



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ C07K 16/28; A61P 17/00; A61P 29/00; (13) B
A61K 39/00; A61P 25/00



1-0045150

-
- (21) 1-2019-06763 (22) 11/05/2018
(86) PCT/US2018/032218 11/05/2018 (87) WO 2018/213113 22/11/2018
(30) 62/508,510 19/05/2017 US
(45) 25/04/2025 445 (43) 25/02/2020 383A
(71) ELI LILLY AND COMPANY (US)
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America
(72) ATWELL, Shane Krummen (US); OBUNGU, Victor H. (KE); VENDEL, Andrew
Charles (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)
-

- (54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT CHẤT LÀM GIẢM LYMPHO BÀO B VÀ T, DƯỢC
PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY, PHÂN TỬ ADN, TẾ BÀO ĐỘNG VẬT CÓ
VÚ BAO GỒM PHÂN TỬ ADN VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT KHÁNG THỂ

(21) 1-2019-06763

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết BTLA và dược phẩm chứa kháng thể này. Kháng thể này là hữu ích làm tác nhân để điều trị các tình trạng bệnh lý liên quan đến bệnh tự miễn bao gồm điều trị bệnh luput.

Sáng chế còn đề cập đến phân tử ADN, tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN và quy trình sản xuất kháng thể.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực y tế. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể được định hướng kháng chất làm giảm lympho bào B và T (B and T Lymphocyte Attenuator-BTLA) và được phẩm chứa kháng thể này. Các kháng thể theo sáng chế được mong đợi là hữu ích trong việc điều trị các bệnh tự miễn như bệnh luput.

Tình trạng kỹ thuật theo sáng chế

Bệnh luput là một bệnh tự miễn với các đặc điểm không đồng nhất, bao gồm các biểu hiện ở da, miệng, cơ và khớp, tim, máu ngoại vi, phổi, thận, sinh sản và CNS. Bệnh nhân mắc bệnh luput có nguy cơ mắc bệnh tim mạch, thận và thần kinh-tâm thần nghiêm trọng và đe dọa tính mạng. Tiêu chuẩn chăm sóc bao gồm nhiều steroid, các thuốc này có nhiều tác dụng phụ không thuận lợi và/hoặc nguy hiểm. Cần có các liệu pháp để quản lý bệnh và cho phép giảm hoặc loại bỏ việc sử dụng steroid.

Chất làm giảm lympho bào B và T (BTLA; CD272) là thành viên của siêu họ Ig và là một phần của họ các thụ thể điểm kiểm soát để điều hòa tiêu cực sự hoạt hóa tế bào miễn dịch. BTLA chủ yếu được biểu hiện trên các tế bào B, tế bào T và tế bào đuôi gai. Phối tử tự nhiên cho BTLA là thành viên siêu họ thụ thể TNF, chất trung gian xâm nhập virus herpes (HVEM; TNFRSF14).

HVEM-Fc người đã được báo cáo là gắn kết với BTLA người được biểu hiện trong các tế bào 293T với K_D là 112 nM như được phát hiện bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. (Cheung et al., PNAS, Sept. 13, 2005, 102:37;13218-13223). Sự gắn kết của HVEM với BTLA dẫn đến phosphoryl hóa tyrosin đối với hai miền motif ức chế dựa trên tyrosin miễn dịch thụ thể được bảo toàn trên miền tế bào chất của BTLA. Sự phosphoryl hóa này dẫn đến việc tuyển mộ, thông qua hai miền tương đồng Src 2, protein tyrosin phosphatase truyền hoạt tính ức chế của BTLA bằng cách khử phosphoryl hóa và điều hòa xuôi tín hiệu của thụ thể tế bào dương tính (ví dụ, dòng thác truyền tín hiệu của thụ thể tế bào T hoặc thụ thể tế bào B) dẫn đến ức chế sự hoạt hóa tế bào miễn dịch. Ở mô hình chuột có xu hướng tự phát triển các bệnh giống luput

(chuột MRL-lpr), chuột khuyết BTLA có sự thâm nhiễm lympho bào nghiêm trọng hơn ở tuyến nước bọt, phổi, tụy, thận và khớp so với chuột biểu hiện BTLA. Do đó, kháng thể chủ vận BTLA có thể mang lại lợi ích cho bệnh nhân mắc các bệnh tự miễn như luput.

Các kháng thể chủ vận đối với BTLA là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, patent Mỹ số 8,563,694 (patent '694) mô tả các kháng thể chủ vận BTLA mà phong bế (Mab21H6 và Mab19A7) hoặc không phong bế (Mab8D5 và Mab8A3) sự gắn kết của HVEM với BTLA. Patent '694 mô tả nhu cầu đang có nhằm phát triển các phương pháp điều trị để khai thác vai trò ức chế của BTLA trong các đáp ứng của lympho bào, đồng thời cho phép sự gắn kết BTLA-HVEM. Tuy nhiên, thiếu các kháng thể chủ vận BTLA bắt chước sự gắn kết của HVEM với BTLA để điều trị các bệnh tự miễn. Kháng thể “bắt chước” sự gắn kết của HVEM với BTLA nếu kháng thể có một epitop chồng lên đáng kể vị trí gắn kết của HVEM, và có sự tương đồng về cấu trúc giữa kháng thể và HVEM. Ngoài ra, còn thiếu các kháng thể chủ vận BTLA gắn kết BTLA người và là hữu ích để nghiên cứu trên các mô hình tiền lâm sàng in vivo về các bệnh tự miễn như mô hình chuột và khỉ cynomolgus. Do đó, vẫn còn nhu cầu về các kháng thể chủ vận BTLA khác.

Bản chất kỹ thuật theo sáng chế

Các kháng thể theo sáng chế nhằm đề xuất các kháng thể chủ vận BTLA khác. Các kháng thể chủ vận BTLA có thể là hữu ích trong việc điều trị các bệnh tự miễn như luput. Các kháng thể chủ vận BTLA như vậy có thể gắn kết BTLA từ nhiều loài như BTLA người, khỉ cynomolgus, và/hoặc chuột. Ngoài ra, các kháng thể chủ vận BTLA như vậy chứng tỏ hoạt tính in vitro tăng so với kháng thể có cùng vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ như Mab8D5. Các kháng thể theo sáng chế có ít nhất một trong số các đặc tính mong muốn này.

Một kháng thể chủ vận BTLA như vậy có thể gắn kết BTLA người, khỉ cynomolgus, và/hoặc chuột. Đáng ngạc nhiên là, kháng thể này có khả năng phản ứng chéo mong muốn này vì nó bắt chước sự gắn kết của HVEM với BTLA. Kháng thể này cũng có ái lực gắn kết cao hơn với BTLA so với sự gắn kết của HVEM với BTLA. Điều này có thể mang lại lợi ích cho các bệnh nhân có tình trạng bệnh với mức HVEM

tạm thời, trong đó có thể mong muốn có một kháng thể chủ vận bất chước BTLA hỗ trợ trong thời gian bệnh nhân giảm HVEM.

Sáng chế đề xuất các kháng thể gắn kết với BTLA và hoạt hóa và/hoặc tăng cường tín hiệu qua trung gian BTLA (các kháng thể chủ vận BTLA). Sáng chế đề xuất kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (light chain variable region-LCVR) và vùng biến đổi của chuỗi nặng (heavy chain variable region-HCVR), trong đó LCVR chứa các vùng quyết định bổ trợ (complementarity determining regions-CDR) LCDR1, LCDR2, và LCDR3 và HCVR chứa các CDR HCDR1, HCDR2, và HCDR3, và trong đó trình tự axit amin của LCDR1 là SEQ ID NO: 22, trình tự axit amin của LCDR2 là SEQ ID NO: 25, trình tự axit amin của LCDR3 là SEQ ID NO: 28, trình tự axit amin của HCDR1 là SEQ ID NO: 13, trình tự axit amin của HCDR2 là SEQ ID NO: 16, và trình tự axit amin của HCDR3 là SEQ ID NO: 19. Theo một phương án, kháng thể chứa LCVR và HCVR, và trong đó trình tự axit amin của LCVR là SEQ ID NO: 4, và trình tự axit amin của HCVR là SEQ ID NO: 3. Theo một phương án khác, kháng thể chứa chuỗi nhẹ (LC) và chuỗi nặng (HC), và trong đó trình tự axit amin của LC là SEQ ID NO: 2, và trình tự axit amin của HC là SEQ ID NO: 1. Theo một phương án khác nữa, kháng thể chứa 2 LC và 2 HC, trong đó trình tự axit amin của mỗi LC là SEQ ID NO: 2, và trình tự axit amin của mỗi HC là SEQ ID NO: 1.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể chủ vận BTLA trong đó trình tự axit amin của LCDR1 là SEQ ID NO: 23, trình tự axit amin của LCDR2 là SEQ ID NO: 26, trình tự axit amin của LCDR3 là SEQ ID NO: 29, trình tự axit amin của HCDR1 là SEQ ID NO: 14, trình tự axit amin của HCDR2 là SEQ ID NO: 17, và trình tự axit amin của HCDR3 là SEQ ID NO: 20. Theo một phương án, trình tự axit amin của LCVR là SEQ ID NO: 8, và trình tự axit amin của HCVR là SEQ ID NO: 7. Theo một phương án khác, trình tự axit amin của LC là SEQ ID NO: 6, và trình tự axit amin của HC là SEQ ID NO: 5. Theo một phương án khác nữa, kháng thể chứa 2 LC và 2 HC, trong đó trình tự axit amin của mỗi LC là SEQ ID NO: 6 và trình tự axit amin của mỗi HC là SEQ ID NO: 5.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể chủ vận BTLA trong đó trình tự axit amin của LCDR1 là SEQ ID NO: 24, trình tự axit amin của LCDR2 là SEQ ID NO: 27, trình tự axit amin của LCDR3 là SEQ ID NO: 30, trình tự axit amin của HCDR1 là SEQ ID NO: 15, trình tự axit amin của HCDR2 là SEQ ID NO: 18, và trình tự axit amin của

HCDR3 là SEQ ID NO: 21. Theo một phương án, trình tự axit amin của LCVR là SEQ ID NO: 12, và trình tự axit amin của HCVR là SEQ ID NO: 11. Theo một phương án khác, trình tự axit amin của LC là SEQ ID NO: 10, và trình tự axit amin của HC là SEQ ID NO: 9. Theo một phương án khác nữa, kháng thể chứa 2 LC và 2 HC, trong đó trình tự axit amin của mỗi LC là SEQ ID NO: 10, và trình tự axit amin của mỗi HC là SEQ ID NO: 9.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể gắn kết với BTLA, trong đó kháng thể được tạo ra bằng các bước bao gồm gây miễn dịch thỏ bằng miễn ngoại bào được gắn thẻ Fc (ECD) của BTLA người và tăng cường bằng protein được gắn thẻ BTLA-Fc của người và chuột. Trình tự axit amin của BTLA ECD người là các axit amin 31-150 của SEQ ID NO: 31.

Sáng chế đề cập đến kháng thể chủ vận BTLA bất chước sự gắn kết của HVEM với BTLA. Sáng chế còn đề cập đến kháng thể chủ vận BTLA có thể gắn kết với BTLA người, khỉ cynomolgus và chuột.

Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế, và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng. Theo một số phương án, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị một hoặc nhiều bệnh thấp khớp, thần kinh và da liễu, theo đó phương pháp điều trị này bao gồm sử dụng lượng hữu hiệu của dược phẩm theo sáng chế cho bệnh nhân có nhu cầu điều trị. Theo một số phương án cụ thể, bệnh thấp khớp ít nhất là một trong những bệnh viêm thận luput, bệnh luput ban đỏ hệ thống và viêm khớp dạng thấp. Theo các phương án cụ thể khác, bệnh da liễu ít nhất là một trong những bệnh viêm da dị ứng và bệnh vẩy nến. Theo các phương án cụ thể khác, bệnh thần kinh là đa xơ cứng.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị cho bệnh nhân mắc một hoặc nhiều bệnh gồm bệnh thấp khớp, thần kinh, và da liễu, bao gồm bước cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế. Theo một số phương án như vậy, bệnh thấp khớp ít nhất là một trong những bệnh viêm thận luput, bệnh luput ban đỏ hệ thống và viêm khớp dạng thấp. Theo các phương án cụ thể khác, bệnh da liễu ít nhất là một trong những bệnh viêm da dị ứng và bệnh vẩy nến. Theo các phương án cụ thể khác, bệnh thần kinh là đa xơ cứng.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể theo sáng chế hoặc dược phẩm chứa chúng để dùng trong trị liệu. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể theo

sáng chế hoặc được phẩm của chúng để sử dụng trong điều trị một hoặc nhiều bệnh thấp khớp, thần kinh và da liễu. Theo một số phương án như vậy, bệnh thấp khớp ít nhất là một trong những bệnh viêm thận luput, bệnh luput ban đỏ hệ thống và viêm khớp dạng thấp. Theo các phương án cụ thể khác, bệnh da liễu ít nhất là một trong những bệnh viêm da dị ứng và bệnh vẩy nến. Theo các phương án cụ thể khác, bệnh thần kinh là đa xơ cứng.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế hoặc được phẩm chứa chúng để sản xuất thuốc để điều trị một hoặc nhiều bệnh thấp khớp, thần kinh và da liễu. Theo một số phương án như vậy, bệnh thấp khớp ít nhất là một trong những bệnh viêm thận luput, bệnh luput ban đỏ hệ thống và viêm khớp dạng thấp. Theo các phương án cụ thể khác, bệnh da liễu ít nhất là một trong những bệnh viêm da dị ứng và bệnh vẩy nến. Theo các phương án cụ thể khác, bệnh thần kinh là đa xơ cứng.

Sáng chế còn đề xuất phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, hoặc SEQ ID NO:9. Sáng chế còn đề xuất phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, hoặc SEQ ID NO:10.

Sáng chế đề xuất phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, và bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Sáng chế còn đề xuất phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, và phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Theo phương án cụ thể, trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 là SEQ ID NO: 35 và trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2 là SEQ ID NO: 36.

Sáng chế còn đề xuất phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 5, và bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6. Sáng chế còn đề xuất phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 5, và phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6. Theo phương án cụ thể, trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 5 là SEQ ID NO: 37, trình tự

polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6 là SEQ ID NO: 38.

Sáng chế còn đề xuất phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9, và bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10. Sáng chế còn đề xuất phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9, và phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10. Theo phương án cụ thể, trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9 là SEQ ID NO: 39, trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10 là SEQ ID NO: 40.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Sáng chế còn đề xuất tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 5 và polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6. Sáng chế còn đề xuất tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9 và polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10. Theo một phương án, dòng tế bào động vật có vú là dòng tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese Hamster Ovary - CHO) hoặc thận phôi của chuột đồng (Hamster embryonic kidney - HEK).

Sáng chế còn đề xuất tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO:1 và/hoặc phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2, trong đó tế bào này có khả năng biểu hiện kháng thể bao gồm HC có trình tự axit amin SEQ ID NO:1 và LC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Tốt hơn nếu tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO:1 và polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2. Theo một phương án, dòng tế bào động vật có vú là dòng tế bào CHO hoặc HEK.

Sáng chế còn đề xuất tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO:5 và/hoặc phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6, trong đó tế bào này có khả năng biểu hiện kháng thể bao gồm HC có trình tự axit amin SEQ ID NO:5 và LC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6. Tốt hơn nếu tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO:5 và polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6. Theo một phương án, dòng tế bào động vật có vú là dòng tế bào CHO hoặc HEK.

Sáng chế còn đề xuất tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO:9 và/hoặc phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10, trong đó tế bào này có khả năng biểu hiện kháng thể bao gồm HC có trình tự axit amin SEQ ID NO:9 và LC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10. Tốt hơn nếu tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO:9 và polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10. Theo phương án dòng tế bào động vật có vú là dòng tế bào CHO hoặc HEK.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất kháng thể bao gồm LC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2 và HC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, trong đó quy trình này bao gồm bước nuôi cấy tế bào động vật có vú bao gồm ADN mã hóa LC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2 và/hoặc HC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 trong các điều kiện sao cho kháng thể này được biểu hiện, và thu hồi kháng thể đã được biểu hiện. Sáng chế bao gồm kháng thể thu được bởi quy trình theo sáng chế như được mô tả ngay trên.

Sáng chế cũng đề cập đến quy trình sản xuất kháng thể bao gồm LC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6 và HC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 5, trong đó quy trình này bao gồm bước nuôi cấy tế bào động vật có vú bao gồm ADN mã hóa LC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6 và/hoặc HC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 5 trong các điều kiện sao cho kháng thể này được biểu hiện, và thu hồi kháng thể đã được biểu hiện. Sáng chế bao gồm kháng thể thu được bởi quy trình theo sáng chế như được mô tả ngay trên.

Sáng chế cũng đề cập đến quy trình sản xuất kháng thể bao gồm LC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10 và HC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9, trong đó quy trình này bao gồm bước nuôi cấy tế bào động vật có vú bao gồm ADN mã hóa LC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10 và/hoặc HC có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9 trong các điều kiện sao cho kháng thể này được biểu hiện, và thu hồi kháng thể đã được biểu hiện. Sáng chế bao gồm kháng thể thu được bởi quy trình theo sáng chế như được mô tả ngay trên.

Sáng chế bao gồm quy trình sản xuất kháng thể, mà kháng thể này bao gồm hai HC và hai LC, trong đó trình tự amin của một trong hai HC là SEQ ID NO: 1, và trình tự axit amin của một trong hai LC là SEQ ID NO: 2, và quy trình này bao gồm: a) nuôi cấy tế bào động vật có vú theo sáng chế, như được mô tả trên đây, trong các điều kiện sao cho kháng thể này được biểu hiện, và b) thu hồi kháng thể đã được biểu hiện. Sáng chế bao gồm kháng thể thu được bởi quy trình theo sáng chế như được mô tả ngay trên.

Sáng chế cũng bao gồm quy trình sản xuất kháng thể, mà kháng thể này bao gồm hai HC và hai LC, trong đó trình tự amin của một trong hai HC là SEQ ID NO: 5 và trình tự axit amin của một trong hai LC là SEQ ID NO: 6, và quy trình này bao gồm: a) nuôi cấy tế bào động vật có vú theo sáng chế, như được mô tả trên đây, trong các điều kiện sao cho kháng thể này được biểu hiện, và b) thu hồi kháng thể đã được biểu hiện. Sáng chế bao gồm kháng thể thu được bởi quy trình theo sáng chế như được mô tả ngay trên.

Sáng chế cũng bao gồm quy trình sản xuất kháng thể, mà kháng thể này bao gồm hai HC và hai LC, trong đó trình tự amin của một trong hai HC là SEQ ID NO: 9 và trình tự axit amin của một trong hai LC là SEQ ID NO: 10, và quy trình này bao gồm: a) nuôi cấy tế bào động vật có vú theo sáng chế, như được mô tả trên đây, trong các điều kiện sao cho kháng thể này được biểu hiện, và b) thu hồi kháng thể đã được biểu hiện. Sáng chế bao gồm kháng thể thu được bởi quy trình theo sáng chế như được mô tả ngay trên.

Sáng chế đề xuất kháng thể tiếp xúc với BTLA của người ở epitop cấu trúc và chức năng có các gốc sau đây của SEQ ID NO: 31: Arg ở vị trí 42 và His ở vị trí 127. Sáng chế còn đề xuất kháng thể tiếp xúc với BTLA của người ở epitop cấu trúc và

chức năng bao gồm Arg ở vị trí 42 của trình tự axit amin được nêu bởi SEQ ID NO: 31.

Sáng chế đề xuất kháng thể tiếp xúc với BTLA của người ở epitop cấu trúc mới có các gốc sau đây của SEQ ID NO: 31: Asp ở vị trí 35, Gln ở vị trí 37, Arg ở vị trí 42, Leu ở vị trí 74, Gly ở vị trí 76, Cys ở vị trí 79, Arg ở vị trí 114, Phe ở vị trí 119, Gln ở vị trí 120, Asn ở vị trí 122, Ser ở vị trí 128. Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể 22B3 được cho là bất chước sự gắn kết của HVEM với BTLA vì HCDR3 của kháng thể 22B3 có cấu trúc tương tự với HVEM. Tốt hơn là, khi cấu trúc tinh thể BTLA:kháng thể được sắp thẳng hàng với cấu trúc tinh thể BTLA:HVEM trong chương trình như PyMOL™, vòng CDR của kháng thể chấp nhận cấu trúc tương tự như vòng HVEM bao gồm các gốc axit amin từ 69 đến 72 (axit amin ELTG của SEQ ID NO:41).

Sáng chế đề xuất kháng thể tiếp xúc với BTLA của người ở epitop chức năng có Asp ở vị trí 52 của SEQ ID NO: Kháng thể tiếp xúc với epitop cấu trúc mới có các gốc sau đây của SEQ ID NO: 31: His ở vị trí 46, Glu ở vị trí 55, Glu ở vị trí 103, Pro ở vị trí 104, Leu ở vị trí 106, Pro ở vị trí 107, Thr ở vị trí 134, Ala ở vị trí 139.

Sáng chế đề xuất kháng thể tiếp xúc với BTLA của người ở epitop chức năng có His ở vị trí 68 và Lys ở vị trí 81 của SEQ ID NO:31. Theo một phương án, kháng thể tiếp xúc với epitop cấu trúc mới có các gốc sau đây của SEQ ID NO: 31: Tyr ở vị trí 62, Ala ở vị trí 64, His ở vị trí 68, Arg ở vị trí 85, Glu ở vị trí 91, Phe ở vị trí 98, Asn ở vị trí 118.

Sáng chế đề xuất kháng thể tiếp xúc với BTLA của người ở epitop cấu trúc mới có các gốc sau đây của SEQ ID NO: 31: Asp ở vị trí 35, Gln ở vị trí 37, Arg ở vị trí 42, Leu ở vị trí 74, Gly ở vị trí 76, Cys ở vị trí 79, Arg ở vị trí 114, Phe ở vị trí 119, Gln ở vị trí 120, Asn ở vị trí 122, và Ile ở vị trí 124, Ser ở vị trí 128.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng trong bản mô tả, “kháng thể” là phân tử globulin miễn dịch chứa 2 HC và 2 LC được liên kết liên phân tử bằng các liên kết disulfua. Phần tận cùng amin của mỗi LC và HC bao gồm vùng biến đổi gồm khoảng 100-120 axit amin chủ yếu chịu trách nhiệm nhận biết kháng nguyên qua các CDR nằm trong đó. Các vùng CDR nằm xen kẽ với các vùng mà được bảo toàn hơn, được gọi là các vùng

khung (framework region - “FR”). Mỗi LCVR và HCVR gồm 3 CDR và 4 FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amin đến đầu tận cùng carboxy theo trật tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 3 CDR của LC được gọi là “LCDR1, LCDR2, và LCDR3,” và 3 CDR của HC được gọi là “HCDR1, HCDR2, và HCDR3.” Các CDR chứa hầu hết các gốc tạo thành tương tác đặc hiệu với kháng nguyên. Tức là, các CDR chứa hầu hết các gốc tiếp xúc với (trong vòng 4,5 Å) các gốc của kháng nguyên. Do đó, khả năng chức năng của kháng thể gắn kết với một kháng nguyên cụ thể bị ảnh hưởng phần lớn bởi các gốc axit amin trong sáu CDR. Việc gán các axit amin vào các miền CDR nằm trong vùng LCVR và HCVR của kháng thể theo sáng chế dựa trên quy tắc đánh số Kabat đã biết rõ (Kabat, et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-93 (1971); Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)), và Chothia (Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 1987;196:901–17. Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith-Gill SJ, Air G, Sheriff S, Padlan EA, Davies D, Tulip WR, et al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature.* 1989;342:877–83). Gốc axit amin khởi đầu của HCDR1 được xác định bởi Chothia và gốc axit amin kết thúc cho HCDR1 được xác định bởi Kabat. Các gốc axit amin khởi đầu và kết thúc cho HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 được xác định bởi Kabat.

Thuật ngữ “epitop” như được sử dụng ở đây có thể đề cập đến epitop cấu trúc (các vị trí của kháng nguyên tiếp xúc với vùng biến đổi của kháng thể) và/hoặc epitop chức năng (các vị trí của kháng nguyên có thể hoặc không thể tiếp xúc với vùng biến đổi của kháng thể và cần thiết cho sự gắn kết kháng thể). Các epitop cấu trúc được xác định bằng tinh thể học tia X trong đó gốc bất kỳ trên BTLA của người nằm trong 4,5Å của gốc khác trên Fab liên kết được coi là một vị trí tiếp xúc.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất và tinh chế bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết. Ví dụ, trình tự cADN mã hóa HC (ví dụ, trình tự axit amin được nêu bởi SEQ ID NO: 1) và LC (ví dụ, trình tự axit amin được nêu bởi SEQ ID NO: 2) có thể được tách dòng và thao tác di truyền thành vector biểu hiện GS (glutamin synthetaza). Vector biểu hiện globulin miễn dịch được thao tác di truyền sau đó có thể được chuyển nhiễm ổn định vào các tế bào CHO. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này sẽ thấy được rằng việc biểu hiện kháng thể ở động vật có vú sẽ

dẫn đến sự glycosyl hóa, tiêu biểu là ở các vị trí N-glycosyl hóa bảo tồn cao trong vùng Fc. Các dòng ổn định có thể được biến đổi để biểu hiện kháng thể gắn kết đặc hiệu với BTLA. Các dòng dương tính có thể được nhân rộng trong môi trường nuôi cấy không chứa huyết thanh để sản xuất kháng thể trong thiết bị phản ứng sinh học. Môi trường, mà kháng thể được tiết vào đó, có thể được tinh chế bằng các kỹ thuật thông thường. Ví dụ, môi trường này có thể được đưa lên cột Protein A hoặc G Sepharose FF mà đã được cân bằng với dung dịch đệm tương thích, như dung dịch muối đệm phosphat một cách thuận tiện. Cột được rửa để loại bỏ các thành phần gắn kết không đặc hiệu. Kháng thể gắn kết được giải hấp, chẳng hạn, bằng gradien pH và các phân đoạn kháng thể được phát hiện, như bằng phương pháp SDS-PAGE, và sau đó gộp chung lại. Kháng thể có thể được cô đặc và/hoặc lọc vô trùng bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường. Thể kết tụ và các multimer hòa tan có thể được loại bỏ một cách hiệu quả bằng các kỹ thuật thông thường, bao gồm sắc ký loại trừ theo kích thước, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký trao đổi ion, hoặc sắc ký hydroxyapatit. Sản phẩm có thể được làm lạnh đông ngay, chẳng hạn ở -70°C hoặc có thể được đông khô.

Kháng thể theo sáng chế có thể được kết hợp vào dược phẩm mà có thể được điều chế bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm kháng thể theo sáng chế và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dùng.

Dược phẩm chứa lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng cho bệnh nhân có nguy cơ, hoặc thể hiện bệnh hoặc rối loạn mô tả trên đây qua các đường ngoài tiêu hóa (ví dụ, dưới da, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong bắp, hoặc qua da). “Lượng hữu hiệu” chỉ lượng cần thiết (theo liều và trong các khoảng thời gian và cho các phương pháp sử dụng) để đạt được kết quả điều trị mong muốn. Lượng hữu hiệu của kháng thể có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính, và thể trọng của cá thể, và khả năng tạo ra đáp ứng mong muốn ở cá thể của kháng thể. Lượng hữu hiệu cũng là lượng mà trong đó các tác dụng độc hoặc bất lợi bất kỳ của kháng thể theo sáng chế nhỏ hơn rất nhiều so với các tác dụng có lợi trong điều trị.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân. Đặc biệt hơn, các kháng thể theo sáng chế được mong đợi điều trị một hoặc nhiều bệnh thấp khớp, thần kinh và da liễu. Bệnh thấp khớp được đặc trưng bởi tình trạng

viêm có thể ảnh hưởng đến khớp, cơ và/hoặc các cơ quan của một người. Một bệnh thấp khớp như vậy là bệnh luput ban đỏ hệ thống (systemic luput erythematosus-SLE).

Như được sử dụng thay đổi cho nhau trong bản mô tả, “sự điều trị” và/hoặc “việc điều trị” và/hoặc “điều trị” được dự định để chỉ tất cả các quy trình trong đó có thể có việc làm chậm, làm gián đoạn, làm ngừng, kiểm soát, chấm dứt, hoặc đảo ngược sự tiến triển của các rối loạn được mô tả trong bản mô tả, nhưng không nhất thiết là việc loại bỏ hoàn toàn tất cả các triệu chứng của rối loạn. Việc điều trị bao gồm việc sử dụng kháng thể theo sáng chế để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh lý ở người mà có thể có lợi từ việc làm tăng hoạt tính BTLA, và bao gồm: (a) việc ức chế tiến triển tiếp theo của bệnh; và (b) làm thuyên giảm bệnh, tức là làm cho bệnh hoặc rối loạn thoái triển hoặc làm giảm các triệu chứng hoặc biến chứng của chúng.

Thao tác di truyền kháng thể

Các kháng thể theo sáng chế được tạo ra bằng cách gây miễn dịch thỏ bằng miễn ngoại bào được gắn thể Fc (ECD) của BTLA người và tăng cường bằng protein được gắn thể BTLA-Fc của chuột (25F7) hoặc xen kẽ với protein được gắn thể BTLA-Fc của người và chuột (22B3 và 23C8). Việc sàng lọc được thực hiện với BTLA người, chuột, và khỉ cynomolgus được gắn thể histidin để xác định khả năng phản ứng chéo. Trình tự axit amin của BTLA người được nêu bởi SEQ ID NO: 31, trình tự axit amin của BTLA chuột Balbc được nêu bởi SEQ ID NO: 32, trình tự axit amin của C57BL6 được nêu bởi SEQ ID NO: 33, và trình tự axit amin của BTLA khỉ cynomolgus được nêu bởi SEQ ID NO: 34. Sau đó, các kháng thể được làm giống như của người và làm thuần thực ái lực.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Biểu hiện và tinh chế các kháng thể chủ vận BTLA được thao tác di truyền

Các kháng thể chủ vận BTLA theo sáng chế có thể được biểu hiện và được tinh chế về cơ bản là như sau. Tế bào chủ thích hợp, như tế bào HEK 293 hoặc CHO, có thể được chuyển nhiễm tạm thời hoặc ổn định với hệ biểu hiện để tiết kháng thể bằng cách sử dụng tỷ lệ vector HC:LC tối ưu định trước (như 1:3 hoặc 1:2) hoặc hệ vector duy nhất mã hóa cả HC và LC. Môi trường đã làm trong, mà kháng thể đã được tiết vào đó, có thể được tinh chế bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ trong số nhiều kỹ thuật thường dùng. Chẳng hạn, môi trường có thể được đưa một cách thuận tiện lên cột

MabSelect (GE Healthcare), hoặc cột KappaSelect (GE Healthcare) dùng cho mảnh Fab, mà đã được cân bằng bằng dung dịch đệm tương thích, như nước muối đệm bằng phosphat (độ pH=7,4). Cột có thể được rửa để loại bỏ các thành phần gắn kết không đặc hiệu. Kháng thể liên kết có thể được rửa giải, ví dụ, bằng gradien độ pH (như dung dịch đệm Tris 20 mM độ pH=7,0 đến dung dịch đệm natri xitrat 10 mM độ pH = 3,0, hoặc nước muối được đệm bằng phosphat độ pH=7,4 đến dung dịch đệm glyxin 100 mM độ pH=3,0). Các phân đoạn kháng thể có thể được phát hiện, chẳng hạn bằng SDS-PAGE, và sau đó có thể được gom lại. Việc tinh chế tiếp là tùy ý, tùy thuộc vào mục đích sử dụng. Kháng thể có thể được cô đặc và hoặc lọc vô trùng bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường. Thể kết tụ và các multimer hòa tan có thể được loại bỏ một cách hiệu quả bằng các kỹ thuật thông thường, bao gồm sắc ký loại trừ theo kích thước, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký trao đổi ion, sắc ký đa phương thức, hoặc sắc ký hydroxyapatit. Độ tinh khiết của kháng thể sau các bước sắc ký này nằm trong khoảng từ 95% đến 99%. Sản phẩm có thể được giữ lạnh, lạnh đông ngay ở -70°C , hoặc có thể được làm đông khô. SEQ ID NO của axit amin đối với các kháng thể được lấy làm ví dụ theo sáng chế được chỉ ra dưới đây.

Bảng 1. Các trình tự axit amin của các kháng thể chủ vận BTLA được lấy làm ví dụ.

SEQ ID NO của kháng thể						
Kháng thể	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
22B3	13	16	19	22	25	28
23C8	14	17	20	23	26	29
25F7	15	18	21	24	27	30

Ái lực và động lực gắn kết

Ái lực gắn kết và động học của các kháng thể chủ vận BTLA theo sáng chế (22B3, 23C8 và 25F7) với BTLA được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng Biacore® 3000 (GE Healthcare). Ái lực gắn kết được đo bằng cách cố định khoảng 120 RU protein BTLA (BTLA người, chuột cống, chuột (Balb hoặc C57BL6), hoặc khỉ cynomolgus) thông qua sự liên kết amin trên chip Biacore® CM5, và cho kháng thể chủ vận BTLA chảy, bắt đầu từ 500 nM trong dung dịch pha loãng theo dãy với nồng độ gấp 2 lần xuống 15,6 nM. Các thử nghiệm được thực hiện ở

25°C trong dung dịch đệm HBS-EP (GE Healthcare BR100669; 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% chất hoạt động bề mặt P20, pH 7,4). Đối với mỗi chu kỳ, 250 µl mẫu kháng thể được chảy qua tế bào dòng 1 và 2 ở 50 µl /phút, và sau đó được phân ly trong 10 phút. Bề mặt chip được tái tạo với 5 µl dung dịch đệm glyxin tiêm ở độ pH 1,5 với tốc độ chảy 10 µl /mL. Dữ liệu được phù hợp với mô hình gắn kết Langmiur 1:1 để suy ra k_{on} , k_{off} , và để tính toán K_D . Các phương pháp sau về cơ bản như được mô tả trên đây, các thông số sau (được thể hiện trong Bảng 2) được quan sát. Dữ liệu hiển thị dưới đây là trung bình của ba thí nghiệm cho người, cyno, chuột cống và chuột cho 22B3.

Bảng 2. ái lực và động lực gắn kết.

Kháng thể	Kháng nguyên (BTLA)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
22B3	người	5,87E+06	2,19E-03	0,365
	Cyno	2,45E+06	6,47E-04	0,27
	Chuột (balbc)	2,60E+06	8,58E-02	32,5
	Chuột (C57BL6)	1,89E+06	2,65E-01	147
	Chuột cống	2,10E+06	4,62E-02	24,1
23C8	người	1,59E+05	2,93E-04	1,93 (n=3)
	Cyno	8,71E+04	3,09E-03	35,35 (n=2)
	Chuột (balbc)	Không gắn kết	Không gắn kết	Không gắn kết
	Chuột (C57BL6)	Không gắn kết	Không gắn kết	Không gắn kết
	Chuột cống	không được thử nghiệm	không được thử nghiệm	không được thử nghiệm
25F7	người	6,8622E+04	1,42E-02	206,2 (n=2)
	Cyno	không được thử nghiệm	không được thử nghiệm	không được thử nghiệm
	Chuột (balbc)	không được thử nghiệm	không được thử nghiệm	không được thử nghiệm
	Chuột (C57BL6)	7,70E+04	3,50E-04	4,63 (n=1)
	Chuột cống	không được thử nghiệm	không được thử nghiệm	không được thử nghiệm

Như được hiển thị trên Bảng 2, các kháng thể chủ vận BTLA theo sáng chế gắn kết với BTLA. Cụ thể, kháng thể 22B3 có thể gắn kết với BTLA người, chuột và khỉ cynomolgus.

Sự gắn kết với các tế bào gốc

Khả năng của kháng thể BTLA theo sáng chế (22B3, 23C8 và 25F7) gắn kết các tế bào sơ cấp từ các loài khác nhau được xác định bởi FACS. Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người (peripheral blood mononuclear cell-PBMC) được phân lập từ mẫu máu của người hiến (Ngân hàng máu San Diego, #LRS-WBC) bằng cách sử dụng Ficoll (GE #17-1440-02) và ống SepMate (STEMCELL # 15450), theo quy trình của nhà sản xuất. Các PBMC Cyno (WorldWide Primates # CA-10) được làm tan băng từ nitơ lỏng và được rửa một lần bằng dung dịch đệm FACS (giống như trên).

Lá lách từ chuột C57BL6 đực (JAX) hoặc chuột Sprague Dawley cái (Harlan) được thu gom, tập hợp lại và phân ly vào huyền phù tế bào đơn bằng cách sử dụng bộ lọc tế bào và pít tông của xi lanh trên ống hình nón 50 mL được rửa bằng RPMI 1640 hoàn thành với FBS được làm bất hoạt bằng nhiệt và 2 mM EDTA. Các tế bào được tạo viên kết, loại bỏ môi trường, và các tế bào hồng cầu được dung giải bằng cách tạo huyền phù lại viên kết trong 2 ml dung dịch đệm Lysing ACK (gibco #A10492-01) trong khoảng 2 phút trước khi dập tắt bằng RPMI đầy đủ. Các tế bào đã dung giải có thể được tạo viên kết và rửa một lần trong dung dịch đệm FACS (DPBS 1X chứa 3% FBS, 20 mM HEPES, và 2 mM EDTA).

Các tế bào sơ cấp đã phân lập được định lượng bằng cách sử dụng bộ đếm tế bào Countess, và được tạo huyền phù lại ở mức 2×10^6 tế bào trên mỗi ml trong dung dịch đệm FACS. Các thí nghiệm đếm tế bào theo dòng được thực hiện cùng ngày với phân lập tế bào bằng cách gieo 50 μ l ($\sim 0,1 \times 10^6$) tế bào vào đĩa 96 lỗ (Greiner #650101). Sự gắn kết kháng thể không đặc hiệu được ngăn chặn bằng cách thêm 1 μ l khối Fc (ví dụ, từ BD #553142) trong 15 phút ở 4°C mà không cần rửa.

Sự gắn kết kháng thể BTLA được thử nghiệm ở các nồng độ khác nhau, bằng cách pha loãng theo dãy trong dung dịch đệm FACS. Ví dụ, kháng thể đã được tinh chế và các mẫu đối chứng bắt đầu ở các nồng độ khác nhau trước tiên được pha loãng thành 30 μ g/mL và việc pha loãng nguyên liệu ban đầu theo dãy tỷ lệ 1:3 được thực hiện trong tổng số 10 lần chuẩn độ (cộng với mẫu đối chứng không được xử lý). Chuẩn độ kháng thể được ủ với các tế bào trong 20 phút ở 4°C, và được rửa bằng dung dịch đệm FACS trước khi nhuộm. Các tế bào được nhuộm bằng cách sử dụng kháng thể liên hợp florocrom để xác định các loại tế bào cụ thể (ví dụ, tế bào CD19 B, tế bào CD4 T hoặc tế bào CD8 T) hoặc sử dụng kháng thể thứ cấp để xác định sự có mặt

hoặc không có kháng thể gắn kết với tập hợp con đó. Việc nhuộm màu được thực hiện trong 20 phút ở 4°C và rửa 3 lần bằng dung dịch đệm FACS trước khi phân tích bằng máy đếm tế bào theo dòng. Kết quả được phân tích bằng phần mềm phân tích FACS tiêu chuẩn (ví dụ FACSDiva) và được báo cáo là cường độ huỳnh quang trung bình của kháng thể thứ cấp cho mỗi phép chuẩn độ. Kết quả dương tính, cho thấy sự gắn kết, được xác định bằng cách nhuộm cường độ huỳnh quang trung bình trên nền.

Thực hiện theo các quy trình về cơ bản như được mô tả ở trên, kháng thể 22B3 gắn kết với các tế bào biểu hiện BTLA của người, khỉ cynomolgus, chuột cống và chuột nhắt, kháng thể 23C8 gắn kết với các tế bào biểu hiện BTLA của người và khỉ cynomolgus, và kháng thể 25F7 gắn kết với các tế bào biểu hiện BTLA của người, khỉ cynomolgus, và chuột nhắt.

Sự phosphoryl hóa do kháng thể chủ vận BTLA gây ra

Để xác định khả năng của các kháng thể chủ vận BTLA theo sáng chế (22B3 và 25F7) gây ra sự phosphoryl hóa tyrosin trong dòng tế bào B của người, kháng thể BTLA được gắn vào đĩa nuôi cấy 24 lỗ với 10 µg/mL trong một giờ ở 37°C. Đĩa được rửa bằng PBS để loại bỏ kháng thể không gắn kết bất kỳ. Dòng tế bào B biểu hiện BTLA của người, như Ramos.2G6.4C10 dòng tế bào lympho B của người (ATCC), có thể được thêm vào các lỗ với 10×10^6 tế bào/mL và ủ trong 37°C trong 30 phút. Các tế bào được loại bỏ và dung giải trong dung dịch đệm Lysis đầy đủ (MSD) và đông lạnh ở -80°C trong ít nhất 30 phút.

BTLA được phosphoryl hóa được phát hiện bởi Meso Sector S 600. Các đĩa phát hiện streptavidin được chuẩn bị bằng cách ủ trong dung dịch phong bế (MSD) trong một giờ ở nhiệt độ phòng. Kháng thể bắt giữ BTLA được biotin hóa (5A5) được phủ lên đĩa trong một giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó là ba bước rửa bằng Tris trở lên. Các chất dung giải tế bào được ủ trong hai giờ ở nhiệt độ phòng. Tổng BTLA được phát hiện bằng kháng thể kháng BTLA SULFO-TAG (ANC6E9) và BTLA được phosphoryl hóa được đo bằng kháng thể kháng phosphotyrosin SULFO-TAG (PY20; MSD), sau đó là ba bước rửa bằng Tris trở lên. Sau đó, bổ sung 2x đệm đọc T (MSD) vào các lỗ ngay trước khi phân tích bằng cách sử dụng Meso Sector S 600.

Theo các quy trình về cơ bản như được mô tả ở trên, kháng thể 22B3 làm tăng sự phosphoryl hóa tyrosin của BTLA gấp 2,41 lần trên mức nền so với mẫu đối chứng âm, và kháng thể 25F7 làm tăng sự phosphoryl hóa tyrosin của BTLA gấp 1,47 lần trên mức nền so với mẫu đối chứng âm. Những dữ liệu này chứng minh rằng các kháng thể chủ vận BTLA 22B3 và 25F7 có thể gây ra sự phosphoryl hóa BTLA trong dòng tế bào B của người.

Ức chế sự tăng sinh tế bào B sơ cấp của người

Hiệu lực in vitro của kháng thể chủ vận BTLA theo sáng chế được đánh giá bằng khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào B sơ cấp của người. Các tế bào B nguyên phát ở người được phân lập từ các tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người khỏe mạnh bằng cách sử dụng kit phân lập tế bào B của người (EasySep) và được tạo huyền phù lại trong môi trường tế bào sơ cấp người thích hợp. Kháng IgM được phủ lên các đĩa cùng với chuẩn độ mẫu đối chứng isotyp hoặc kháng thể BTLA và được ủ trong một giờ ở 37°C sau đó là bước rửa PBS. Các tế bào B người phân lập được thêm vào từng lỗ và được ủ trong 72 giờ ở 37°C với 5% CO₂, sau đó là xung [³H]-thymidin trong 18 giờ cuối. Các đĩa sau ủ được lấy ra và đặt trên băng khô trong 30 phút và sau đó được bảo quản ở -20°C cho đến khi sẵn sàng để thu gom. Các tế bào được dung giải bằng cách làm tan giá và thu gom bằng Harvester9600 (Tomtec). Sự tăng sinh được đánh giá bằng cách đo sự kết hợp [³H]-thymidin với bộ đếm vi đĩa MicroBeta² 2450 (Perkin Elmer).

Số lần đếm được sử dụng để đánh giá đáp ứng tăng sinh tương đối trong thử nghiệm này, và phần trăm ức chế được tính bằng phương trình [% ức chế = (tín hiệu cực đại trung bình-mẫu tín hiệu)/tín hiệu cực đại trung bình x 100], có thể được sử dụng để xác định giá trị IC₅₀ bằng phần mềm vẽ đồ thị (GraphPad Prism).

Theo các quy trình về cơ bản như được mô tả ở trên, kháng thể chủ vận BTLA 22B3 có thể ức chế sự tăng sinh tế bào B sơ cấp in vitro với IC₅₀ được tính toán là 0,32 +/- 0,1 nM, kháng thể 23C8 có thể ức chế sự tăng sinh tế bào B sơ cấp in vitro với IC₅₀ được tính toán là 0,14 nM, và kháng thể 25F7 có thể ức chế sự tăng sinh tế bào B sơ cấp in vitro với IC₅₀ được tính toán là 0,17 nM. Trong thí nghiệm tương tự, kháng thể 22B3 có thể ức chế sự tăng sinh tế bào B sơ cấp với IC₅₀ được tính là 0,32 nM, và kháng thể có cùng HCVR và LCVR như Mab8D5 (ID SEQ NO: 11 và 18 của bảng

sáng chế '694, tương ứng) ức chế sự tăng sinh tế bào B sơ cấp với IC₅₀ được tính là 6,38 nM. Những dữ liệu này chứng minh rằng các kháng thể chủ vận BTLA 22B3, 23C8 và 25F7 có thể ức chế sự tăng sinh tế bào B in vitro, và kháng thể 22B3 có hoạt tính in vitro lớn hơn so với Mab8D5.

Mô hình chuột NSG được làm giống như của người của GvHD

Việc phòng ngừa bệnh mãnh ghép chống lại vật chủ (graft vs. host disease-GvHD) do PBMC người gây ra được xác định in vivo.

Tóm lại, chuột NSG cái (JAX Labs, Stock # 05557), khoảng 8-10 tuần tuổi, được chuẩn hóa và chia thành các nhóm điều trị (n = 8 chuột cho mỗi nhóm điều trị) dựa trên số đo trọng lượng cơ thể cơ bản. Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell-PBMC) được phân lập từ mẫu máu của người hiến (Ngân hàng máu San Diego, #LRS-WBC) bằng cách sử dụng Ficoll (GE #17-1440-02) và ống SepMate (STEMCELL # 15450), theo quy trình của nhà sản xuất. PBMC được tạo huyền phù lại với khoảng 150 x10⁶ tế bào trên một ml PBS. Các nhóm điều trị được che giấu trước khi dùng liều.

Vào ngày 1, 100µl (15 x10⁶ tế bào) PBMC được tạo huyền phù trong PBS (như được mô tả ở trên) (hoặc 100µl PBS cho các đối chứng không được cấy ghép) được tiêm tĩnh mạch (IV) vào đuôi của mỗi con chuột. Chuột được dùng liều hàng tuần (QW) bằng kháng thể theo sáng chế (22B3 hoặc 23C8) hoặc các đối chứng với các nồng độ khác nhau trong chất dẫn PBS, bằng cách tiêm dưới da (SQ). Ba nghiên cứu độc lập được thực hiện về cơ bản như được mô tả trong tài liệu này. Nồng độ liều cho mỗi nghiên cứu là [nghiên cứu 1 (kháng thể 22B3): 0,1, 1,0, 5,0, 10,0 và 20,0 mg/kg; nghiên cứu 2 (kháng thể 22B3 hoặc 23C8): 0,001, 0,01, 10,0 và 100 mpk; và nghiên cứu 3: 0,001, 0,005, 0,01, 0,1, 0,5 và 1,0mpk].

Nghiên cứu được chấm dứt và chuột được làm chết êm ái trước khi các con vật đối chứng isotyp giảm 20% trọng lượng cơ thể cơ bản (Nghiên cứu 1 và 2) hoặc ngày 28 (Nghiên cứu 3). Trọng lượng được ghi lại (nghiên cứu 1 và nghiên cứu 2), huyết thanh được thu thập để phân tích xytokin (nghiên cứu 1; phân tích được thực hiện bởi ELISA MSD; xytokin được phân tích là TNFα, IL-10, IL-6, IL-4, IL12p70, IL-13, IL-2 và IL-8), và lách được thu gom để phân tích kiểu hình/độc lực học (được xác định bằng mức độ giảm quần thể tế bào CD 8 T; nghiên cứu 1 và nghiên cứu 3).

Theo các quy trình về cơ bản như được mô tả trên đây, thu được các dữ liệu sau.

Động vật được điều trị bằng kháng thể 22B3 trong nghiên cứu 1 chứng minh những điều sau đây (ở liều 0,1, 1,0, 5,0, 10,0 hoặc 20,0 mg/kg kháng thể): (i) trọng lượng cơ thể tương tự khi kết thúc nghiên cứu so với trọng lượng cơ thể của động vật đối chứng không được cấy ghép; (ii) giảm các xytokin TNF α , IL-10, IL-6, IL-4 và IL-12p70 so với động vật đối chứng isotyp; và (iii) giảm quần thể tế bào CD 8 T so với động vật đối chứng isotyp (phân tích kiểu hình/dược lực học).

Dữ liệu từ nghiên cứu 2 chứng minh rằng chuột được điều trị bằng 0,01mg/kg kháng thể 22B3, hoặc 1,0, 5,0 hoặc 10,0 mg/kg kháng thể 23C8 có trọng lượng cơ thể tương tự khi kết thúc nghiên cứu so với trọng lượng cơ thể của động vật đối chứng không được cấy ghép. Nghiên cứu 2 không chứng minh hoạt tính của 22B3 trên trọng lượng cơ thể ở mức 10,0 mg/kg, điều này có thể phản ánh sự thay đổi tự nhiên của đối tượng cho trong mô hình này. Trong nghiên cứu 3, kháng thể 22B3 chứng minh hoạt tính dược lực học in vivo ở các liều kháng thể sau: 0,01, 0,1, 0,5, và 1,0 mg/kg. Kết hợp lại với nhau, những dữ liệu này chứng minh rằng kháng thể 22B3 và kháng thể 23C8 có hiệu quả trong việc phòng ngừa GvHD in vivo.

Bệnh viêm thận luput do mIFN α gây ra

Mô hình viêm thận luput do interferon-alpha (IFN α) gây ra là mô hình chuột mắc bệnh luput ban đỏ hệ thống (systemic luput erythematosus-SLE) trong đó IFN α được sử dụng để đồng bộ khởi phát và đẩy nhanh tiến triển của bệnh ở thể lai với chuột đen New Zealand và chuột trắng New Zealand (NZB/W). Mô hình chuột NZB/W là một mô hình cổ điển của bệnh viêm thận luput tự phát. Sự tiến triển bệnh ở những con chuột này có thể được đẩy nhanh bằng cách sử dụng IFN α ngoại sinh bằng cách sử dụng các vectơ adenovirut. Mô hình viêm thận luput này được sử dụng để chứng minh hoạt tính của các kháng thể chủ vận BTLA theo sáng chế.

Một ngày trước khi bắt đầu nghiên cứu, những con chuột cái NZB/W mười một tuần tuổi được sắp xếp ngẫu nhiên dựa trên trọng lượng cơ thể. Chuột được phân phối vào các nhóm điều trị sau đây: (1) Virut liên quan đến LacZ adeno (AAV + 10 mg/kg đối chứng isotyp IgG4 PAA ở người (PAA là các đột biến S228P, F234A, và L235A), (2) IFN α AAV + 10 mg/kg đối chứng isotyp IgG4 PAA ở người, (3) IFN α AAV + 3

mg/kg kháng thể 22B3, (4) IFN α AAV + 10 mg/kg kháng thể 22B3, hoặc (5) IFN α AAV + 50 mg/kg xyclophosphamit. Vào ngày bắt đầu nghiên cứu (Ngày 0), chuột được sử dụng một lần với 10^{11} bản sao bộ gen (GC) của AAV biểu hiện gen LacZ (không bị bệnh) hoặc IFN α chuột (bị bệnh) bằng đường tĩnh mạch PBS. Trong nhóm 1-4, những con chuột được điều trị bằng đối chứng isotyp hoặc kháng thể 22B3 bằng đường tiêm dưới da PBS mỗi tuần một lần bắt đầu vào ngày 0. Trong nhóm 5, chuột được điều trị bằng xyclophosphamit bằng đường tiêm trong phúc mạc PBS cứ sau 10 ngày. Các mẫu nước tiểu được thu thập từ những con chuột cứ sau 2 tuần cho đến khi kết thúc nghiên cứu 6 tuần sau khi bắt đầu điều trị. ELISA vi albumin chuột Kamiya Biomedical™ được sử dụng để định lượng nồng độ albumin trong nước tiểu. Creatinin nước tiểu được đo bằng cách sử dụng xét nghiệm creatinin bằng enzym (Roche Diagnostics). Albumin niệu, một dấu ấn sinh học của chức năng thận, được xác định là lớn hơn 300 μ g albumin trên mỗi mg creatinin được phát hiện trong nước tiểu.

Theo các quy trình về cơ bản như được mô tả ở trên, vào tuần thứ 4, tỷ lệ mắc bệnh albumin niệu ở nhóm bị bệnh được điều trị bằng isotyp (IFN α AAV + hIgG4 PAA) đạt 100% và duy trì ở mức cao cho đến khi kết thúc nghiên cứu, trong khi chuột được điều trị bằng LacZ AAV (không bị bệnh) không cho thấy bất kỳ tỷ lệ mắc bệnh albumin niệu. Xyclophosphamit, có thể gây độc thận cấp, gây ra sự gia tăng tạm thời albumin niệu ở những con chuột bị bệnh, nhưng tỷ lệ mắc bệnh albumin niệu trong nhóm xyclophosphamit đã giảm xuống không khi kết thúc nghiên cứu. Kháng thể 22B3 ở mức 3 mg/kg và 10 mg/kg có thể làm giảm tỷ lệ mắc bệnh albumin niệu xuống còn 50% và 20%, tương ứng, vào ngày 28, và 60% và 70%, tương ứng, vào ngày 42. Những kết quả này chỉ ra rằng kháng thể 22B3 có thể bảo vệ chức năng thận trong mô hình.

Đồ thị Kaplan-Meier (dữ liệu không được hiển thị) về tỷ lệ phần trăm sống sót trong nghiên cứu cho thấy rằng sự suy thận ở nhóm bệnh được điều trị bằng isotyp dẫn đến tử vong bắt đầu từ ngày 28. Đến cuối nghiên cứu, tỷ lệ sống sót trong nhóm bị bệnh được điều trị bằng isotyp là 60%. Các nhóm không bị bệnh và được điều trị bằng xyclophosphamit có tỷ lệ sống sót là 100%. Những con chuột được điều trị bằng 10 mg/kg kháng thể 22B3 cũng cho thấy tỷ lệ sống 100% khi kết thúc nghiên cứu, trong khi những con chuột được điều trị với 3 mg/kg cho thấy tỷ lệ sống 80%. Những kết

quả này chỉ ra rằng kháng thể 22B3 có thể phòng ngừa sự tử vong liên quan đến bệnh trong mô hình.

Mô hình bệnh vẩy nến do imiquimod gây ra

Khả năng của kháng thể theo sáng chế hạn chế mức độ nghiêm trọng của bệnh viêm da giống bệnh vẩy nến có được khi sử dụng chất chủ vận TLR7/8 imiquimod (IMQ) được thử nghiệm. Chuột cái B6.SJL-*Ptprca*^a *Peprc*^b/BoyJ bảy tuần tuổi (số danh pháp JAX: 002014), hoặc chuột HVEM^{-/-} (được mô tả trong Wang et al, J. Clin. Invest., 115:3, 711-717, March 2005) được tiêm trong phúc mạc bằng 3 mg/kg hoặc 1 mg/kg kháng thể 22B3 hoặc kháng thể 25F7, tương ứng, vào ngày 0, và lưng của chuột được cạo. Các con vật được tiêm đối chứng isotyp hIgG4 làm mẫu đối chứng. Vào ngày 1-3, chuột được gây mê bằng isofluran dạng hít (VetOne), và sau đó kem IMQ 5% (50mg, Fougera) được bôi lên vùng da đã được cạo. Vào ngày thứ 4, vùng da được điều trị được cắt bỏ và phân tích mức độ nghiêm trọng của bệnh và biểu hiện gen liên quan đến viêm.

Theo các quy trình về cơ bản như được mô tả ở trên, phân tích mô học đã chứng minh sự dày lên của lớp biểu bì với sự hóa sừng giả và tăng sừng hóa trong các nhóm được điều trị bằng đối chứng isotyp hIgG4 hoặc 1mg/kg kháng thể 22B3. Chuột được điều trị bằng 3mg/kg kháng thể 22B3 hoặc 3mg/kg kháng thể 25F7 cho thấy giảm đáng kể độ dày biểu bì, với một số vùng có vẻ bình thường về mặt mô học. Sự biểu hiện gen ở da được phân tích bởi qPCR bằng cách sử dụng iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Chuột được điều trị bằng 3mg/kg kháng thể 22B3 cho thấy giảm đáng kể sự biểu hiện của IFN typ I (IFN α , IFN β) và IFN γ , cũng như các gen đáp ứng IFN (Isg15, Mx1, Mx2, Oas2). Phân tích các xytokin liên quan đến việc thiết lập viêm da do IMQ gây ra cũng cho thấy sự giảm đáng kể biểu hiện IL-22 và IL-23 trong nhóm điều trị bằng 3mg/kg kháng thể 22B3. Những dữ liệu này chứng minh rằng các kháng thể chủ vận BTLA 22B3 và 25F7 có thể làm giảm độ dày biểu bì ở mô hình chuột bị bệnh viêm da giống bệnh vẩy nến.

Xác định epitop

Các epitop chức năng của các kháng thể chủ vận BTLA theo sáng chế được xác định bằng ELISA, và các epitop cấu trúc được xác định bằng tinh thể học tia X.

Các phương pháp

ELISA: Epitop chức năng

Tập hợp các đột biến bề mặt sau đây của BTLA đã được đưa riêng lẻ vào protein BTLA ở người được dung hợp với Fc (người): D35R, Q37R, Y39E, R42D, Q43A, E45R, S47H, L49R, D52R, E55R, E57R, D84R, N65R, H68A, V80R, K81E, E83R, S88H, K90H, E91H, I95R, E103H, L106R, N108R, R114V, S121Y, N122R, E125H, H127E, T130R, Y132R, và T134H.

Sự gắn kết của 22B3 và 23C8 được xác định bằng cách sử dụng ELISA trong đó kháng thể cần được lập bản đồ epitop được bắt giữ bởi kháng thể kháng thể bất động và sau khi rửa, mỗi đột biến BTLA được ủ ở dạng dây pha loãng theo nồng độ gấp 4 lần 4 điểm với kháng thể bắt giữ và được phát hiện bằng thuốc thử kháng Fc người liên kết enzym. Tín hiệu thu được được so sánh giữa các kháng thể và với các kháng thể đối chứng. Các epitop chức năng thường tự chỉ ra bằng cách giảm đáng kể tín hiệu cho một hoặc hai đột biến. Đối với kháng thể 25F7, ELISA kẹp được thực hiện, trong đó 22B3 được làm giống của người được làm bất động, các đột biến BTLA được bắt giữ, và được gắn kết bởi 25F7 thô. Điều này tạo ra tín hiệu mạnh mẽ hơn nhiều và epitop 25F7 có thể được xác định sau khi loại bỏ epitop 22B3.

Tinh thể học tia X: Epitop cấu trúc

Để xác định các giao diện tương tác và do đó, epitop vật lý trên BTLA của các kháng thể khác nhau, BTLA của người được đồng kết tinh với phần Fab của kháng thể theo sáng chế và cấu trúc tinh thể được xác định. Từ cấu trúc tinh thể thu được, các gốc BTLA nằm trong 4,5 Å của bất kỳ nguyên tử kháng thể nào được tính là một phần của epitop (sử dụng phần mềm trực quan hóa Pymol). 4,5 ăngstrom được xác định từ tâm nguyên tử đến tâm nguyên tử. Gốc bất kỳ với ít nhất một nguyên tử ở gần 4,5 ăngstrom với nguyên tử bất kỳ trong kháng thể là một phần của epitop.

Hai cấu trúc 22B3 được xác định trong phức hợp với BTLA của người. Đầu tiên sử dụng Fab kháng thể 22B3 của thỏ bố mẹ, được gắn thẻ histidin và tinh chế bằng đột biến S47H (đột biến làm ổn định) của BTLA người được biểu hiện dưới dạng thể dung hợp Fc và sau đó được tách ra và tinh chế. Hai protein này được trộn với tỷ lệ xấp xỉ đẳng mol và được sàng lọc theo các mô hình sàng lọc có sẵn trên thị trường để kết tinh. Các tinh thể thu được và dữ liệu nhiễu xạ được thu thập ở nguồn photon cao.

Dữ liệu này được giảm và giải quyết bằng cách thay thế phân tử và tinh chỉnh để tạo thành cấu trúc có độ phân giải cao của phức hợp giữa 22B3 và BTLA. Phức hợp thứ hai là giữa phiên bản thuần thực ái lực (với các đột biến HC I56Q/T57H/G98A và LC S95H) của 22B3 được làm giống như của người (phần Fab) và BTLA người. Chúng được cùng biểu hiện, tinh chế dưới dạng phức hợp và được sàng lọc tương tự. Cấu trúc và epitop thu được là tương tự với cấu trúc ban đầu.

Cấu trúc của 23C8 trong phức hợp thu được theo cách tương tự như phức hợp 22B3 đầu tiên, cụ thể là bằng cách tinh chế Fab thô bổ mẹ được gắn thẻ His, trộn lẫn với BTLA người S47H monome và kết tinh.

Cấu trúc của 25F7 trong phức hợp với BTLA người thu được theo phức hợp 22B3 thứ hai, cụ thể là bằng đồng biểu hiện, đồng tinh chế và kết tinh. Đột biến kép của 25F7 được làm giống như của người với khả năng gắn kết với BTLA người được cải thiện được sử dụng (25F7 được làm giống như của người được sử dụng để xác định epitop có các đột biến ở HC S30W/LC E27R).

Kết quả

Kháng thể 22B3: Trong số tập hợp các đột biến bề mặt BTLA, R42D và H127E có tác động tiêu cực đáng kể đến sự gắn kết với kháng thể 22B3 của thỏ (bao gồm các CDR giống như 22B3 nhưng có khung của thỏ). Các epitop chức năng bao gồm Arg ở vị trí 42 và His ở vị trí 127 của BTLA người (SEQ ID NO:31). Các gốc BTLA nằm trong 4,5 ăngstrom của 22B3 trong phức hợp cấu trúc tinh thể giữa BTLA của người và 22B3 Fab của thỏ, và là epitop cấu trúc, là các gốc sau đây của SEQ ID NO: 31: Asp ở vị trí 35, Gln ở vị trí 37 đến Arg ở vị trí 42, Leu ở vị trí 74, Gly ở vị trí 76 đến Cys ở vị trí 79, Arg ở vị trí 114, Phe ở vị trí 119, Gln ở vị trí 120, và Asn ở vị trí 122 đến Ser ở vị trí 128. Các gốc BTLA nằm trong 4,5 ăngstrom của 22B3 trong phức hợp cấu trúc tinh thể giữa BTLA người và Fab biến thể 22B3 người (HC I56Q/T57H/G98A LC S95H) là Asp ở vị trí 35, Gln ở vị trí 37 đến Arg ở vị trí 42, Leu ở vị trí 74, Gly ở vị trí 76 đến Cys ở vị trí 79, Arg ở vị trí 114, Phe ở vị trí 119, Gln ở vị trí 120, Asn ở vị trí 122, và Ile ở vị trí 124 đến Ser ở vị trí 128 của SEQ ID NO:31.

Trong một nghiên cứu tương tự, epitop cấu trúc cho BTLA gắn kết HVEM là các axit amin sau của BTLA: Gln ở vị trí 37 đến Arg ở vị trí 42, Leu ở vị trí 74, Gly ở vị trí 76, Thr ở vị trí 77, Ser ở vị trí 112, Arg ở vị trí 114, Asn ở vị trí 118, Ser ở vị trí 121 đến Ser ở vị trí 128, và Thr ở vị trí 130. Sự tương đồng về cấu trúc giữa kháng thể

22B3 và HVEM được đánh giá bằng cách đặt chồng cấu trúc tinh thể kháng thể:BTLA lên cấu trúc tinh thể HVEM:BTLA sắp thẳng hàng các phân tử BTLA. Độ lệch căn trung bình bình phương trực chính trong vùng HVEM chứa các gốc axit amin 69-72 và vùng kháng thể tương ứng được xác định là 1,4 ăngstrom.

Kháng thể 23C8: D52R phong bế sự gắn kết của 23C8 thỏ (bao gồm cùng HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1 và LCDR2 là 23C8, có LCDR3 của QCTYGGVVGSTSDNP, và có khung của thỏ) với BTLA người trong ELISA. Epitop chức năng bao gồm Asp ở vị trí 52 của BTLA người (SEQ ID NO:31). Các gốc BTLA nằm trong 4,5 ăngstrom của 23C8 trong phức hợp cấu trúc tinh thể giữa BTLA người (S47H) và 23C8 Fab thỏ, và là epitop cấu trúc, là His ở vị trí 46 đến Glu ở vị trí 55, Glu ở vị trí 103, Pro ở vị trí 104, Leu ở vị trí 106, Pro ở vị trí 107, Thr ở vị trí 134 đến Ala ở vị trí 139 của SEQ ID NO:31. Kháng thể 23C8 không bắt chước sự gắn kết của HVEM.

Kháng thể 25F7: Trong số tập hợp các đột biến bề mặt BTLA, H68A và K61E có tác động tiêu cực đáng kể đến sự gắn kết với kháng thể 25F7 của thỏ (bao gồm các CDR giống như 25F7 nhưng có khung của thỏ). Các epitop chức năng bao gồm His ở vị trí 68, và Lys ở vị trí 81, của BTLA người (SEQ ID NO:31). Các gốc BTLA nằm trong 4,5 ăngstrom của 25F7 trong phức hợp cấu trúc tinh thể giữa BTLA người và biến thể 25F7 Fab được làm giống như của người (HC S30W, LC E27R), và là epitop cấu trúc, là Tyr ở vị trí 62, Ala ở vị trí 64 đến His ở vị trí 68, Arg ở vị trí 85 đến Glu ở vị trí 91, Phe ở vị trí 98, và Asn ở vị trí 118 của SEQ ID NO:31. Kháng thể 25F7 không bắt chước sự gắn kết của HVEM.

Trình tự**HC của kháng thể 22B3 (SEQ ID NO: 1)**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSLSYGVSWVRQAPGQGLEWMGAI
SYDGITYYASWAKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGDYDD
YVYVYALDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNV
D HKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

LC của kháng thể 22B3 (SEQ ID NO: 2)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCQASQSISTALAWYQQKPGQAPRLLIYAAS
TL ASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGYSSSNLDNVFGG
GTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNR GEC

HCVR của kháng thể 22B3 (SEQ ID NO: 3)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSLSYGVSWVRQAPGQGLEWMGAI
SYDGITYYASWAKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGDYDD
YVYVYALDIWGQGTLVTVSS

LCVR của kháng thể 22B3 (SEQ ID NO: 4)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCQASQSISTALAWYQQKPGQAPRLLIYAAS
TL ASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGYSSSNLDNVFGG
GTKVE IK

HC của kháng thể 23C8 (SEQ ID NO: 5)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDISKYNIQWVRQAPGKGLEWVGF
IN YGGSAYYASRAKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARGLS
NSDL WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNV
D HKPSNTKVD KR VESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVVSQED

DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLGLG

LC của kháng thể 23C8 (SEQ ID NO: 6)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTL
ASGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQSTYGGVVGSTSDDNPFGGG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

HCVR của kháng thể 23C8 (SEQ ID NO: 7)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDISKYNIQWVRQAPGKGLEWVGFIN
YGGSAYYASRAKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARGLSNSDL
WGQGTLLTVSS

LCVR của kháng thể 23C8 (SEQ ID NO: 8)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTL
ASGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQSTYGGVVGSTSDDNPFGGG
TKVEIK

HC của kháng thể 25F7 (SEQ ID NO: 9)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSLSSTYAMNWVRQAPGQGLEWMGII
SDDGTTYATWAKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDAGAG
GVQDYLTWLGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH
KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

LC của kháng thể 25F7 (SEQ ID NO: 10)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCQASENIYNFLAWYQQKPGQPPKLLIYSASTL
ASGVLPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQGSSNSNIDNPFGGGTVK
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG

NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGE

HCVR của kháng thể 25F7 (SEQ ID NO: 11)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSYSTYAMNWVRQAPGQGLEWMGII
SDDGTTYATWAKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDAGAG
GVQDYLTWLGQGLTVTVSS

LCVR của kháng thể 25F7 (SEQ ID NO: 12)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCQASENIYNFLAWYQQKPGQPPKLLIYSASTL
ASGVPRDFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQGSSNSNIDNPFGGGTKV
EIK

HCDR1 của kháng thể 22B3 (SEQ ID NO: 13)

GFSLSYGV

HCDR1 của kháng thể 23C8 (SEQ ID NO: 14)

GFDISKYNIQ

HCDR1 của kháng thể 25F7 (SEQ ID NO: 15)

GFSLSYSTYAMN

HCDR2 của kháng thể 22B3 (SEQ ID NO: 16)

AISYDGITYYASWAKS

HCDR2 của kháng thể 23C8 (SEQ ID NO: 17)

FINYGG SAYYASRAKG

HCDR2 của kháng thể 25F7 (SEQ ID NO: 18)

IISDDGTTYATWAKG

HCDR3 của kháng thể 22B3 (SEQ ID NO: 19)

GDYYDDYVYVYALDI

HCDR3 của kháng thể 23C8 (SEQ ID NO: 20)

GLSNSDL

HCDR3 của kháng thể 25F7 (SEQ ID NO: 21)

DAGAGGVQDYLT

LCDR1 của kháng thể 22B3 (SEQ ID NO: 22)

QASQSISTALA

LCDR1 của kháng thể 23C8 (SEQ ID NO: 23)

QASQSISSWLS

LCDR1 của kháng thể 25F7 (SEQ ID NO: 24)

QASENIYNFLA

LCDR2 của kháng thể 22B3 (SEQ ID NO: 25)

AATLAS

LCDR2 của kháng thể 23C8 (SEQ ID NO: 26)

RASTLAS

LCDR2 của kháng thể 25F7 (SEQ ID NO: 27)

SASTLAS

LCDR3 của kháng thể 22B3 (SEQ ID NO: 28)

QQGYSSSNLDNV

LCDR3 của kháng thể 23C8 (SEQ ID NO: 29)

QSTYGGVVGSTSDNP

LCDR3 của kháng thể 25F7 (SEQ ID NO: 30)

QQGSSNSNIDNP

BTLA người (SEQ ID NO: 31)

MKTLPAMLGTGKLFWVFFLIPYLDIWNHKGESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPF
ELECPVKYCANRPHVTWCKLNGTTCVKLEDRTSWKEEKNISFFILHFEPVLP
NDNGSYRCSANFQSNLIESHSTTLTYVTDVKSASERPSKDEMASRPWLLYRLLP
LGGLPLLITTCFLFCCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQ
NSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSHVIGPN
SRLARNVKEAPTEYASICVRS

BTLA chuột Balb/c (SEQ ID NO: 32)

MKTVPAMLGTPRLFREFFILHLGLWSILCEKATKRNDDECEVQLNIKRNSKHS
AWTGELFKIECPVKYCVHRPNVTWCKHNGTIWVPLEVGPQLYTSWEENRSVP
VFVLHFKPIHLSDNGSYSCSTNFNSQVINSHSVTIHVRERTQNSSEHPLITVSDIP
DATNASGPSTMEERPGRTWLLYTLLPLGALLLLACVCLLCFLKRIQGKEKKP
SDLAGRDTNLVDIPASSRTNHQALPSGTGIYDNDPWSSMQDESELTISLQSERN
NQGIVYASLNHCVIGRNPRQENNMQEAPTEYASICVRS

BTLA chuột C57BL/6 (SEQ ID NO: 33)

MKTVPAMLGTPRLFREFFILHLGLWSILCEKATKRNDDECPVQLTITRNSKQSA
RTGELFKIQCPVKYCVHRPNVTWCKHNGTICVPLEVSPQLYTSWEENQSVPVF

VLHFKPIHLSDNGSYSCSTNFNSQVINSHSVTIHVTERTQNSSEHPLITVSDIPDA
 TNASGPSTMEERPGRTWLLYTLLPLGALLLLACVCLLCFLKRIQ GK
 EKKPSDLAGRDTNLVDIPASSRTNHQALPSGTGIYDNDPWSSMQDESELTISLQ
 SERNNQGIVYASLNHCVIGRNPRQENNMQEAPTEYASICVRS

BTLA khỉ cynomolgus (SEQ ID NO: 34)

MKTLPAMLGSGRLFWVFLIPYLDIWNHKGESCDVQLYIKRQSYHSIFAGDP
 FKLECPVKYCAHRPQVTWCKLNGTTCVKLEGRHTSWKQEKNLSSFILHFEPV
 LPSDNGSYRCSANFLSAIIESHSTTLVYTDVKSASERPSKDEMASRPWLLYSL
 PLGGLPLLITTCFLFCFLRRHQGKQNELSDTTGREITLVDVPFKSEQTEASTRQ
 NSQVLLSETGIYDNEPDFCFRMQEGSEVYSNPCLEENKPGIYASLNHSIIGLNS
 RQARNVKEAPTEYASICVRS

**ADN làm ví dụ để biểu hiện chuỗi nặng SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO: 35) của
 kháng thể 22B3**

cagggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgagggttctctgcaaggcatctggattc
 tcctcagtagctatggagtgagctgggtgacagggccctggacaagggttgagtgatgggagccattagttatgat
 ggtattacatactacgcgagctgggcgaaaagcagagtcaccatgaccaggacacgtccacgagcacagctctacatgga
 gctgagcagcctgagatctgaggacacggcctgtattactgtgcgagaggggactactacgatgattatgtttatgtttatgc
 tttagacatctggggccagggcaccctggtcaccgtctctcagcttctaccaaggggcccatcggtcttcccgtagcgcct
 gctccaggagcacctccgagagcacagccgctgggtgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtagcgggtgc
 gtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcag
 cgtggtgaccgtgcccctccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaag
 gtggacaagagagttgagtccaaatatgtccccatgccaccctgccagcacctgaggccgcgggggacccatcagt
 ctctctgtccccccaaaaccaaggacactctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagc
 caggaagaccccagggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaaagacaagccgcgggagg
 agcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggtgaacggcaaggagtacaag
 tgcaagggttccaacaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagagccac
 aggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgctggtcaaggcttctac
 cccagcgacatcgccgtggagtgaggaaagcaatgggcagccggagaaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggac
 tccgacggctccttctctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccg
 tgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctctgggt

ADN làm ví dụ để biểu hiện chuỗi nhẹ SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO: 36) của kháng thể 22B3

Gaaattgtgtgacgcagtcctccaggcacccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctctgccaggccagtcagagcattagtaactgcattagcctgtaccagcagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgctgcattccactctggcattctggcatcccagacagggtcagtggcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagactggagcctgaagatttgcagtgattactgtcaacagggttatagtagtagtaattcttgataatgtttcggcggaggggaccaaggtggagatcaaacggaccgtggctgcaccatctgtcttcattctccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgctgcctgctgaataactctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcaggggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgct

ADN làm ví dụ để biểu hiện chuỗi nặng SEQ ID NO:5 (SEQ ID NO: 37) của kháng thể 23C8

gagggtgcagctggtggagctctgggggaggcttggtccagcctggagggtccctgagactctctgtgcagcctctggattcgacatcagtaagtacaacatccaatgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtggttggttcattaattatggtgtagcgcatactacgcgagccgggagaaaggcagattcaccatctcaagagatgattcaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgaggacacggccgtgtattactgtgctagaggactaagtaatagcgacctctggggccaggggccctgggtcacgtctctcagctttctaccaagggcccatcggtcttcccgttagcgccctgtccaggagcacctccgagagcacagccgccctgggtgctgtaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggtgcacacctcccgggtgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcccctcagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtccaaatatggtcccccattgccaccctgccagcacctgaggccgccgggggaccatcagttctctgttcccccaaaaacccaaaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgcgtggtgggtggacgtgagccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtagctggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactgggtgaacgggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaggcctcccgtctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgcccccatccaggaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgggtcaaaaggcttctacccagcgacatcgccgtggagtggaagcaatgggcagccggagaaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctctacacagggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggaggggaatgtttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacactacacacagaagagcctctccctgtctctgggt

ADN làm ví dụ để biểu hiện chuỗi nhẹ SEQ ID NO:6 (SEQ ID NO: 38) của kháng thể 23C8

gacatccagatgacccagtcctccatcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcaactgccaggccagtcaga
gcattagtagttggttatcctggtatcagcagaaaccagggaagcccctaagctcctgatctacagggcatccactctggca
tctggggctcccatcaaggttcagtggaagtggatctgggacagattttactttcaccatcagcagcctgcagcctgaagatatt
gcaacatattactgtcaatccacttatgggtggtgtgtggcagtagtagtgataatcctttcggcggagggaaccaagggtg
gagatcaaacggaccgtggctgcaccatctgtttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtt
gtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccc
aggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagact
acgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcggccgtcacaagagcttcaacagggg
agagtgc

ADN làm ví dụ để biểu hiện chuỗi nặng SEQ ID NO:9 (SEQ ID NO: 39) của kháng thể 25F7

cagggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtggaaggttctcgaaggcatctggattc
tcctcagtagctatgcaatgaactgggtgcacagggccctggacaagggcttgagtggtggaatcattagtgatgatg
gtaccacatactacgcgacctgggcgaaaggcagagtcaccatgaccaggacacgtccacgagcacagctcatatgga
gctgagcagcctgagatctgaggacacggcctgtattactgtgcgagagatgctggtgctggtgtccaagactactta
acctgtggggccagggcacctggtcaccgtctctcagcttctaccaaggggcccatcggtcttcccgttagcgcctgct
ccaggagcacctccgagagcacagccgccctgggtgcctggtcaaggactacttcccgaaccgggtgacgggtgctgtg
gaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgt
ggtgacctgacctccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaagggtg
gacaagagagttgagtcacaaatggtccccatgccaccctgccagcacctgaggccggcgggggaccatcagttt
cctgttcccccaaaacccaaggacactctcatgatctccggaccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagcca
ggaagaccccaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccggggagga
gcagttcaacagcacgtacctgtgtggtcagcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagt
gcaaggtctccaacaaaggcctcccgtcctccatcagaaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagagccaca
ggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggctcagcctgacctggtcacaaggcttctacc
ccagcgacatcgccgtggagtgggaaagcaatgggcagccgggagaaactacaagaccacgcctcccgtgctggact
ccgacggctccttctctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggaggggaatgttctctcatgctccgt
gatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctctgggt

ADN làm ví dụ để biểu hiện chuỗi nhẹ SEQ ID NO:10 (SEQ ID NO: 40) của kháng thể 25F7

Gacatcgtgatgaccagctctccagactccctggctgtgtctctgggcgagagggccaccatcaactgccaggccagtga
gaatatttacaacttttggcctggtaccagcagaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttactctgcatccactctggca
tctgggggtccctgaccgattcagtgggcagcgggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatg
tggcagtttattactgtcaacaggggtctagtaatagtaaatattgataatccttcggcggagggaaccaaggtggagatcaaac
ggaccgtggctgcaccatctgtcttcattcttccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgct
gaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgt
cacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacgagaaaca
caaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgc

HVEM người (SEQ ID NO: 41)

MEPPGDWGPPPWRSTPKTDVLRVLVLYLTFLGAPCYAPALPSCKEDEYPVGSEC
CPKCSPGYRVKEACGELTGTVCEPCPPGTYIAHLNGLSKCLQCQMCDPAMGL
RASRNCSTENAVCGCSPGHFCIVQDGDHCAACRAYATSSPGQRVQKGGTES
QDTLCQNCPPGTFFSPNGTLEECQHQTCSWLVTKAGAGTSSSHWVWWFLSGS
LVIVIVCSTVGLIICVKRRKPRGDVVKVIVSVQRKRQEAGEATVIEALQAPPD
VTTVAVEETIPSFTGRSPNH

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể gắn kết chất làm giảm lympho bào B và T (B and T Lymphocyte Attenuator-BTLA) bao gồm HCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 13, HCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 16, HCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 19, LCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 22, LCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 25, và LCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 28.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 4.
3. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng (HC) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và chuỗi nhẹ (LC) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2.
4. Kháng thể gắn kết BTLA bao gồm HCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 14, HCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 17, HCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 20, LCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 23, LCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 26, và LCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 29.
5. Kháng thể theo điểm 4, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 7, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 8.
6. Kháng thể theo điểm 4, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng (HC) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 5 và chuỗi nhẹ (LC) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 6.
7. Kháng thể gắn kết BTLA bao gồm HCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 15, HCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 18, HCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 21, LCDR1 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 24, LCDR2 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 27, và LCDR3 có trình tự axit amin SEQ ID NO: 30.

8. Kháng thể theo điểm 7, trong đó kháng thể này bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 11, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 12.
9. Kháng thể theo điểm 7, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng (HC) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 9, và chuỗi nhẹ (LC) có trình tự axit amin SEQ ID NO: 10.
10. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược được dụng.
11. Phân tử ADN bao gồm polynuceotit mã hóa trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6, 9 hoặc 10.
12. Tế bào động vật có vú được phân lập bao gồm phân tử ADN theo điểm 11.
13. Quy trình sản xuất kháng thể bao gồm các bước: a) nuôi cấy tế bào động vật có vú được phân lập theo điểm 12 trong các điều kiện sao cho kháng thể này được biểu hiện, và b) thu hồi kháng thể được biểu hiện.
14. Kháng thể có thể thu được từ quy trình theo điểm 13.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eli Lilly and Company

<120> Kháng thể gắn kết BTLA, dược phẩm chứa kháng thể này, phân tử ADN, tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN và quy trình sản xuất kháng thể

<130> X21261

<140> 62/508510

<141> 19-05-2017

<160> 41

<170> Patent phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 1

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

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

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

Gly Ala Ile Ser Tyr Asp Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Arg Gly Asp Tyr Tyr Asp Asp Tyr Val Tyr Val Tyr Ala Leu Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 210 215 220

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly

<210> 2
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Ala
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95

Leu Asp Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

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

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

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

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 3
<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 3

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

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

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

Gly Ala Ile Ser Tyr Asp Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Arg Gly Asp Tyr Tyr Asp Asp Tyr Val Tyr Val Tyr Ala Leu Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Ala
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Ser Ser Asn
85 90 95

Leu Asp Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110
 <210> 5
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 5
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Asn Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Phe Ile Asn Tyr Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Arg Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Leu Ser Asn Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 290 295 300

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

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn

8

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

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

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

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

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

<210> 7
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 7

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

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

Asn Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Phe Ile Asn Tyr Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Arg Ala Lys
 50 55 60

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

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

Arg Gly Leu Ser Asn Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 114
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Thr Tyr Gly Gly Val Val
85 90 95

Gly Ser Thr Ser Asp Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
100 105 110

Ile Lys

<210> 9
<211> 447
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 9

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

```

225                230                235                240

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
      260                265                270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
      275                280                285

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

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

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
      325                330                335

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

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
      355                360                365

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

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

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

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

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

<210> 10
<211> 217

```

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 10

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Asn Ser Asn
 85 90 95

Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110

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

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 130 135 140

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

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

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

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val

195

200

205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 11
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 11

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

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

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

Gly Ile Ile Ser Asp Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys
 50 55 60

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

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

Arg Asp Ala Gly Ala Gly Gly Val Gln Asp Tyr Leu Thr Leu Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 12
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Asn Ser Asn
 85 90 95

Ile Asp Asn Pro Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 13

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Gly Val Ser
 1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 14

Gly Phe Asp Ile Ser Lys Tyr Asn Ile Gln
 1 5 10

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 15

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Ala Met Asn
 1 5 10

<210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 16

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

<210> 17
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 17

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

<210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 18

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

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 19

Gly Asp Tyr Tyr Asp Asp Tyr Val Tyr Val Tyr Ala Leu Asp Ile
 1 5 10 15

<210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 20

Gly Leu Ser Asn Ser Asp Leu
 1 5

<210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 21

Asp Ala Gly Ala Gly Gly Val Gln Asp Tyr Leu Thr Leu
 1 5 10

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 22

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 23

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 23

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ser
 1 5 10

<210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 24

Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Asn Phe Leu Ala
 1 5 10

<210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 25

Ala Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

<210> 26
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 26

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

<210> 27
 <211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 27

Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1

5

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 28

Gln Gln Gly Tyr Ser Ser Ser Asn Leu Asp Asn Val

1

5

10

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 29

Gln Ser Thr Tyr Gly Gly Val Val Gly Ser Thr Ser Asp Asp Asn Pro

1

5

10

15

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 30

Gln Gln Gly Ser Ser Asn Ser Asn Ile Asp Asn Pro

1

5

10

<210> 31

<211> 289

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

Phe Phe Leu Ile Pro Tyr Leu Asp Ile Trp Asn Ile His Gly Lys Glu
20 25 30

Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser Ile
35 40 45

Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr Cys Ala
50 55 60

Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr Cys Val
65 70 75 80

Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp Lys Glu Glu Lys Asn Ile Ser
85 90 95

Phe Phe Ile Leu His Phe Glu Pro Val Leu Pro Asn Asp Asn Gly Ser
100 105 110

Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser His Ser
115 120 125

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

Lys Asp Glu Met Ala Ser Arg Pro Trp Leu Leu Tyr Arg Leu Leu Pro
145 150 155 160

Leu Gly Gly Leu Pro Leu Leu Ile Thr Thr Cys Phe Cys Leu Phe Cys
165 170 175

Cys Leu Arg Arg His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr Ala
180 185 190

Gly Arg Glu Ile Asn Leu Val Asp Ala His Leu Lys Ser Glu Gln Thr
195 200 205

Glu Ala Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu Thr Gly

210 215 220
 Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly Ser
 225 230 235 240

 Glu Val Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile Val
 245 250 255

 Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Pro Asn Ser Arg Leu Ala
 260 265 270

 Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val Arg
 275 280 285

 Ser

 <210> 32
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 32

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

 Phe Phe Ile Leu His Leu Gly Leu Trp Ser Ile Leu Cys Glu Lys Ala
 20 25 30

 Thr Lys Arg Asn Asp Glu Glu Cys Glu Val Gln Leu Asn Ile Lys Arg
 35 40 45

 Asn Ser Lys His Ser Ala Trp Thr Gly Glu Leu Phe Lys Ile Glu Cys
 50 55 60

 Pro Val Lys Tyr Cys Val His Arg Pro Asn Val Thr Trp Cys Lys His
 65 70 75 80

 Asn Gly Thr Ile Trp Val Pro Leu Glu Val Gly Pro Gln Leu Tyr Thr
 85 90 95

 Ser Trp Glu Glu Asn Arg Ser Val Pro Val Phe Val Leu His Phe Lys
 100 105 110

Pro Ile His Leu Ser Asp Asn Gly Ser Tyr Ser Cys Ser Thr Asn Phe
 115 120 125

Asn Ser Gln Val Ile Asn Ser His Ser Val Thr Ile His Val Arg Glu
 130 135 140

Arg Thr Gln Asn Ser Ser Glu His Pro Leu Ile Thr Val Ser Asp Ile
 145 150 155 160

Pro Asp Ala Thr Asn Ala Ser Gly Pro Ser Thr Met Glu Glu Arg Pro
 165 170 175

Gly Arg Thr Trp Leu Leu Tyr Thr Leu Leu Pro Leu Gly Ala Leu Leu
 180 185 190

Leu Leu Leu Ala Cys Val Cys Leu Leu Cys Phe Leu Lys Arg Ile Gln
 195 200 205

Gly Lys Glu Lys Lys Pro Ser Asp Leu Ala Gly Arg Asp Thr Asn Leu
 210 215 220

Val Asp Ile Pro Ala Ser Ser Arg Thr Asn His Gln Ala Leu Pro Ser
 225 230 235 240

Gly Thr Gly Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Trp Ser Ser Met Gln Asp Glu
 245 250 255

Ser Glu Leu Thr Ile Ser Leu Gln Ser Glu Arg Asn Asn Gln Gly Ile
 260 265 270

Val Tyr Ala Ser Leu Asn His Cys Val Ile Gly Arg Asn Pro Arg Gln
 275 280 285

Glu Asn Asn Met Gln Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val
 290 295 300

Arg Ser
 305

<210> 33
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 33

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

Phe Phe Ile Leu His Leu Gly Leu Trp Ser Ile Leu Cys Glu Lys Ala
 20 25 30

Thr Lys Arg Asn Asp Glu Glu Cys Pro Val Gln Leu Thr Ile Thr Arg
 35 40 45

Asn Ser Lys Gln Ser Ala Arg Thr Gly Glu Leu Phe Lys Ile Gln Cys
 50 55 60

Pro Val Lys Tyr Cys Val His Arg Pro Asn Val Thr Trp Cys Lys His
 65 70 75 80

Asn Gly Thr Ile Cys Val Pro Leu Glu Val Ser Pro Gln Leu Tyr Thr
 85 90 95

Ser Trp Glu Glu Asn Gln Ser Val Pro Val Phe Val Leu His Phe Lys
 100 105 110

Pro Ile His Leu Ser Asp Asn Gly Ser Tyr Ser Cys Ser Thr Asn Phe
 115 120 125

Asn Ser Gln Val Ile Asn Ser His Ser Val Thr Ile His Val Thr Glu
 130 135 140

Arg Thr Gln Asn Ser Ser Glu His Pro Leu Ile Thr Val Ser Asp Ile
 145 150 155 160

Pro Asp Ala Thr Asn Ala Ser Gly Pro Ser Thr Met Glu Glu Arg Pro
 165 170 175

Gly Arg Thr Trp Leu Leu Tyr Thr Leu Leu Pro Leu Gly Ala Leu Leu
 180 185 190

Leu Leu Leu Ala Cys Val Cys Leu Leu Cys Phe Leu Lys Arg Ile Gln
 195 200 205

Gly Lys Glu Lys Lys Pro Ser Asp Leu Ala Gly Arg Asp Thr Asn Leu
 210 215 220

Val Asp Ile Pro Ala Ser Ser Arg Thr Asn His Gln Ala Leu Pro Ser
225 230 235 240

Gly Thr Gly Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Trp Ser Ser Met Gln Asp Glu
245 250 255

Ser Glu Leu Thr Ile Ser Leu Gln Ser Glu Arg Asn Asn Gln Gly Ile
260 265 270

Val Tyr Ala Ser Leu Asn His Cys Val Ile Gly Arg Asn Pro Arg Gln
275 280 285

Glu Asn Asn Met Gln Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val
290 295 300

Arg Ser
305

<210> 34
<211> 289
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 34

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

Val Phe Leu Ile Pro Tyr Leu Asp Ile Trp Asn Ile His Gly Lys Glu
20 25 30

Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Tyr His Ser Ile
35 40 45

Phe Ala Gly Asp Pro Phe Lys Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr Cys Ala
50 55 60

His Arg Pro Gln Val Thr Trp Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr Cys Val
65 70 75 80

Lys Leu Glu Gly Arg His Thr Ser Trp Lys Gln Glu Lys Asn Leu Ser
85 90 95

Phe Phe Ile Leu His Phe Glu Pro Val Leu Pro Ser Asp Asn Gly Ser
 100 105 110

Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Leu Ser Ala Ile Ile Glu Ser His Ser
 115 120 125

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

Lys Asp Glu Met Ala Ser Arg Pro Trp Leu Leu Tyr Ser Leu Leu Pro
 145 150 155 160

Leu Gly Gly Leu Pro Leu Leu Ile Thr Thr Cys Phe Cys Leu Phe Cys
 165 170 175

Phe Leu Arg Arg His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr Thr
 180 185 190

Gly Arg Glu Ile Thr Leu Val Asp Val Pro Phe Lys Ser Glu Gln Thr
 195 200 205

Glu Ala Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu Thr Gly
 210 215 220

Ile Tyr Asp Asn Glu Pro Asp Phe Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly Ser
 225 230 235 240

Glu Val Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile Ile
 245 250 255

Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Ile Ile Gly Leu Asn Ser Arg Gln Ala
 260 265 270

Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val Arg
 275 280 285

Ser

<210> 35

<211> 1347

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 35

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt      60
tcttgcaagg catctggatt ctccctcagt agctatggag tgagctgggt gogacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagcc attagttatg atggtattac atactacgcg      180
agctgggcga aaagcagagt caccatgacc agggacacgt ccacgagcac agtctacatg      240
gagctgagca gcttgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgagag aggggactac      300
tacgatgatt atgtttatgt ttatgcttta gacatctggg gccagggcac cctggtcacc      360
gtctcctcag cttctaccaa gggcccatcg gtcttccgcg tagcgccctg ctccaggagc      420
acctccgaga gcacagccgc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccggtg      480
acgggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta      540
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc      600
acgaagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga      660
gttgagtcca aatatgggtc cccatgccc cctgcccag cacctgaggc cgccggggga      720
ccatcagtct tctgttccc cccaaaacc aaggacactc tcatgatctc ccggaccct      780
gaggtcacgt gcgtgggtgt ggaactgagc caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg      840
tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac      900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaacggcaag      960
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagc ctcccgtcct ccatcgagaa aaccatctcc      1020
aaagccaaag ggcagcccg agagccacag gtgtacaccc tgccccatc ccaggaggag      1080
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc      1140
gccgtggagt gggaaagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gctcccggtg      1200
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtgg      1260
caggagggga atgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccaactacaca      1320
cagaagagcc tctccctgct tctgggt      1347

```

<210> 36

<211> 651

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 36
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgcc aggccagtca gagcattagt actgcattag cctggtacca gcagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgct gcatecactc tggcatctgg catcccagac 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag actggagcct 240
 gaagattttg cagtgtatta ctgtcaacag gggttatagta gtagtaatct tgataatggt 300
 ttccggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa cggaccgtgg ctgcaccatc tgtcttcato 360
 ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 420
 aactttatc ccagagagggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgcct ccaatcggt 480
 aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540
 accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600
 catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg c 651

<210> 37

<211> 1323

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 37
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cgacatcagt aagtacaaca tccaatgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggttggttc attaatatg gtggtagcgc atactacgcg 180
 agccggggcga aaggcagatt caccatctca agagatgatt caaagaactc actgtatctg 240
 caaatgaaca gcctgaaaac cgaggacacg gccgtgtatt actgtgctag aggactaagt 300
 aatagcgacc tctggggcca gggcaccctg gtcaccgtct cctcagcttc taccaagggc 360
 ccatcggtct tcccgctagc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agccgcctg 420
 ggctgccttg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg tgcgtggaa ctcaggcgcc 480
 ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540
 agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta 600
 gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agtccaaata tggccccca 660

tgcccaccct gccagcacc tgaggccgcc gggggaccat cagtcttcct gttcccccca 720
 aaaccaagg acactctcat gatctcccg accctgagg tcacgtgctt ggtggtggac 780
 gtgagccagg aagacccga ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat 840
 aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 900
 ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 960
 aaaggcctcc cgctctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gcccgcagag 1020
 ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1080
 acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga aagcaatggg 1140
 cagccggaga acaactacaa gaccacgctt cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc 1200
 ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc 1260
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg 1320
 ggt 1323

<210> 38
 <211> 663
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 38
 gacatccaga tgaccagtc tccatctctc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtoacc 60
 atcacttgcc aggccagtca gacattagt agttggttat cctggatatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctctt gatctacagg gcatccactc tggcatctgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat ttactttca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatattg caacatatta ctgtcaatcc acttatgggtg gtgttggttg cagtactagt 300
 gatgataatc ctttcggcgg agggaccaag gtggagatca aacggaccgt ggctgcacca 360
 tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttggtg 420
 tgctgtctga ataacttcta tccagagag gccaaagtac agtggaagggt ggataacgcc 480
 ctccaatcgg gtaactocca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac 540
 agcctcagca gcacctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc 600
 tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcaca agagcttcaa caggggagag 660
 tgc 663

<210> 39
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 39
 cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
 tcttgcaagg catctggatt ctccctcagt acctatgcaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatc attagtgatg atggtaaccac atactacgcg 180
 acctggggcga aaggcagagt caccatgacc agggacacgt ccacgagcac agtctacatg 240
 gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatgctggt 300
 gctggtggtg tccaagacta cttaaccttg tggggccagg gcacctggt caccgtctcc 360
 tcagcttcta ccaagggccc atcggtcttc ccgctagcgc cctgctccag gagcacctcc 420
 gagagcacag ccgcctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
 tegtggaaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag 600
 acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 660
 tccaaatatg gtcccccatg cccacctgc ccagcacctg aggcgcggg gggaccatca 720
 gtcttctgt tcccccaaa acccaaggac actctcatga tctccggac cctgaggtc 780
 acgtgcgtgg tgggtgacgt gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 840
 gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagcccggg aggagcagtt caacagcacg 900
 taccgtgtgg tcagcgtcct cacgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgcagg tctccaacaa aggcctcccg tctccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
 aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaaa gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
 tccgacggct ccttcttct ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag 1260
 gggaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag 1320
 agcctctccc tgtctctggg t 1341

<210> 40
 <211> 651
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 40
 gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctggggcga gagggccacc 60
 atcaactgcc aggccagtga gaatatattac aacttttttg cctgggtacca gcagaaacca 120
 ggacagcctc ctaagctgct catttactct gcattccactc tggcatctgg ggtccctgac 180
 cgatttcagtg gcagcgggctc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaggct 240
 gaagatgtgg cagtttatta ctgtcaacag ggttctagta atagtaatat tgataatcct 300
 ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa cggacogtgg ctgcaccatc tgtcttcac 360
 ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttggtgtg cctgctgaat 420
 aacttctatc ccagagagggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480
 aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540
 accctgaagc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600
 catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg c 651

<210> 41
 <211> 283
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41

Met Glu Pro Pro Gly Asp Trp Gly Pro Pro Pro Trp Arg Ser Thr Pro
 1 5 10 15

Lys Thr Asp Val Leu Arg Leu Val Leu Tyr Leu Thr Phe Leu Gly Ala
 20 25 30

Pro Cys Tyr Ala Pro Ala Leu Pro Ser Cys Lys Glu Asp Glu Tyr Pro
 35 40 45

Val Gly Ser Glu Cys Cys Pro Lys Cys Ser Pro Gly Tyr Arg Val Lys
 50 55 60

Glu Ala Cys Gly Glu Leu Thr Gly Thr Val Cys Glu Pro Cys Pro Pro

65	70	75	80
Gly Thr Tyr Ile Ala His Leu Asn Gly Leu Ser Lys Cys Leu Gln Cys	85	90	95
Gln Met Cys Asp Pro Ala Met Gly Leu Arg Ala Ser Arg Asn Cys Ser	100	105	110
Arg Thr Glu Asn Ala Val Cys Gly Cys Ser Pro Gly His Phe Cys Ile	115	120	125
Val Gln Asp Gly Asp His Cys Ala Ala Cys Arg Ala Tyr Ala Thr Ser	130	135	140
Ser Pro Gly Gln Arg Val Gln Lys Gly Gly Thr Glu Ser Gln Asp Thr	145	150	155
Leu Cys Gln Asn Cys Pro Pro Gly Thr Phe Ser Pro Asn Gly Thr Leu	165	170	175
Glu Glu Cys Gln His Gln Thr Lys Cys Ser Trp Leu Val Thr Lys Ala	180	185	190
Gly Ala Gly Thr Ser Ser Ser His Trp Val Trp Trp Phe Leu Ser Gly	195	200	205
Ser Leu Val Ile Val Ile Val Cys Ser Thr Val Gly Leu Ile Ile Cys	210	215	220
Val Lys Arg Arg Lys Pro Arg Gly Asp Val Val Lys Val Ile Val Ser	225	230	235
Val Gln Arg Lys Arg Gln Glu Ala Glu Gly Glu Ala Thr Val Ile Glu	245	250	255
Ala Leu Gln Ala Pro Pro Asp Val Thr Thr Val Ala Val Glu Glu Thr	260	265	270
Ile Pro Ser Phe Thr Gly Arg Ser Pro Asn His	275	280	