ctgctcctaa ggtgtacccc ctgagctctt gctgcggcga caagtctagc	60
agcaccgtga ccctcggatg cctcgtcagc agctatatgc ctgagccagt tacagtgaca	120
tggaattctg gtgcccttaa gtccggcgtc cataccttcc ctgctgtgct gcagtcctct	180
ggcctgtaca gtttgtcctc tatggtgaca gtaccgggtt ccacctcgg acagaccttt	240
acctgtaatg tggctcatcc cgctcctcc acaaagggtg ataaggctgt tgacctacc	300
tgtaaaccga gtccatgcga ctgctgtccc cccctccag ttgccggacc ctcagtcctt	360
attttccac ccaaaccxaa agacaccctg acaatctctg gaacaccaga agtcacctgc	420
gtcgtcgtgg atgtgggcca cgacgatcct gaggtaaaat tctcatgggt cgtcgacgat	480
gtggaagtga atacagctac tacaaaacct cgcaagagc agtttaactc tacctatcga	540
gtggtttctg ctttgcggat tcagcatcag gattggacag gcggcaaaga gtttaaagt	600
aaagtccata acgagggact tccttctagt atcgtgcgca ctatcagtag aactaaagg	660
cctgctcggg aacctcaggt gtacgtcctg gcacctccac aggaagagct gagtaagtct	720
acagtttctc tgacttgat ggtaacatct ttttatccag attacatgc agttgaatgg	780
cagaggaacg ggcagccaga gagtaggat aagtacggga ctactccacc acagctggac	840
gcagactcaa gttacttcct gtactcaaag ctgaggggtg acagaaactc atggcaggag	900
ggggacactt acacttgct agttatgcac gaggcacttc acaaccacta cactcagaag	960
agtacttcaa agagtgcagg gaagtaa	987

<210> 104
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự được tối ưu hoá codon
 <400> 104

cagcctaaga gtcctccttc tgtaaacactc tttccccct ctaccgagga actcaacggc	60
aataaagcta ccttggtttg ccttatttct gatttctacc ccgggtctgt gaccgtgggtg	120
tggaagctg atgggtccac cattactcg aatgtggaaa ccaccgggc ttctaagcag	180
tccaactcta aatacgcagc atcctcctat ttgagttcta ctagtagtga ctggaagtca	240
aagggtagtt acagttgcga agtcacacat gaaggttcaa cagtgacaaa gacagtcaag	300
ccctcagagt gtcctatag	318

<210> 105
 <211> 238

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi L dạng khảm

<400> 105

```

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

```

<210> 106

<211> 465

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi H dạng khảm

<400> 106

```

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

```

325 330 335
 Cys Lys Val His Asn Glu Gly Leu Pro Ser Ser Ile Val Arg Thr Ile
 340 345 350
 Ser Arg Thr Lys Gly Pro Ala Arg Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Ala
 355 360 365
 Pro Pro Gln Glu Glu Leu Ser Lys Ser Thr Val Ser Leu Thr Cys Met
 370 375 380
 Val Thr Ser Phe Tyr Pro Asp Tyr Ile Ala Val Glu Trp Gln Arg Asn
 385 390 395 400
 Gly Gln Pro Glu Ser Glu Asp Lys Tyr Gly Thr Thr Pro Pro Gln Leu
 405 410 415
 Asp Ala Asp Ser Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Arg Val Asp Arg
 420 425 430
 Asn Ser Trp Gln Glu Gly Asp Thr Tyr Thr Cys Val Val Met His Glu
 435 440 445
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Thr Ser Lys Ser Ala Gly
 450 455 460

Lys

465

<210> 107

<211> 717

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tối ưu hoá codon

<400> 107

atggaatctc aaactcatgt ttgatttca ttacttctga gtgtttccgg aacctacggt 60
 gatatcgcta tcaactcaatc tccctcctct gttgctgtgt ctgtgggcga aaccggttacc 120
 ctgtcctgca agtccagtca gtctcttctc tactccgaga atcaaaagga ctacctgggc 180
 tggtagcaac agaagcccgg ccagacccca aagccactga tatactgggc aaccaacagg 240
 cacaccggag tgcccgcagag gttcacaggc agtggatctg gcaccgactt taccttgatc 300
 atttcaagcg tgcaggctga agatctggcc gactactact gtggtcagta tctggtgtat 360
 cctttcactt tcggggccagg gacaaaactc gagctcaaac agcctaagag tctccttct 420
 gtaacactct ttccccctc taccgaggaa ctcaacggca ataaagctac cttgggtttgc 480
 cttatttctg atttctaccc cgggtctgtg accgtggtgt ggaaagctga tgggtccacc 540
 attactcgga atgtggaaac caccggggt tctaagcagt ccaactctaa atacgcagca 600
 tcctcctatt tgagtcttac tagtagtgac tggaagtcaa agggtagtta cagttgcgaa 660
 gtcacacatg aaggttcaac agtgacaaag acagtcaagc cctcagagtg ctcatag 717

<210> 108

<211> 1398

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự được tối ưu hoá codon

<400> 108

```

atgggggtggt cccagattat attgttcctc gtcgccgccg ccacttgcg acacagccaa      60
gtgcaacttc aacaaagcgg tgcagaactg gtaaagcccg gtagctctgt gaaaatatcc      120
tgtaaagcca gtggctacac atttaccagc aactttatgc actgggtgaa gcaacagccc      180
ggaaatggct tggagtggat tggctggatc tatcccgaat atggtaacac caagtataat      240
cagaagttcg acggtaaagg caccctcacc gccgataagt catcctccac cgcctatatg      300
cagctcagca gcctgaccag cgaggattcc gctgtgtact tctgtgccag cgaagaggct      360
gtgatctcat tgggtgattg gggacagggc accctcgtca ccgtgtccag cgctagcaca      420
actgctccta aggtgtaccc cctgagctct tgctgcggcg acaagtctag cagcaccgtg      480
accctcggat gcctcgtcag cagctatatg cctgagccag ttacagtgc atggaattct      540
ggtgccctta agtccggcgt ccataccttc cctgctgtgc tgcagtcctc tggcctgtac      600
agtttgtcct ctatgggtgc agtaccgggt tccacctccg gacagacctt tacctgtaat      660
gtggctcatc ccgcctcctc cacaaggtg gataaggctg ttgaccctac ctgtaaacc      720
agtccatgcg actgctgtcc cccccctcca gttgccggac cctcagtctt tattttccca      780
cccaaaccga aagacaccct gacaatctct ggaacaccag aagtcacctg cgtcgtcgtg      840
gatgtgggccc acgacgatcc tgaggtaaaa ttctcatggt tcgtcgacga tgtggaagtg      900
aatacagcta ctacaaaacc tcgcgaagag cagtttaact ctacctatcg agtggtttct      960
gctttgcgga ttcagcatca ggattggaca ggcggaag agtttaaatg taaagtccat      1020
aacgaggggac ttccttctag tatcgtgccc actatcagta gaactaaagg gcctgctcgg      1080
gaacctcagg tgtacgtcct ggacacctca caggaagagc tgagtaagtc tacagtttct      1140
ctgacttgta tggtaacatc tttttatcca gattacatcg cagttgaatg gcagaggaac      1200
gggcagccag agagtgagga taagtacggg actactccac cacagctgga cgcagactca      1260
agttacttcc tgtactcaaa gctgaggggt gacagaaact catggcagga gggggacact      1320
tacacttgcg tagttatgca cgaggcactt cacaaccact aactcagaa gagtacttca      1380
aagagtgcag ggaagtaa                                     1398

```

<210> 109

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 109

```

atgaggatat atagtgtctt aacat                                             25

```

<210> 110

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 110

ttacgtctcc tcaaaatgtg 20
<210> 111
<211> 25
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 111
atgaggatat gtagtatctt tacat 25
<210> 112
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 112
ttacgtctcc tcaaattgtg t 21
<210> 113
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 113
atgaggatat atagtgtctt 20
<210> 114
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 114
gccactcagg acttggtgat 20
<210> 115
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 115
gggggtttac tgttgcttga 20
<210> 116

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 116
 ttacgtctcc tcaaattgt 19
 <210> 117
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 117
 gaagatctat ggggaccccg cgggcgcgcg 29
 <210> 118
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 118
 gacccgggga ggggccagga gcagtgtcc 29
 <210> 119
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 119
 ccgctcgaga tgaggatata tagtgtct 28
 <210> 120
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 120
 atcccgggcg tctoctcaaa atgtgtag 28
 <210> 121
 <211> 25
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 121
actaagctta tggggacccc gcggg 25
<210> 122
<211> 26
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 122
actcccgggg aggggccaag agcagt 26
<210> 123
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 123
ccgctcgaga tgaggatatg tagtatctt 29
<210> 124
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 124
atcccggggcg tctcctcaaa ttgtgtatc 29
<210> 125
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 125
gacgctagca tgaggatata tagtgtct 28
<210> 126
<211> 28
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Đoạn mỗi
<400> 126
gctctgatat ccctcgtttt tgctggat 28
<210> 127
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 127
gacgctagca tgaggatatg tagtatctt 29
<210> 128
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 128
agcttgatat ccctctttct tgctggatc 29
<210> 129
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 129
cgcggatatc atggattaca cagcgaagtg 30
<210> 130
<211> 29
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 130
cggggtaccc cagagctgtt gctggttat 29
<210> 131
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 131

cgcggtctagc atgagaatgt ttagtgtctt 30
 <210> 132
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 132
 cgcggtatc ttaatgggtga tggatgatgg gagtcctctc acttgctgg 49
 <210> 133
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 133
 atatgctggcc gcatggggac cccgctggcg ct 32
 <210> 134
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 134
 gcgcaagctt tcagaggggc caggagcagt 30
 <210> 135
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 135
 ctagctagca ccatgaggat atatagtgtc ttaac 35
 <210> 136
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi
 <400> 136
 caatctcgag ttacagacag aagatgactg c 31
 <210> 137

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 137

gctagcatga ggatatatag tgtcttaac

29

<210> 138

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

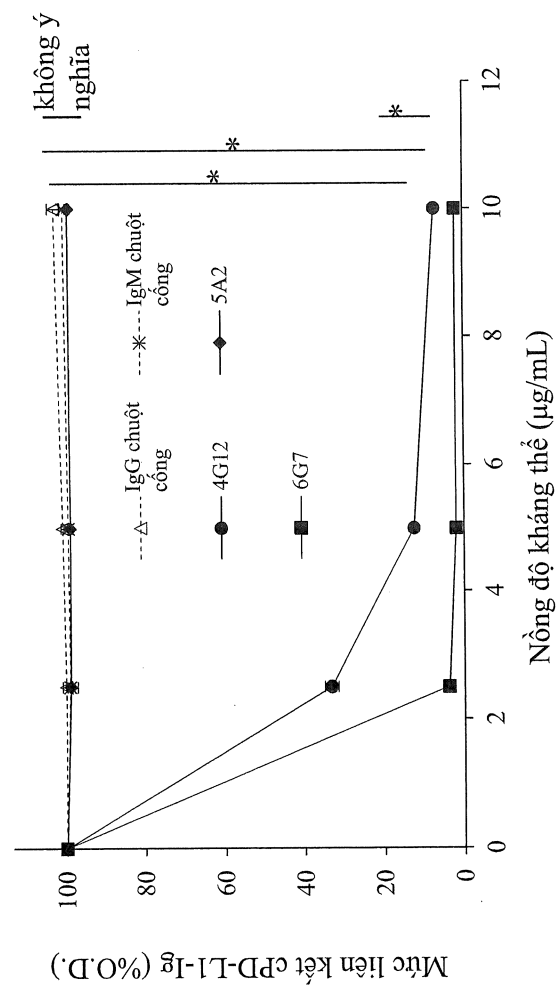
<400> 138

gatatcattc ctcttttttg ctggat

26

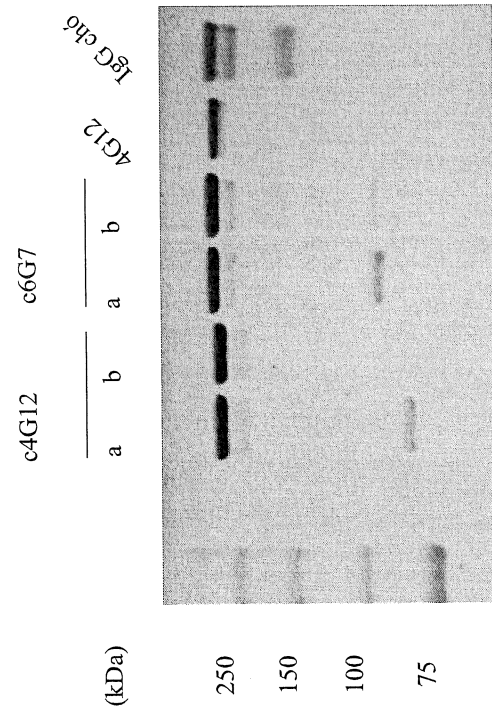
1/28

Fig.1

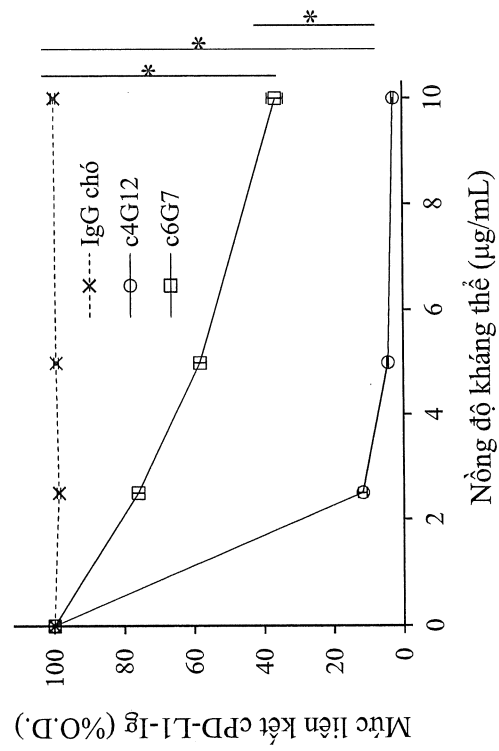


3/28

Fig.3

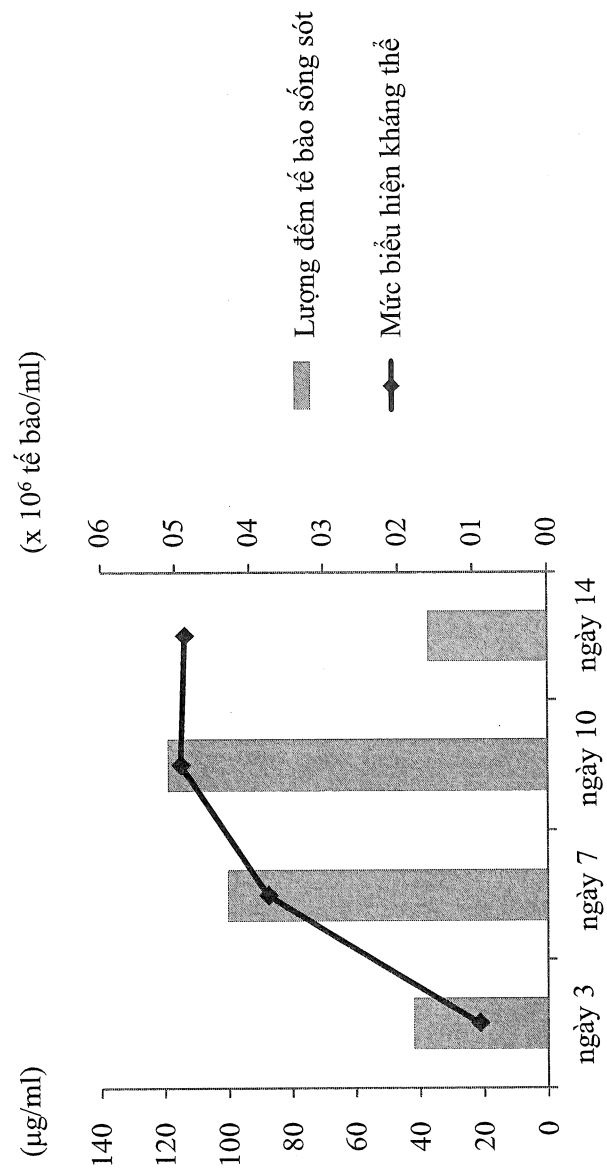


4/28

Fig.4

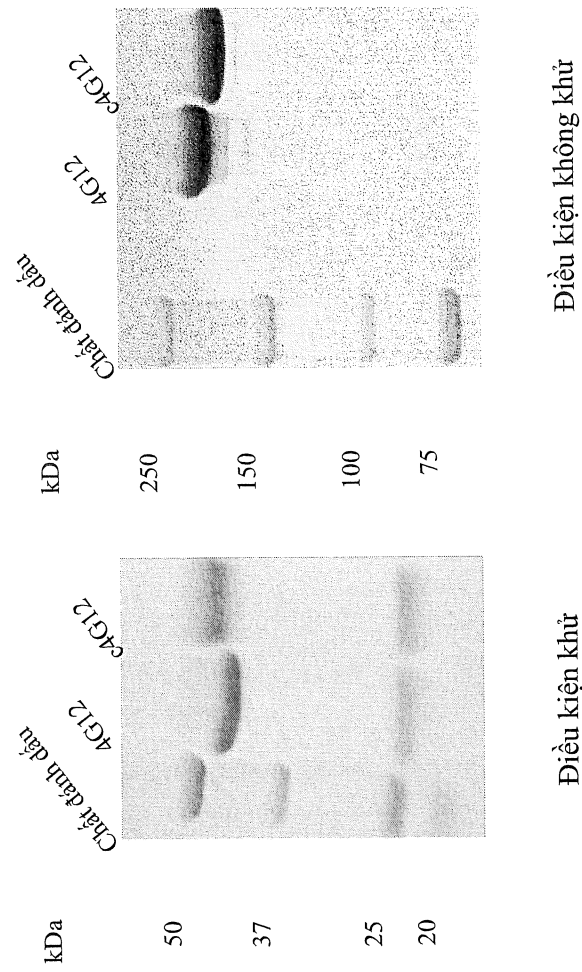
5/28

Fig.5

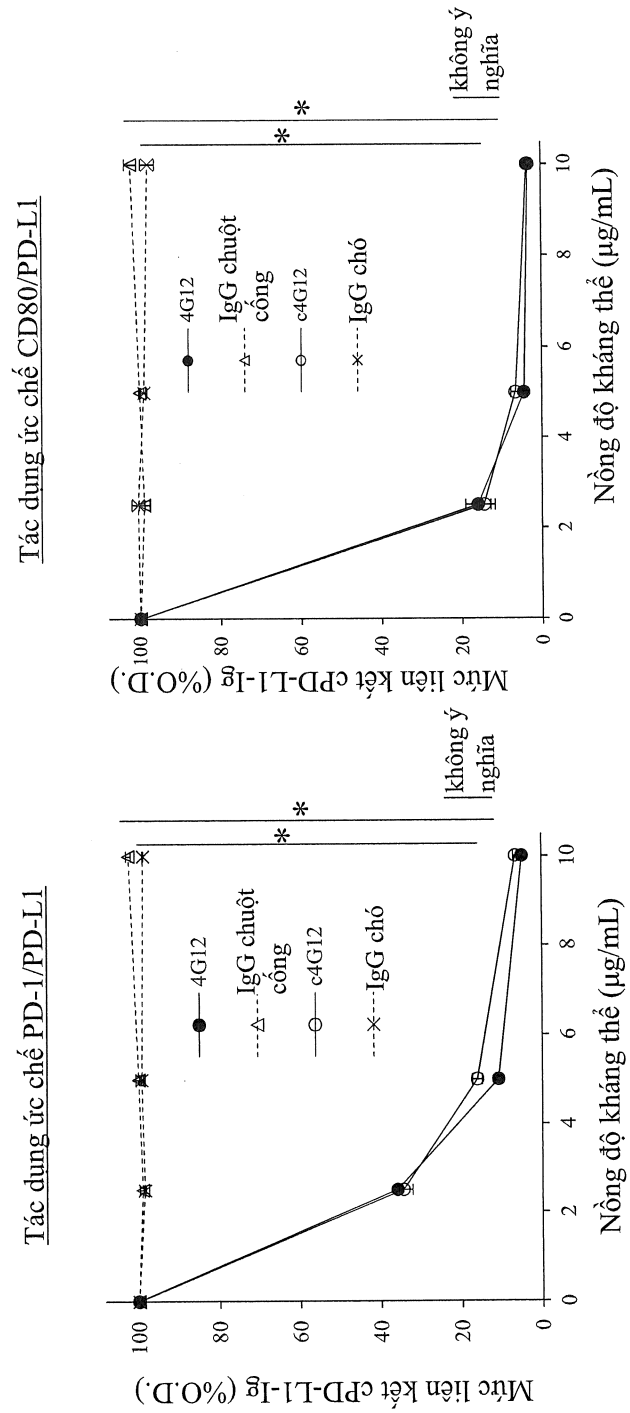


6/28

Fig.6



7/28

Fig.7

8/28

Fig.8

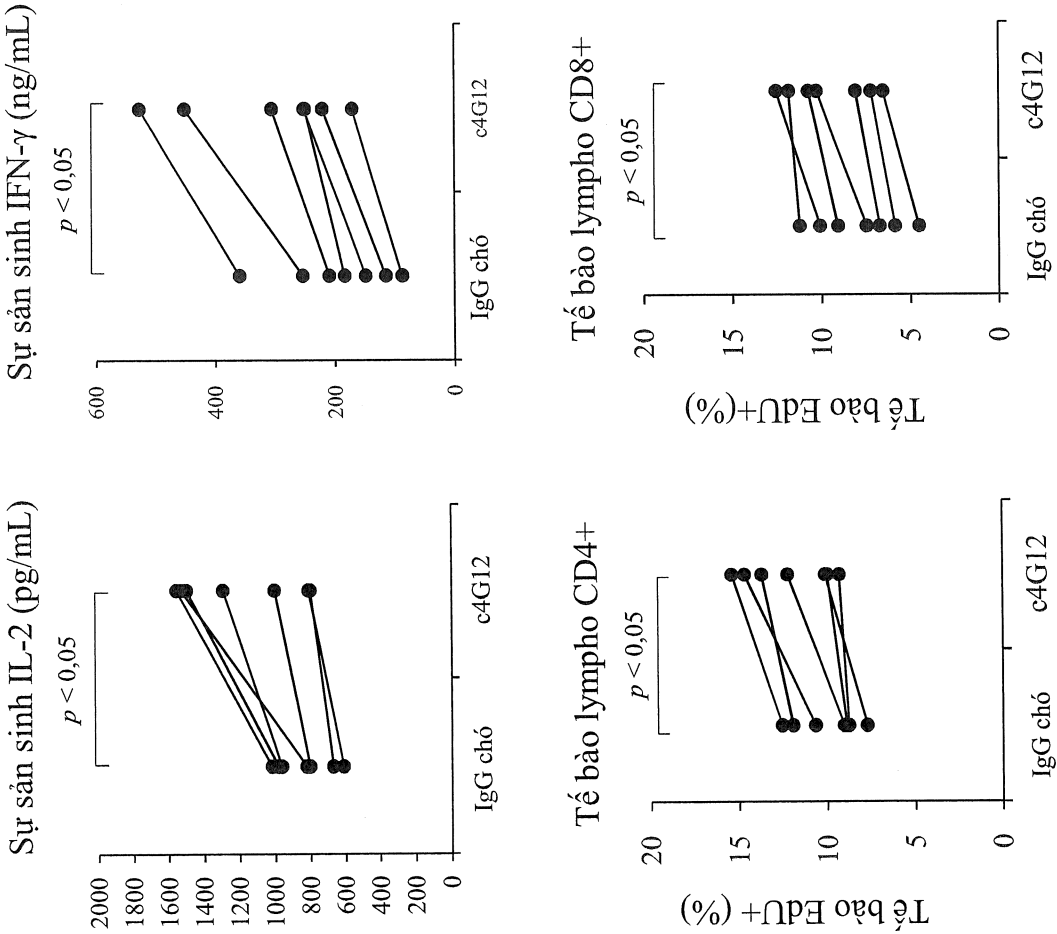
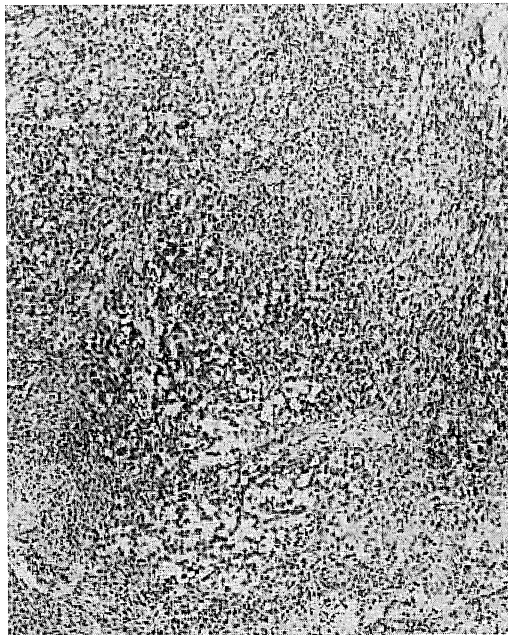


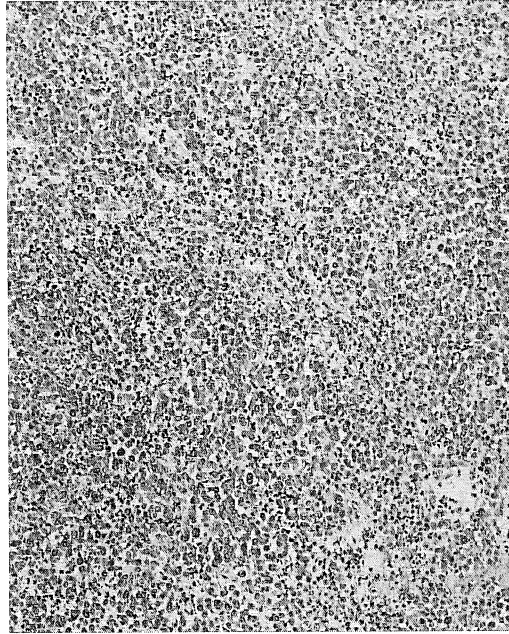
Fig.9

A



Bệnh ung thư hắc tổ miệng

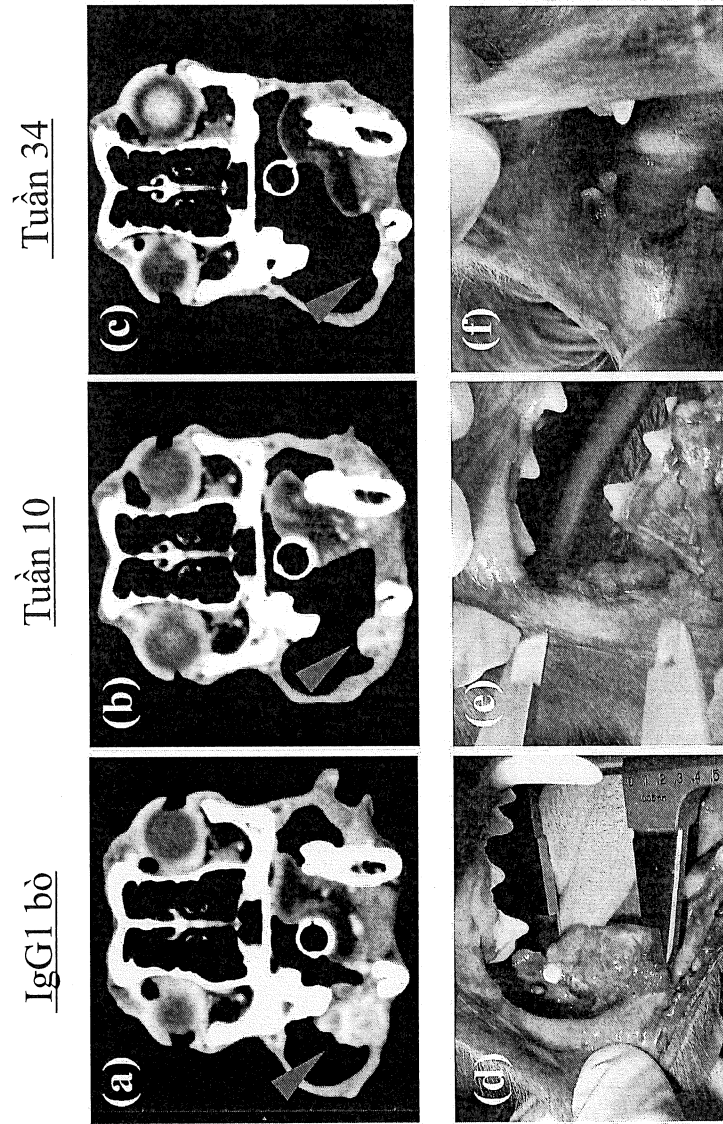
B



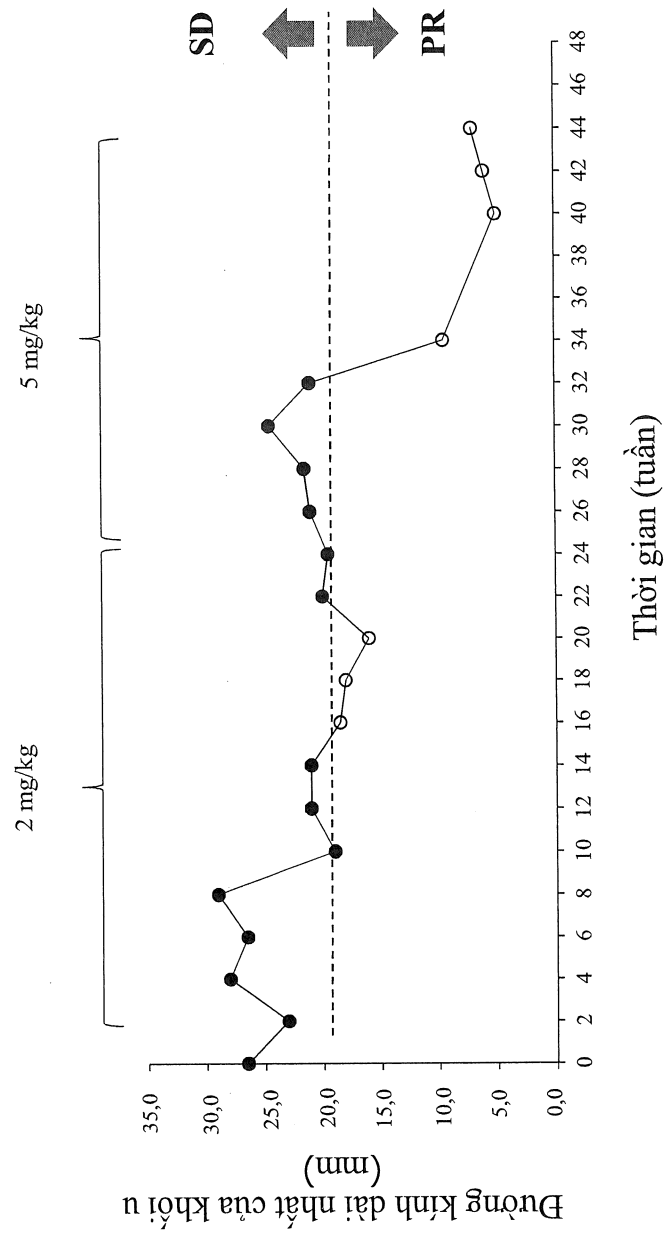
Sacôm không biệt hoá

10/28

Fig.10

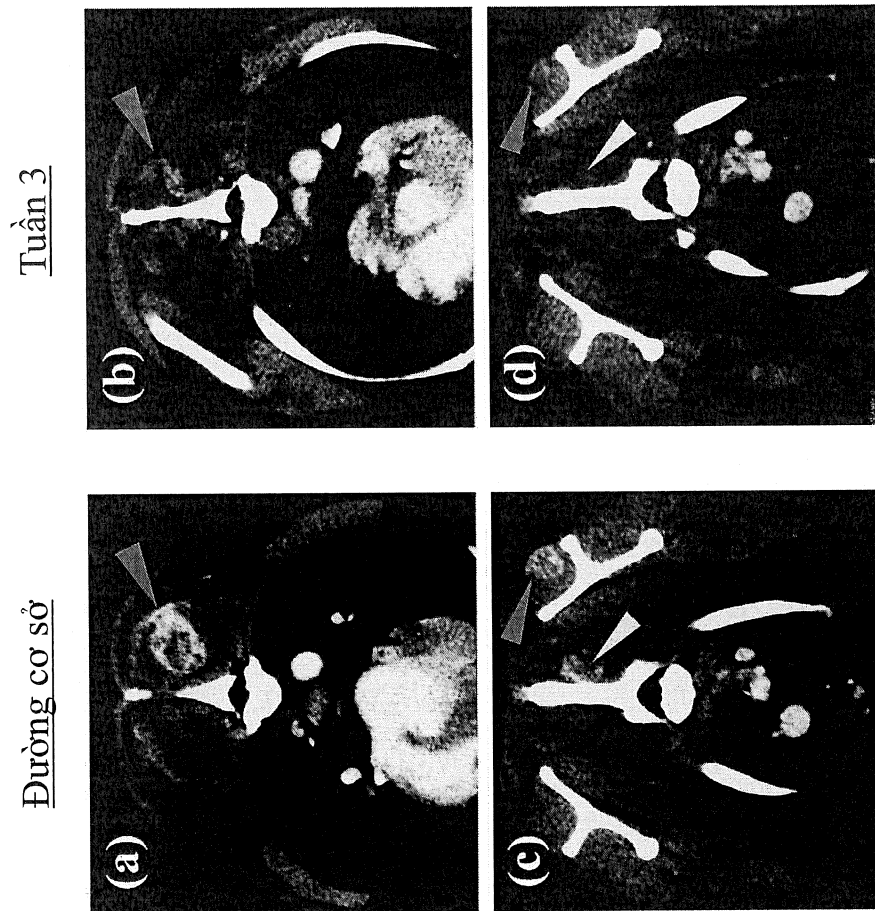


11/28

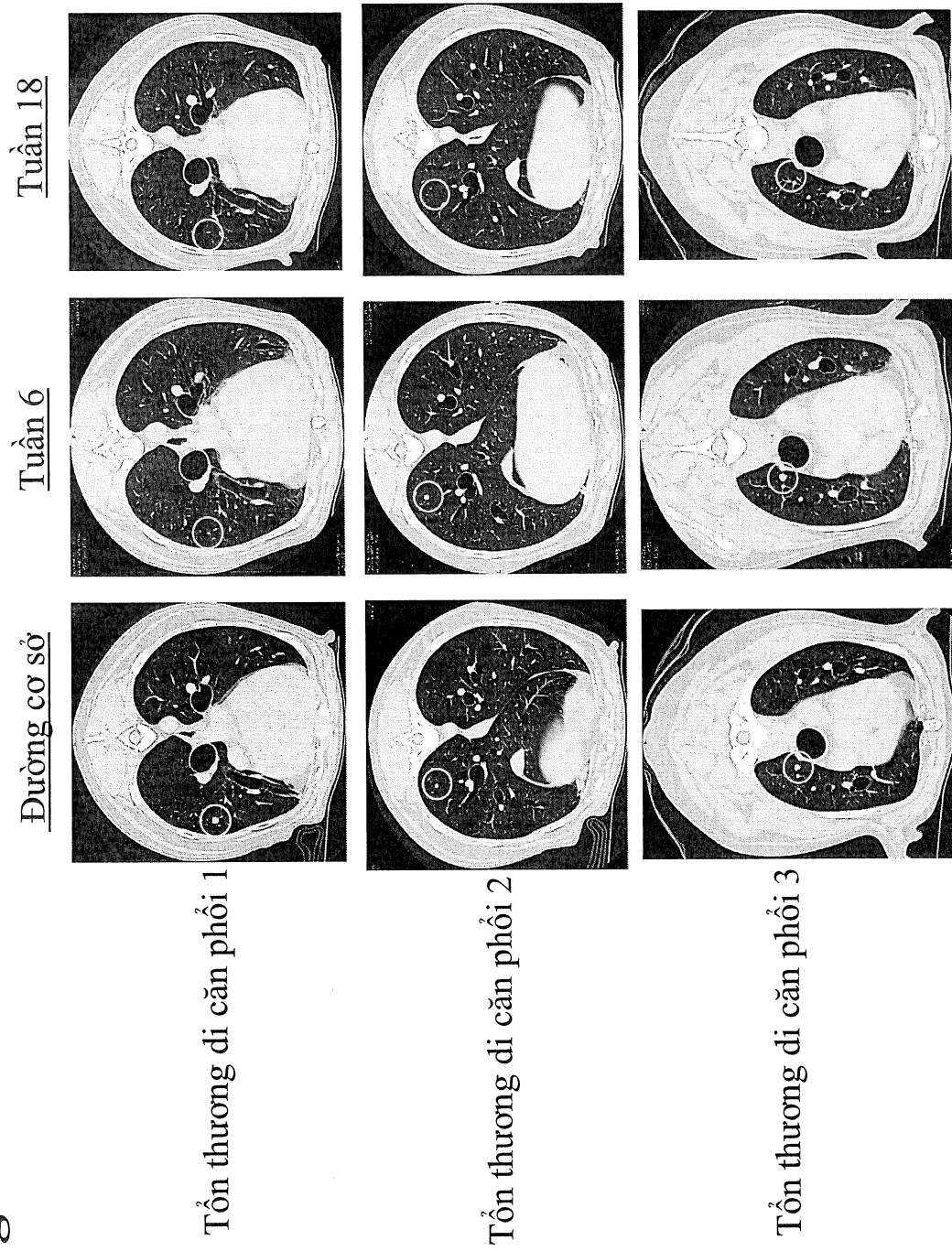
Fig.11

12/28

Fig.12



13/28

Fig.13

14/28

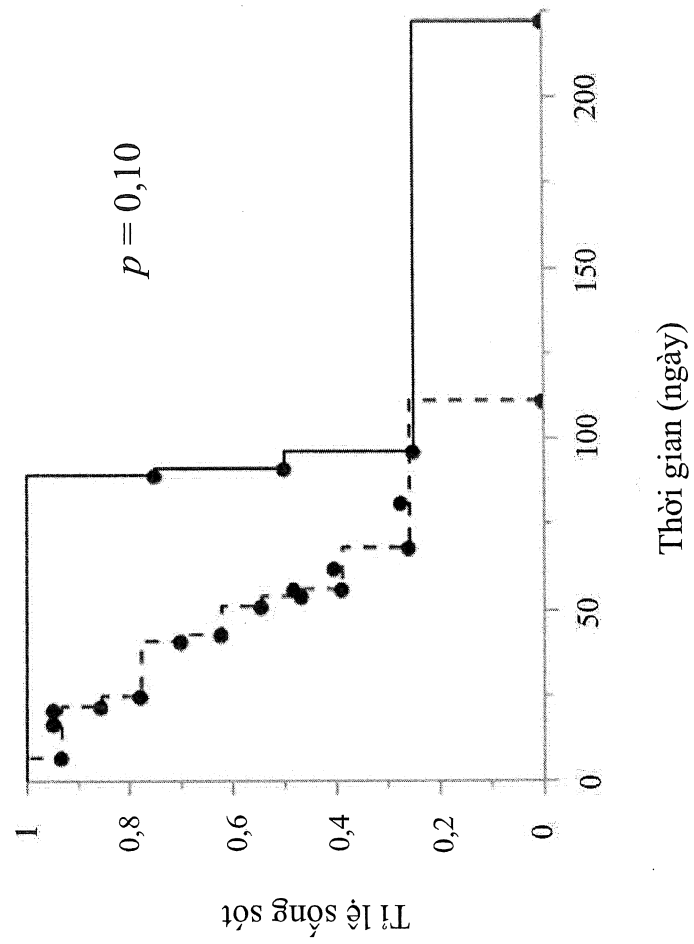
Fig.14

Fig.15

CDR1
CDR2
CDR3

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ

MESQTHVLISLLLSVSGTYGDIATQSPSSAVSVGETVTLSCKSSQSLLYSENQKDYL
CDR1

GWYQQKPGQTPKPLIYWATNRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLIISVQAEDLADYYC
CDR2

GQYLVYPFTFGPGTKLELK
CDR3

Vùng biến đổi chuỗi nặng

MGWSQIILFLVAAATCVHSQVQLQQSGAELVKPGSSVKISKASGYTFTSNFMHWV
CDR1

KQQPGNGLEWIGWIYPEYGNTRYNQKFDGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV
CDR2

YFCASEEAVISLVYWGQGLVTVSS
CDR3

Fig.16

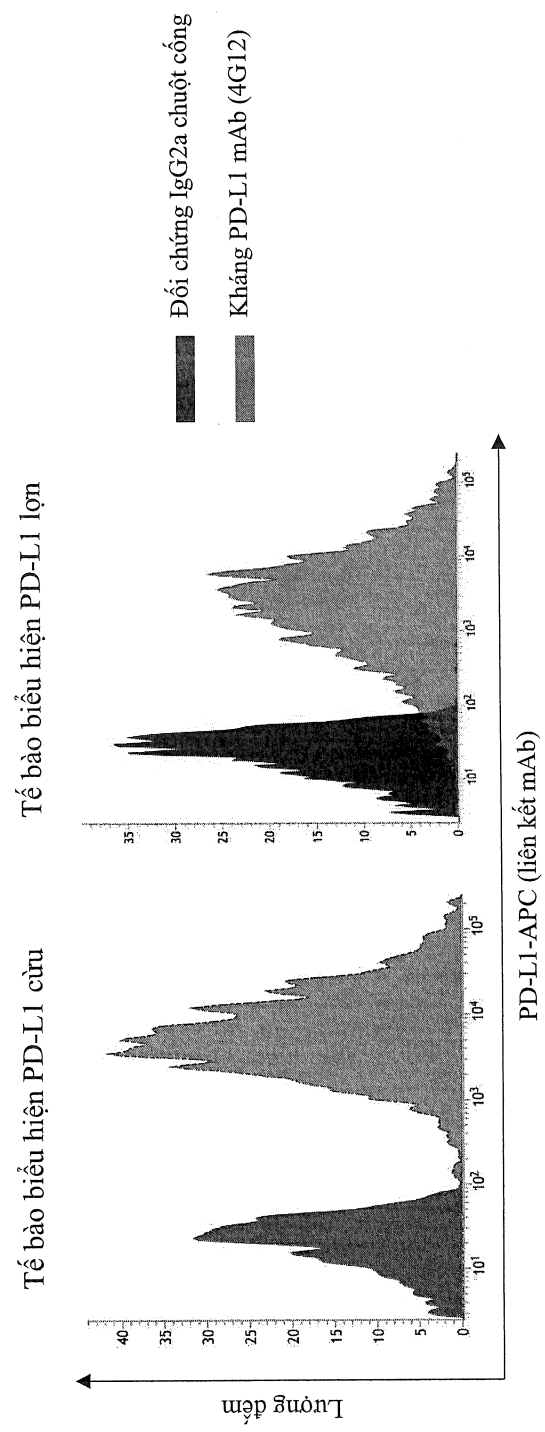
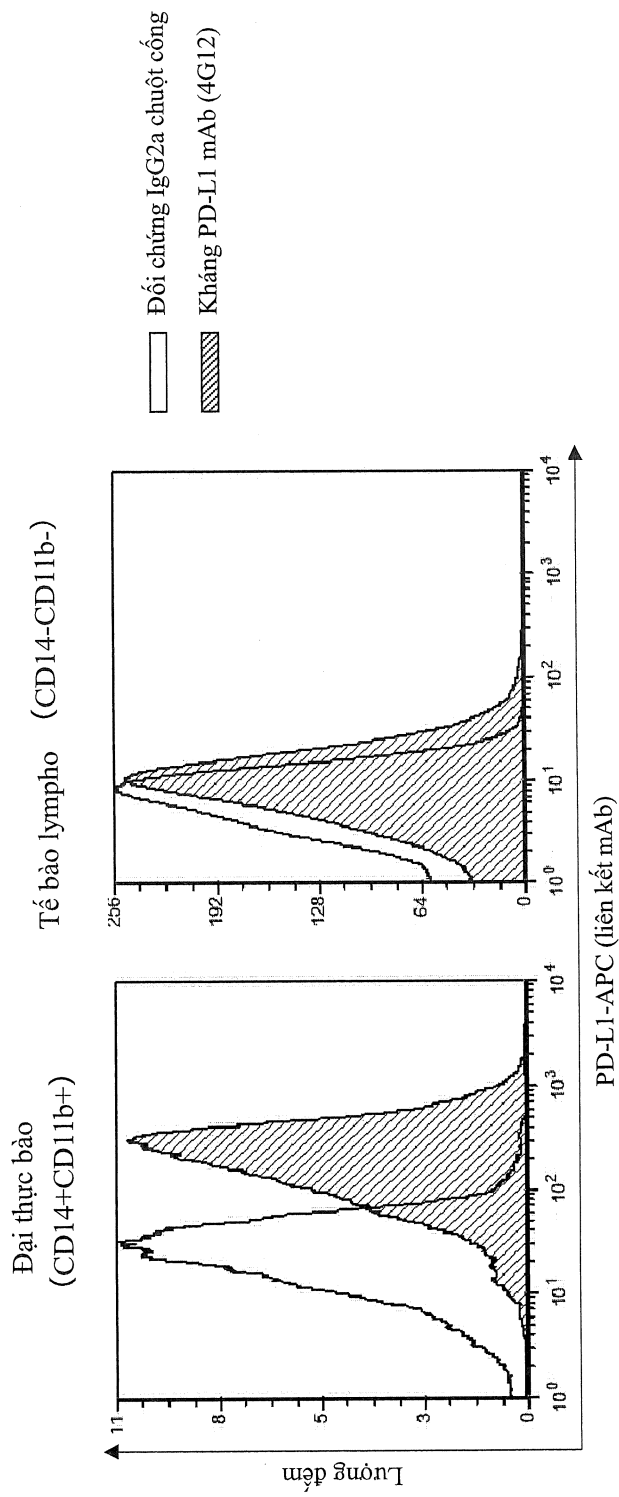
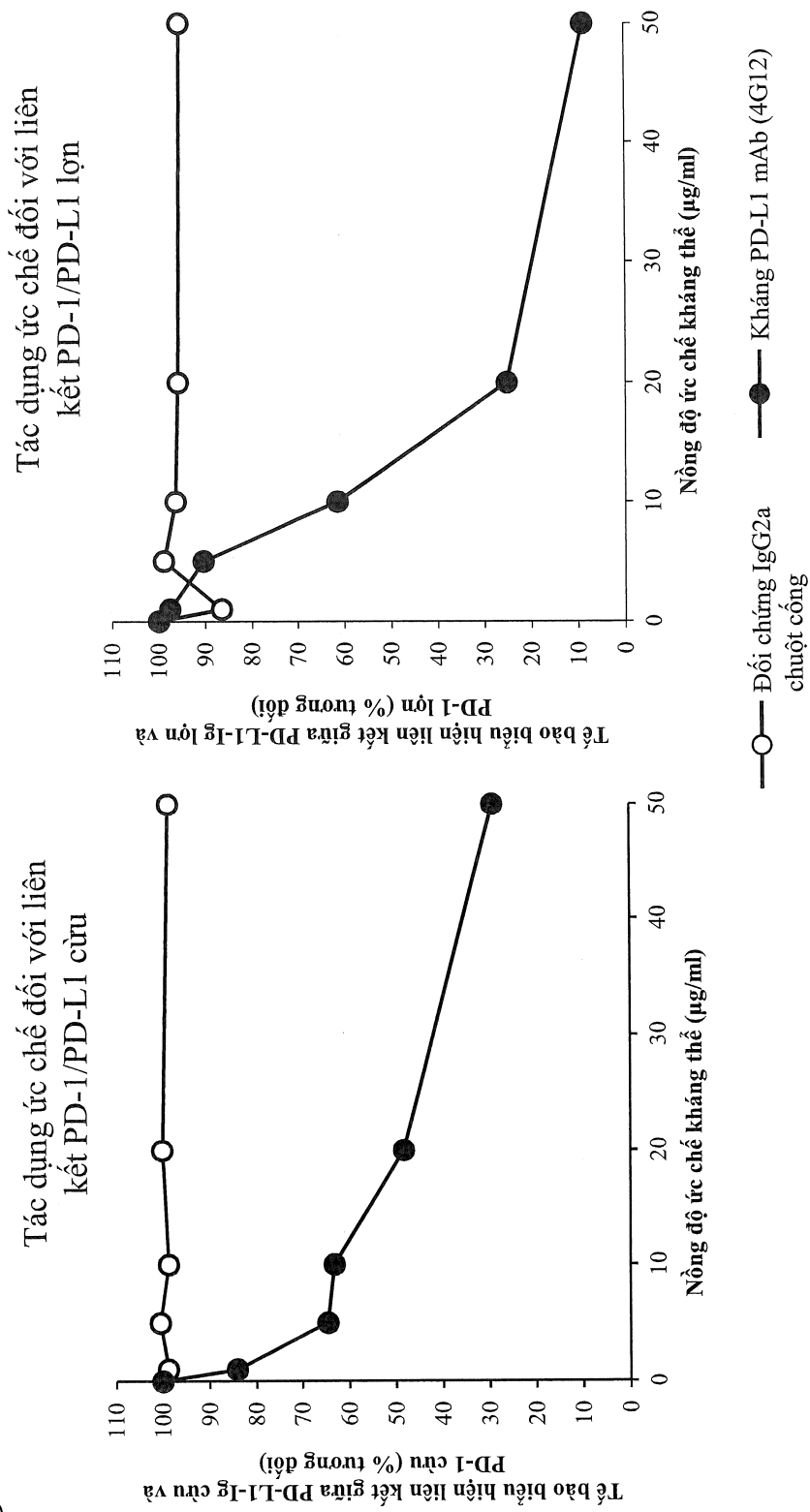


Fig.17

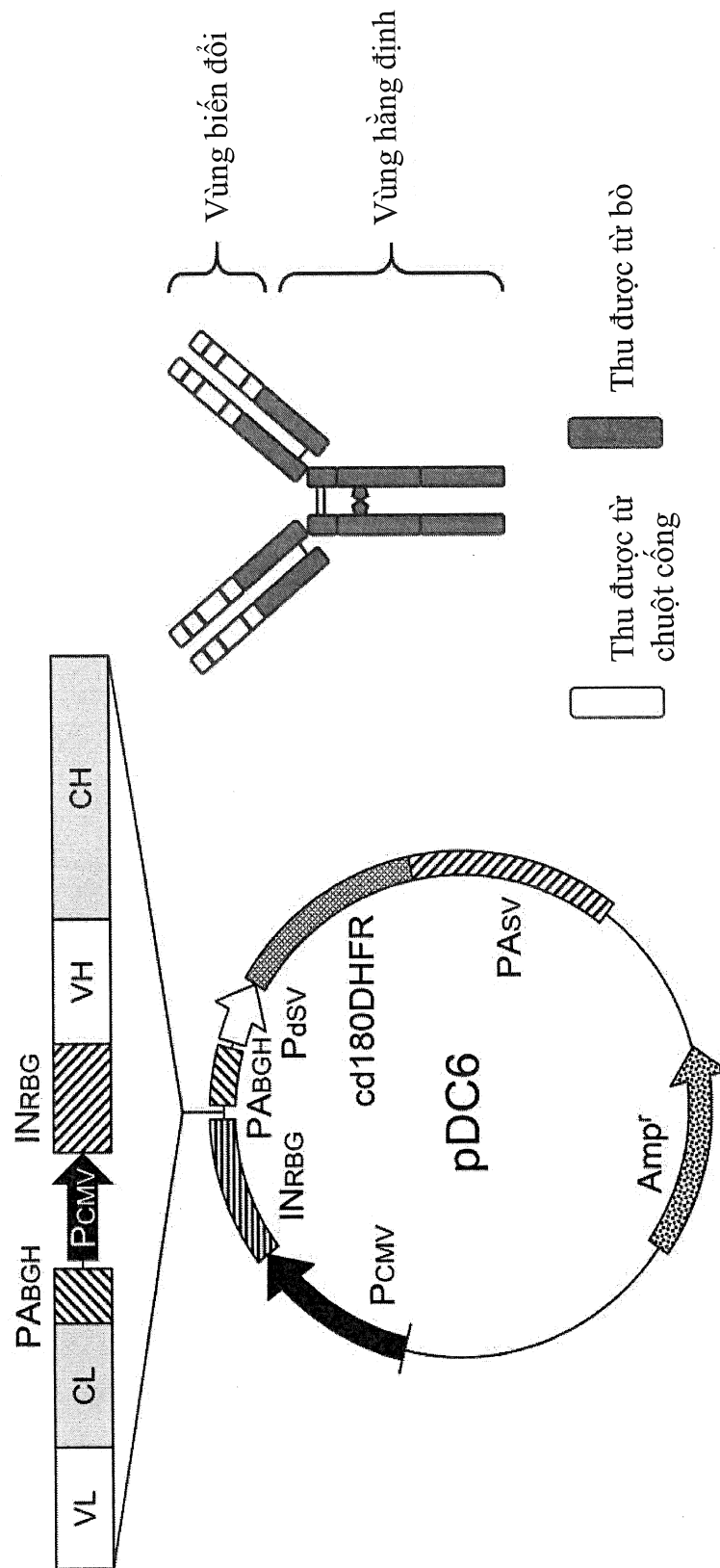


18/28

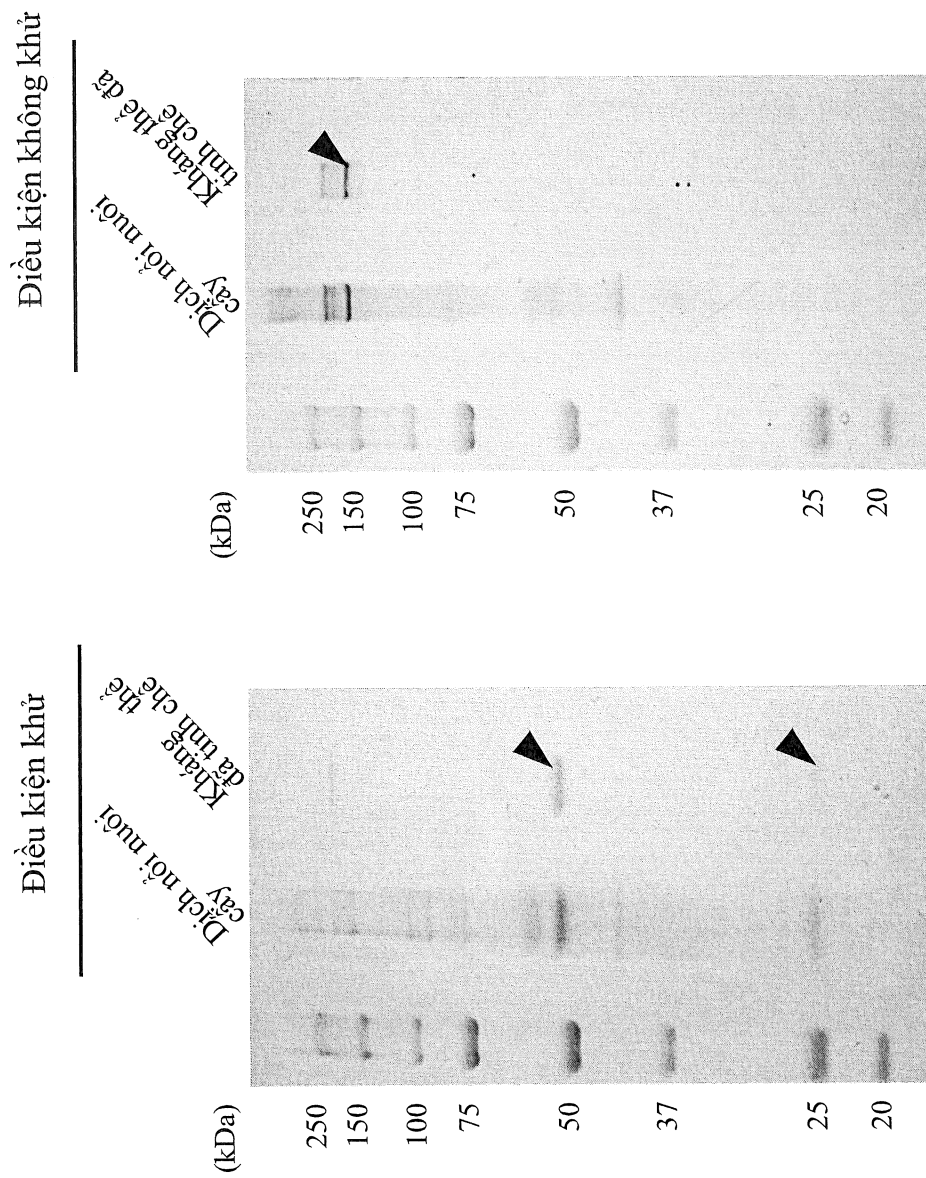
Fig.18

20/28

Fig.20

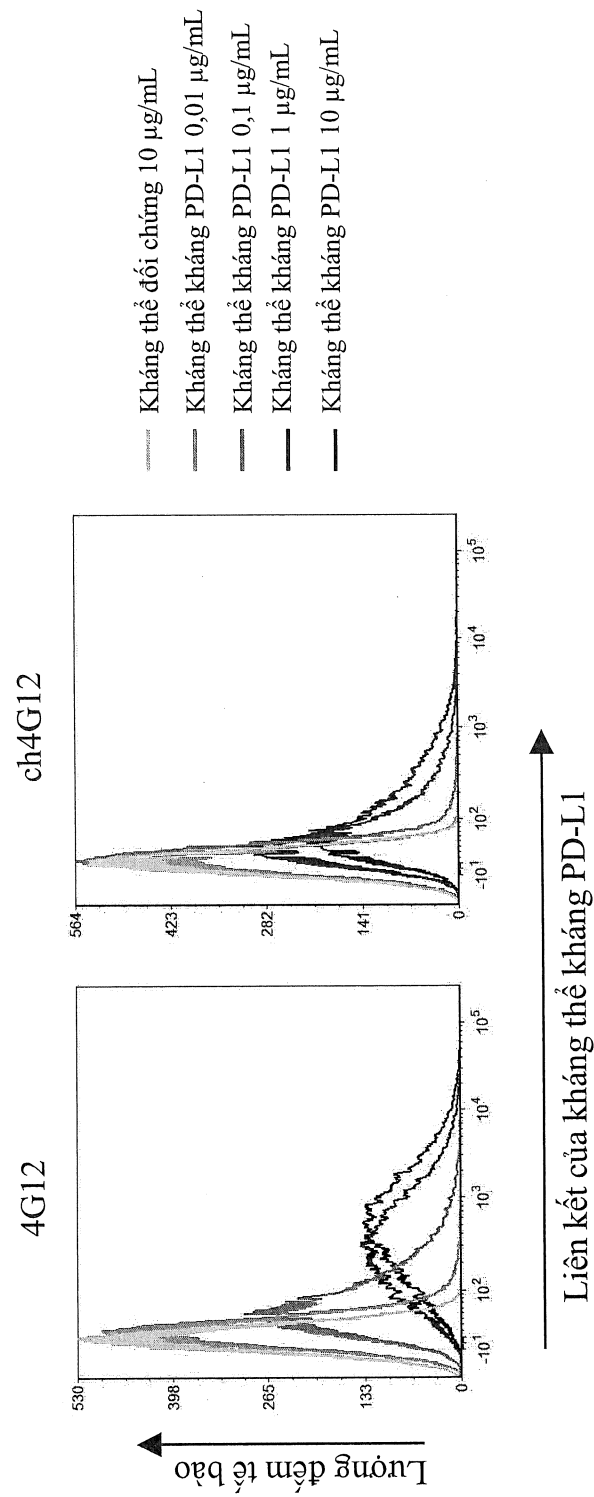


21/28

Fig.21

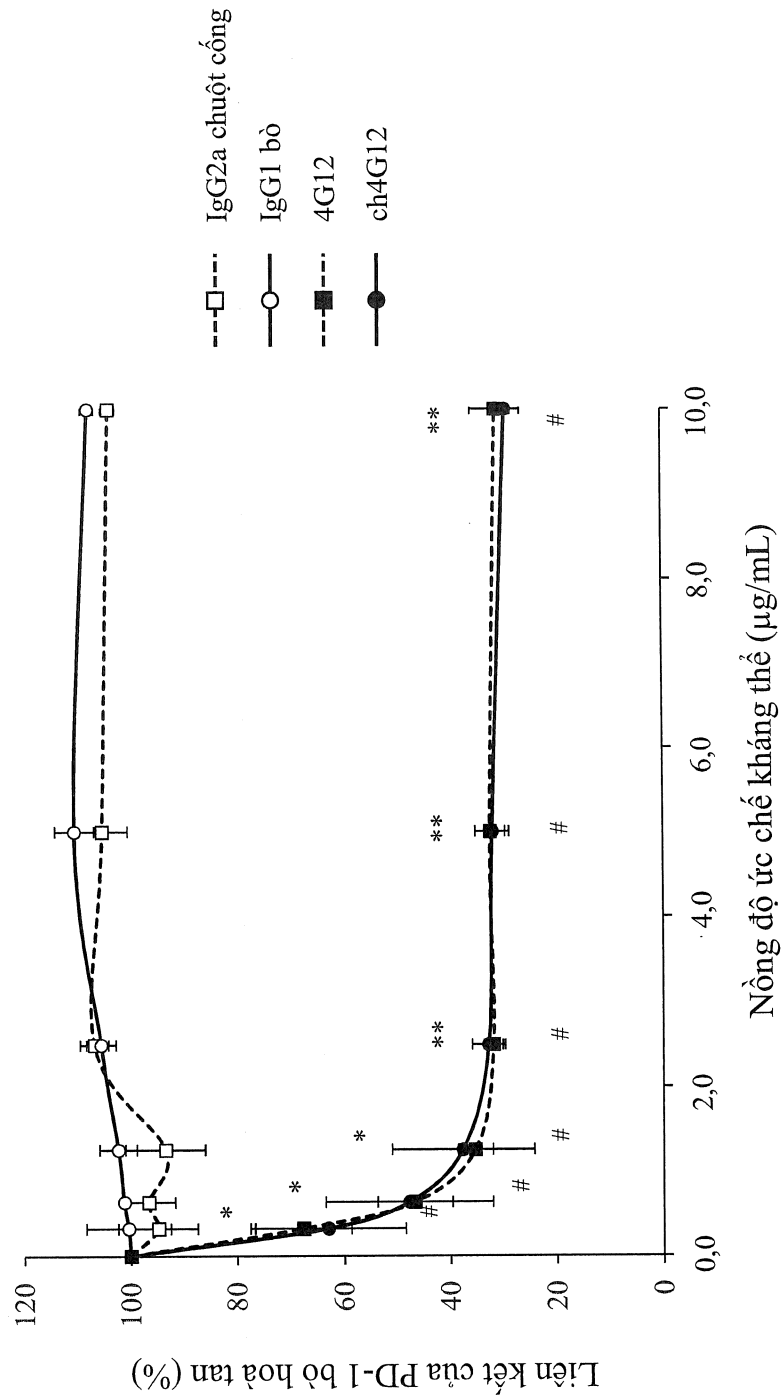
22/28

Fig.22



23/28

Fig.23



24/28

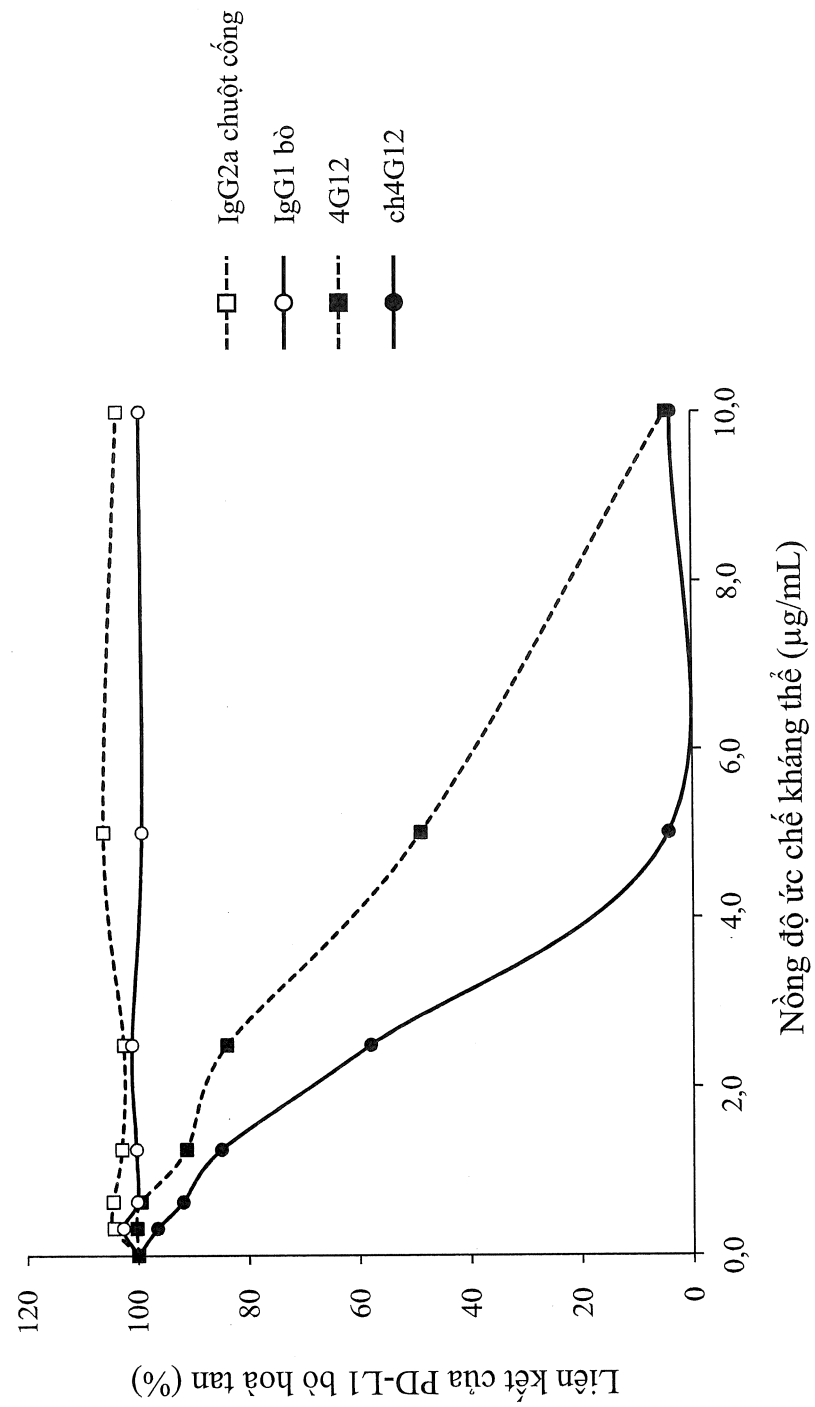
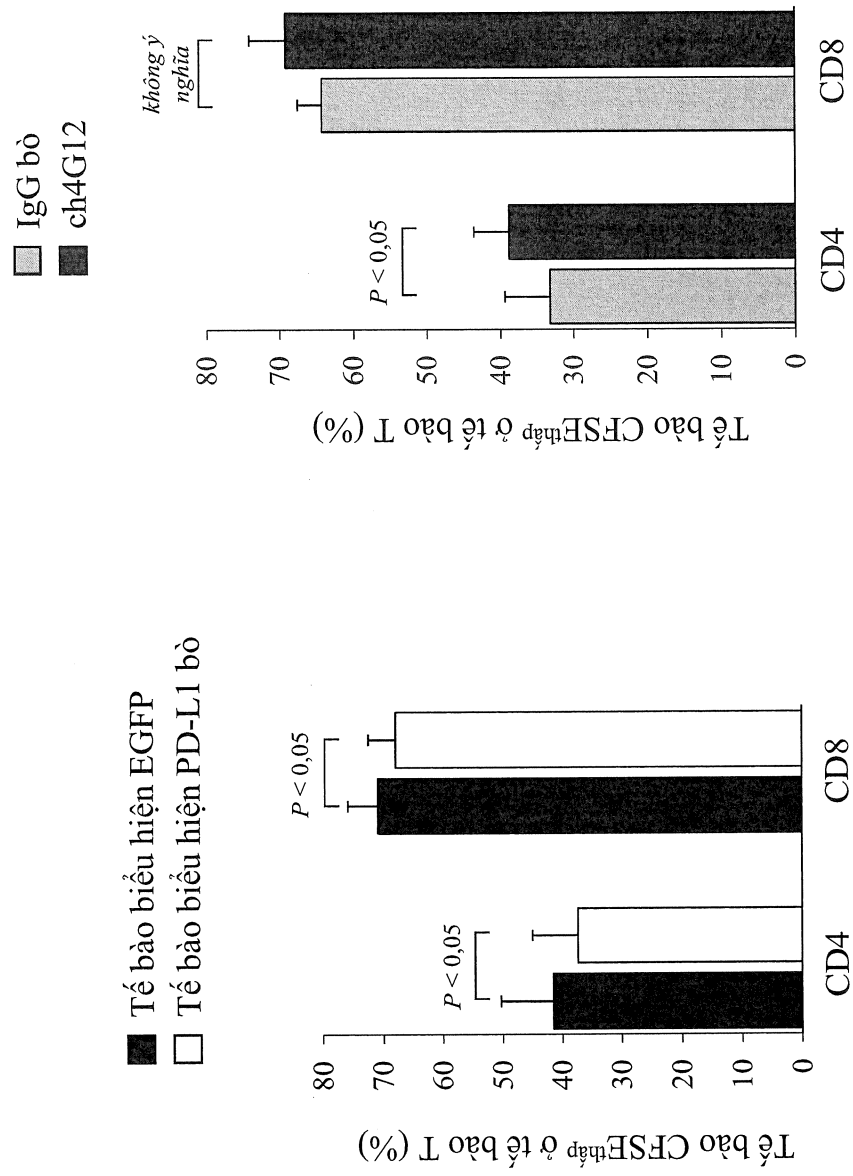


Fig.24

25/28

Fig.25



26/28

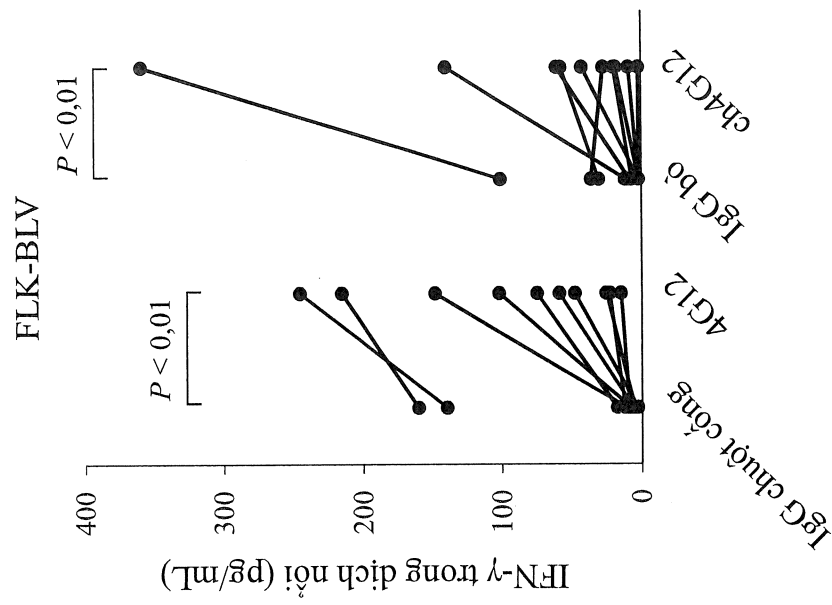
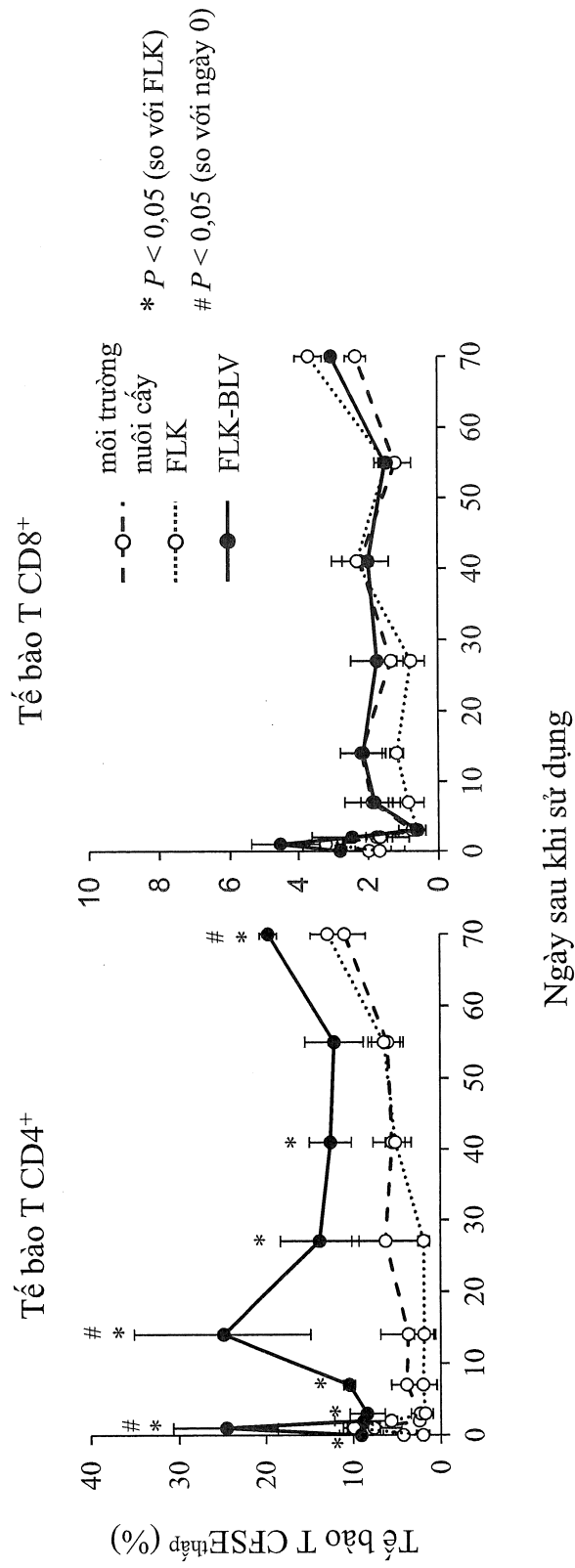


Fig.26

27/28

Fig.27



28/28

Fig.28

