



(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



1-0048276

(51)^{2021.01} C07K 16/28; A61P 37/06; A61K 39/395; (13) B
A61P 37/00

(21) 1-2022-05885

(22) 22/02/2021

(86) PCT/US2021/018989 22/02/2021

(87) WO 2021/173471 02/09/2021

(30) 62/983,093 28/02/2020 US

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/11/2022 416A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) ALLAN, Barrett (US); BOYLES, Jeffrey Streetman (US); BUDELSKY, Alison Lee Sim (US); NA, Songqing (US); RUBTSOVA, Kira Vladimirovna (US); ZHANG, Guifeng (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG CD19 NGƯỜI, DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY
VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2022-05885

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết CD19 người (“kháng thể kháng CD19 người” hoặc “kháng thể kháng CD19 của người”), chế phẩm chứa kháng thể kháng CD19 người này, và quy trình sản xuất kháng thể kháng CD19 người này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết CD19 người (“kháng thể kháng CD19 người” hoặc “kháng thể kháng CD19”), chế phẩm chứa kháng thể kháng CD19 người này, và phương pháp sử dụng kháng thể kháng CD19 người này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tế bào B có thể tạo ra kháng thể chống lại các kháng nguyên khác nhau và do đó đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch dịch thể. Ngoài ra, các tế bào B cũng hoạt động như các tế bào trình diện kháng nguyên (antigen presenting cells - APC) và tiết ra các cytokin. Tế bào B biểu hiện thụ thể tế bào B (B cell receptor - BCR) trên màng tế bào của chúng; và BCR cho phép tế bào B liên kết với kháng nguyên cụ thể, kháng nguyên này sẽ bắt đầu đáp ứng kháng thể. Rối loạn điều hòa các tế bào B có liên quan đến một loạt các rối loạn.

Kháng nguyên tế bào lympho B ở người CD19 (còn được gọi là Cụm biệt hóa 19, kháng nguyên bề mặt tế bào lympho B B4. Kháng nguyên bề mặt tế bào T Leu-12, hoặc CVID3) là một protein xuyên màng được biểu hiện rộng rãi trong tất cả các giai đoạn phát triển của tế bào B cho đến giai đoạn biệt hóa cuối của nó thành tương bào. Vì thế, CD19 người là dấu chuẩn chung tế bào B. CD19 được tìm thấy cùng với CD21, một thụ thể bổ thể và với CD81, một thành viên của họ tetraspan (Carter, et al., Immunol. Res. 26: 45-54, 2002). CD19 là một đồng thụ thể đối với BCR và hoạt động như một protein thích ứng để thu nạp các protein truyền tín hiệu trong tế bào chất đến phức hợp BCR. CD19 cần thiết cho các chức năng bình thường của tế bào B và tham gia vào các đáp ứng đa dạng của tế bào B, bao gồm sự tồn tại, tăng sinh, hoạt hóa và biệt hóa của tế bào B.

Kháng thể kháng CD19 người đã được mô tả trước đây và đang được thử nghiệm trong các thử nghiệm lâm sàng. Nhiều kháng thể kháng CD19 ở người đã biết là kháng thể

làm suy giảm tế bào B; ví dụ, inebilizumab (còn được gọi là MEDI-551) và tafasitamab (còn được gọi là MOR208 hoặc XmAb5574) trong các thử nghiệm lâm sàng Giai đoạn III, loncastuximab trong thử nghiệm lâm sàng Giai đoạn II, 4G7SDIE và DI-B4 trong thử nghiệm lâm sàng Giai đoạn I, đều được báo cáo là kháng thể làm suy giảm tế bào B (Cree, et al., Lancet. 394(10206):1352-1363, 2019; Kellner, et al., Leukemia. 27(7):1595–1598, 2013; Kaplon, et al., MAbs. 12(1): 1703531, 2020; Seidel, et al., Mol. Ther. 24(9):1634-43, 2016; WO2007076950).

Obexelimab (còn được gọi là XmAb5871) là kháng thể được thiết kế Fc gắn kết với cả CD19 và FcγRIIb, và ức chế chức năng tế bào B bằng cách tham gia vào việc truyền tín hiệu thụ thể FcγRIIb ức chế (Szili, et al., MAbs. 6(4): 991–999, 2014). Tuy nhiên, sự gắn kết ái lực cao của obexelimab với FcγRIIb có thể dẫn đến việc gắn kết không đặc hiệu với các loại tế bào khác. Ở người bệnh, obexelimab được báo cáo là có thời gian bán hủy ngắn, với $T_{1/2}$ là $3,5 \pm 1,0$ ngày; và giảm số lượng tế bào B ngoại vi của con người, với mức giảm trung bình khoảng 30 - 40% so với mức cơ bản (Jaraczewska-Baumann, et al., European League Against Rheumatism (EULAR) 2015 Annual Meeting Poster: *A Phase 1b/2a Study of the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of XmAb®5871 in Patients with Rheumatoid Arthritis*, June 12, 2015, sẵn có tại <https://investors.xencor.com/static-files/0017dcf1-deb2-46eb-93ff-90ba164ec50c>).

Do đó, vẫn cần có các kháng thể kháng CD19 người thay thế có khả năng gắn kết và ức chế đặc hiệu tế bào B của người, mà không làm suy kiệt chúng, để điều trị các rối loạn liên quan đến tế bào B.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết CD19 người và ức chế đáp ứng tế bào B (ví dụ, tăng sinh, hoạt hóa, và biệt hóa) mà không làm suy kiệt tế bào B (tức là, “kháng thể kháng CD19 người không làm suy kiệt”). Kháng thể kháng CD19 người không làm suy kiệt như vậy có thể được sử dụng để điều trị các rối loạn liên quan đến tế bào B, ví dụ, bệnh tự miễn, mà không phá hủy các tế bào miễn dịch quan trọng đó, và do đó tránh được tình trạng suy giảm miễn dịch đồng thời có vấn đề, ức chế miễn dịch lâu dài và các biến

chứng khác do suy giảm tế bào B. Kháng thể kháng CD19 người được cung cấp ở đây có một hoặc nhiều trong số các đặc tính sau đây: 1) gắn kết với CD19 người (và đôi khi là CD19 của khỉ cynomolgus) với các ái lực liên kết và/hoặc tỷ lệ liên kết và phân ly mong muốn, 2) gắn kết đặc hiệu với tế bào B của người và ức chế sự tăng sinh, hoạt hóa và/hoặc biệt hóa tế bào B chính của người, 3) không làm suy kiệt tế bào B của người, 4) được nội bộ hóa thành tế bào B của người, 5) nguy cơ sinh miễn dịch thấp, 6) tính kỵ nước thấp, và/hoặc 7) tính ổn định, độ hòa tan, độ nhớt và đặc điểm dược động học tốt để phát triển và sử dụng trong điều trị các rối loạn tự miễn. Như được mô tả bên dưới, khi so sánh song song, kháng thể kháng CD19 của người Cb3f như vậy được chứng minh là gắn kết các tế bào B của người với độ đặc hiệu cao trong xét nghiệm máu toàn phần, trong khi obexelimab cho thấy sự gắn kết không đặc hiệu với bạch cầu trung tính của người ngoài việc gắn kết tế bào B. Vì bạch cầu trung tính là loại tế bào bạch cầu phong phú nhất ở người, nên sự gắn kết không đặc hiệu với bạch cầu trung tính có thể giải thích cho thời gian bán hủy ngắn của obexelimab được quan sát thấy ở bệnh nhân. Ngoài ra, trong thử nghiệm chết theo chương trình của tế bào B *in vitro*, obexelimab được chứng minh là gây ra quá trình chết theo chương trình của tế bào B sơ cấp ở người theo cách phụ thuộc vào liều lượng, trong khi kháng thể kháng CD19 của người Cb3f không gây ra quá trình chết theo chương trình của các tế bào B sơ cấp của người trong cùng một thử nghiệm.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD19 người không làm suy kiệt mới. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD19 người là kháng thể người hoàn toàn.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể gắn kết CD19 người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng thay đổi chuỗi nặng (VH) và vùng thay đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH bao gồm vùng xác định tính hỗ trợ chuỗi nặng (HCDR) HCDR1, HCDR2, và HCDR3, và VL bao gồm vùng xác định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ (LCDR) LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó HCDR1 gồm có SEQ ID NO: 29, HCDR2 gồm có SEQ ID NO: 30, HCDR3 gồm có SEQ ID NO: 31, LCDR1 gồm có SEQ ID NO: 32, LCDR2 gồm có SEQ ID NO: 33, và LCDR3 gồm có SEQ ID NO: 34. Theo một số phương án, kháng

thể kháng CD19 người bao gồm VH gồm có SEQ ID NO: 37 và VL gồm có SEQ ID NO: 41.

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD19 người có isotyp IgG1 hoặc IgG4 người. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD19 người có isotyp IgG4 người. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD19 người có vùng bản lề IgG4 người được cải biến gồm đột biến S228P (theo phương pháp đánh số chỉ mục EU), mà làm giảm sự trao đổi nhánh Fab của IgG4 *in vivo* (xem Labrijn, et al., Nat. Biotechnol. 2009, 27(8):767). Theo một số phương án, kháng thể kháng CD19 người có isotyp IgG1 người. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD19 của người có vùng Fc IgG1 của người đã được cải biến mà đã làm giảm hoặc loại bỏ các chức năng tác động Fc, chẳng hạn như độc tính tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC) và độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể (CDC). Kháng thể như vậy được gọi là kháng thể “vô hiệu tác động IgG1”.

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD19 người có isotyp IgG4 người. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể này bao gồm chuỗi nặng (HC) gồm có SEQ ID NO: 35 và chuỗi nhẹ (LC) gồm có SEQ ID NO: 39. Theo một số phương án, kháng thể có isotyp IgG1 người. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể này bao gồm HC gồm có SEQ ID NO: 50 và LC gồm có SEQ ID NO: 39. Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể vô hiệu tác động IgG1. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể này bao gồm HC gồm có SEQ ID NO: 52 và LC gồm có SEQ ID NO: 39.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến mảnh kháng thể (ví dụ, Fab hoặc scFv) gắn kết CD19 người, trong đó mảnh kháng thể này bao gồm VH và VL, trong đó VH bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3, và VL bao gồm LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó HCDR1 bao gồm SEQ ID NO: 29, HCDR2 gồm có SEQ ID NO: 30, HCDR3 gồm có SEQ ID NO: 31, LCDR1 gồm có SEQ ID NO: 32, LCDR2 gồm có SEQ ID NO: 33, và LCDR3 gồm có SEQ ID NO: 34. Theo một số phương án, mảnh kháng thể bao gồm VH gồm có SEQ ID NO: 37 và VL gồm có SEQ ID NO: 41.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể gắn kết CD19 người, trong đó kháng thể này bao gồm VH và VL, trong đó VH bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3, và VL bao gồm

LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó HCDR1 gồm có SEQ ID NO: 29, HCDR2 gồm có SEQ ID NO: 30, HCDR3 gồm có SEQ ID NO: 31, LCDR1 gồm có SEQ ID NO: 43, LCDR2 gồm có SEQ ID NO: 44, và LCDR3 gồm có SEQ ID NO: 45. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD19 người bao gồm VH gồm có SEQ ID NO: 37 và VL gồm có SEQ ID NO: 48. Theo một số phương án, kháng thể có isotyp IgG4 người. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể này bao gồm HC gồm có SEQ ID NO: 35 và LC gồm có SEQ ID NO: 46. Theo một số phương án, kháng thể có isotyp IgG1 người. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể này bao gồm HC gồm có SEQ ID NO: 50 và LC gồm có SEQ ID NO: 46. Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể vô hiệu tác động IgG1. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể này bao gồm HC gồm có SEQ ID NO: 52 và LC gồm có SEQ ID NO: 46.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến mảnh kháng thể (ví dụ, Fab hoặc scFv) gắn kết CD19 người, trong đó mảnh kháng thể này bao gồm VH và VL, trong đó VH bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3, và VL bao gồm LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó HCDR1 gồm có SEQ ID NO: 29, HCDR2 gồm có SEQ ID NO: 30, HCDR3 gồm có SEQ ID NO: 31, LCDR1 gồm có SEQ ID NO: 43, LCDR2 gồm có SEQ ID NO: 44, và LCDR3 gồm có SEQ ID NO: 45. Theo một số phương án, mảnh kháng thể bao gồm VH gồm có SEQ ID NO: 37 và VL gồm có SEQ ID NO: 48.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể gắn kết CD19 người, trong đó kháng thể này bao gồm VH và VL, trong đó VH bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3, và VL bao gồm LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó HCDR1 gồm có SEQ ID NO: 15, HCDR2 gồm có SEQ ID NO: 16, HCDR3 gồm có SEQ ID NO: 17, LCDR1 gồm có SEQ ID NO: 18, LCDR2 gồm có SEQ ID NO: 19, và LCDR3 gồm có SEQ ID NO: 20. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD19 người bao gồm VH gồm có SEQ ID NO: 23 và VL gồm có SEQ ID NO: 27. Theo một số phương án, kháng thể có isotyp IgG4 người. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể này bao gồm HC gồm có SEQ ID NO: 21 và LC gồm có SEQ ID NO: 25. Theo một số phương án, kháng thể có isotyp IgG1 người. Theo một số phương án,

kháng thể là kháng thể vô hiệu tác động IgG1. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể này bao gồm HC gồm có SEQ ID NO: 54 và LC gồm có SEQ ID NO: 25.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến mảnh kháng thể (ví dụ, Fab hoặc scFv) gắn kết CD19 người, trong đó mảnh kháng thể này bao gồm VH và VL, trong đó VH bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3, và VL bao gồm LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó HCDR1 bao gồm SEQ ID NO: 15, HCDR2 gồm có SEQ ID NO: 16, HCDR3 gồm có SEQ ID NO: 17, LCDR1 gồm có SEQ ID NO: 18, LCDR2 gồm có SEQ ID NO: 19, và LCDR3 gồm có SEQ ID NO: 20. Theo một số phương án, mảnh kháng thể bao gồm VH gồm có SEQ ID NO: 23 và VL gồm có SEQ ID NO: 27.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể gắn kết CD19 người, trong đó kháng thể này bao gồm VH và VL, trong đó VH bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3, và VL bao gồm LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó HCDR1 gồm có SEQ ID NO: 1, HCDR2 gồm có SEQ ID NO: 2, HCDR3 gồm có SEQ ID NO: 3, LCDR1 gồm có SEQ ID NO: 4, LCDR2 gồm có SEQ ID NO: 5, và LCDR3 gồm có SEQ ID NO: 6. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD19 người bao gồm VH gồm có SEQ ID NO: 9 và VL gồm có SEQ ID NO: 13. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm HC gồm có SEQ ID NO: 7 và LC gồm có SEQ ID NO: 11.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến mảnh kháng thể (ví dụ, Fab hoặc scFv) gắn kết CD19 người, trong đó mảnh kháng thể này bao gồm VH và VL, trong đó VH bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3, và VL bao gồm LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó HCDR1 bao gồm SEQ ID NO: 1, HCDR2 gồm có SEQ ID NO: 2, HCDR3 gồm có SEQ ID NO: 3, LCDR1 gồm có SEQ ID NO: 4, LCDR2 gồm có SEQ ID NO: 5, và LCDR3 gồm có SEQ ID NO: 6. Theo một số phương án, mảnh kháng thể bao gồm VH gồm có SEQ ID NO: 9 và VL gồm có SEQ ID NO: 13.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hóa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, hoặc VH hoặc VL, của kháng thể kháng CD19 người mới được mô tả ở đây, và vectơ gồm axit nucleic này.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến axit nucleic mã hóa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD19 người được mô tả ở đây. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến axit nucleic gồm trình tự mã hóa SEQ ID NO: 35, 52, 50, 39, 46, 21, 54, 25, 7 hoặc 11. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến axit nucleic gồm trình tự mã hóa chuỗi nặng kháng thể gồm có SEQ ID NO: 35, 52, 50, 21, 54, hoặc 7. Ví dụ, axit nucleic có thể bao gồm trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 36, 53, 51, 22, 55, hoặc 8. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến axit nucleic gồm trình tự mã hóa chuỗi nhẹ kháng thể gồm có SEQ ID NO: 39, 46, 25, hoặc 11. Ví dụ, axit nucleic có thể bao gồm trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 40, 47, 26, hoặc 12.

Sáng chế cũng đề cập đến axit nucleic mã hóa VH hoặc VL của kháng thể kháng CD19 người được mô tả ở đây. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến axit nucleic gồm trình tự mã hóa SEQ ID NO: 37, 23, 27, 9, 41, 48, 13. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến axit nucleic gồm trình tự mã hóa VH kháng thể gồm có SEQ ID NO: 37, 23, 27, 9. Ví dụ, axit nucleic có thể bao gồm trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 38, 24, 28, 10. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến axit nucleic gồm trình tự mã hóa VL kháng thể gồm có SEQ ID NO: 41, 48, 13. Ví dụ, axit nucleic có thể bao gồm trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 42, 49, 14.

Sáng chế cũng đề cập đến vector chứa trình tự axit nucleic mã hóa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ kháng thể. Ví dụ, vector này có thể chứa trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 35, 52, 50, 39, 46, 21, 54, 25, 7, hoặc 11. Theo một số phương án, vector gồm có SEQ ID NO: 36, 53, 51, 40, 47, 22, 55, 26, 8, hoặc 12.

Sáng chế cũng đề cập đến vector gồm trình tự axit nucleic mã hóa VL hoặc VH kháng thể. Ví dụ, vector này có thể chứa trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 37, 23, 27, 9, 41, 48, hoặc 13. Theo một số phương án, vector gồm có SEQ ID NO: 38, 24, 28, 10, 42, 49, hoặc 14.

Sáng chế cũng đề cập đến vector gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa chuỗi nặng kháng thể và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa chuỗi nhẹ kháng thể. Theo một số phương án, vector bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa SEQ ID NO: 35, 50, hoặc

52, và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa SEQ ID NO: 39 hoặc 46. Theo một số phương án, vector bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa SEQ ID NO: 21 hoặc 54, và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa SEQ ID NO: 25.

Theo một số phương án, vector bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa SEQ ID NO: 35 và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa SEQ ID NO: 39. Theo một số phương án, vector bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa SEQ ID NO: 52 và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa SEQ ID NO: 39. Theo một số phương án, vector bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa SEQ ID NO: 50 và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa SEQ ID NO: 39. Theo một số phương án, vector bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa SEQ ID NO: 35 và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa SEQ ID NO: 46. Theo một số phương án, vector bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa SEQ ID NO: 52 và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa SEQ ID NO: 46. Theo một số phương án, vector bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa SEQ ID NO: 50 và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa SEQ ID NO: 46. Theo một số phương án, vector bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa SEQ ID NO: 21 và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa SEQ ID NO: 25. Theo một số phương án, vector bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa SEQ ID NO: 54 và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa SEQ ID NO: 25. Theo một số phương án, vector bao gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa SEQ ID NO: 7 và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa SEQ ID NO: 11.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa vector thứ nhất gồm trình tự axit nucleic mã hóa chuỗi nặng kháng thể, và vector thứ hai chứa trình tự axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ kháng thể. Theo một số phương án, chế phẩm chứa vector thứ nhất gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 35, 52, hoặc 50, và vector thứ hai gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 39 hoặc 46. Theo một số phương án, chế phẩm chứa vector thứ nhất gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 21 hoặc 54, và vector thứ hai gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 25.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa vector thứ nhất gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 35 và vector thứ hai gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 39.

Theo một số phương án, chế phẩm chứa vector thứ nhất gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 52 và vector thứ hai gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 39. Theo một số phương án, chế phẩm chứa vector thứ nhất gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 50 và vector thứ hai gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 39. Theo một số phương án, chế phẩm chứa vector thứ nhất gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 35 và vector thứ hai gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 46. Theo một số phương án, chế phẩm chứa vector thứ nhất gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 52 và vector thứ hai gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 46. Theo một số phương án, chế phẩm chứa vector thứ nhất gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 50 và vector thứ hai gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 46. Theo một số phương án, chế phẩm chứa vector thứ nhất gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 21 và vector thứ hai gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 25. Theo một số phương án, chế phẩm chứa vector thứ nhất gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 54 và vector thứ hai gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 25. Theo một số phương án, chế phẩm chứa vector thứ nhất gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 7 và vector thứ hai gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 11.

Axit nucleic theo sáng chế có thể được biểu hiện trong tế bào chủ, ví dụ, sau khi axit nucleic được liên kết hoạt động với trình tự kiểm soát sự biểu hiện. Trình tự kiểm soát sự biểu hiện có khả năng biểu hiện axit nucleic mà chúng được liên kết hoạt động đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Vector biểu hiện có thể bao gồm trình tự mã hóa một hoặc nhiều peptit tín hiệu để tạo điều kiện tiết (các) polypeptit từ tế bào chủ. Các vector biểu hiện chứa axit nucleic quan tâm (ví dụ, axit nucleic mã hóa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể) có thể được chuyển vào tế bào chủ bằng các phương pháp đã biết, ví dụ: chuyển nhiễm, biến nạp, chuyển nạp hoặc nhiễm một cách ổn định hoặc tạm thời. Ngoài ra, vector biểu hiện có thể chứa một hoặc nhiều dấu chuẩn chọn lọc, ví dụ, tetracyclin, neomycin, và dihydrofolat reductaza, để hỗ trợ phát hiện các tế bào chủ được biến nạp với trình tự axit nucleic mong muốn.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào, ví dụ, tế bào chủ, gồm axit nucleic, vector, hoặc chế phẩm axit nucleic được mô tả ở đây. Tế bào chủ có thể là tế bào được chuyển nhiễm, biến nạp, chuyển nạp hoặc được nhiễm một cách ổn định hoặc tạm thời với một hoặc nhiều vector biểu hiện biểu hiện tất cả hoặc một phần kháng thể được mô tả ở đây. Theo một số phương án, tế bào chủ có thể được chuyển nhiễm, biến nạp, chuyển nạp hoặc được nhiễm một cách ổn định hoặc tạm thời với vector biểu hiện biểu hiện polypeptit HC và LC của kháng thể theo sáng chế. Theo một số phương án, tế bào chủ có thể được chuyển nhiễm, biến nạp, chuyển nạp hoặc được nhiễm một cách ổn định hoặc tạm thời với vector thứ nhất biểu hiện polypeptit HC và vector thứ hai biểu hiện polypeptit LC của kháng thể được mô tả ở đây. Các tế bào chủ như vậy, ví dụ, tế bào chủ động vật có vú, có thể biểu hiện kháng thể kháng CD19 người được mô tả ở đây. Tế bào chủ động vật có vú được biết là có khả năng biểu hiện kháng thể bao gồm tế bào CHO, tế bào HEK293, tế bào COS, và tế bào NS0.

Theo một số phương án, tế bào, ví dụ, tế bào chủ, bao gồm vector gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa SEQ ID NO: 35, 50, hoặc 52, và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa SEQ ID NO: 39 hoặc 46. Theo một số phương án, tế bào, ví dụ, tế bào chủ, bao gồm vector gồm trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa SEQ ID NO: 21 hoặc 54, và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa SEQ ID NO: 25.

Theo một số phương án, tế bào, ví dụ, tế bào chủ, bao gồm vector thứ nhất gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 35, 52, hoặc 50, và vector thứ hai gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 39 hoặc 46. Theo một số phương án, tế bào, ví dụ, tế bào chủ, bao gồm vector thứ nhất gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 21 hoặc 54, và vector thứ hai gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 25.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể kháng CD19 người được mô tả ở đây bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ được mô tả ở trên, ví dụ, tế bào chủ động vật có vú, trong các điều kiện sao cho kháng thể được biểu hiện và thu hồi kháng thể được biểu hiện từ môi trường nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy, trong đó kháng thể đã được tiết ra, có thể được tinh sạch bằng các kỹ thuật thông thường. Nhiều phương pháp tinh chế protein

khác nhau có thể được sử dụng và các phương pháp như vậy đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả, chẳng hạn trong tài liệu Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-89 (1990) và Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Edition, Springer, NY (1994).

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể được sản xuất bằng quy trình bất kỳ trong số các quy trình được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể, axit nucleic, hoặc vector được mô tả ở đây. Các dược phẩm có thể chứa thêm một hoặc nhiều tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng. Các dược phẩm được bào chế bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này (ví dụ, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 22nd ed. (2012), A. Loyd et al., Pharmaceutical Press).

Kháng thể kháng CD19 người, axit nucleic, vector, hoặc dược phẩm được mô tả ở đây có thể được sử dụng để điều trị các rối loạn liên quan đến tế bào B. Do vai trò quan trọng của chúng trong việc điều chỉnh hệ miễn dịch, nên sự rối loạn điều hòa tế bào B có liên quan đến nhiều loại rối loạn. Các rối loạn liên quan đến tế bào B bao gồm các bệnh tự miễn, gây ra bởi sự hoạt hóa của tế bào B và tế bào T tự phản ứng, cũng như u lympho và bệnh bạch cầu, gây ra bởi sự tăng sinh quá mức và/hoặc không kiểm soát được của tế bào B. Ví dụ về các bệnh tự miễn liên quan đến tế bào B bao gồm viêm khớp dạng thấp, lupus ban đỏ hệ thống, bệnh đa xơ cứng, hội chứng Sjogren, ban xuất huyết giảm tiểu cầu vô căn, đái tháo đường loại 1, bệnh Pemphigus thông thường, rối loạn phổ viêm tủy thị thần kinh, viêm mạch ANCA (kháng thể kháng bào tương của bạch cầu đoạn trung tính), bệnh nhược cơ.

Do các kháng thể CD19 kháng người được mô tả ở đây không làm suy giảm tế bào B, chúng cung cấp các lợi thế hơn các kháng thể làm suy giảm tế bào B để điều trị các bệnh tự miễn và có thể tránh suy giảm miễn dịch đồng thời có vấn đề, ức chế miễn dịch lâu dài và các biến chứng khác do suy giảm tế bào B. Như được thể hiện ở đây, kháng thể kháng CD19 người được mô tả ở đây được nội bộ hóa trong các tế bào B người sơ cấp. Vì thế, kháng thể kháng CD19 người được mô tả ở đây cũng có thể được sử dụng để phân phối chất điều trị khác vào trong tế bào B người.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các phương pháp điều trị rối loạn liên quan đến tế bào B, ví dụ, bệnh tự miễn, ở đối tượng (ví dụ, bệnh nhân là người) có nhu cầu điều trị, bằng cách sử dụng cho đối tượng một lượng có hiệu quả điều trị bệnh của kháng thể kháng CD19, axit nucleic mã hóa cho kháng thể CD19 kháng người, vector chứa axit nucleic này, hoặc dược phẩm chứa kháng thể CD19, axit nucleic hoặc vector này, như được mô tả trong bản mô tả này. Kháng thể, axit nucleic, vector hoặc dược phẩm được mô tả ở đây, có thể được sử dụng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, dưới da và trong tĩnh mạch). Theo một số phương án, rối loạn liên quan đến tế bào B được chọn từ lupus ban đỏ hệ thống, đa xơ cứng, viêm khớp dạng thấp, hội chứng Sjogren, xuất huyết giảm tiểu cầu miễn dịch, đái tháo đường Typ 1, bệnh Pemphigus thông thường, viêm tủy thị thần kinh, viêm mạch ANCA, bệnh nhược cơ.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể kháng CD19 người, axit nucleic, vector, hoặc dược phẩm được mô tả ở đây để sử dụng trong điều trị. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến kháng thể kháng CD19 người, axit nucleic, vector, hoặc dược phẩm được mô tả ở đây để sử dụng trong điều trị rối loạn liên quan đến tế bào B, ví dụ, bệnh tự miễn, ví dụ, lupus ban đỏ hệ thống, đa xơ cứng, viêm khớp dạng thấp, hội chứng Sjogren, xuất huyết giảm tiểu cầu miễn dịch, Type 1 đái tháo đường, bệnh Pemphigus thông thường, viêm tủy thị thần kinh, viêm mạch ANCA, bệnh nhược cơ.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng kháng thể kháng CD19 người, axit nucleic, vector, hoặc dược phẩm được mô tả ở đây trong sản xuất thuốc để điều trị rối loạn liên quan đến tế bào B, ví dụ, bệnh tự miễn, ví dụ, lupus ban đỏ hệ thống, đa xơ cứng, viêm khớp dạng thấp, hội chứng Sjogren, xuất huyết giảm tiểu cầu miễn dịch, hoặc đái tháo đường Typ 1, bệnh Pemphigus thông thường, viêm tủy thị thần kinh, viêm mạch ANCA, bệnh nhược cơ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các Fig. 1A-1B thể hiện profin kỵ nước bề mặt của kháng thể gốc kháng CD19 người C323 (FIG. 1A) và kháng thể kháng CD19 người được tối ưu hóa CB3f (FIG. 1B).

Fig. 2 thể hiện sự gắn kết của kháng thể kháng CD19 người với CD19 người trong thử nghiệm ELISA.

Fig. 3 thể hiện sự ức chế tăng sinh tế bào B sơ cấp bằng mAb kháng CD19 người CB3f.

Fig. 4 thể hiện sự ức chế hoạt hóa tế bào B trong máu toàn phần bằng mAb kháng CD19 người CB3f.

Fig. 5 thể hiện sự ức chế biệt hóa tế bào B thành nguyên tương bào bằng mAb kháng CD19 người CB3f.

Các Fig. 6A-6B thể hiện mAb kháng CD19 người CB3f không có CDC (FIG. 6A) và ADCC (FIG. 6B) hoạt tính.

Fig. 7 thể hiện tính đặc hiệu gắn kết của mAb kháng CD19 người CB3f và obexelimab đối với các tế bào trong máu toàn phần của người.

Fig. 8 thể hiện sự khác biệt trong cảm ứng quá trình chết theo chương trình của tế bào B bởi obexelimab và mAb kháng CD19 người CB3f.

Các Fig. 9A-9B thể hiện việc giảm IgM người trong chuột NSG được điều trị bằng mAb kháng CD19 người CB3f vào ngày 6 (FIG. 9A) và ngày 10 (FIG. 9B) sau điều trị.

Fig. 10 thể hiện mức giảm biểu hiện DLL3 người thể hiện việc giảm biểu hiện CD86 trên tế bào B người ở chuột NSG được điều trị bằng mAb kháng CD19 người CB3f.

Fig. 11 thể hiện tần suất của tế bào B ở chuột NSG được điều trị bằng mAb kháng CD19 người CB3f.

Fig. 12 thể hiện sự nội bộ hóa của mAb1 kháng CD19 người (CB3f) và mAb2 kháng CD19 người (C323.C1) ở tế bào B sơ cấp.

Các Fig. 13A-13B cho thấy sự so sánh về hiệu quả của Ab thay thế CD19 không làm suy kiệt và Ab thay thế CD20 làm suy kiệt trong mô hình viêm khớp do collagen ở chuột (CIA). FIG.13A thể hiện việc điều trị bằng Ab thay thế CD19 không làm suy kiệt trong mô hình bán thiết lập làm giảm điểm lâm sàng cao hơn Ab thay thế CD20 làm suy

kiệt trong mô hình CIA trên chuột. Điểm lâm sàng của chuột từ Ngày 21 đến Ngày 42 của nghiên cứu ($n = 12$ /nhóm ngoại trừ $n = 5$ đối với nhóm đối chứng không có bệnh được điều trị bằng đối chứng Isotyp). Các ký hiệu đại diện cho giá trị trung bình của nhóm và các thanh sai số thể hiện sai số chuẩn của giá trị trung bình (SEM). Động vật được dùng theo liều bắt đầu từ ngày 19. FIG.13B thể hiện việc điều trị bằng Ab thay thế CD19 không làm suy kiệt đã giảm điểm số lâm sàng AUC (các ngày 24 đến 42) lớn hơn kháng thể thay thế CD20 làm suy kiệt ở mô hình CIA trên chuột. Điểm số lâm sàng AUC của chuột từ ngày 24 đến ngày 42 của nghiên cứu ($n = 12$ /nhóm ngoại trừ $n = 5$ đối với nhóm đối chứng không có bệnh được điều trị bằng đối chứng Isotyp). Các cột đại diện cho giá trị trung bình của nhóm và các thanh sai số thể hiện sai số chuẩn của giá trị trung bình (SEM). Chuột được dùng theo liều bắt đầu từ ngày 19. Các thanh không có chung ký tự thì khác nhau đáng kể ($p < 0,05$ phân tích hậu định Tukey phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA)).

Fig. 14 thể hiện việc điều trị bằng Ab thay thế CD19 không làm suy kiệt trong mô hình bán điều trị đã trì hoãn và giảm khả năng mắc bệnh đái tháo đường lớn hơn kháng thể thay thế CD20 làm suy kiệt trong mô hình NOD của đái tháo đường Typ 1. Tỷ lệ mắc đái tháo đường (chuột với mức glucoza huyết trên 240 mg/dl được coi là có đái tháo đường $>$. $n = 10$ /nhóm ngoại trừ $n = 9$ đối với nhóm không điều trị). Động vật được dùng theo liều bắt đầu ở 12 tuần tuổi.

Fig. 15 thể hiện việc điều trị bằng Ab thay thế CD19 không làm suy kiệt trong mô hình bán điều trị đã làm giảm điểm số lâm sàng lớn hơn kháng thể thay thế CD20 làm suy kiệt trong mô hình EAE ở chuột nhắt. Điểm số lâm sàng của chuột từ ngày 6 đến ngày 42 của nghiên cứu ($n = 12$ /nhóm). Các ký hiệu đại diện cho giá trị trung bình của nhóm và các thanh sai số thể hiện sai số chuẩn của giá trị trung bình (SEM). Động vật được dùng theo liều bắt đầu từ ngày 6. * $p < 0,05$ đối với đối chứng Isotyp cùng ngày.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng ở đây, các mạo từ số ít “một” và các dạng tương tự được sử dụng trong ngữ cảnh sáng chế (đặc biệt trong ngữ cảnh của các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây)

được hiểu là bao hàm cả dạng số ít và số nhiều trừ khi có quy định khác ở đây hoặc rõ ràng là trái với ngữ cảnh đó.

Thuật ngữ “kháng thể,” như được sử dụng ở đây, để chỉ phân tử globulin miễn dịch gắn kết với kháng nguyên. Các phương án của sáng chế bao gồm kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể người, kháng thể người hóa, kháng thể khảm, hoặc kháng thể liên hợp. Kháng thể có thể là lớp bất kỳ (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA) và phân lớp bất kỳ (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4).

Kháng thể làm ví dụ là kháng thể loại globulin miễn dịch G (IgG) bao gồm bốn chuỗi polypeptit: hai chuỗi nặng (HC) và hai chuỗi nhẹ (LC) mà được liên kết ngang qua liên kết disulfua giữa các chuỗi. Phần tận cùng amin của mỗi một trong số bốn chuỗi polypeptit bao gồm vùng biến đổi gồm khoảng 100-125 axit amin chủ yếu chịu trách nhiệm nhận diện kháng nguyên. Phần tận cùng bằng cacboxy của mỗi một trong số bốn chuỗi polypeptit này chứa vùng hằng định chủ yếu chịu trách nhiệm về chức năng tác động. Mỗi chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (“VH”) và vùng ổn định chuỗi nặng. Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) và vùng ổn định của chuỗi nhẹ. Isotyp IgG có thể được phân chia thêm thành các phân lớp (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4).

Các vùng VH và VL có thể được chia tiếp thành các vùng siêu biến, được gọi là vùng xác định bổ cứu CDR), đặt rải rác với các vùng mà được bảo toàn hơn, được gọi là các vùng khung FR). Các CDR được lộ ra trên bề mặt của protein và là vùng quan trọng của kháng thể đối với tính đặc hiệu gắn kết với kháng nguyên. Mỗi một VH và VL được tạo thành từ ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng cacboxyl theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Ở đây, ba CDR của chuỗi nặng được gọi là “HCDR1, HCDR2, và HCDR3” và ba CDR của chuỗi nhẹ được gọi là “LCDR1, LCDR2, và LCDR3”. Các CDR chứa hầu hết các gốc mà tạo ra các tương tác đặc hiệu với kháng nguyên. Việc gán các gốc axit amin cho CDR có thể được thực hiện theo các sơ đồ nổi tiếng, bao gồm cả những sơ đồ được mô tả bởi Kabat (Kabat et al., “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), Chothia (Chothia et al., “Canonical structures for the hypervariable

regions of immunoglobulins”, *Journal of Molecular Biology*, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani et al., “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, *Journal of Molecular Biology*, 273, 927-948 (1997)), North (North *et al.*, “A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations”, *Journal of Molecular Biology*, 406, 228-256 (2011)), hoặc IMGT (cơ sở dữ liệu ImMunoGeneTics quốc tế trên www.imgt.org; xem Lefranc et al., *Nucleic Acids Res.* 1999; 27:209-212). Các định nghĩa North CDR được sử dụng cho các kháng thể kháng CD19 người được mô tả ở đây.

Các phương án làm ví dụ của kháng thể theo sáng chế cũng bao gồm mảnh kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên, mà bao gồm ít nhất một phần của kháng thể giữ lại khả năng tương tác đặc hiệu với kháng nguyên chẳng hạn Fab, Fab', F(ab')₂, mảnh Fv, scFv, scFab, Fvs (sdFv) được liên kết disulfua, mảnh Fd và kháng thể thẳng.

Thuật ngữ “gắn kết” và “liên kết” như được sử dụng ở đây nhằm mục đích có nghĩa là, trừ khi có chỉ định khác, khả năng của một protein hoặc phân tử tạo thành liên kết hóa học hoặc tương tác hấp dẫn với protein hoặc phân tử khác, dẫn đến sự gần nhau của hai protein hoặc các phân tử như được xác định bằng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này.

Thuật ngữ “CD19” như được sử dụng ở đây, trừ khi được quy định khác, để chỉ kháng nguyên lympho bào B của người CD19 (còn được biết như là cụm biệt hóa 19, kháng nguyên bề mặt lympho bào B B4, kháng nguyên bề mặt tế bào T Leu-12, hoặc CVID3). Trình tự axit amin của CD19 người đã được biết trong lĩnh vực này, ví dụ, trình tự tham chiếu NCBI NP_001171569.1 (isoform 1, SEQ ID NO: 56) hoặc NP_001761.3 (isoform 2, SEQ ID NO: 57). Isoform 2 là một biến thể nối của isoform 1 và là một axit amin ngắn hơn isoform 1 trong miền nội bào. Thuật ngữ “CD19” được sử dụng ở đây để chỉ chung cho tất cả các isoform và dạng đa hình của CD19 người.

Thuật ngữ “vùng Fc” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ một vùng của kháng thể, vùng này bao gồm miền CH₂ và CH₃ của chuỗi nặng kháng thể. Theo tùy chọn, vùng Fc có thể bao gồm một phần của vùng bản lề hoặc toàn bộ vùng bản lề của chuỗi nặng kháng thể.

Thuật ngữ “kháng thể không làm suy kiệt” như được sử dụng ở đây dùng để chỉ kháng thể không làm giảm đáng kể số lượng tế bào B ở đối tượng sau khi điều trị, so với số lượng tế bào B trước khi điều trị. Số lượng tế bào B có thể được đo bằng các thử nghiệm đã được biết rõ như các thử nghiệm được mô tả trong phần Ví dụ. Kháng thể không làm suy kiệt thường không cảm ứng việc gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC), thực bào tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCP), gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể (CDC) hoặc quá trình chết theo chương trình của tế bào B.

Các thuật ngữ “axit nucleic” hoặc “polynucleotit”, như được sử dụng thay thế cho nhau ở đây, dùng để chỉ các polyme của nucleotit, bao gồm các phân tử chứa nucleotit sợi đơn và/hoặc sợi đôi, chẳng hạn như phân tử ADN, cADN và ARN, kết hợp dạng nguyên vẹn, cải biến và/hoặc các chất tương tự của nucleotit. Polynucleotit theo sáng chế có thể cũng bao gồm các chất được kết hợp vào đó, ví dụ, bằng ADN hoặc ARN polymeraza hoặc phản ứng tổng hợp.

Thuật ngữ “đối tượng”, như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ động vật có vú, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở người, tinh tinh, vượn, khỉ, gia súc, ngựa, cừu, dê, lợn, thỏ, chó, mèo, chuột, chuột lang, và dạng tương tự. Tốt hơn nếu đối tượng là người.

Thuật ngữ “lượng có hiệu quả điều trị,” như được sử dụng ở đây, dùng để chỉ một lượng protein hoặc axit nucleic hoặc vector hoặc chế phẩm sẽ tạo ra phản ứng sinh học hoặc y tế của đối tượng, ví dụ, giảm hoặc ức chế enzym hoặc hoạt tính protein, hoặc cải thiện các triệu chứng, giảm bớt tình trạng, làm chậm hoặc trì hoãn sự tiến triển của bệnh, hoặc ngăn ngừa bệnh, v.v. Trong một phương án không giới hạn, thuật ngữ "lượng có hiệu quả điều trị" dùng để chỉ lượng protein hoặc axit nucleic hoặc vector hoặc chế phẩm, khi được sử dụng cho đối tượng, có hiệu quả ít nhất là làm giảm bớt, ức chế, ngăn ngừa và/hoặc cải thiện một phần tình trạng hoặc rối loạn hoặc bệnh.

Như được sử dụng ở đây, “sự điều trị” hoặc “việc điều trị” dùng để chỉ tất cả các quy trình trong đó có thể là làm chậm, kiểm soát, hoặc làm ngừng sự tiến triển của các rối loạn hoặc bệnh được bộc lộ ở đây, hoặc cải thiện các triệu chứng của rối loạn hoặc bệnh nhưng không nhất thiết chỉ ra việc loại bỏ hoàn toàn tất cả các triệu chứng của rối loạn

hoặc bệnh. Việc điều trị bao gồm việc sử dụng protein hoặc axit nucleic hoặc vector hoặc chế phẩm để điều trị bệnh hoặc tình trạng ở bệnh nhân, đặc biệt là người.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây được đưa ra để minh họa, nhưng không nhằm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Ví dụ 1. Tạo ra kháng thể gắn kết CD19 người (kháng thể kháng CD19 người).

Kháng thể kháng CD19 người C323 được phát hiện từ thư viện hiển thị thể thực khuẩn phage bằng cách sử dụng phương pháp sàng lọc dựa trên tế bào đối với các tế bào thận phôi thai người (HEK) được đồng chuyển nhiễm với CD19 của người (SEQ ID NO: 56) và đồng thụ thể của nó CD21. Việc sàng lọc âm tính đối với tế bào HEK-293 bố mẹ được sử dụng để loại bỏ chất gắn kết tế bào không đặc hiệu. Việc gắn kết đặc hiệu CD19 được khẳng định bằng cách sử dụng protein miền ngoại bào CD19 (ECD) bằng ELISA. Sau khi chuyển thành dạng IgG format và tinh chế, việc gắn kết tế bào được khẳng định bằng cách sử dụng dòng tế bào u lympho Burkitt của người Daudi và được phân lập tế bào B sơ cấp của người bằng FACS.

Sắc ký tương tác kỵ nước (HIC) là kỹ thuật tách protein thường được sử dụng để xác định đặc điểm của các biến thể kháng thể; và thời gian lưu vào cột HIC của protein quan tâm phản ánh tính kỵ nước tổng thể của nó (J Pharm Biomed Anal. 2016 130:3-18). C323 được coi là kỵ nước do thời gian lưu cột HIC kéo dài. Tính kỵ nước của kháng thể có thể gây ra các vấn đề sản xuất như sự biểu hiện và sự tập hợp protein kém. Việc gây đột biến mục tiêu và ngẫu nhiên được sử dụng để nâng cao các đặc tính lý sinh của C323 và tăng ái lực và hiệu lực của nó. Một mô hình tương đồng về vùng biến đổi của mAb kháng CD19 người bố mẹ C323 được tạo ra. Sau đó, thuật toán xu hướng tổng hợp không gian được áp dụng cho mô hình để xác định các mảng kỵ nước lộ ra trên bề mặt. Quá trình này xác định tám gốc kỵ nước được lộ ra trên bề mặt trong LCDR1, HCDR2 và HCDR3: LCDR1: Y31, Y32; HCDR2: I52, I53 và F54; HCDR3: F97, Y99 và Y100a (cách đánh số Kabat) (FIG. 1A). Các gốc này được nhắm mục tiêu để gây đột biến. Thư viện được tạo ra

để bao gồm nhiều axit amin ưa nước hơn (phân cực hoặc tích điện) bằng cách sử dụng các oligonucleotit gây đột biến dựa trên codon VVK và được kết hợp bằng cách sử dụng phương pháp gây đột biến Kunkel vào mẫu ADN sợi đơn chứa uraxil mã hóa kháng thể gốc C323 ban đầu với các trình tự CDR đã chọn đã bị xóa. Các Fab biểu hiện thể thực khuẩn được sàng lọc bằng cách sử dụng kháng nguyên ECD CD19 người được đánh dấu biotin. Các đột biến trung tính về ái lực được xác định theo cách này là các dòng ADN được giải trình tự và các dòng duy nhất được biểu hiện dưới dạng Fab ngoại chất ở *E.coli* và được phân tích bằng phương pháp chuẩn độ ELISA. Quá trình này xác định ba sự thay thế axit amin trung tính nhưng ưa nước hơn: LCDR1: Y31H, HCDR2: F54Y và HCDR3: Y99K (cách đánh số Kabat).

Song song đó, việc tối ưu hóa để tăng ái lực được thực hiện bằng cách sử dụng các oligonucleotit gây đột biến dựa trên codon NNK nhằm mục tiêu tất cả sáu CDR và được kết hợp bằng cách sử dụng gây đột biến Kunkel vào khuôn ADN sợi đơn chứa uraxil với các CDR đã chọn đã bị xóa. Việc sàng lọc các biến thể Fab được biểu hiện ở thể thực khuẩn được thực hiện bằng phương pháp bắt giữ (Anal Biochem. 1998 256(2):169-77) và ELISA bằng cách sử dụng kháng nguyên CD19 ECD người được biotinyl hóa. Theo cách này, việc thay thế CDR dẫn đến tăng ái lực được xác định: HCDR1: F29I, I34Y; HCDR2: G55D, HCDR3: G100bA; LCDR1: G27aK, A34H, LCDR2: S52R, A55P, LCDR3: N93Q (cách đánh số Kabat) và được kết hợp, dẫn đến việc tạo ra C323.C1.

Ba thay thế ưa nước được mô tả ở trên (Y31H, F54Y và Y99K) được bổ sung vào C323.C1, tạo ra khuôn Fab được sử dụng cho chu trình cuối cùng của việc ngẫu nhiên hóa CDR bằng cách sử dụng đột biến trên cơ sở codon NNK. Các đột biến CDR có lợi được kết hợp trong một thư viện cho phép tất cả các đột biến có lợi được kết hợp ngẫu nhiên hoặc đột biến ngược thành trình tự kiểu hoang. Quá trình này xác định một biến thể có ái lực cao được gọi là CB3. CB3 chứa các thay thế gốc CDR bổ sung: HCDR1: G27H, HCDR2: G50D, I53A, D55G, T56S, A57P; LCDR1: K27aH, H34A, LCDR3: L95Q (cách đánh số Kabat).

Việc sử dụng CB3 làm khuôn, các thay đổi CDR bổ sung được thực hiện để khôi phục các gốc cụ thể về dạng đồng nhất dòng mầm IGKV3-20 của người. Một gốc trong LCDR1: N29S và năm gốc trong LCDR2: A50G, T51A, R52S, T53S, P55A được khôi phục đồng thời với tác động tối thiểu đến các chức năng của kháng thể. Điều này tạo ra phân tử cuối cùng được gọi là Cb3f.

Một vài biến thể của CB3f được tạo ra, bao gồm (1) isotyp IgG4 gồm HC của SEQ ID NO: 35 và LC của SEQ ID NO: 39; (2) isotyp IgG1 gồm HC của SEQ ID NO: 50 và LC của SEQ ID NO: 39, và (3) kháng thể vô hiệu tác động IgG1 gồm HC của SEQ ID NO: 52 và LC của SEQ ID NO: 39. Trừ khi được quy định khác, “CB3f” để chỉ isotyp IgG4 gồm HC của SEQ ID NO: 35 và LC của SEQ ID NO: 39.

Các FIG.1A-1B thể hiện profin kỵ nước bề mặt được cải thiện của CB3f so với kháng thể C323 bố mẹ. Thời gian lưu của CB3f trên cột HIC đã giảm hơn hai lần khi so sánh với kháng thể C323 bố mẹ. Đồng thời, hiệu giá kháng thể CB3f từ biểu hiện CHO thoáng qua đã tăng hơn hai lần khi so sánh với hiệu giá kháng thể C323 bố mẹ.

Fig. 2 thể hiện việc gắn kết với CD19 người được cải thiện nhờ các kháng thể được thiết kế ái lực CB3 và CB3f, khi được so sánh với C323 và C323.C1, trong thử nghiệm ELISA. Thử nghiệm ELISA được thực hiện như sau. Đĩa vi chuẩn 96 giếng được phủ qua đêm ở 4°C bằng cách sử dụng 50µL/giếng kháng thể đa dòng của dê kháng kappa người được pha loãng thành 5 µg/mL trong nước muối đệm phosphat (PBS). Sau khi ủ qua đêm, đĩa được hút và phong bế bằng cách sử dụng 200 µL đệm casein trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Đĩa được rửa ba lần bằng PBST (PBS với 0,1% Tween). Kháng thể kháng CD19 người được pha loãng đến nồng độ 5 µg/mL trong PBS casein và 50 µL được bổ sung vào mỗi cột của đĩa được phong bế bằng casein được phủ kháng kappa người trong 1 giờ ở 37°C. Đĩa này được rửa ba lần bằng PBST. protein miễn ngoại bào CD19 người được biotiny hóa được pha loãng theo chuỗi từ 20 µg/mL đến 9 ng/mL và 50 µL được bổ sung vào các đĩa và được ủ trong 1 giờ ở 37°C. Đĩa này được rửa ba lần bằng cách sử dụng PBST và sau đó được chuyển vào cốc mở chứa 1 lit PBST và được ủ trong khi khuấy qua đêm (khoảng 16 giờ) ở 37°C. Dung dịch đệm rửa được hút ra và 50 µL thể liên hợp

neutravidin phosphatase kiềm được pha loãng 1:1000 trong đệm casein được bổ sung và được ủ trong 1 giờ ở 37°C. Đĩa này được rửa ba lần bằng cách sử dụng PBS 0,1% Tween. 50 µL chất AMP-PMP được pha loãng 1:35 trong nước khử ion được bổ sung và độ hấp thụ ở 560 nm được đọc trên máy đọc đĩa Spectramax.

Như được thể hiện dưới đây, CB3f thể hiện ái lực cao trong việc gắn kết với tế bào CHO biểu hiện CD19 người và bất ngờ đạt được sự gắn kết với tế bào CHO biểu hiện CD19 khỉ cynomolgus. CB3f có độ tương đồng lần lượt 92% và 96% với dòng mầm IGHV1-69 và IGKV3-20 của người. Do đó kháng thể kháng CD19 người CB3f có ái lực cao, tính kỵ nước thấp, và tỷ lệ % đồng nhất cao với dòng mầm của người, tức là, nguy cơ sinh miễn dịch thấp.

Kháng thể kháng CD19 người được mô tả ở đây, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, CB3f, có thể được biểu hiện ở dòng tế bào động vật có vú chẳng hạn HEK293 hoặc CHO, 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 được xác định trước tối ưu hoặc hệ vector đơn 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 các kỹ thuật thường được sử dụng. Việc tinh chế kháng thể, sau các bước sắc ký này, có thể đạt được giá trị lớn hơn 99,0% (monome).

Ví dụ 2. Mô tả đặc điểm của kháng thể kháng CD19 người.

Ái lực gắn kết với CD19 người

Ái lực liên kết cân bằng pha dung dịch của mAb kháng CD19 người Cb3f với CD19 của người và CD19 của khỉ cynomolgus được liên kết với màng được biểu hiện ổn định trên tế bào CHO được đo bằng thử nghiệm chuẩn độ cân bằng dung dịch MSD (MSD-SET) ở 37°C. Ngoài ra, ái lực đơn hóa trị và động học của mảnh CB3f Fab liên kết với CD19 được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) ở 37°C.

Thiết bị MSD SI6000 (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) được sử dụng để đọc các đĩa MSD. Các đĩa thử nghiệm MSD được chuẩn bị như sau. Đĩa 96 giếng đa dãy (Meso Scale Discovery, P/N L15XA-3) được phủ qua đêm ở 4°C bằng dung dịch 1 µg/mL của

kháng thể dê bất giữ kháng Fc người (Jackson ImmunoResearch, P/N 109-005-098) trong PBS. Các đĩa được rửa 3X trong TBS + 0,1% Tween-20 (TBST) sau khi phủ.

Tế bào CHO biểu hiện ổn định tế bào CD19 của người và khỉ cynomolgus được cố định trong 1% paraformaldehyt trong PBS trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng. Paraformaldehyt được loại bỏ bằng cách rửa bằng PBS, và tế bào được bảo quản ở 4°C trong 1% chất phong bế A (được pha loãng từ 3% chất phong bế A, Meso Scale Discovery, P/N R93AA-1) với 0,05% (khối lượng/thể tích) natri azit.

Để đo ái lực CD19 người, các mẫu được chuẩn bị thành hai mẫu giống nhau với nồng độ kháng thể cố định là 400 pM, 80 pM, 16 pM và 3,2 pM. Để đo ái lực CD19 khỉ Cynomolgus, các mẫu được chuẩn bị thành hai mẫu giống nhau với nồng độ kháng thể cố định là 10 nM, 2 nM, 400 pM, và 80 pM. Các tế bào CD19 CHO người được cố định được tạo viên bằng cách ly tâm và huyền phù lại trong dung dịch 3% chất phong bế A ở 22×10^6 tế bào/mL. Các tế bào CD19 CHO khỉ Cynomolgus được cố định được tạo viên bằng cách ly tâm và huyền phù lại trong dung dịch 3% chất phong bế A ở 200×10^6 tế bào/mL. Tế bào được pha loãng theo chuỗi 2,5 lần trong đĩa 96 giếng đáy hình nón trong 3% chất phong bế A xuống khoảng 900 tế bào/mL đối với CD19 người và 8400 tế bào/mL đối với CD19 khỉ cynomolgus trong tổng 12 mẫu pha loãng tế bào mỗi loại. Chúng được trộn 1: 1 với các dung dịch pha loãng kháng thể đã chuẩn bị trước đó. Đối với CD19 người, nồng độ kháng thể cuối cùng là 200 pM, 40 pM, 8 pM và 1,6 pM, và độ pha loãng tế bào cuối cùng là 11×10^6 tế bào / mL xuống khoảng 450 tế bào/mL. Đối với CD19 khỉ cynomolgus, nồng độ kháng thể cuối cùng là 5 nM, 1 nM, 200 pM và 40 pM, và độ pha loãng tế bào cuối cùng là 100×10^6 tế bào/mL xuống còn khoảng 4200 tế bào/mL. Đĩa được ủ trên máy lắc đĩa ở 37°C trong 3-4 ngày đối với CD19 người và 2 ngày đối với CD19 khỉ cynomolgus để cho phép gắn kết đến trạng thái cân bằng.

Sau khi ủ, tế bào được tạo viên bằng cách ly tâm. Một trăm microlit dịch nổi được làm trong từ đĩa được chuyển sang đĩa MSD đã chuẩn bị và ủ trên máy lắc đĩa ở nhiệt độ phòng trong 60 phút. Sau khi ủ, đĩa được rửa 3X bằng TBST, sau đó 100 μ L kháng thể dê sơ cấp kháng IgG người được biotinyl hóa nồng độ 1 μ g/mL (Southern Biotech, Catalog

2010-08) trong 1% chất phong bế A được thêm vào tất cả các giếng. Kháng thể dê sơ cấp kháng IgG người được biotinyl hóa 1 $\mu\text{g/mL}$ (Southern Biotech, Catalog 2010-08) trong 1% chất phong bế A được bổ sung vào tất cả các giếng. Đĩa này được ủ trên máy lắc đĩa ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút. Đĩa được rửa 3X bằng TBST, sau đó 100 μL SULFO-TAG streptavidin 1 $\mu\text{g/mL}$ (Meso Scale Discovery, P/N R32AD-1) trong 1% chất phong bế A được bổ sung vào tất cả các giếng. Đĩa này được ủ trên máy lắc đĩa ở nhiệt độ trong phòng trong 60 phút. Đĩa được rửa 3x bằng TBST, sau đó dịch đệm đọc 1X T (Meso Scale Discovery, P/NR92TC-1) được bổ sung ngay trước khi đọc đĩa. Hằng số phân ly (K_D) và hệ số nhân ít chung nhất (LCM) để giải thích cho nồng độ kháng nguyên chưa biết trên tế bào phù hợp toàn cầu từ dữ liệu MSD-SET đến phương trình liên kết cân bằng (xem Darling and Brault, 2005, Kinetic Exclusion Assay Technology: Characterization of Molecular Interactions. Assay and Drug Development Technologies 2: 647–657) sử dụng hồi quy phi tuyến tính trong GraphPad Prism.

Thiết bị Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences), chất phản ứng và phần mềm đánh giá Biacore T200 Ver 3.1 được sử dụng để phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt của CD19 người, chuột và khỉ cynomolgus liên kết với mảnh Fab của Cb3f. Các protein CD19-Fc tái tổ hợp được mua từ Systems R&D. Chip cảm biến protein A (chip GE protein A P / N 2912755) được sử dụng. Dung dịch đệm chạy mẫu là 1X HBS-EP+ (Teknova P/N H8022), và nhiệt độ chạy mẫu là 37°C.

Các protein dung hợp CD19 Fc được pha loãng đến 3 $\mu\text{g/mL}$ trong dung dịch đệm chạy mẫu, và khoảng 60 RU mỗi protein của người, khỉ cynomolgus và chuột được bắt giữ trong các tế bào dòng chảy (Fc) 2, 3 và 4, tương ứng. Mảnh CB3f Fab được pha loãng đến 1000 nM trong dung dịch đệm chạy mẫu và pha loãng năm lần theo chuỗi trong dung dịch đệm chạy mẫu đến 1,6 nM để tổng 5 dịch pha loãng. Fab hoặc dịch trống chứa chất đệm được tiêm 50 μL /phút trong 300 giây sau đó là pha phân ly 900 giây. Sự tái sinh được thực hiện bằng cách tiêm 10 mM glyxin độ pH=1,5 trong 30 giây ở 50 μL /phút qua tất cả các Fc. Dữ liệu trừ tham chiếu được thu thập dưới dạng Fc2-Fc1, Fc3-Fc1 và Fc4-Fc1, sau đó dữ liệu trừ tham chiếu được trừ đi để trống. Tỷ lệ kết hợp (k_{on}) và tỷ lệ phân ly (k) được

làm phù hợp bằng cách sử dụng mô hình “Gắn kết 1: 1”. Ái lực (K_D) được tính từ động lực gắn kết theo hệ thức: $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$.

CB3f gắn kết với CD19 người và khỉ cynomolgus được biểu hiện trên các tế bào CHO với ái lực (K_D) lần lượt là 3,35 pM và 45,2 pM (bảng 1).

Mảnh Fab của CB3f gắn kết với CD19 người với ái lực là $3,20 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, tỷ lệ phân ly (k_{off}) là $2,35 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, và ái lực (K_D) là 76,8 pM (bảng 2). Mảnh Fab của CB3f gắn kết với CD19 khỉ cynomolgus với ái lực là $1,04 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, tỷ lệ phân ly (k_{off}) là $9,78 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, và ái lực (K_D) là 94,5 nM (bảng 2). Không gắn kết với CD19 chuột được quan sát ở nồng độ Fab 1 μM .

Bảng 1: Gắn kết *in vitro* của CB3f với tế bào CHO được cố định biểu hiện CD19 người hoặc khỉ cynomolgus.

[Được đo bằng MSD-SET ở 37°C. Kết quả được báo cáo là trung bình hình học của K_D từ 3 lần lặp lại độc lập. Sai số ước lượng được tính bằng giá trị trung bình hình học x độ lệch chuẩn $\log_{10} K_D \times \ln 10$]

Loài	Ái lực mAb (pM)
CD19 người	$3,35 \pm 0,56$
CD19 khỉ Cynomolgus	$45,2 \pm 2,8$

Bảng 2: Thông số gắn kết *in vitro* của mảnh Fab của CB3f với protein dung hợp CD19 Fc người, khỉ cynomolgus, và chuột.

[Được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) ở 37°C. Các kết quả được thông báo là giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn của 3 lần lặp lại độc lập.]

Loài	Tỷ lệ kết hợp Fab (k_{on}) ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1} \times 10^6$)	Tỷ lệ phân ly Fab (k_{off}) ($\text{s}^{-1} \times 10^{-4}$)	Ái lực Fab (K_D) (pM)
CD19 người	$3,20 \pm 1,15$	$2,35 \pm 0,37$	$76,8 \pm 16,0$
CD19 khỉ Cynomolgus	$1,04 \pm 0,03$	978 ± 79	$94,500 \pm 7,900$
CD19 chuột nhắt	Không quan sát có sự gắn kết ở nồng độ Fab 1 μM		

Độ ổn định

Độ ổn định của CB3f được đánh giá ở nồng độ cao (khoảng 100 mg/mL) trong dung dịch đệm histidin 5 mM (độ pH=6,0) với tá dược. Các mẫu cô đặc được ủ trong thời gian 4 tuần ở 5°C và 35°C. Sau khi ủ, các mẫu được phân tích phần trăm của phân tử khối lượng cao (% HMW) bằng sắc ký loại trừ kích thước (SEC), để phân mảnh bằng điện di mao quản (CE-SDS), và để cải biến hóa học (ví dụ như khử amit, đồng phân hóa hoặc oxy hóa) bằng cách lập bản đồ peptit LC-MS. Sau 4 tuần ở 35°C, CB3f thể hiện $\Delta\%$ HMW là 0,5%, $\Delta\%$ các mảnh là 0,6%, và không cải biến hóa học CDR lớn hơn 0,2%.

Độ ổn định đông/rã đông trong cùng điều kiện được đánh giá bằng cách sử dụng 3 chu kỳ nhiệt độ chậm, được kiểm soát lặp lại, mô phỏng các điều kiện đông lạnh/rã đông của lượng lớn dược chất dạng khối được đặt ở -70°C. CB3f thể hiện $\Delta\%$ HMW là 1,9% được đo bằng SEC sau 3 chu kỳ đông lạnh-rã đông. Các tá dược khác có thể làm giảm thêm việc gia tăng % HMW (dữ liệu chưa được hiển thị).

Những kết quả này cho thấy CB3f có độ ổn định vật lý và hóa học tốt.

Độ tan

Độ tan được đánh giá bằng cách cô 100mg CB3f với thiết bị lọc ly tâm ngưỡng khối lượng phân tử 30 kDa (ví dụ, Amicon U.C. filters, Millipore, catalog # UFC903024) đến thể tích khoảng 0,5 mL. Nồng độ cuối cùng của mẫu được đo bằng độ hấp thụ UV ở bước sóng 280 nm sử dụng máy quang phổ Solo VPE (C Technologies, Inc).

CB3f thể hiện độ tan lớn hơn hoặc bằng 183 mg/mL trong dung dịch đệm histidin 5 mM độ pH=6 và lớn hơn hoặc bằng 170 mg/mL trong PBS (nước muối đệm phosphat) độ pH=7,4. Các kết quả này cho thấy CB3f thể hiện độ tan cao.

Độ nhớt

Độ nhớt của CB3f được phân tích ở 15°C ở nồng độ xấp xỉ 125 mg/mL trong histidin 5 mM ở độ pH=6,0 với các tá dược khác nhau. Việc đo độ nhớt được thực hiện bằng thiết bị VROC Initium (RheoSense). CB3f thể hiện độ nhớt là 14,2 cP ở 131 mg/mL trong histidin 5mM ở độ pH=6 + 280mM mannitol, 9,5 cP trong histidin 5mM ở độ pH=6,0 +

natri clorua 150 mM, và 6,1 cP Độ nhớt trong histidin 5mM độ pH=6,0 + arginin 280 mM. Những kết quả này chỉ ra rằng CB3f có độ nhớt thấp, có thể cho phép dùng theo liều nồng độ cao.

Dược động học (PK)

Đặc tính PK của CB3f được nghiên cứu ở khỉ cynomolgus sau khi tiêm dưới da một liều 0,03, 0,3, 1 và 10 mg/kg CB3f, hoặc tiêm tĩnh mạch một liều 1 mg/kg Cb3f. CB3f cho thấy PK tuyến tính trên phạm vi liều tiêm dưới da được khảo sát, với thời gian bán hủy cuối ($T_{1/2}$) dao động từ 182 đến 301 giờ. $T_{1/2}$ sau khi tiêm tĩnh mạch liều lớn duy nhất 1 mg/kg CB3f là 324 giờ.

Theo báo cáo, obexelimab có thời gian $T_{1/2}$ trung bình là $3,5 \pm 1,0$ ngày, tương đương với 60-108 giờ (Jaraczewska-Baumann, et al., European League Against Rheumatism (EULAR) 2015 Annual Meeting Poster: *A Phase 1b/2a Study of the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of XmAb®5871 in Patients with Rheumatoid Arthritis*, June 12, 2015, sẵn có tại <https://investors.xencor.com/static-files/0017dcf1-deb2-46eb-93ff-90ba164ec50c>). Vì thế, CB3f có $T_{1/2}$ tốt hơn obexelimab.

Ví dụ 3. Mô tả đặc điểm chức năng *in vitro* của kháng thể kháng CD19 người.

Sự ức chế tăng sinh tế bào B in vitro bởi mAb kháng CD19 người CB3f.

Khả năng của mAb kháng CD19 người CB3f trong việc ức chế tăng sinh của tế bào B người sơ cấp được thử nghiệm trong thử nghiệm tăng sinh tế bào B *in vitro*.

Tế bào B người sơ cấp được tách từ PBMC người hiến tặng khỏe mạnh bằng cách chọn lọc âm tính sử dụng kit phân lập tế bào B (Stemcell Technologies). Tế bào B sơ cấp của người được tái huyền phù ở mật độ 1×10^6 tế bào/mL và được nuôi cấy ở 37°C trong các đĩa polystyren 96 giếng đáy chữ u trong môi trường hoàn chỉnh (RPMI-1640 chứa 10% huyết thanh thai bò, 1x MEM-axit amin không thiết yếu, 1 mM Natri pyruvat, dung dịch 1x Penicillin-Streptomycin (tất cả từ Corning) và 1x Glutamax (Gibco), 0,1% β -mercaptoetanol (Life Technologies). Các tế bào được xử lý trước bằng kháng thể CD19 kháng người trong 1 giờ và được kích thích bằng IgM chuột kháng người (2 μ g/mL-

mAb kháng CD19 người CB3f ức chế sự tăng sinh của tế bào B người sơ cấp theo cách phụ thuộc liều lượng, trong khi đối chứng Isotyp không chứng tỏ sự ức chế ở nồng độ thử nghiệm bất kỳ (FIG. 3). Chức năng ức chế của CB3f được thử nghiệm bằng cách sử dụng tế bào B thu được từ 12 người hiến tặng khác nhau, và giá trị IC_{50} trung bình đối với CB3f là 0,007 nM (bảng 3). Dữ liệu thể hiện rằng mAb kháng CD19 người CB3f có thể ức chế sự tăng sinh của tế bào B người sơ cấp theo cách phụ thuộc liều lượng, trong khi sự tăng sinh tế bào B không bị ảnh hưởng bởi kháng thể đối chứng isotyp.

	Giá trị IC ₅₀ (nM)
Người hiến tặng 1	0,006
Người hiến tặng 2	0,009
Người hiến tặng 3	0,003
Người hiến tặng 4	0,006
Người hiến tặng 5	0,004
Người hiến tặng 6	0,003
Người hiến tặng 7	0,003
Người hiến tặng 8	0,005
Người hiến tặng 9	0,005
Người hiến tặng 10	0,028
Người hiến tặng 11	0,004
Người hiến tặng 12	0,005

Trung bình	0,007
------------	-------

Ức chế sự hoạt hóa tế bào B in vitro trong máu toàn phần của người

Khả năng của mAb kháng CD19 người CB3f trong việc ức chế sự hoạt hóa tế bào B người sơ cấp trong máu toàn phần được thử nghiệm trong thử nghiệm *hoạt hóa* máu toàn phần in vitro.

Máu toàn phần người được xử lý EDTA (người hiến tặng khỏe mạnh, Dịch vụ cho người hiến máu bình thường TSRI, San Diego, CA) được nuôi cấy trong đĩa polystyren 96 giếng, đáy hình chữ U và được ủ sơ bộ với CB3f hoặc kháng thể đối chứng isotyp trong 30 phút đến một giờ ở 37 °C và 5% CO₂. 7 nM mỗi kháng thể được sử dụng ở nồng độ cao nhất với sự pha loãng 4 lần và 12 điểm chuẩn độ trong môi trường hoàn chỉnh (RPMI-1640 chứa 10% huyết thanh thai bò, 1x MEM-axit amin không thiết yếu, 1mM natri pyruvat, dung dịch 1x penicillin-streptomycin (đều từ Corning) và 1x Glutamax (Gibco), 0,1% β-mercaptoetanol (Life Technologies). Máu toàn phần được kích thích bằng 2,5 µg/mL phối tử TLR9 trong 24 giờ ở 37 °C và 5% CO₂ (CpG ODN 7909 (InvivoGen, San Diego, CA)). Profin hoạt hóa tế bào B được đo bằng phân tích tế bào theo dòng chảy và dữ liệu được phân tích bằng phần mềm FlowJo.

Phân tích tế bào theo dòng chảy được thực hiện như sau. Máu toàn phần của người đã xử lý và hoạt hóa được ly giải bằng đệm ly giải RBC (Fisherscientific, USA). Tế bào được nhuộm bằng tổ hợp thích hợp của các kháng thể liên hợp với chất nhuộm huỳnh quang trong 30 phút ở 4°C để xác định các dấu hiệu hoạt hóa tế bào B: CD69 BV605 (số lô #310938) từ BioLegend. Các tế bào cũng được nhuộm bằng CD3 FITC (số lô # 300306), CD19 APC (số lô # 363006) tất cả từ BioLegend, CD20 PerCP-Cy5.5 (số lô # 560736) từ BD Pharminogen và thuốc nhuộm khả năng cố định eFluor™ 780 (eBioscience). Ít nhất 25.000-50.000 sự kiện liên quan đến tế bào sống được phân tích cho mỗi mẫu. Các mẫu được lấy trên BD Fortessa X-20 và kết quả được phân tích bằng Phần mềm FlowJo.

mAb kháng CD19 người CB3f ức chế sự hoạt hóa tế bào B người sơ cấp theo cách phụ thuộc liều lượng, được đo bằng việc giảm tế bào B CD69+. Thử nghiệm được thực

hiện bằng cách sử dụng máu thu được từ ba người hiến tặng khác nhau và kết quả đại diện được thể hiện trên Fig. 4. Giá trị IC_{50} trung bình đối với CB3f trong thử nghiệm này là 0,008 nM (Bảng 4). Kháng thể đối chứng isotyp không chứng tỏ sự ức chế biểu hiện CD69 ở nồng độ thử nghiệm bất kỳ. Dữ liệu cho thấy rằng mAb kháng CD19 người CB3f có thể ức chế sự hoạt hóa các tế bào B sơ cấp của người trong máu toàn phần theo cách phụ thuộc vào liều lượng, trong khi sự hoạt hóa tế bào B không bị ảnh hưởng bởi kháng thể đối chứng isotyp.

Bảng 4. Ức chế sự hoạt hóa tế bào B trong máu toàn phần bằng mAb kháng CD19 người CB3f

	Giá trị IC_{50} (nM)
Người hiến tặng 1	0,015
Người hiến tặng 2	0,0006
Người hiến tặng 3	0,008
Trung bình	0,008

Ức chế in vitro sự biệt hóa tế bào B thành nguyên tương bào

Tế bào B nhớ của người được phân lập từ PBMC của người hiến tặng khỏe mạnh bằng cách sử dụng kit phân lập tế bào B nhớ (Miltenyi Biotec). Tế bào B nhớ sơ cấp của người được tái huyền phù ở nồng độ 1×10^6 tế bào/mL và được nuôi cấy ở 37 °C trong đĩa polystyren 96 giếng đáy hình chữ u trong môi trường hoàn chỉnh (RPMI-1640 chứa 10% huyết thanh thai bò, 1x MEM-axit amin không thiết yếu, 1mM natri pyruvat, 1x dung dịch penicilin-streptomycin (tất cả từ Corning) và 1x Glutamax (Gibco), 0,1% β -mercaptoetanol (Life Technologies). Tế bào được xử lý trước với mAb kháng CD19 người CB3f trong 1 giờ và được kích thích bằng 50 ng/mL kháng CD40, 200 ng/mL BAFF, 1 ng/mL IL-2, 100 ng/mL IL-21 (tất cả đều từ R&D) trong 5 ngày. Tế bào được rửa sạch và nhuộm bằng tổ hợp thích hợp của các kháng thể liên hợp với thuốc nhuộm huỳnh quang trong 30 phút ở 4 °C để xác định sự biệt hóa của tế bào B nhớ thành tế bào bạch cầu: CD38 PE, CD3 FITC (cat # 300306), CD19 APC (cat # 363006) đều từ BioLegend, CD20 PerCP-Cy5.5 (cat. # 560736) từ BD Pharminogen và thuốc nhuộm khả thi có khả năng cố định eFluor™ 780,

eBioscience. Ít nhất 25.000-50.000 sự kiện liên quan đến tế bào sống được phân tích cho mỗi mẫu. Các mẫu được lấy trên BD Fortessa X-20 và kết quả được phân tích bằng Phần mềm FlowJo. % nguyên tương bào được xác định là % của tế bào B CD38^{sáng}/CD20^{thấp} B.

mAb kháng CD19 người CB3f ức chế sự biệt hóa tế bào B nhớ sơ cấp của người into nguyên tương bào theo cách phụ thuộc liều lượng (FIG. 5). Thí nghiệm được lặp lại ba lần và dữ liệu đại diện được thể hiện. Kháng thể đối chứng isotyp không chứng tỏ sự ức chế sự biệt hóa nguyên tương bào ở nồng độ thử nghiệm bất kỳ. Dữ liệu cho thấy rằng CB3f có thể ức chế sự biệt hóa tế bào B nhớ sơ cấp của người thành nguyên tương bào theo cách phụ thuộc liều lượng, trong khi sự biệt hóa này không bị ảnh hưởng bởi kháng thể đối chứng isotyp.

mAb CD19 CB3f là mAb không làm suy kiệt và không có hoạt tính trong thử nghiệm CDC và ADCC in vitro.

mAb kháng CD19 người CB3f là kháng thể ức chế tế bào B, được thiết kế để ức chế chức năng tế bào B nhưng không làm suy kiệt tế bào B. Các thử nghiệm *in vitro* được thực hiện để xác nhận CB3f thiếu các hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) và gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), nghĩa là nó không có chức năng làm suy giảm.

Dòng tế bào Wil2-s biểu hiện CD19 và CD20 được sử dụng làm tế bào đích, và dòng tế bào Jurkat biểu hiện FcγRIIIa (V158)-NFAT-Luc chức năng (Eli Lilly and Company) được sử dụng làm dòng tế bào tác động. CB3f được thử nghiệm và kháng thể IgG1 được biết là chất cảm ứng có hiệu lực đã biết của ADCC và CDC được sử dụng làm đối chứng dương tính.

CB3f được pha loãng theo chuỗi trong ba lần bắt đầu ở nồng độ thử nghiệm 10 µg/mL và 1 µg/mL cho xét nghiệm CDC và ADCC, tương ứng. Hợp chất thử nghiệm 50 µL/giếng hoặc dung dịch đậm thử nghiệm được thêm vào đĩa 96 giếng (Costar 3916). Tế bào Wil2-s được pha loãng đến nồng độ 1×10^6 tế bào/mL và thêm 50 µL/giếng vào đĩa. Các đĩa CDC và ADCC được ủ trong 1 giờ ở 37°C. Tiếp theo, tế bào Jurkat V158 được pha loãng đến nồng độ 3×10^6 tế bào/mL và thêm 50 µL/giếng cho đĩa ADCC, hoặc 50

μL /giếng bỏ thể được pha loãng trước từ huyết thanh người (Quidel A113) cho đĩa CDC. Các đĩa CDC được ủ ở 37°C trong 2 giờ sau khi bổ sung $100 \mu\text{L}$ /giếng Cell-Titre Glo (Promega G7571). Các đĩa ADCC được ủ ở 37°C trong 4 giờ sau khi bổ sung $100 \mu\text{L}$ /giếng ONE-Glo (Promega E8130). Thành phần của các đĩa được trộn bằng cách sử dụng máy lắc đĩa ở tốc độ chậm, và tín hiệu phát quang được đọc trên đầu đọc đĩa đa chế độ Envision 11 sử dụng tích hợp 0,2 cps. Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism v8.2.

Kết quả của thử nghiệm CDC và ADCC được thể hiện trên các FIG. 6A-6B (các kết quả tương ứng từ ba lần chạy đĩa độc lập). Tất cả các mức độ đáp ứng được phân loại tương ứng với kháng thể IgG1 đối chứng dương tính. mAb kháng CD19 người CB3f không có hoạt tính CDC (FIG. 6A) lẫn hoạt tính ADCC (FIG. 6B) ở các nồng độ chỉ định.

Tính đặc hiệu của mAb kháng CD19 người gắn kết với tế bào B trong máu toàn phần của người.

mAb kháng CD19 người CB3f là kháng thể ức chế tế bào B, hoạt động bằng cách ức chế chức năng tế bào B. Obexelimab là kháng thể gắn kết với cả CD19 và $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$. Tuy nhiên, sự gắn kết ái lực cao của obexelimab với $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$ có thể dẫn đến việc gắn kết với các loại tế bào khác theo cách độc lập với CD19. Vì thế, tính đặc hiệu gắn kết của obexelimab và mAb kháng CD19 người CB3f được so sánh bằng cách sử dụng thử nghiệm gắn kết máu toàn phần của người.

Máu toàn phần của người đã được xử lý EDTA (Người hiến máu khỏe mạnh, Dịch vụ Người hiến máu Bình thường TSRI, San Diego, CA) được dàn mỏng lên đĩa polystyren 96 giếng và được nhuộm bằng nồng độ khác nhau của Alexa Flour® 647 liên hợp CB3f, Alexa Flour® 647 liên hợp và Alexa Flour® 647 liên hợp isotyp đối chứng cộng với tổ hợp thích hợp của các kháng thể ngoại bào liên hợp với chất nhuộm huỳnh quang để phát hiện quần thể tế bào lympho/bạch cầu hạt. 7 nM mỗi kháng thể được sử dụng làm nồng độ cao nhất với độ pha loãng 3 lần và chuẩn độ 8 điểm trong DPBS 1x không có Ca^{2+} , không có Mg^{2+} (nước muối đệm phosphat Dulbecco (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) được bổ sung với 2% huyết thanh thai bò được (bất hoạt FBS-nhiệt) đều từ Corning®.

Hỗn hợp gồm CD20 PerCP-Cy5.5 (cat # 560736), CD45 BV421 (cat # 563879), CD66 FITC (cat # 555724) đều từ BD Biosciences. CD3 BV605 (cat # 317322), CD11b PE-Cy7 (cat # 101216) đều từ BioLegend và thuốc nhuộm khả thi có khả năng cố định eFluor™ 780, (cat # 65-0865-14) từ eBioscience. Máu toàn phần cộng kháng thể được nhuộm trong 30 phút ở 4°C trong tối. Tế bào chết được loại trừ bằng thuốc nhuộm khả thi và ít nhất 25.000-50.000 sự kiện liên quan đến tế bào sống được phân tích. Các mẫu được lấy trên BD Fortessa X-20 và kết quả được phân tích bằng Phần mềm FlowJo.

Phân tích tế bào theo dòng chảy chứng tỏ rằng CB3f gắn kết riêng với tế bào B trong máu toàn phần của người ở tất cả các nồng độ thử nghiệm (FIG. 7). Obexelimab cho thấy sự liên kết với tế bào B của người cũng như quần thể tế bào âm tính với CD20 (tức là không phải tế bào B), biểu hiện CD66 và CD11b và do đó được xác định là bạch cầu trung tính (Fig. 7). Do đó, dữ liệu cho thấy mAb kháng CD19 người CB3f có liên kết đặc hiệu cao với tế bào B của người trong máu toàn phần của người, trong khi obexelimab cho thấy liên kết không đặc hiệu với bạch cầu trung tính của người ngoài việc liên kết tế bào B. Vì bạch cầu trung tính là loại tế bào bạch cầu phong phú nhất ở người, nên sự gắn kết không đặc hiệu với bạch cầu trung tính có thể giải thích cho thời gian bán hủy ngắn của obexelimab được quan sát thấy ở bệnh nhân. Thử nghiệm được lặp lại bằng cách sử dụng máu từ bốn người hiến tặng khác nhau, kết quả đại diện được thể hiện trong Fig. 7.

Thử nghiệm chết theo chương trình in vitro.

Như được mô tả ở trên, obexelimab được thể hiện là làm giảm số lượng tế bào B ở bệnh nhân trong các nghiên cứu lâm sàng (Jaraczewska-Baumann, et al., EULAR 2015 Annual Meeting Poster: *A Phase 1b/2a Study of the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of XmAb®5871 in Patients with Rheumatoid Arthritis*, June 12, 2015).

Khả năng của mAb kháng CD19 người CB3f và obexelimab trong việc cảm ứng sự chết theo chương trình của tế bào B người sơ cấp được thử nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm chết theo chương trình *in vitro* tế bào B. Tế bào B sơ cấp của người được tách từ PBMC người hiến tặng khỏe mạnh bằng việc chọn lọc âm tính sử dụng kit phân lập tế bào

B (Stemcell Technologies). Tế bào B sơ cấp của người được tái huyền phù ở nồng độ 1×10^6 tế bào/mL và được nuôi cấy ở 37 °C trong đĩa polystyren 96 giếng đáy hình chữ u trong môi trường hoàn chỉnh (RPMI-1640 chứa 10% huyết thanh thai bò, 1x MEM-axit amin không thiết yếu, 1mM natri pyruvat, 1x dung dịch penicillin-streptomycin (tất cả từ Corning) và 1x Glutamax (Gibco), 0,1% β -mercaptoetanol (Life Technologies). Tế bào được xử lý bằng các nồng độ chỉ định là CB3f, obexilimab, hoặc kháng thể đối chứng isotyp trong 24 giờ ở 37 °C và 5% CO₂. Sự chết theo chương trình tế bào B được đo bằng đếm tế bào theo dòng bằng cách sử dụng nhuộm Annexin V kết hợp với thuốc nhuộm khả thi. Tế bào được nhuộm bằng tổ hợp thích hợp của các kháng thể liên hợp với chất nhuộm huỳnh quang trong 30 phút ở 4 °C để xác định các dấu chuẩn hoạt hóa tế bào B: CD19 APC (Biolegend), CD20 PerCP-Cy5.5 (BD Pharminogen), Annexin V (Invitrogen) và thuốc nhuộm khả thi có khả năng cố định eFluor™ 780 (eBioscience). Tế bào chết theo chương trình được định nghĩa là tế bào Annexin V⁺ sống. Các mẫu được lấy trên BD Fortessa X-20 và kết quả được phân tích bằng Phần mềm FlowJo.

Thử nghiệm được lặp lại bằng cách sử dụng các tế bào B thu được từ ba người hiến tặng khác nhau và dữ liệu đại diện được thể hiện trong Fig. 8. Obexilimab cảm ứng sự chết theo chương trình của tế bào B theo cách phụ thuộc liều lượng (FIG. 8), mà có thể giải thích việc giảm số lượng tế bào B ở bệnh nhân được quan sát trong các thử nghiệm lâm sàng. Ngược lại, CB3f cảm ứng rất ít hoặc không cảm ứng sự chết theo chương trình của tế bào B người khi được so sánh với đối chứng Isotyp (FIG. 8). Dữ liệu này chỉ ra rằng, trái ngược với obexilimab, mAb kháng CD19 người CB3f không cảm ứng sự chết theo chương trình của tế bào B người sơ cấp *ex vivo*, đề xuất cơ chế hoạt động khác đối với CB3f. Dữ liệu này cũng chỉ ra rằng mAb kháng CD19 người CB3f hoạt động bằng cách ức chế chức năng tế bào B mà không làm suy kiệt tế bào B hoặc giảm đáng kể số lượng tế bào B.

Ví dụ 4. Mô tả đặc điểm chức năng *in vivo* của kháng thể kháng CD19 người.

Các con chuột nhắt NSG cái (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, JAX Labs, Stock #05557) được nhốt 3 con mỗi lồng ở 72° trong chu kỳ 12 giờ sáng:tối và cho phép

dùng thức ăn và nước uống tùy thích (n=33 con). Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) của người được phân lập từ các ống LRS thu được từ ngân hàng máu San Diego (San Diego CA) bằng cách sử dụng các ống điều chế SepMate 50 Ficol theo hướng dẫn của nhà sản xuất (StemCell Technologies, Vancouver, BC). PBMC mới được phân lập được tạo huyền phù trong PBS ở $1,2 \times 10^8$ tế bào/mL và chuột nhất được cấy ghép $100 \mu\text{L}$ huyền phù PBMC vào trong tĩnh mạch vào ngày 0 ($1,2 \times 10^7$ /chuột nhất, n=29); 4 con chuột không được sử dụng PBMC làm đối chứng không cấy ghép. Vào ngày 1, các con chuột nhất được chia thành 3 nhóm phù hợp về khối lượng và được dùng theo liều đối chứng Isotyp IgG4 người hoặc CB3f ở 0,01 hoặc 1,0 mg/kg dưới da ($200 \mu\text{L}$ /chuột nhất, n= 10, 10, và 9 tương ứng). Việc dùng theo liều tiếp tục một lần mỗi tuần trong thời gian còn lại của thử nghiệm. Việc kiểm tra sức khỏe và cân khối lượng cơ thể được thực hiện đều đặn. Máu được thu thập bằng cách cắt đuôi vào các ống mao mạch phủ heparin vào các ngày 6 và 10. Vào ngày 15, máu được thu gom bằng cách đâm thủng tim, trong điều kiện gây mê bằng isofluran, vào các ống EDTA để phân tích FACS và được làm trong bằng cách ly tâm để phân tích huyết tương. Các lá lách được thu hoạch và xử lý thành huyền phù tế bào đơn để phân tích FACS.

Các con chuột được cân trong tủ hút BSL2 và được đánh giá các dấu hiệu lâm sàng về sự kiệt sức 2 đến 3 lần/tuần. Các dấu hiệu lâm sàng thông thường đối với mô hình này là lông xù, cơ thể gù, gầy còm, thờ hoặc cử động khó khăn. Sự thay đổi khối lượng cơ thể được tính dưới dạng phần trăm khối lượng cơ sở của chúng: $(\text{Khối lượng ngày (x)}/\text{Khối lượng ngày 0}) \times 100$.

Máu từ việc chọc lỗ ở tim được thu gom vào các ống được phủ EDTA, làm trong bằng cách ly tâm, và huyết tương thu được được bảo quản ở -80°C để xử lý sau này. Các IgM huyết tương được đo bằng cách sử dụng bảng lập isotyp của người quy mô phát hiện trung bình (Rockville, Maryland) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Thế huyền phù tế bào đơn của lách chuột nhất được sử dụng để phân tích FACS. Các tế bào được cấy lên đĩa 96 giếng và được nhuộm bằng tổ hợp thích hợp của các kháng thể liên hợp với chất nhuộm huỳnh quang trong 30 phút ở 4°C để xác định các dấu hiệu hoạt hóa tế bào B: hCD45-BV421, CD86 BV650, CD3 APC, CD19 FTIC đều từ

BioLegend, CD20 PerCP-Cy5.5 và thuốc nhuộm khả thi có khả năng cố định eFluor™ 780. Ít nhất 250.000 sự kiện liên quan đến tế bào sống được phân tích cho mỗi mẫu. Các mẫu được lấy trên BD Fortessa X-20 và kết quả được phân tích bằng Phần mềm FlowJo.

Dữ liệu được dựng đồ thị và các số liệu thống kê được tính bằng cách sử dụng phần mềm Prism (GraphPad, San Diego, CA). Chênh lệch về khối lượng giữa các nhóm được xác định bằng phương pháp RM-ANOVA 2 chiều với kiểm định hậu kiểm Tukey. Sự chênh lệch về mức IgM huyết tương được xác định bằng phương pháp ANOVA 1 chiều với kiểm định hậu kiểm Tukey và được coi là có ý nghĩa nếu $p < 0.05$.

Tiêm PBMC của người vào chuột nhắt NSG dẫn đến sự cấy ghép rõ rệt của các tế bào B chức năng được đo bằng cách tiết IgM của người vào ngoại vi. IgM ở động vật được điều trị bằng đối chứng Isotyp IgG4 tăng nhanh từ mức không có khả năng phát hiện đến $1,3 \pm 0,1$ và $48,8 \pm 6,2$ $\mu\text{g/mL}$ lần lượt ở các ngày 6 và 10 sau khi cấy ghép. CB3f được dùng theo liều ở mức 0,01 và 1,0 mg/kg/tuần làm giảm đáng kể sự tiết IgM 60% và 78% vào ngày thứ 6 như trên các FIG. 9A-9B ($p < 0,01$ đối với cả hai liều). Giảm 57% IgM tuần hoàn cũng được quan sát thấy vào ngày thứ 10 với liều 1,0 mg/kg/tuần của CB3f ($p < 0,05$). Cân nặng của chuột nhắt không khác biệt giữa các nhóm, cũng như không có chuột nào thể hiện dấu hiệu của GvHD.

Việc hoạt hóa tế bào B người ở chuột nhắt NSG được đo bằng sự biểu hiện của dấu chuẩn hoạt hóa CD86. Như được chứng tỏ trên FIG. 10, việc điều trị bằng mAb kháng CD19 người CB3f giảm biểu hiện của CD86 trên tế bào B người theo cách phụ thuộc liều lượng.

Việc điều trị bằng CB3f làm giảm nhẹ tỷ lệ phần trăm tế bào B lách, có thể là do giảm sự hoạt hóa và tăng sinh của tế bào B. Mặc dù vậy, tế bào B hiện diện trong lách với số lượng hầu như không thay đổi ($> 50\%$ tế bào lách), cho thấy bản chất không làm suy kiệt của mAb kháng CD19 người CB3f (Fig. 11).

Ví dụ 5. Nội bộ hóa các kháng thể kháng CD19 người trong các tế bào B

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được thu thập từ LRS-WBC của những tình nguyện viên khỏe mạnh bằng cách sử dụng phương pháp ly tâm gradien mật độ tiêu chuẩn. Tế bào B sơ cấp của người được phân lập từ PBMC của người hiến tặng khỏe mạnh bằng cách chọn lọc âm tính sử dụng kit phân lập tế bào B. Đối với nghiên cứu nội hóa, các tế bào B được tạo huyền phù lại ở mật độ 4×10^6 tế bào/ mL và 50 μ L được thêm vào mỗi giếng trong đĩa 96 giếng. Mẫu Ig Fc γ người hướng đích F(ab')₂ được đánh dấu (F(ab')₂-TAMRA-QSY7) được sử dụng như một mẫu dò để theo dõi quá trình nội hóa. Kháng thể thử nghiệm được ủ với đầu dò ở 4 °C trong 30 phút để tạo thành phức hợp và 50 μ L được thêm vào tế bào B trong mỗi giếng. Nồng độ cuối cùng của kháng thể thử nghiệm là 2 μ g/mL. Tế bào được ủ trong 24 giờ ở 37 °C trong tủ ấm CO₂. Sau đó, các tế bào được rửa hai lần bằng 2% FBS PBS và được huyền phù lại trong 2% FBS PBS với thuốc nhuộm khả thi (SYTOX Green, Invitrogen). Dữ liệu được thu thập trên BD Fortessa X-20 và được phân tích trong FlowJo.

Cả mAb1 kháng CD19 người (CB3f) và mAb2 kháng CD19 người (C323.C1) đều chứng tỏ khả năng nội bộ hóa trong tế bào B sơ cấp của người sau 24 giờ (Fig. 12). Kháng thể đối chứng isotyp vô hiệu tác động IgG1 được sử dụng làm đối chứng âm tính và không thể hiện sự nội bộ hóa đáng kể bất kỳ khi được chứng tỏ bằng tỷ lệ % thấp của tế bào TAMRA+ (FIG. 12). mAb IgG4 đối chứng âm tính chứng tỏ được sự nội bộ hóa tương đương với mAb kháng CD19 người được thử nghiệm (FIG. 12).

Ví dụ 6. So sánh hiệu quả của kháng thể thay thế kháng CD19 chuột nhất không làm suy kiệt với kháng thể thay thế kháng chuột nhất CD20 làm suy kiệt tế bào B trên mô hình động vật

Hiệu quả in vivo của kháng thể thay thế CD19 không làm suy kiệt và kháng thể thay thế CD20 làm suy kiệt tế bào B ở mô hình chuột nhất CIA

Trong nghiên cứu này, kháng thể thay thế kháng CD19 chuột nhất không làm suy kiệt (Ab thay thế CD19) và kháng thể thay thế kháng CD20 chuột nhất làm suy kiệt tế bào

B (kháng thể thay thế CD20) được thử nghiệm cùng với kháng thể đối chứng isotyp ở mô hình chuột nhất viêm khớp do collagen (CIA) trong mô hình bệnh bán thiết lập (tức là, kháng thể được đưa vào sau khi cảm ứng bệnh nhưng trước khi động vật phát triển điểm số lâm sàng có thể phát hiện được bất kỳ).

Chuột nhất được điều trị bằng đối chứng Isotyp được chủng ngừa với collagen và tá được Freund hoàn chỉnh (CFA) đã phát triển các dấu hiệu viêm khớp quan sát được bắt đầu vào ngày 25, trong khi chuột không có bệnh được điều trị bằng isotyp không có hiện tượng viêm khớp quan sát được trong suốt thử nghiệm (FIG. 13A). Việc điều trị bắt đầu từ ngày 19 với kháng thể thay thế CD20 (10 mg/kg SC, một lần mỗi tuần) đã cải thiện điểm số lâm sàng trung bình, trong khi đó Ab thay thế CD19 (5 mg/kg SC, hai lần mỗi tuần) đã giảm điểm số lâm sàng trung bình nhiều hơn (FIG. 13A). Kháng thể thay thế CD20 không làm giảm đáng kể AUC điểm số lâm sàng so với đối chứng Isotyp (FIG. 13B). Nói cách khác, Ab thay thế CD19 đã giảm đáng kể AUC điểm số lâm sàng so với cả đối chứng Isotyp và kháng thể thay thế CD20 (FIG. 13B). Các kết quả này đề xuất rằng Ab thay thế CD19 có thể giảm độ nghiêm trọng của bệnh lớn hơn kháng thể thay thế CD20 khi được đánh giá bằng AUC điểm số lâm sàng trong mô hình CIA về bệnh viêm khớp ở chuột nhất được thực hiện trong mô hình bán thiết lập.

Hiệu quả in vivo của Ab thay thế CD19 không làm suy kiệt và kháng thể thay thế CD20 làm suy kiệt tế bào B ở mô hình NOD chuột nhất có bệnh đái tháo đường typ 1.

Chủng chuột nhất NOD/ShiLtJ (thường được gọi là không đái tháo đường) là mô hình đa gen đối với bệnh đái tháo đường typ 1 tự miễn (T1D). Bệnh đái tháo đường ở chuột NOD được đặc trưng bởi sự tăng đường huyết và thâm nhập bạch cầu của các đảo tụy. Tỷ lệ mắc bệnh cao nhất ở chuột cái.

Trong nghiên cứu này, Ab thay thế CD19 không làm suy kiệt đã được thử nghiệm cùng với Ab thay thế CD20 làm suy kiệt trong mô hình NOD ở chuột mắc bệnh tiểu đường typ 1 ở chế độ bệnh bán điều trị (tức là, kháng thể được đưa vào ngay trước khi động vật đối chứng bắt đầu phát triển điểm số lâm sàng).

Chuột NOD-LTJ cái không được điều trị, được dùng theo liều với 5 mg/kg/BIW Ab thay thế CD19, hoặc kháng thể thay thế CD20 bắt đầu lúc 12 tuần tuổi. Tất cả các con chuột đều được kiểm tra đường huyết hàng tuần bằng máy đo đường huyết Accu Check Aviva (Roche cat # 06870287001) và que thử (Roche cat # 06908373001 lot # 497064). Những con chuột có mức đường huyết trên 240 mg/dl được coi là mắc bệnh đái tháo đường. Chuột không được điều trị phát triển bệnh đái tháo đường bắt đầu lúc 14 tuần tuổi. Việc điều trị bằng Ab thay thế CD20 (5 mg/kg SC, hai lần mỗi tuần) cho thấy khả năng bảo vệ rất nhẹ khỏi sự tiến triển của bệnh, trong khi CD19 thay thế Ab (5 mg/kg SC, hai lần mỗi tuần) làm chậm và giảm tỷ lệ mắc bệnh tiểu đường (FIG. 14). Các kết quả này đề xuất rằng Ab thay thế CD19 không làm suy kiệt có thể làm chậm và giảm khả năng mắc bệnh đái tháo đường typ 1 ở chuột NOD lớn hơn kháng thể thay thế kháng CD20 làm suy kiệt.

Hiệu quả in vivo của Ab thay thế CD19 không làm suy kiệt và kháng thể thay thế CD20 làm suy kiệt tế bào B ở mô hình EAE ở chuột nhắt.

Bệnh viêm não tủy tự miễn thực nghiệm trên chuột (EAE) đã được sử dụng rộng rãi như một mô hình của các bệnh thoái hóa thần kinh và khử myelin do viêm, chẳng hạn như bệnh đa xơ cứng (MS).

Trong nghiên cứu này, Ab thay thế kháng CD19 không làm suy kiệt được thử nghiệm cùng kháng thể thay thế CD20 làm suy kiệt trong mô hình EAE hủy myelin truyền giảm - tái phát cảm ứng bởi proteolipit protein (PLP) trong mô hình bán điều trị bệnh (tức là, kháng thể được đưa vào sau khi khởi phát bệnh, nhưng trước khi động vật bắt đầu phát triển điểm số lâm sàng phát hiện được bất kỳ).

Chuột SJL cái 9-10 tuần tuổi (Jackson Labs), với thể trọng trung bình là 18-21g được sử dụng cho nghiên cứu này. Chuột được chủng ngừa bằng nhũ tương Hooke Kit™ PLP139-151/CFA (số catalog EK-0120, Hooke Laboratories, Lawrence MA), và 75 ng độc tố ho gà (PTX). Các động vật được phân ngẫu nhiên dựa trên thể trọng vào các nhóm nghiên cứu với 15 con chuột trong mỗi nhóm. Ab thay thế CD19 không làm suy kiệt, kháng thể thay thế CD20 làm suy kiệt hoặc đối chứng isotyp IgG1 chuột nhắt với lượng 5 mg/kg đã được tiêm dưới da hai lần một tuần bắt đầu từ ngày thứ 8. Điểm số EAE được thu thập

hàng ngày với thang điểm 0–6 trong gia số 0,5 đơn vị. Chuột được chết nhân đạo vào ngày 42. Việc điều trị bằng Ab thay thế CD19 không làm suy kiệt làm giảm đáng kể điểm số EAE vào ngày 35-41 so với đối chứng Isotyp; với mức giảm điểm số EAE là 51% vào ngày cuối cùng (FIG. 15). Việc điều trị bằng kháng thể thay thế CD20 làm suy kiệt không chứng tỏ được mức giảm đáng kể về điểm số bệnh so với đối chứng Isotyp ở các thời điểm thử nghiệm (FIG. 15). Các kết quả này đề xuất rằng Ab thay thế CD19 không làm suy kiệt có thể làm giảm mức nghiêm trọng của bệnh lớn hơn kháng thể thay thế CD20 làm suy kiệt khi được đánh giá bởi điểm số lâm sàng ở mô hình EAE về bệnh đa xơ cứng trong mô hình điều trị bán trị liệu.

DANH MỤC TRÌNH TỰ**C323****SEQ ID NO: 1 C323 HCDR1 (North)**

KASGGTFSSY AIS

SEQ ID NO: 2 C323 HCDR2 (North)

GIPIFGTAN

SEQ ID NO: 3 C323 HCDR3 (North)

AREDFGYNYGMDV

SEQ ID NO: 4 C323 LCDR1 (North)

RASQGVNSYYLA

SEQ ID NO: 5 C323 LCDR2 (North)

YATSTRAT

SEQ ID NO: 6 C323 LCDR3 (North)

QHYGNSLFT

SEQ ID NO: 7 C323 HC IgG4-S228P

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAREDFGYNYGMD
VWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRV
ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHY
TQKSLSLSLG

SEQ ID NO: 8 C323 HC IgG4-S228P DNA

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGG
TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGC
TGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCC
CTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGAT
TACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAG
ATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGACTTCGGCTACAAT
TACGGCATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTT
CTACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
GAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
TGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC
GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC
CCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGC
CCACCCTGCCCAGCACCTGAGTTTCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCC
CCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACG
TGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
TCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTG
GCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCC
TCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAG
GTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCC
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
AAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGG
TGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT

SEQ ID NO: 9 Vùng biến đổi HC C323 (VH)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREDFGYNYGMD
VWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 10 C323 HC VH DNA

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGG
TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGC
TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCC
CTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGAT
TACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAG
ATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGACTTCGGCTACAAT
TACGGCATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 11 C323 LC

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQGVNSYYLAWYQQKPGQAPRLLMYATST
RATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQHYGNSLFTFGPGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 12 C323 LC ADN

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGGGTGTTAACAGCTACTACTTAGCCT
GGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATGTATGCTACATC
CACCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTA
CTGTCAGCACTATGGTAACTCACTATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAGGTGG
AGATCAAACGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT
GAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA
TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT
AACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGC

CTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC
TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT
TCAACAGGGGAGAGTGC

SEQ ID NO: 13 Vùng biến đổi C323 LC (VL)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQGVNSYYLAWYQQKPGQAPRLLMYATST
RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGNSLFTFGPGTKVEIK

SEQ ID NO: 14 C323 LC VL ADN

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGGGTGTTAACAGCTACTACTTAGCCT
GGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATGTATGCTACATC
CACCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTA
CTGTCAGCACTATGGTAACTCACTATTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAGGTGG
AGATCAAA

C323.C1

SEQ ID NO: 15 C323.C1 HCDR1 (North)

KASGGTISSYAYS

SEQ ID NO: 16 C323.C1 HCDR2 (North)

GIPIFDTAN

SEQ ID NO: 17 C323.C1 HCDR3 (North)

AREDFGYNYAMDV

SEQ ID NO: 18 C323.C1 LCDR1 (North)

RASQKVNSYYLH

SEQ ID NO: 19 C323.C1 LCDR2 (North)

YATRTRPT

SEQ ID NO: 20 C323.C1 LCDR3 (North)

QHYGQSLFT

SEQ ID NO: 21 C323.C1 HC IgG4-S228P

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTISSYAYSWVRQAPGQGLEWMGGIPI
FDTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDFGYNAM
DVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDPHKPSNTKVDK
RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSLG

SEQ ID NO:22 C323.C1 HC IgG4-S228P ADN

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGG
TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCATTAGCAGCTATGCTTACAG
CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATC
CCTATCTTTGACACAGCAAACACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGA
TTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAG
ATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGACTTCGGCTACAAT
TACGCGATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCCTTGTCACCGTCTCCTCAGCTTC
TACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
GAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
TGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC
GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC
CCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGC
CCACCCTGCCCAGCACCTGAGTTTCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCC

CCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACG
TGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
TCAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTG
GCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCC
TCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAG
GTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCC
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
AAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGG
TGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT

SEQ ID NO: 23 C323.C1 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTISSYAYSWVRQAPGQGLEWMGGIPI
FDTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDFGYNAM
DVWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 24 C323.C1 VH DNA

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGG
TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCATTAGCAGCTATGCTTACAG
CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATC
CCTATCTTTGACACAGCAAACACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGA
TTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAG
ATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGACTTCGGCTACAAT
TACGCGATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCCTTGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 25 C323.C1 LC

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQKVNSYYLHWYQQKPGQAPRLLIYATRTR
PTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGQSLFTFGQGTKVEIKRTV

AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 26 C323.C1 LC ADN

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGGCCAGTCAGAAAGTTAACAGCTACTACTTACAT
TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCTACAA
GAACCAGGCCAACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC
AGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATT
ACTGTCAGCACTATGGTCAGTCACTATTCCTTTTCGGCCAGGGGACCAAGGT
GGAGATCAAACGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG
ATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG
GTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA
GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG
TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
CTTCAACAGGGGAGAGTGC

SEQ ID NO: 27 C323.C1 VL

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQKVNNSYYLHWYQQKPGQAPRLLIYATRTR
PTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGQSLFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 28 C323.C1 VL DNA

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGGCCAGTCAGAAAGTTAACAGCTACTACTTACAT
TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCTACAA
GAACCAGGCCAACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC
AGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATT
ACTGTCAGCACTATGGTCAGTCACTATTCCTTTTCGGCCAGGGGACCAAGGT
GGAGATCAAA

CB3f**SEQ ID NO: 29 CB3f/CB3 HCDR1 (North)**

KASGHTISSYAYS

SEQ ID NO: 30 CB3f/CB3 HCDR2 (North)

DIIPAYGSPN

SEQ ID NO: 31 CB3f/CB3 HCDR3 (North)

AREDFGKNYAMDV

SEQ ID NO: 32 CB3f LCDR1 (North)

RASQHVSSHILA

SEQ ID NO: 33 CB3f LCDR2 (North)

YGASSRAT

SEQ ID NO: 34 CB3f LCDR3 (North)

QHYGQSQFT

SEQ ID NO: 35 CB3f/CB3 HC IgG4-S228P

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGHTISSYAYS WVRQAPGQGLEWMGDIIPA
YGSPNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAREDFGKNYAM
DVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDK
RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV S
NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSLG

SEQ ID NO: 36 CB3f/CB3 HC IgG4-S228P DNA

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGG
TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGACATACCATTAGCAGCTATGCTTACAGC
TGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGACATCATCC
CTGCCTATGGCTCACCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGAT
TACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAG
ATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGACTTCGGCAAGAAT
TACGCGATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCCTTGTCACCGTCTCCTCAGCTTC
TACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC
GAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
TGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC
GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC
CCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGC
CCACCCTGCCCAGCACCTGAGTTTCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCT
CCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACG
TGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
TCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTG
GCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCC
TCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAG
GTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCC
TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
AAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGG
TGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT

SEQ ID NO: 37 CB3f/CB3 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGHTISSYAYSWVRQAPGQGLEWMGDIIPA
YGSPNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDFGKNYAM
DVWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 38 CB3f/CB3 VH DNA

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGG
TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGACATAACCATTAGCAGCTATGCTTACAGC
TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGACATCATCC
CTGCCTATGGCTCACCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGAT
TACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAG
ATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGACTTCGGCAAGAAT
TACGCGATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCCTTGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 39 CB3f LC

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQHVSSHYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGQSQFTFGQGTKVEIKRTV
AAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 40 CB3f LC ADN

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGCATGTTAGCAGCCACTACTTAGCTT
GGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATC
CAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTA
CTGTCAGCACTATGGTCAGTCACAGTTCACCTTCGGCCAGGGGACCAAGGTG
GAGATCAAACGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA
TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT
ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG
GTAACCTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA

GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG
TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
CTTCAACAGGGGAGAGTGC

SEQ ID NO: 41 CB3f VL

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQHVSSHYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGQSQFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 42 CB3f VL DNA

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGCATGTTAGCAGCCACTACTTAGCTT
GGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATC
CAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTA
CTGTCAGCACTATGGTCAGTCACAGTTCACCTTCGGCCAGGGGACCAAGGTG
GAGATCAAA

CB3 (chỉ LC; HC giống với CB3f)

SEQ ID NO: 43 CB3 LCDR1 (North)

RASQHVNSHYLA

SEQ ID NO: 44 CB3 LCDR2 (North)

YATRTRPT

SEQ ID NO: 45 CB3 LCDR3 (North)

QHYGQSQFT

SEQ ID NO: 46 CB3 LC

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQHVNSHYLAWYQQKPGQAPRLLIYATRTR
PTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGQSQFTFGQGTKVEIKRTV

AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 47 CB3 LC ADN

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGCATGTTAACAGCCACTACTTAGCTT
GGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCTACAAG
AACCAGGCCAACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTA
CTGTCAGCACTATGGTCAGTCACAGTTCACTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTG
GAGATCAAACGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA
TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT
ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG
GTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA
GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG
TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
CTTCAACAGGGGAGAGTGC

SEQ ID NO: 48 CB3 VL

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQHVNSHYLAWYQQKPGQAPRLLIYATRTR
PTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGQSQFTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 49 CB3 VL DNA

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGCATGTTAACAGCCACTACTTAGCTT
GGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCTACAAG
AACCAGGCCAACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA
GACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTA
CTGTCAGCACTATGGTCAGTCACAGTTCACTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTG
GAGATCAAA

CB3f/CB3-IgG1**SEQ ID NO: 50 CB3f/CB3 IgG1 HC**

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGHTISSYAYSWVRQAPGQGLEWMGDIIPA
YGSPNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDFGKNYAM
DVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 51 CB3f/CB3 IgG1 HC ADN

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGG
TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGACATAACCATTAGCAGCTATGCTTACAGC
TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGACATCATCC
CTGCCTATGGCTCACCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGAT
TACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAG
ATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGACTTCGGCAAGAAT
TACGCGATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCCTTGTCACCGTCTCCTCAGCTTC
TACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTG
GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT
GACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCG
GCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC
CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTC
ACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT
CCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG
GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA

ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
 AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA
 CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC
 CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
 GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGACGAGCTGACCAAGAACC
 AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT
 GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCCCC
 CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACA
 AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
 TCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

CB3f/CB3-IgG1 vô hiệu tác động

SEQ ID NO: 52 CB3f/CB3 vô hiệu tác động IgG1 HC (LC giống với CB3f/CB3) (các thay đổi so với IgG1 WT được gạch chân)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGHTISSYAYSWVRQAPGQGLEWMGDIIPA
 YGSPNYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREDFGKNYAM
 DVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVSSVSHE
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 53 CB3f/CB3 vô hiệu tác động IgG1 HC ADN (LC giống với CB3f/CB3)

CAGGTGCAACTTGTCCAAAGCGGAGCTGAGGTTAAGAAACCAGGTTCATCTG
 TGAAGGTGTCATGTAAGGCAAGCGGCCACACCATTTCATCTTACGCATACTCC
 TGGGTTCGACAAGCTCCAGGCCAGGGATTGGAATGGATGGGAGACATAATCC
 CAGCATACGGATCACCTAACTACGCACAGAAGTTTCAGGGGAGAGTGACAAT

TACAGCCGACGAGTCTACTAGCACTGCTTACATGGAGTTGTCTTCACTTCGGT
 CAGAGGATACAGCAGTTTACTATTGTGCCAGGGAGGATTTCTGGGAAAAATTA
 TGCTATGGATGTATGGGGTCAGGGCACCCCTGGTTACTGTATCATCTGCTAGCA
 CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
 GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
 CGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGC
 TGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
 CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG
 CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC
 ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCC
 TCTTCCCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
 ACATGCGTGGTGGTGTCCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT
 GGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
 AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA
 AGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC
 CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA
 CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAAG
 TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA
 GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGT
 GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATTCCAAGCTCACCGTGGACAAGA
 GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT
 GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAAA

C323.C1-IgG1 vô hiệu tác động

SEQ ID NO: 54 C323.C1 vô hiệu tác động IgG1 HC (LC giống với CB3.C1) (changes from IgG1 WT được gạch chân)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTISSYAYSWVRQAPGQGLEWMGGIPI
 FDTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREDFGYNYAM
 DVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW

NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKV
RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVSVSHE
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVNHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 55 C323.C1 vô hiệu tác động IgG1 HC ADN

CAGGTTTCAGCTCGTGCAAAGTGGAGCTGAGGTGAAAAACCTGGTTCTAGCG
 TCAAGGTCTCTTGTAAGGCCTCTGGGGGCACTATAAGCTCTTATGCTTATAGT
 TGGGTGCGCCAGGCCCCAGGACAGGGCTTGGAATGGATGGGCGGCATAATAC
 CCATATTCGACACAGCCAACTACGCTCAAAAATTTTCAGGGGAGAGTGACTAT
 AACTGCAGACGAGAGCACTAGCACCGCTTACATGGAGTTGAGTAGTCTCCGC
 AGTGAAGACACAGCCGTCTATTATTGCGCTAGGGAGGACTTTGGTTACAAC
 ACGCCATGGATGTCTGGGGCCAGGGTACTTTGGTCACCGTATCTAGTGCTAGC
 ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG
 GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
 ACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG
 CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
 TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA
 GCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCA
 CACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTC
 CTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT
 CACATGCGTGGTGGTGTCCGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC
 TGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
 GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC
 AAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT
 CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
 ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAA

GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCG
 TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATTCCAAGCTCACCGTGGACAAG
 AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC
 TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAAA

SEQ ID NO: 56 isoform 1 CD19 người (trình tự tham chiếu NCBI: NP_001171569.1)

MPPPRLLFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRE
 SPLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPG
 WTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDR
 PEIWEGEPPCLPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVH
 PKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNL TMSFH
 LEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKR
 MTDPTRRFFKVTTPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYG
 NPSSDVQADGALGSRSPPGVGPEEEEEGEGYEEDSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQ
 DGSGYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVAR TMDFLSPHGSAWDPS
 REATSLAGSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGPDP
 AWGGGGRMGTWSTR

SEQ ID NO: 57 isoform 2 CD19 người (trình tự tham chiếu NCBI: NP_001761.3)

MPPPRLLFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRE
 SPLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPG
 WTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDR
 PEIWEGEPPCLPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVH
 PKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNL TMSFH
 LEITARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIFCLCSLVGILHLQRALVLRKRKR
 MTDPTRRFFKVTTPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTSGLGRAQRWAAGLGGTAPSYG
 NPSSDVQADGALGSRSPPGVGPEEEEEGEGYEEDSEEDSEFYENDSNLGQDQLSQ
 DGSGYENPEDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQPVAR TMDFLSPHGSAWDPS

REATSLGSQSYEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENMDNPDGPDPA
WGGGGRMGTWSTR

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể gắn kết CD19 người, trong đó kháng thể này bao gồm vùng thay đổi chuỗi nặng (VH) và vùng thay đổi chuỗi nhẹ (VL), trong đó VH này bao gồm vùng xác định tính hỗ trợ chuỗi nặng HCDR1, HCDR2, và HCDR3, và VL bao gồm vùng xác định tính hỗ trợ chuỗi nhẹ LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó

HCDR1 gồm có SEQ ID NO: 29,

HCDR2 gồm có SEQ ID NO: 30,

HCDR3 gồm có SEQ ID NO: 31,

LCDR1 gồm có SEQ ID NO: 32,

LCDR2 gồm có SEQ ID NO: 33, và

LCDR3 gồm có SEQ ID NO: 34.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó VH gồm có SEQ ID NO: 37 và VL gồm có SEQ ID NO: 41.
3. Kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này bao gồm chuỗi nặng (HC) gồm có SEQ ID NO: 35 và chuỗi nhẹ (LC) gồm có SEQ ID NO: 39.
4. Kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này bao gồm HC gồm có SEQ ID NO: 52 và LC gồm có SEQ ID NO: 39.
5. Kháng thể gắn kết CD19 người, trong đó kháng thể này bao gồm VH và VL, trong đó VH bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3, và VL bao gồm LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó

HCDR1 gồm có SEQ ID NO: 29,

HCDR2 gồm có SEQ ID NO: 30,

HCDR3 gồm có SEQ ID NO: 31,

LCDR1 gồm có SEQ ID NO: 43,

LCDR2 gồm có SEQ ID NO: 44, và

LCDR3 gồm có SEQ ID NO: 45.

6. Kháng thể theo điểm 5, trong đó VH gồm có SEQ ID NO: 37 và VL gồm có SEQ ID NO: 48.
7. Kháng thể theo điểm 5 hoặc 6, trong đó kháng thể này bao gồm HC gồm có SEQ ID NO: 35 và LC gồm có SEQ ID NO: 46.
8. Kháng thể theo điểm 5 hoặc 6, trong đó kháng thể này bao gồm HC gồm có SEQ ID NO: 52 và LC gồm có SEQ ID NO: 46.
9. Kháng thể gắn kết CD19 người, trong đó kháng thể này bao gồm VH và VL, trong đó VH gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3, và VL gồm LCDR1, LCDR2, và LCDR3, trong đó

HCDR1 gồm có SEQ ID NO: 15,

HCDR2 gồm có SEQ ID NO: 16,

HCDR3 gồm có SEQ ID NO: 17,

LCDR1 gồm có SEQ ID NO: 18,

LCDR2 gồm có SEQ ID NO: 19, và

LCDR3 gồm có SEQ ID NO: 20.

10. Kháng thể theo điểm 9, trong đó VH gồm có SEQ ID NO: 23 và VL gồm có SEQ ID NO: 27.
11. Kháng thể theo điểm 9 hoặc 10, trong đó kháng thể này bao gồm HC gồm có SEQ ID NO: 21 và LC gồm có SEQ ID NO: 25.
12. Kháng thể theo điểm 9 hoặc 10, trong đó kháng thể này bao gồm HC gồm có SEQ ID NO: 54 và LC gồm có SEQ ID NO: 25.
13. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó kháng thể này là kháng thể không làm suy kiệt.
14. Axit nucleic chứa trình tự mã hóa SEQ ID NO: 35, 52, 39, 46, 21, 54, hoặc 25.
15. Vector chứa axit nucleic theo điểm 14.

16. Vector theo điểm 15, trong đó vector này chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa SEQ ID NO: 35 hoặc 52, và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa SEQ ID NO: 39 hoặc 46.
17. Vector theo điểm 15, trong đó vector này chứa trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa SEQ ID NO: 21 hoặc 54, và trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa SEQ ID NO: 25.
18. Chế phẩm chứa vector thứ nhất bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 35 hoặc 52, và vector thứ hai bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 39 hoặc 46.
19. Chế phẩm chứa vector thứ nhất bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 21 hoặc 54, và vector thứ hai bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 25.
20. Tế bào chứa vector theo điểm 16 hoặc 17.
21. Tế bào chứa vector thứ nhất bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 35 hoặc 52, và vector thứ hai bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 39 hoặc 46.
22. Tế bào chứa vector thứ nhất gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 21 hoặc 54, và vector thứ hai gồm trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 25.
23. Tế bào theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 20 đến 22, trong đó tế bào là tế bào động vật có vú.
24. Quy trình sản xuất kháng thể bao gồm bước nuôi cấy tế bào theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 20 đến 23 trong các điều kiện sao cho kháng thể được biểu hiện và thu hồi kháng thể được biểu hiện này từ môi trường nuôi cấy.
25. Kháng thể được sản xuất bằng quy trình theo điểm 24.
26. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13 hoặc 25, và tá dược, chất pha loãng hoặc chất mang dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eli Lilly and Company
 <120> KHÁNG THỂ KHÁNG CD19 NGƯỜI, DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT KHÁNG THỂ NÀY
 <130> X22706
 <150> 62/983,093
 <151> 2020-02-28
 <160> 57
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 1
 Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 2
 Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 3
 Ala Arg Glu Asp Phe Gly Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 4
 Arg Ala Ser Gln Gly Val Asn Ser Tyr Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 5
 Tyr Ala Thr Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 6
 Gln His Tyr Gly Asn Ser Leu Phe Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 7
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Asp Phe Gly Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu

260	265	270	
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
275	280	285	
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
290	295	300	
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
305	310	315	320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile			
	325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro			
	340	345	350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu			
	355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn			
	370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser			
385	390	395	400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg			
	405	410	415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu			
	420	425	430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly			
	435	440	445

<210> 8
 <211> 1338
 <212> ADN
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 8

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	ggtgaaggctc	60
tcttgcaagg	cttctggagg	caccttcagc	agctatgcta	tcagctgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggaggg	atcatcccta	tctttggtac	agcaactac	180
gcacagaagt	tccagggcag	agtcacgatt	accgcggacg	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagaggac	300
ttcgggtaca	attacggcat	ggacgtcttg	ggccaaggga	ccacggtcac	cgtctcctca	360
gcttctacca	agggcccatc	ggtcttccc	ctagcgccct	gctccaggag	cacctccgag	420
agcacagccg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacgggtgtcg	480
tggaactcag	gcgcctgac	cagcggcggtg	cacaccttcc	cggtctgctc	acagtcctca	540
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	cacgaagacc	600
tacacctgca	acgtagatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggaacaagag	agttgagtcc	660
aaatatggtc	ccccatgccc	accctgccc	gcacctgagt	ttctgggggg	accatcagtc	720
ttcctgttcc	ccccaaaacc	caaggacact	ctcatgatct	cccggaaccc	tgaggtcacg	780
tgcggtggtg	tggacgtgag	ccaggaagac	cccaggtcc	agttcaactg	gtacgtggat	840
ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaaag	ccgcgggagg	agcagttcaa	cagcacgtac	900
cgtgtggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	caggactggc	tgaacggcaa	ggagtacaag	960
tgcaaggtct	ccaacaaaag	cctcccgtcc	tccatcgaga	aaacctctc	caaagccaaa	1020
gggcagcccc	gagagccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	cccaggagga	gatgaccaag	1080
aaccagggtca	gcctgacctg	cctgggtcaaa	ggcttctacc	ccagcgacat	cgccgtggag	1140
tggaagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgctcccgt	gctggactcc	1200
gacggctcct	tcttctctta	cagcaggcta	accgtggaca	agagcagggtg	gcaggagggg	1260

aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1320
ctctccctgt ctctgggt 1338

<210> 9

<211> 120

<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 Ser
1 5 10 15

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Asp Phe Gly Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10

<211> 360

<212> ADN

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 10

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcttgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagt gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaggac 300
ttcggtctaca attacggcat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 11

<211> 215

<212> PRT

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 11

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 Arg Ala Ser Gln Gly Val Asn Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 12

<211> 645

<212> ADN

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12

gaaattgtgt	tgacacagtc	tccaggcacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gggccagtca	gggtgttaac	agctactact	tagcctggta	ccagcagaaa	120
cctggccagg	ctcccaggct	cctcatgtat	gctacatcca	ccagggccac	tggcatccca	180
gacaggttca	gtggcagtgg	gtctgggaca	gacttcactc	tcaccatcag	cagactggag	240
cctgaagatt	ttgcagtgtg	ttactgtcag	cactatggta	actcactatt	cacttttcggc	300
cctgggacca	aggtggagat	caaacggacc	gtggctgcac	catctgtctt	catcttcccg	360
ccatctgatg	agcagttgaa	atctggaact	gcctctgttg	tgtgcctgct	gaataacttc	420
tatcccagag	aggccaaagt	acagtggaag	gtggataacg	ccctccaatc	gggtaactcc	480
caggagagtg	tcacagagca	ggacagcaag	gacagcacct	acagcctcag	cagcacccctg	540
acgctgagca	aagcagacta	cgagaaacac	aaagtctacg	cctgcgaagt	cacccatcag	600
ggcctgagct	cgcccgtcac	aaagagcttc	aacaggggag	agtgc		645

<210> 13

<211> 108

<212> PRT

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 13

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 Arg Ala Ser Gln Gly Val Asn Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 14

<211> 324

<212> ADN

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 14

gaaattgtgt	tgacacagtc	tccaggcacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gggccagtca	gggtgttaac	agctactact	tagcctggta	ccagcagaaa	120
cctggccagg	ctcccaggct	cctcatgtat	gctacatcca	ccagggccac	tggcatccca	180
gacaggttca	gtggcagtgg	gtctgggaca	gacttcactc	tcaccatcag	cagactggag	240
cctgaagatt	ttgcagtgtg	ttactgtcag	cactatggta	actcactatt	cactttcggc	300
cctgggacca	aggtggagat	caaa				324

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 15

Lys Ala Ser Gly Gly Thr Ile Ser Ser Tyr Ala Tyr Ser
1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 16

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Ala Asn
1 5 10

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 17

Ala Arg Glu Asp Phe Gly Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Val
1 5 10

<210> 18

<211> 12
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 18
 Arg Ala Ser Gln Lys Val Asn Ser Tyr Tyr Leu His
 1 5 10

<210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 19
 Tyr Ala Thr Arg Thr Arg Pro Thr
 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 20
 Gln His Tyr Gly Gln Ser Leu Phe Thr
 1 5

<210> 21
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 21
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Asp Phe Gly Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445

<210> 22
 <211> 1338
 <212> ADN
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 22
 caggtgacgc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaagggtc 60
 tcctgcaagg cttctggagg caccattagc agctatgctt acagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagt gatgggagg atcatcccta tctttgacac agcaaactac 180
 gcacagaagt tocagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaggac 300
 ttcggctaca attacgcgat ggacgtctgg ggccaaggga cccttgtcac cgtctcctca 360
 gcttctacca agggcccac cgtcttccc gtagcgccct gctccaggag cacctccgag 420
 agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
 tggaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 540
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 600
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtc 660
 aaatatggtc ccccatgccc accctgccc gcacctgagt ttctgggggg accatcagtc 720
 ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcattgatc cccggacccc tgaggtcacg 780
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 840
 ggctgtggag tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 900
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 1080
 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1140
 tgggaaagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 1200
 gacggctcct tcttctctca cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1260
 aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1320
 ctctccctgt ctctgggt 1338

<210> 23

<211> 120

<212> PRT

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 23

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Asp Phe Gly Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 24

<211> 360

<212> ADN

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 24

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggagg caccattagc agctatgctt acagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttgacac agcaaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaggac 300
 ttccggtaca attacgcgat ggacgtctgg ggccaaggga cccttgtcac cgtctcctca 360

<210> 25

<211> 215

<212> PRT

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 25

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 Arg Ala Ser Gln Lys Val Asn Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 26

<211> 645

<212> ADN

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 26


```

gaaatttgtgt tgacacagtc tccagggcacc ctgtcttttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gaaagttaac agctactact tacattggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gctacaagaa ccaggccaac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cactatggtc agtcactatt cactttcggc      300
caggggacca aggtggagat caaacggacc gtggctgcac catctgtctt catcttcccg      360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc      420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggttaactcc      480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg      540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag      600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgc      645

```

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 27

```

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 Arg Ala Ser Gln Lys Val Asn Ser Tyr
          20           25           30

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

<210> 28

<211> 324

<212> ADN

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 28

```

gaaatttgtgt tgacacagtc tccagggcacc ctgtcttttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gaaagttaac agctactact tacattggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gctacaagaa ccaggccaac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cactatggtc agtcactatt cactttcggc      300
caggggacca aggtggagat caaa      324

```

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 29

```

Lys Ala Ser Gly His Thr Ile Ser Ser Tyr Ala Tyr Ser
1           5           10

```

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 30
 Asp Ile Ile Pro Ala Tyr Gly Ser Pro Asn
 1 5 10

<210> 31
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 31
 Ala Arg Glu Asp Phe Gly Lys Asn Tyr Ala Met Asp Val
 1 5 10

<210> 32
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 32
 Arg Ala Ser Gln His Val Ser Ser His Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 33
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 33
 Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 34
 Gln His Tyr Gly Gln Ser Gln Phe Thr
 1 5

<210> 35
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 35
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Thr Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asp Ile Ile Pro Ala Tyr Gly Ser Pro Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Asp Phe Gly Lys Asn Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 36

<211> 1338

<212> ADN

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 36

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctggaca	taccattagc	agctatgctt	acagctgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggagac	atcatccctg	cctatggctc	accaaactac	180
gcacagaagt	tccagggcag	agtcacgatt	accgcggacg	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagaggac	300
ttcggcaaga	attacgcgat	ggacgtctgg	ggccaaggga	cccttgctac	cgtctcctca	360
gcttctacca	agggcccatc	ggtcttcccg	ctagcgccct	gctccaggag	cacctccgag	420
agcacagccg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacggtgtcg	480
tggaactcag	gcgccctgac	cagcggcgctg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtcctca	540
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	cacgaagacc	600
tacacctgca	acgtagatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggaacaag	agttgagtcc	660
aaatatggtc	ccccatgcc	accctgccc	gcacctgagt	ttctgggggg	accatcagtc	720
ttctgtttcc	ccccaaaacc	caaggacact	ctcatgatct	cccggaaccc	tgaggtcacg	780
tgcgtggtgg	tgagcgtgag	ccaggaagac	cccgaggtcc	agttcaactg	gtacgtggat	840
ggcgtggagg	tgcataaatgc	caagacaaaag	ccgcgggagg	agcagttcaa	cagcacgtac	900
cgtgtggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	caggactggc	tgaacggcaa	ggagtacaag	960
tgcaaggtct	ccaacaaagg	cctcccgtcc	tccatcgaga	aaaccatctc	caaagccaaa	1020
gggcagcccc	gagagccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	cccaggagga	gatgaccaag	1080
aaccagggtca	gctgacctg	cctgggtcaaa	ggcttctacc	ccagcgacat	cgccgtggag	1140
tgggaaagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgccctcccg	gctggactcc	1200
gacggctcct	tcttcctcta	cagcaggcta	accgtggaca	agagcagggtg	gcaggagggg	1260
aatgtcttct	catgctccgt	gatgcatgag	gctctgcaca	accactacac	acagaagagc	1320
ctctccctgt	ctctgggt					1338

<210> 37

<211> 120

<212> PRT

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 37

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Thr Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Asp Phe Gly Lys Asn Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38

<211> 360

<212> ADN

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 38

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctggaca	taccattagc	agctatgctt	acagctgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggagac	atcatccctg	cctatggctc	accaaactac	180
gcacagaagt	tccagggcag	agtcacgatt	accgcggacg	aatccacgag	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagaggac	300
ttcggcaaga	attacgcgat	ggacgtctgg	ggccaaggga	cccttgctac	cgtctcctca	360

<210> 39

<211> 215

<212> PRT

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 39

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 Arg Ala Ser Gln His Val Ser Ser His
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 40

<211> 645

<212> ADN

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 40

gaaattgtgt	tgacacagtc	tccaggcacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gggccagtca	gcatgttagc	agccactact	tagcttggtg	ccagcagaaa	120
cctggccagg	ctcccaggct	cctcatctat	ggtgcatcca	gcagggccac	tgcatccca	180
gacaggttca	gtggcagtgg	gtctgggaca	gacttcactc	tcaccatcag	cagactggag	240
cctgaagatt	ttgcagtgtg	ttactgtcag	cactatggtc	agtcacagtt	cactttcggc	300
caggggacca	aggtggagat	caaacggacc	gtggctgcac	catctgtctt	catcttcccg	360
ccatctgatg	agcagttgaa	atctggaact	gcctctgttg	tgtgcctgct	gaataacttc	420
tatcccagag	aggccaaagt	acagtggaag	gtggataacg	ccctccaatc	gggtaactcc	480
caggagagtg	tcacagagca	ggacagcaag	gacagcacct	acagcctcag	cagcaccctg	540
acgctgagca	aagcagacta	cgagaaacac	aaagtctacg	cctgcgaagt	cacccatcag	600
ggcctgagct	cgcccgctcac	aaagagcttc	aacaggggag	agtg		645

<210> 41

<211> 108

<212> PRT

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 41

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 Arg Ala Ser Gln His Val Ser Ser His
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 42

<211> 324
 <212> ADN
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 42
 gaaatttgtt tgacacagtc tccagggcacc ctgtcttttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gcatgttagc agccactact tagcttggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cactatgggc agtcacagtt cactttcggc 300
 caggggacca aggtggagat caaa 324

<210> 43
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 43
 Arg Ala Ser Gln His Val Asn Ser His Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 44
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 44
 Tyr Ala Thr Arg Thr Arg Pro Thr
 1 5

<210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 45
 Gln His Tyr Gly Gln Ser Gln Phe Thr
 1 5

<210> 46
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 46
 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 Arg Ala Ser Gln His Val Asn Ser His
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

```

65                               70                               75                               80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Gln Ser Gln
                        85                               90                               95
Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
                        100                               105                               110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
                        115                               120                               125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
                        130                               135                               140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145                               150                               155                               160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
                        165                               170                               175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
                        180                               185                               190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
                        195                               200                               205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
                        210                               215

<210> 47
<211> 645
<212> ADN
<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp
<400> 47
gaaattgtgt tgacacagtc toccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gcatgttaac agccactact tagcttggtgta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gctacaagaa ccaggccaac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cactatggtc agtcacagtt cactttcggc 300
caggggacca agtgggagat caaacggacc gtggctgcac catctgtctt catcttccc 360
ccatctgatg agcagttgaa atcttggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgc 645

<210> 48
<211> 108
<212> PRT
<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp
<400> 48
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 Arg Ala Ser Gln His Val Asn Ser His
20                               25                               30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35                               40                               45

```


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

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

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

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

<210> 49

<211> 324

<212> ADN

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 49

gaaattgtgt	tgacacagtc	tccaggcacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gggccagtca	gcatgttaac	agccactact	tagcttggtta	ccagcagaaa	120
cctggccagg	ctcccagget	cctcatctat	gctacaagaa	ccaggccaac	tgcatccca	180
gacaggttca	gtggcagtgg	gtctgggaca	gacttcactc	tcaccatcag	cagactggag	240
cctgaagatt	ttgcagtgtg	ttactgtcag	cactatgggc	agtcacagtt	cactttcggc	300
caggggacca	aggtggagat	caaa				324

<210> 50

<211> 449

<212> PRT

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 50

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Thr Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Asp Phe Gly Lys Asn Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

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

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu 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 His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 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 Ala Leu Pro Ala Pro 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 Arg Asp Glu Leu 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 Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln 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 Pro
 435 440 445

Gly

<210> 51
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>

<223> Cấu trúc tổng hợp
 <400> 51
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggaca taccattagc agctatgctt acagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggagac atcatccctg cctatggctc accaaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaggac 300
 ttccggcaaga attacgcgat ggacgtctgg ggccaaggga cccttgctac cgtctcctca 360
 gcttctacca agggcccac cgtcttcccg ctacgaccct cctccaagag cacctctggg 420
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg 480
 tggaactcag gcgcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
 aaatcttggt acaaaaactca cacatgccc cagtgtccag cactgaact cctgggggga 720
 ccgtcagctc tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccgaccct 780
 gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggagggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
 gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggacgag 1080
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcccccggtg 1200
 ctggactccg acggtctcct cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 1320
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggt 1347

<210> 52

<211> 450

<212> PRT

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 52

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Thr Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Asp Phe Gly Lys Asn Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

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

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr 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 Ser Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 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 Ala Leu Pro Ala Pro 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 Arg 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 Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln 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 Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 53
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
 <220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

```

<400> 53
caggtgcaac ttgtccaaag cggagctgag gttaagaaac caggttcac tgtgaagggt 60
tcatgtaagg caagcggcca caccatttca tcttacgcat actcctgggt tgcacaagct 120
ccaggccagg gattggaatg gatgggagac ataatcccag catacggatc acctaactac 180
gcacagaagt ttcaggggag agtgacaatt acagccgacg agtctactag cactgcttac 240
atggagttgt cttcacttcg gtcagaggat acagcagttt actattgtgc cagggaggat 300
ttcgggaaaa attatgctat ggatgtatgg ggtcagggca ccctggttac tgtatcatct 360
gctagcacca agggcccacg ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 420
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcggt cacaccttcc cggctgtcct acagtccctc 540
ggactctact cctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 660
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccc cctgccccag cacctgaagc cgccggggga 720
ccgtcagctc tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 780
gaggtcacat gcgtgggtgt gtccgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg 840
tatgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctcgcacc aagactgggt gaatggcaag 960
gagtacaagt gcaagggtct caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag 1080
atgaccaaga accaagtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctctat tccaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggcaaa 1350

```

<210> 54

<211> 450

<212> PRT

<213> TRÌNH TỰ NHÂN TẠO

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 54

```

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

```

```

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Ile Ser Ser Tyr
20          25          30

```

```

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

```

```

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

```

```

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

```

```

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

```

```

Ala Arg Glu Asp Phe Gly Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln
100          105          110

```

```

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115          120          125

```

```

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130          135          140

```

```

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

```

```

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

```

<210>	55
<211>	1350
<212>	ADN
<213>	TRÌNH TỰ NHÂN TẠO
<220>	
<223>	Cấu trúc tổng hợp
<400>	55

```

caggttcagc tcgtgcaaag tggagctgag gtgaaaaaac ctggttctag cgtcaaggtc      60
tcttgtaagg cctctggggg cactataagc tcttatgctt atagttgggt gcgccaggcc      120
ccaggacagg gcttggaatg gatgggcggc ataataccca tattcgacac agccaactac      180
gctcaaaaat ttcaggggag agtgactata actgcagacg agagcactag caccgcttac      240
atggagttga gtagtctccg cagtgaagac acagccgtct attattgcgc tagggaggac      300
tttggttaca actacgcatc ggatgtctgg gccagggta ctttggtcac cgtatctagt      360
gctagacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg      420
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg      480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca      540
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      600
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc      660
aaatcttggt acaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaagc cgccggggga      720
ccgtcagttc tctcttcccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctc      780
gaggtcacat gcgtggtggt gtcctgtgac cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      840
tatgtggacg gcgtggagggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac      900
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aagactggct gaatggcaag      960
gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc     1020
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag     1080
atgaccaaga accaagtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc     1140
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg     1200
ctggactccg acggtcctt cttctcttat tccaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg     1260
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg     1320
cagaagagcc tctccctgtc tccgggcaaa                                1350

```

<210> 56

<211> 557

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

```

Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met
1              5              10              15

```

```

Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp
                20              25              30

```

```

Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln
35              40              45

```

```

Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu
50              55              60

```

```

Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile
65              70              75              80

```

```

Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu
85              90              95

```

```

Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr
100              105              110

```

```

Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp
115              120              125

```

```

Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro
130              135              140

```

```

Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala
145              150              155              160

```

```

Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro
165              170              175

```

```

Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro

```

180								185				190							
Gly	Ser	Thr	Leu	Trp	Leu	Ser	Cys	Gly	Val	Pro	Pro	Asp	Ser	Val	Ser				
		195					200					205							
Arg	Gly	Pro	Leu	Ser	Trp	Thr	His	Val	His	Pro	Lys	Gly	Pro	Lys	Ser				
	210					215					220								
Leu	Leu	Ser	Leu	Glu	Leu	Lys	Asp	Asp	Arg	Pro	Ala	Arg	Asp	Met	Trp				
225					230					235					240				
Val	Met	Glu	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Pro	Arg	Ala	Thr	Ala	Gln	Asp	Ala				
				245					250					255					
Gly	Lys	Tyr	Tyr	Cys	His	Arg	Gly	Asn	Leu	Thr	Met	Ser	Phe	His	Leu				
			260					265					270						
Glu	Ile	Thr	Ala	Arg	Pro	Val	Leu	Trp	His	Trp	Leu	Leu	Arg	Thr	Gly				
		275					280					285							
Gly	Trp	Lys	Val	Ser	Ala	Val	Thr	Leu	Ala	Tyr	Leu	Ile	Phe	Cys	Leu				
	290					295					300								
Cys	Ser	Leu	Val	Gly	Ile	Leu	His	Leu	Gln	Arg	Ala	Leu	Val	Leu	Arg				
305					310					315					320				
Arg	Lys	Arg	Lys	Arg	Met	Thr	Asp	Pro	Thr	Arg	Arg	Phe	Phe	Lys	Val				
				325					330					335					
Thr	Pro	Pro	Pro	Gly	Ser	Gly	Pro	Gln	Asn	Gln	Tyr	Gly	Asn	Val	Leu				
			340					345					350						
Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Thr	Ser	Gly	Leu	Gly	Arg	Ala	Gln	Arg	Trp	Ala				
		355					360					365							
Ala	Gly	Leu	Gly	Gly	Thr	Ala	Pro	Ser	Tyr	Gly	Asn	Pro	Ser	Ser	Asp				
	370					375					380								
Val	Gln	Ala	Asp	Gly	Ala	Leu	Gly	Ser	Arg	Ser	Pro	Pro	Gly	Val	Gly				
385					390					395					400				
Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Glu	Gly	Tyr	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Glu	Glu				
				405					410					415					
Asp	Ser	Glu	Phe	Tyr	Glu	Asn	Asp	Ser	Asn	Leu	Gly	Gln	Asp	Gln	Leu				
			420					425					430						
Ser	Gln	Asp	Gly	Ser	Gly	Tyr	Glu	Asn	Pro	Glu	Asp	Glu	Pro	Leu	Gly				
		435					440					445							
Pro	Glu	Asp	Glu	Asp	Ser	Phe	Ser	Asn	Ala	Glu	Ser	Tyr	Glu	Asn	Glu				
	450					455					460								
Asp	Glu	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Val	Ala	Arg	Thr	Met	Asp	Phe	Leu	Ser				
465					470					475					480				
Pro	His	Gly	Ser	Ala	Trp	Asp	Pro	Ser	Arg	Glu	Ala	Thr	Ser	Leu	Ala				
				485					490					495					
Gly	Ser	Gln	Ser	Tyr	Glu	Asp	Met	Arg	Gly	Ile	Leu	Tyr	Ala	Ala	Pro				
			500					505					510						
Gln	Leu	Arg	Ser	Ile	Arg	Gly	Gln	Pro	Gly	Pro	Asn	His	Glu	Glu	Asp				


```

515                      520                      525
Ala Asp Ser Tyr Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala
530                      535                      540

Trp Gly Gly Gly Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg
545                      550                      555

<210> 57
<211> 556
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 57
Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met
1                      5                      10                      15

Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp
20                      25                      30

Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln
35                      40                      45

Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu
50                      55                      60

Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile
65                      70                      75                      80

Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu
85                      90                      95

Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr
100                      105                      110

Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp
115                      120                      125

Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro
130                      135                      140

Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala
145                      150                      155                      160

Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro
165                      170                      175

Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro
180                      185                      190

Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser
195                      200                      205

Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser
210                      215                      220

Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp
225                      230                      235                      240

Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala
245                      250                      255

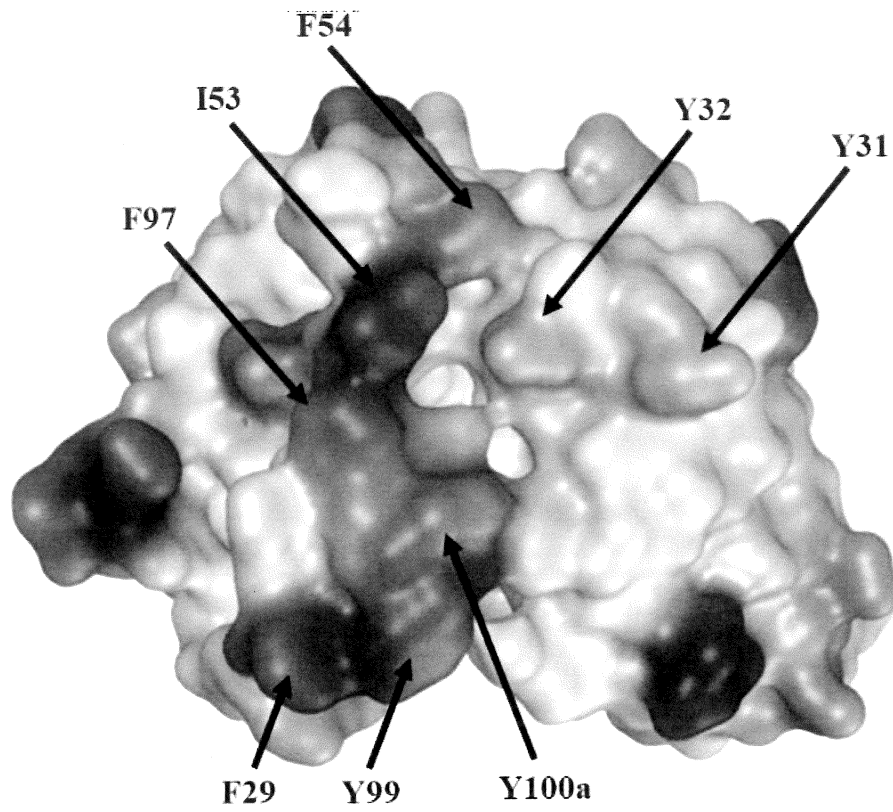
Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu
260                      265                      270

```

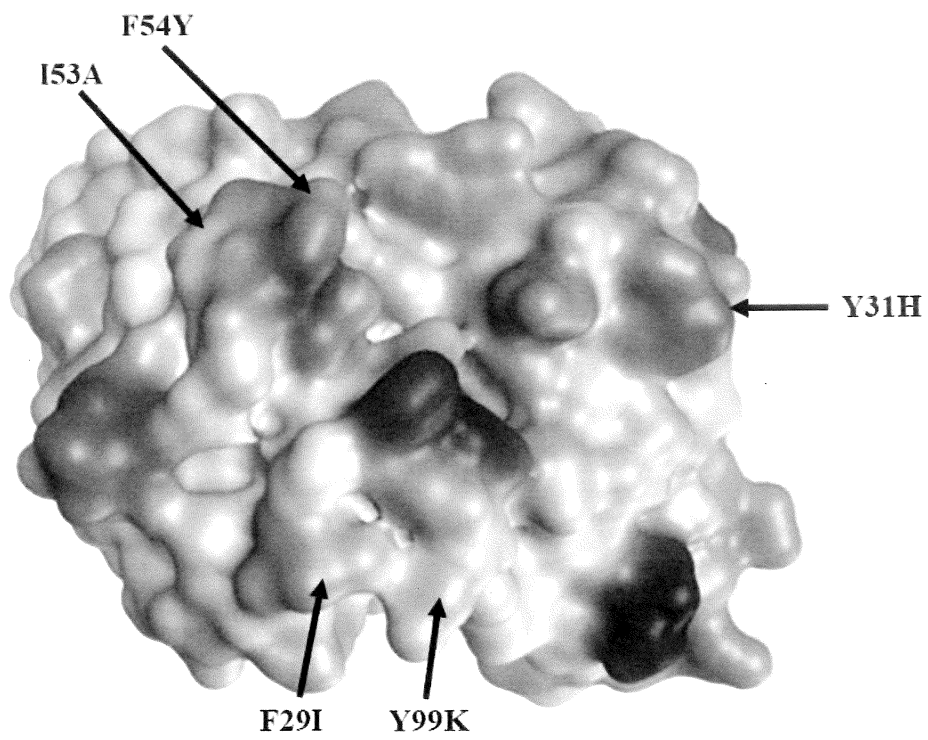
Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly
 275 280 285
 Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu
 290 295 300
 Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg
 305 310 315 320
 Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val
 325 330 335
 Thr Pro Pro Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu
 340 345 350
 Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala
 355 360 365
 Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp
 370 375 380
 Val Gln Ala Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly
 385 390 395 400
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu
 405 410 415
 Asp Ser Glu Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu
 420 425 430
 Ser Gln Asp Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly
 435 440 445
 Pro Glu Asp Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu
 450 455 460
 Asp Glu Glu Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser
 465 470 475 480
 Pro His Gly Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Gly
 485 490 495
 Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln
 500 505 510
 Leu Arg Ser Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala
 515 520 525
 Asp Ser Tyr Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala Trp
 530 535 540
 Gly Gly Gly Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg
 545 550 555

1/17

FIG. 1A

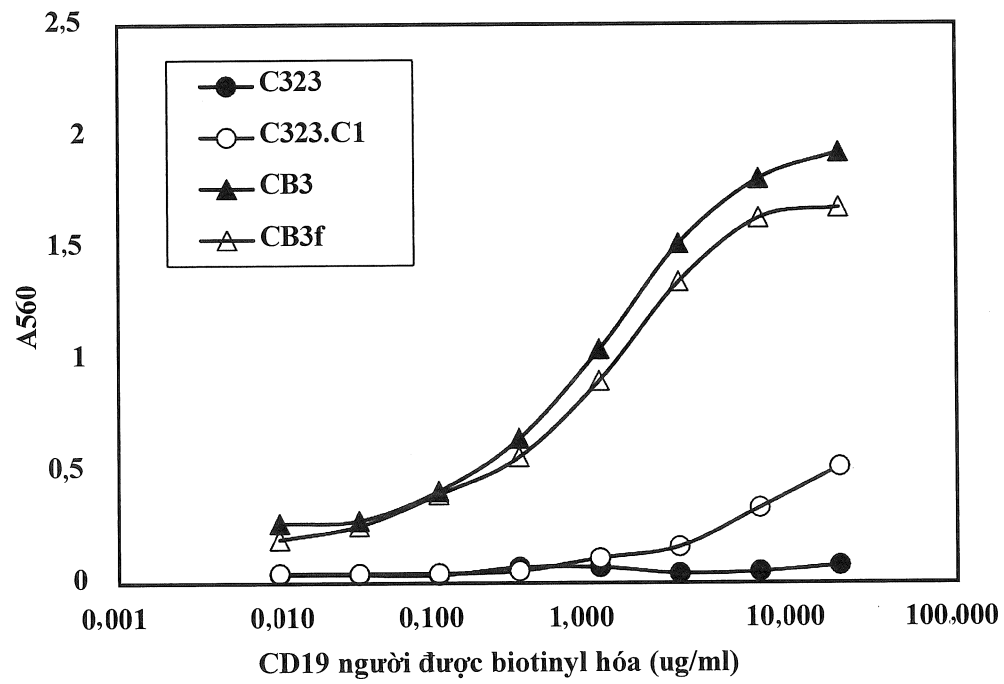


2/17

FIG. 1B

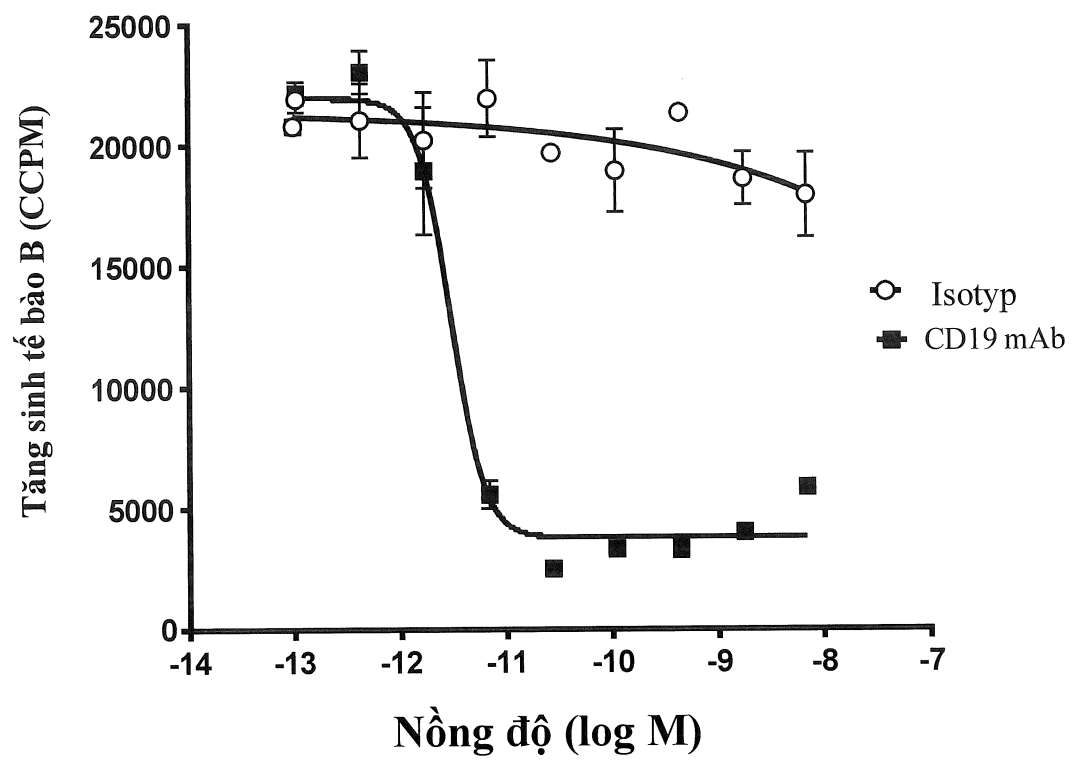
3/17

FIG. 2



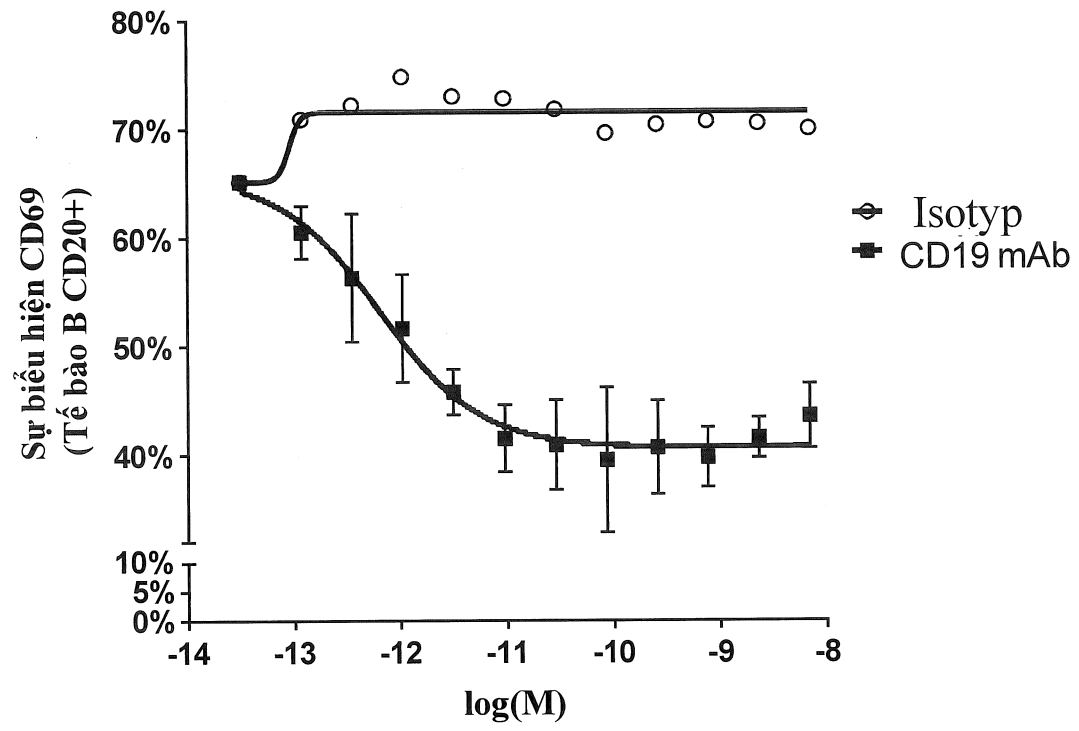
4/17

FIG. 3



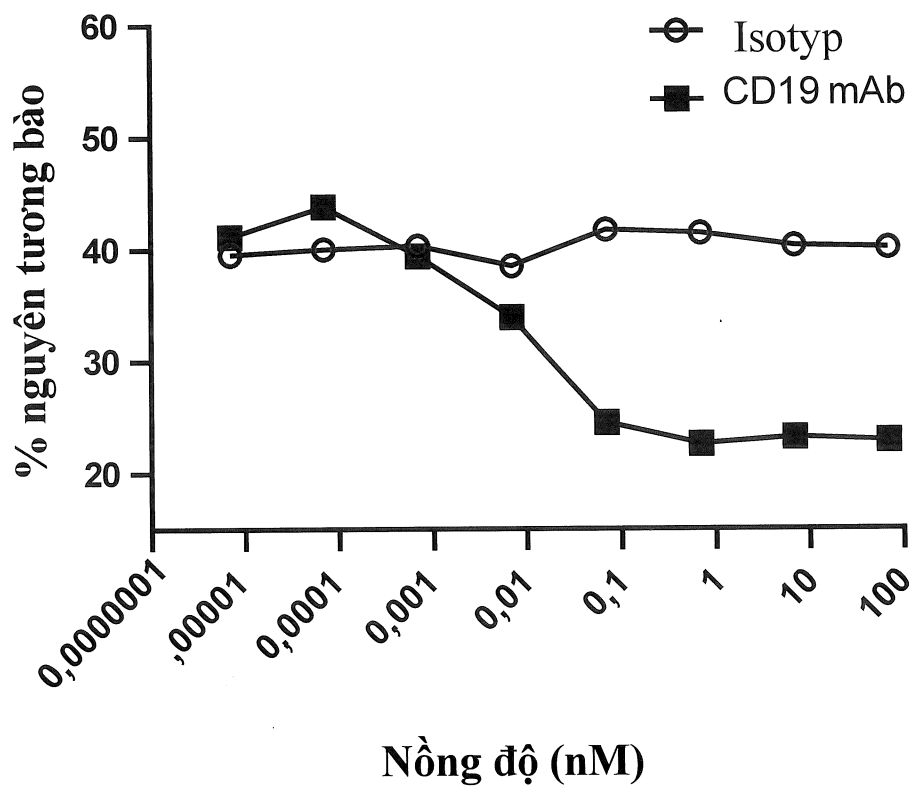
5/17

FIG. 4



6/17

FIG. 5



7/17

FIG. 6A

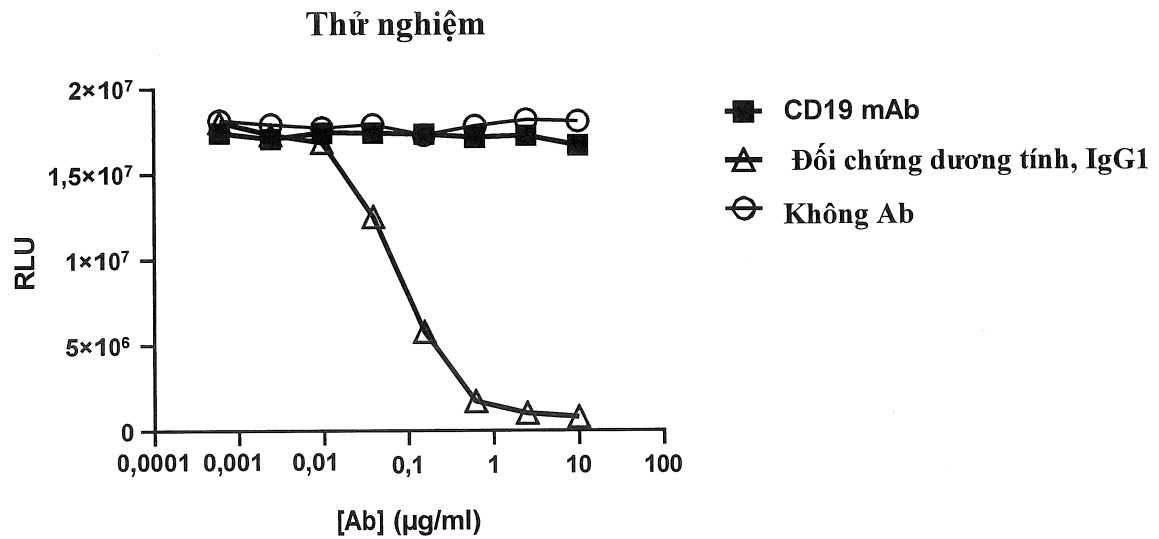
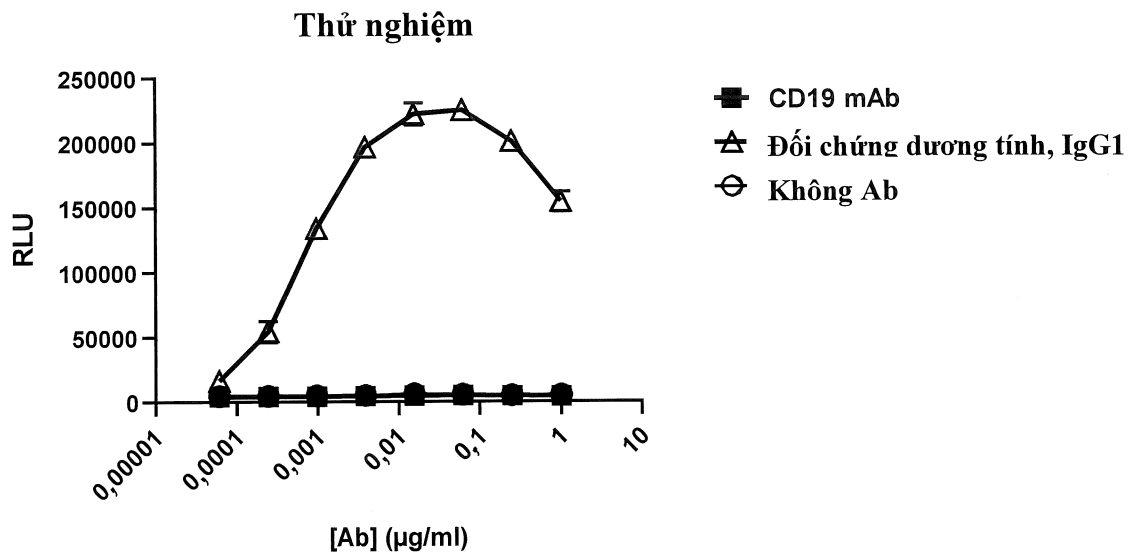
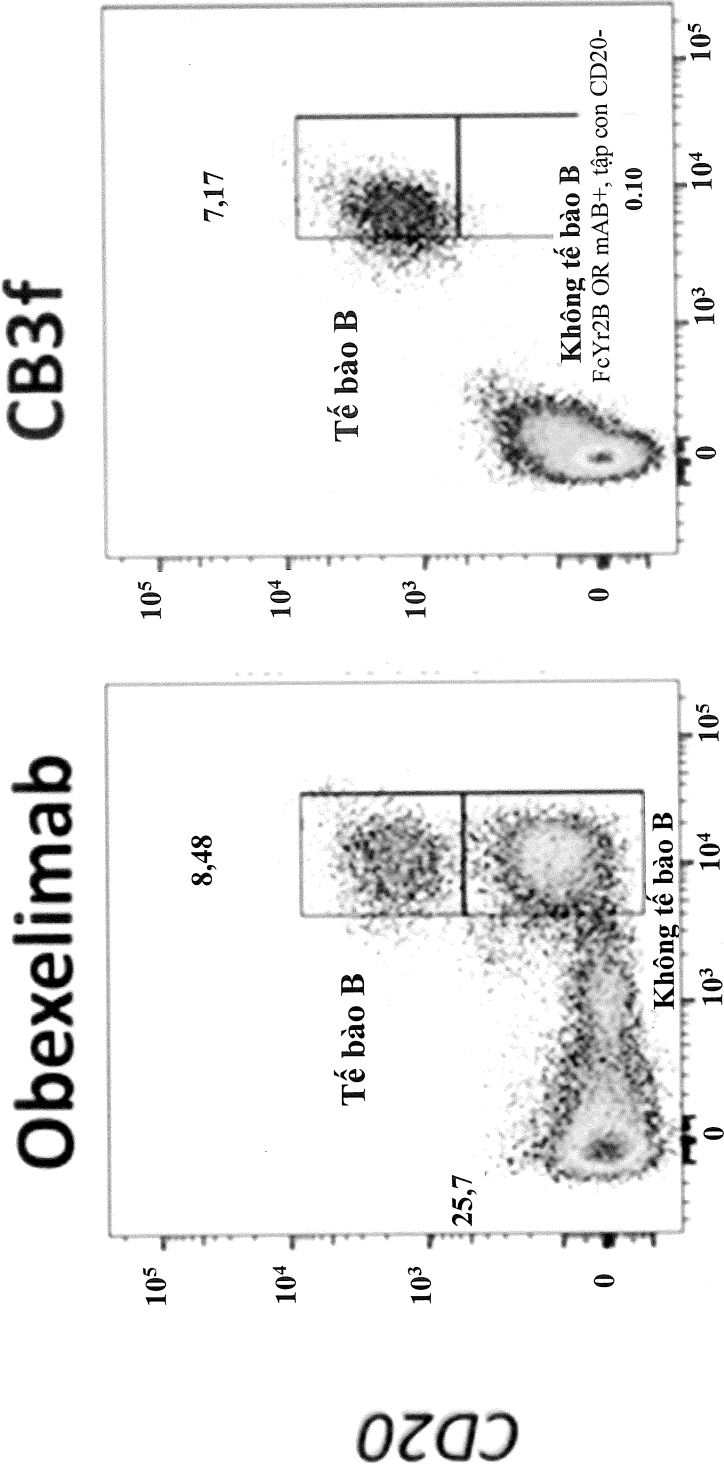


FIG. 6B



8/17

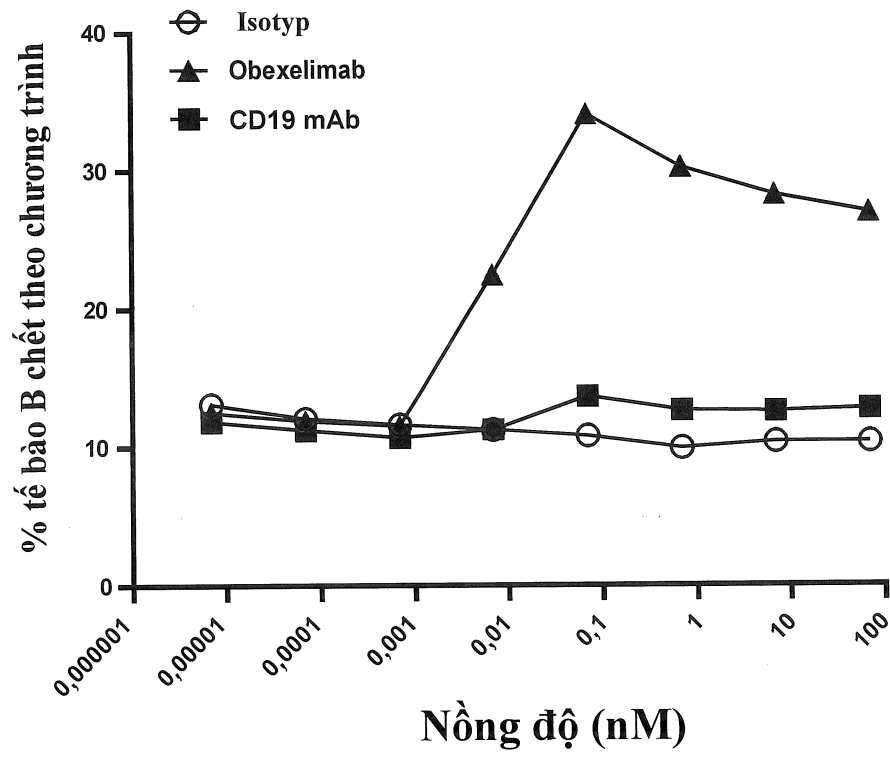
FIG. 7



Ab thử nghiệm được đánh dấu

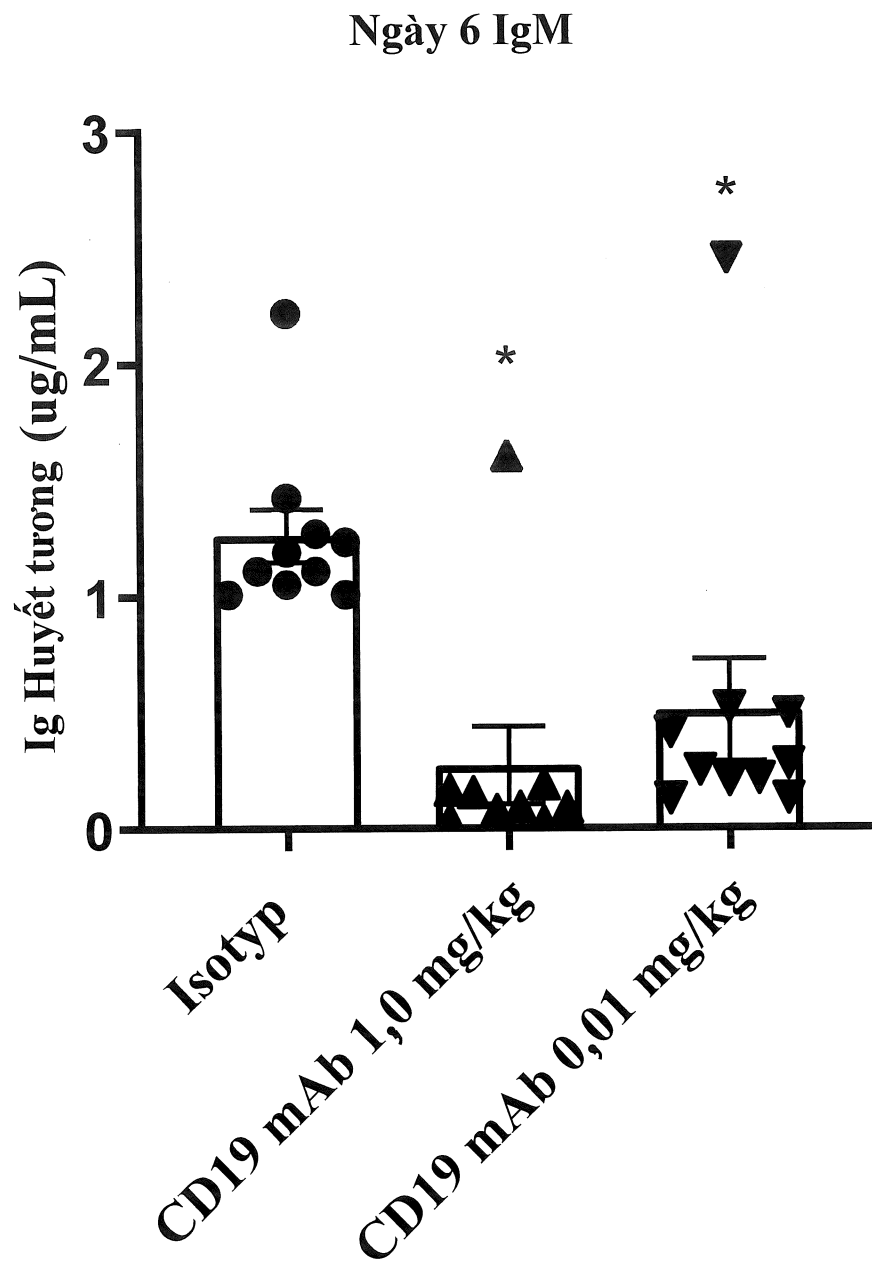
9/17

FIG. 8



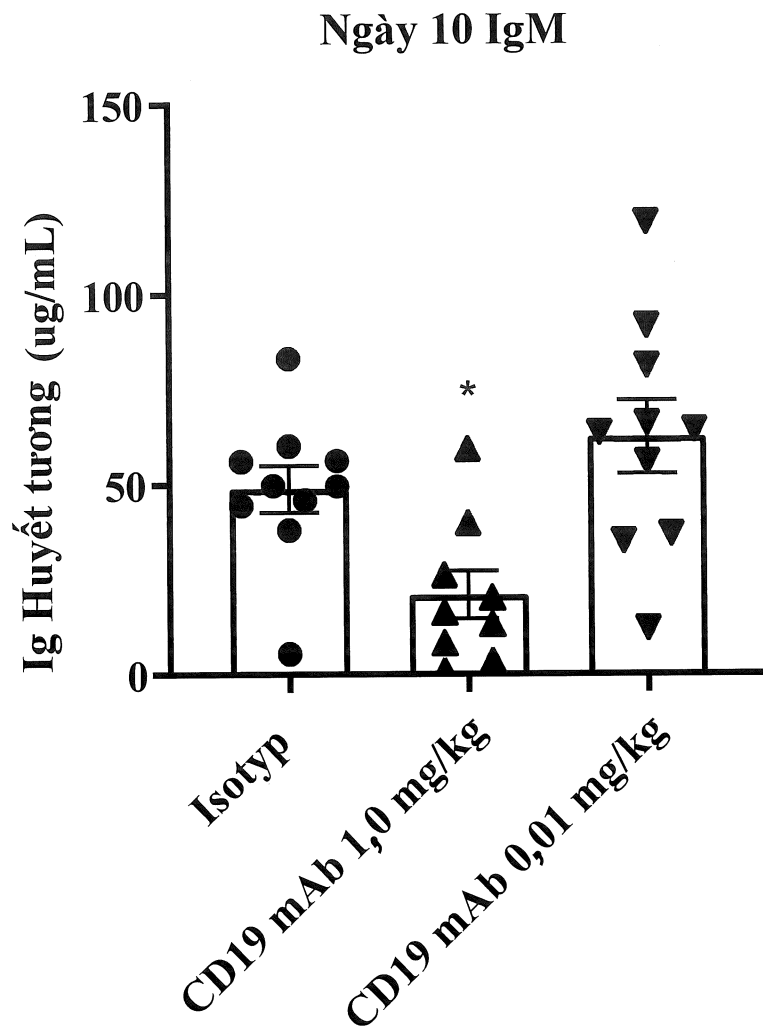
10/17

FIG. 9A



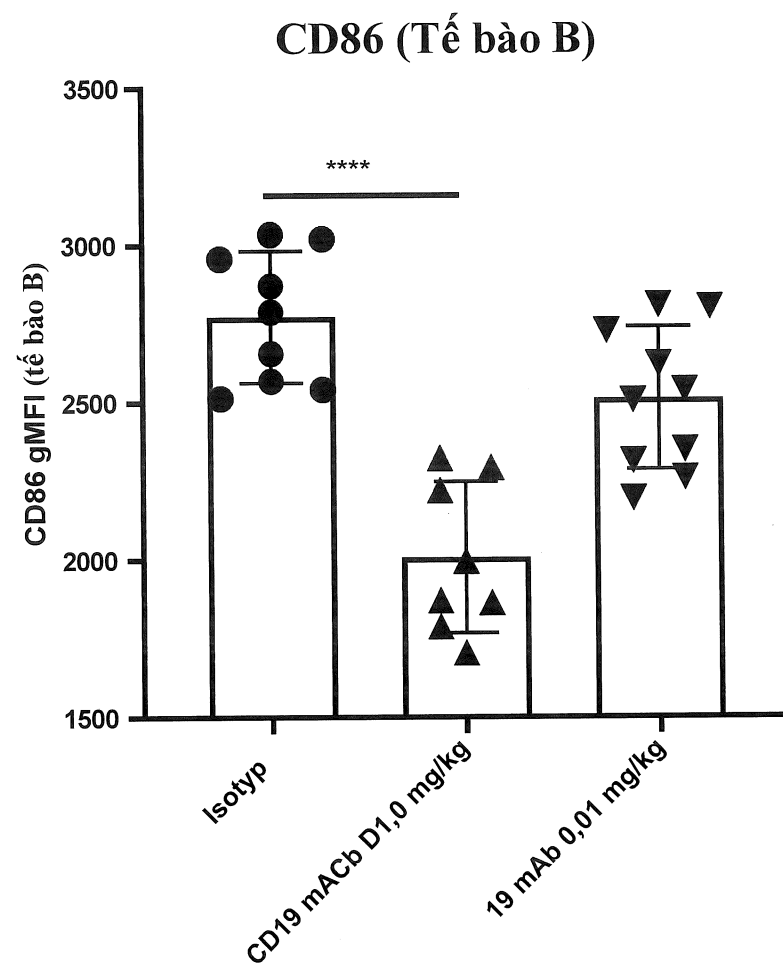
11/17

FIG. 9B



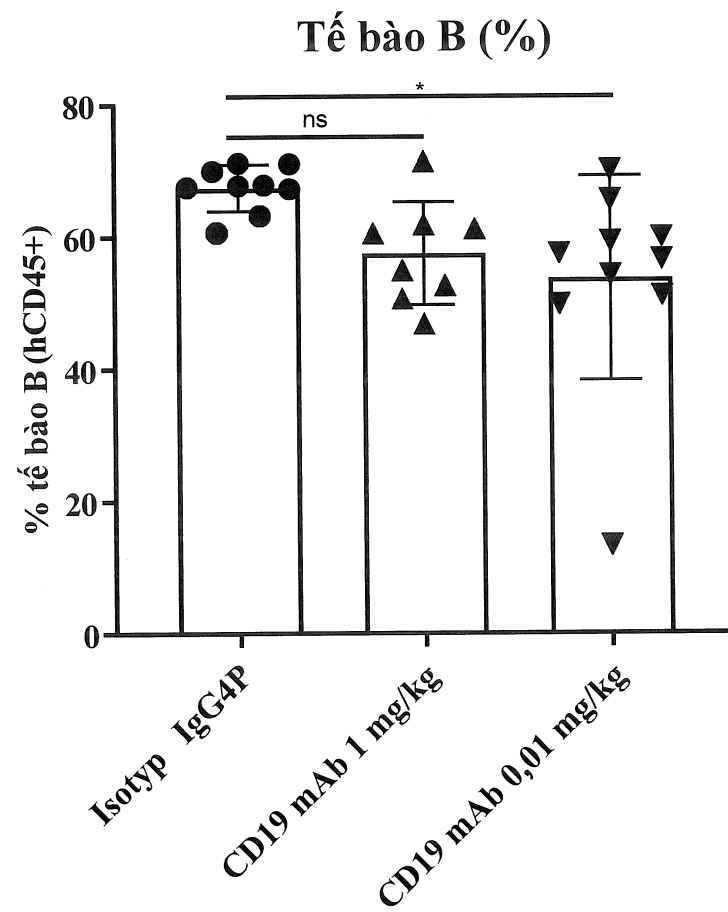
12/17

FIG. 10



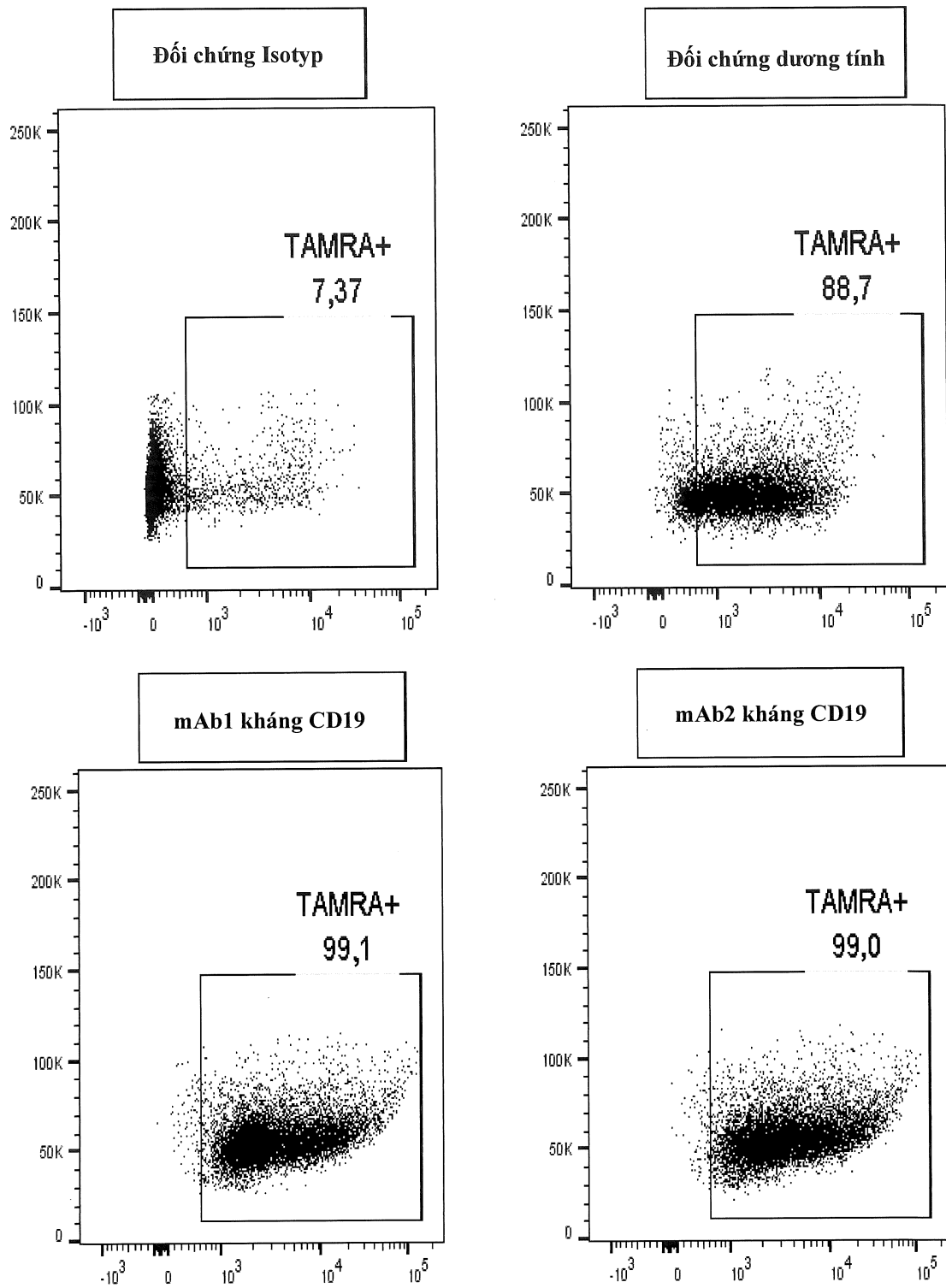
13/17

FIG. 11



14/17

FIG. 12



15/17

FIG. 13A

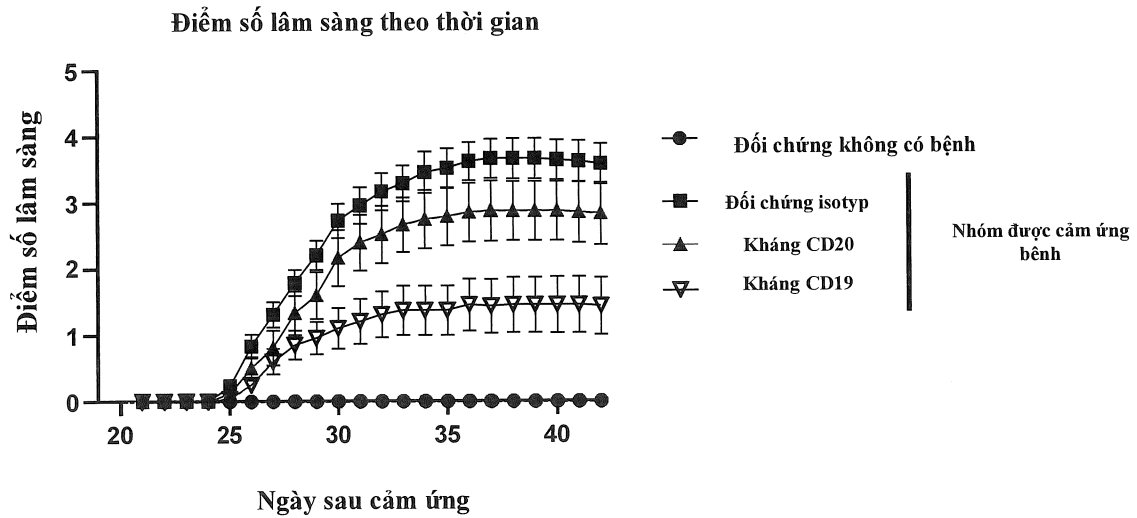
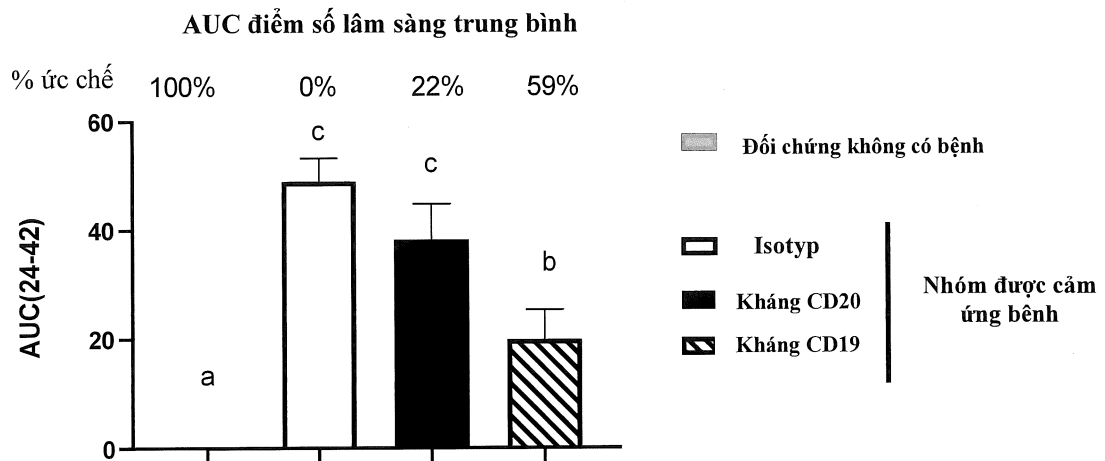


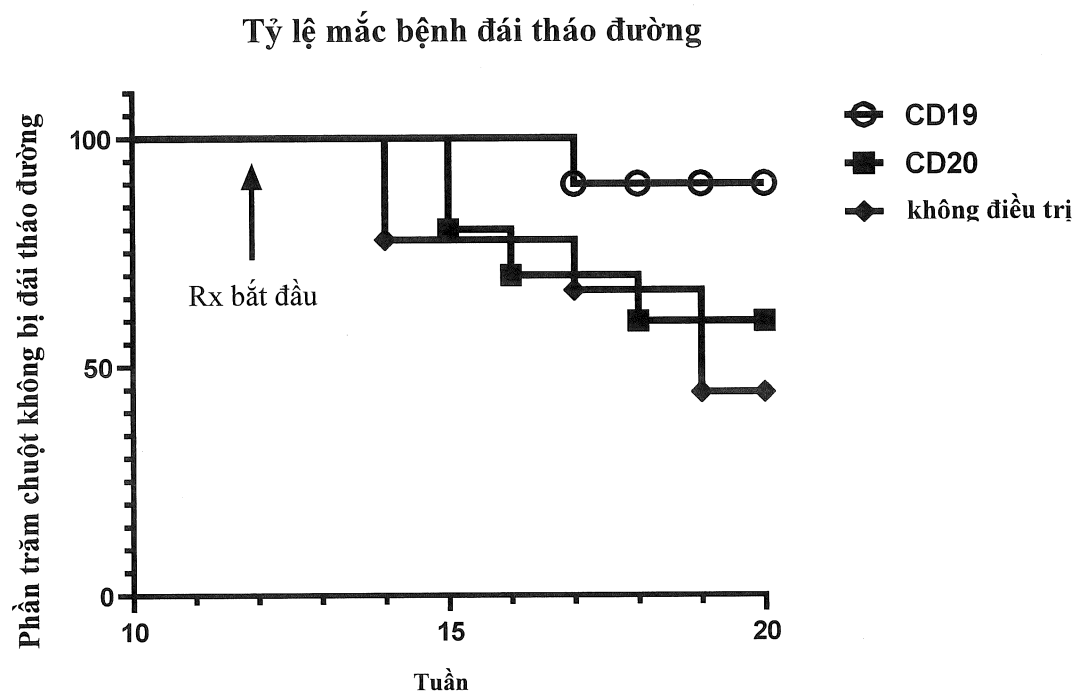
FIG. 13B



$p < 0,05$ (Phương pháp thống kê: ANOVA một bên đối với dữ liệu được biến đổi log sau đó là kiểm định Tukey.
 Các cột với các ký tự khác nhau khác biệt đáng kể.)

16/17

FIG. 14



17/17

FIG. 15

