



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

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

(11)



1-0028991

(51)⁷ C07K 16/24

(13) B

-
- (21) 1-2015-03628 (22) 12/03/2014
(86) PCT/US2014/023930 12/03/2014 (87) WO/2014/164959 09/10/2014
(30) 61/778,687 13/03/2013 US; 61/819,018 03/05/2013 US
(45) 25/07/2021 400 (43) 25/01/2016 334A
(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, USA
(72) MURPHY, Andrew, J. (US); PAPADOPOULOS, Nicholas, J. (US); ORENGO,
Jamie, M. (US).
(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK
CO., LTD.)
-

(54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI INTOLOKIN- 33 (IL-33)
VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết với intolokin-33 (IL-33) và phương pháp sử dụng kháng thể này. Sáng chế còn đề cập đến kháng thể mà ức chế hoặc làm giảm mức truyền tín hiệu qua trung gian IL-33. Kháng thể theo sáng chế có thể thực hiện chức năng để phong bế sự tương tác giữa IL-33 và ST2. Theo cách khác, kháng thể nhất định theo sáng chế ức chế hoặc làm giảm mức truyền tín hiệu qua trung gian IL-33 mà không phong bế sự tương tác IL-33/ST2. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể là kháng thể hoàn toàn của người mà liên kết với IL-33 của người với ái lực cao. Kháng thể theo sáng chế là hữu ích để điều trị bệnh và rối loạn gắn liền với quá trình truyền tín hiệu qua trung gian IL-33 và/hoặc biểu hiện IL-33 ở tế bào, như bệnh viêm hoặc bệnh dị ứng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể, và đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng, kháng thể này đặc hiệu với IL-33 của người, và các phương pháp sử dụng kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Intolokine-33 (IL-33) là một phối tử của ST2, một thành viên của siêu họ thụ thể giống toll/intolokine-1 mà liên kết với protein phụ, IL-1RAcP (ví dụ, xem tài liệu: Kakkar and Lee, *Nature Reviews – Drug Discovery* 7(10):827-840 (2008), Schmitz et al., *Immunity* 23:479-490 (2005); Liew et al., *Nature Reviews – Immunology* 10:103-110 (2010); US 2010/0260770; US 2009/0041718). Sau khi IL-33 hoạt hoá ST2/IL-1RAcP, một dòng thác truyền tín hiệu được khởi động bởi các phân tử phía cuối dòng như MyD88 (yếu tố biệt hoá tế bào dòng tuỷ 88) và TRAF6 (yếu tố gắn liền với thụ thể TNF 6), dẫn đến hoạt hoá NF κ B (yếu tố nhân- κ B), trong số nhiều phân tử khác. Việc truyền tín hiệu qua trung gian IL-33 được cho là một yếu tố gây ra nhiều bệnh và rối loạn. (Liew et al., *Nature Reviews – Immunology* 10:103-110 (2010)).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết với intolokine-33 ("IL-33") của người. Kháng thể theo sáng chế là hữu ích, ngoài các tính hữu ích khác, để ức chế quá trình truyền tín hiệu qua trung gian IL-33 và để điều trị các bệnh và rối loạn do hoặc có liên quan đến hoạt tính và/hoặc quá trình truyền tín hiệu qua IL-33.

Kháng thể theo sáng chế có thể có chiều dài đầy đủ (ví dụ, kháng thể IgG1 hoặc IgG4) hoặc có thể chỉ là phần liên kết với kháng nguyên (ví dụ, đoạn Fab, F(ab')₂ hoặc scFv), và có thể được cải biến để tác động đến tính năng, ví dụ, để loại

bỏ chức năng kích động dư (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

Theo một phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với intolokin-33 của người là kháng thể đơn dòng được phân lập hoàn toàn của người.

Theo một phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với intolokin-33 của người, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng ức chế hoặc làm giảm mức truyền tín hiệu qua trung gian IL-33.

Theo một phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với intolokin-33 của người, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng phong bế sự tương tác giữa IL-33 và ST2.

Theo một phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với intolokin-33 của người, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng phong bế sự tương tác giữa IL-33 và ST2 với trị số IC_{50} nhỏ hơn 10nM, hoặc phong bế hơn 50% mức tương tác giữa IL-33 và ST2 như được đo trong thử nghiệm liên kết phối tử/thụ thể *in vitro* ở 25°C.

Theo một phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với intolokin-33 của người, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng không phong bế, hoặc chỉ phong bế một phần sự tương tác giữa IL-33 và ST2.

Theo một phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với intolokin-33 của người, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng liên kết với IL-33 của người với hằng số cân bằng phân ly liên kết (K_D) nhỏ hơn 1nM như được đo bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 37°C.

Theo một phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với intolokin-33 của người, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng liên kết với IL-33 của người với thời gian bán huỷ phân ly ($t_{1/2}$) lớn hơn 8 phút như được đo bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 37°C.

Theo một phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với intolokin-33 của người, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng ức chế quá trình mất hạt nhỏ của bạch cầu ưa bazơ của người qua trung gian IL-33.

Theo một phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với intolokin-33 của người, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng ức chế quá trình mất hạt nhỏ của bạch cầu ưa bazơ của người qua trung gian IL-33 với IC_{50} nhỏ hơn 600pM như

được đo bằng thử nghiệm hoạt hoá bạch cầu ưa bazơ (basophil activation test-BAT) *in vitro*.

Theo một phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với intolokine-33 của người, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng ức chế quá trình sản xuất IFN-gama từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người (peripheral blood mononuclear cell-PBMC) qua trung gian IL-33.

Theo một phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với intolokine-33 của người, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng ức chế quá trình sản xuất IFN-gama từ PBMC của người qua trung gian IL-33 với IC_{50} nhỏ hơn 25nM như được đo bằng thử nghiệm sản xuất IFN-gama từ PBMC *in vitro*.

Theo một phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với intolokine-33 của người, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng ức chế quá trình sản xuất IFN-gama từ PBMC của người qua trung gian IL-33 với IC_{50} nhỏ hơn 3nM như được đo bằng thử nghiệm sản xuất IFN-gama từ PBMC *in vitro*.

Theo một phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với intolokine-33 của người, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng ức chế quá trình sản xuất IFN-gama từ PBMC của người qua trung gian IL-33 với IC_{50} nhỏ hơn 0,5nM như được đo bằng thử nghiệm sản xuất IFN-gama từ PBMC *in vitro*.

Theo một phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với intolokine-33 của người, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng làm giảm tần suất tế bào T CD4+, bạch cầu ưa eosin và tế bào ILC2 ở phổi khi được sử dụng cho mô hình động vật bị viêm phổi do dị ứng nguyên gây ra.

Theo một phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với intolokine-33 của người, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng làm giảm lượng IL-4 và IL-5 trong phổi khi được sử dụng cho mô hình động vật bị viêm phổi do dị ứng nguyên gây ra.

Theo một phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với intolokine-33 của người, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng, khi được sử dụng cho mô hình động vật bị viêm phổi do dị ứng nguyên gây ra, làm giảm lượng IL-4 ít nhất 4 lần và/hoặc làm giảm lượng IL-5 ít nhất 5 lần so với mô hình động vật được thử dị ứng nguyên tiếp nhận kháng thể tham chiếu kiểu tương đương.

Sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable region-HCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, và 308, hoặc trình tự về cơ bản tương đồng của chúng có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (light chain variable region-LCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, và 316, hoặc trình tự về cơ bản tương đồng của chúng có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó chứa cặp trình tự HCVR và LCVR (HCVR/LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, và 308/316.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể chứa miền CDR3 chuỗi nặng (heavy chain CDR3-HCDR3) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, và 314, hoặc trình tự về cơ bản tương đồng của chúng có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%; và miền CDR3 chuỗi nhẹ (light chain CDR3-LCDR3) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, và 322, hoặc trình tự về cơ bản tương đồng của chúng có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của kháng thể chứa cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8/16, 24/32, 40/48, 56/64, 72/80, 88/96, 104/112, 120/128, 136/144, 152/160, 168/176, 184/192, 200/208, 216/224, 232/240, 248/256, 264/272,

280/288, 296/304 và 314/322.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể hoặc đoạn của nó còn chứa miền CDR1 chuỗi nặng (heavy chain CDR1-HCDR1) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, và 310, hoặc trình tự về cơ bản tương đồng của chúng có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%; miền CDR2 chuỗi nặng (HCDR2) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, và 312, hoặc trình tự về cơ bản tương đồng của chúng có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%; miền CDR1 chuỗi nhẹ (LCDR1) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, và 318, hoặc trình tự về cơ bản tương đồng của chúng có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%; và miền CDR2 chuỗi nhẹ (LCDR2) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, và 320, hoặc trình tự về cơ bản tương đồng của chúng có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên tiêu biểu và không hạn chế nhất định theo sáng chế chứa các miền HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 lần lượt có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16 (ví dụ, H1M9559N); 20-22-24-28-30-32 (ví dụ, H1M9566N); 36-38-40-44-46-48 (ví dụ, H1M9568N); 52-54-56-60-62-64 (ví dụ, H4H9629P); 68-70-72-76-78-80 (ví dụ, H4H9633P); 84-86-88-92-94-96 (ví dụ, H4H9640P); 100-102-104-108-110-112 (ví dụ, H4H9659P); 116-118-120-124-126-128 (ví dụ, H4H9660P); 132-134-136-140-142-144 (ví dụ, H4H9662P); 148-150-152-156-158-160 (ví dụ, H4H9663P); 164-166-168-172-174-176 (ví dụ, H4H9664P); 180-182-184-188-190-192 (ví dụ, H4H9665P); 196-198-200-204-206-208 (ví dụ, H4H9666P); 212-214-216-220-222-224 (ví dụ, H4H9667P); 228-230-232-236-238-240 (ví dụ, H4H9670P); 244-246-248-252-254-256 (ví dụ, H4H9671P); 260-262-

264-268-270-272 (ví dụ, H4H9672P); 276-278-280-284-286-288 (ví dụ, H4H9675P); 292-294-296-300-302-304 (ví dụ, H4H9676P); và 310-312-314-318-320-322 (H1M9565N).

Theo một phương án có liên quan, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể mà liên kết đặc hiệu với IL-33, trong đó kháng thể hoặc đoạn này chứa các miền CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nằm trong các trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (HCVR/LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, và 308/316. Phương pháp và kỹ thuật nhận diện các CDR trong các trình tự axit amin của HCVR và LCVR thì đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sử dụng để nhận diện các CDR trong các trình tự axit amin của HCVR và/hoặc LCVR xác định được bộc lộ trong tài liệu này. Các quy ước tiêu biểu, mà có thể được sử dụng để nhận diện ranh giới của các CDR bao gồm, ví dụ, định nghĩa Kabat, định nghĩa Chothia, và định nghĩa AbM. Nhìn chung, định nghĩa Kabat là trên cơ sở mức biến đổi trình tự, định nghĩa Chothia là trên cơ sở vị trí của vùng vòng cấu trúc, và định nghĩa AbM là dạng chiết trung giữa phương pháp Kabat và phương pháp Chothia. Ví dụ, xem tài liệu: Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); và Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Các cơ sở dữ liệu công cộng cũng sẵn có để nhận diện các trình tự CDR trong kháng thể.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến các phân tử axit nucleic mã hoá các kháng thể kháng IL-33 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng. Vector biểu hiện tái tổ hợp mang các axit nucleic theo sáng chế, và tế bào chủ mà các vector này đã được đưa vào trong đó, cũng thuộc phạm vi sáng chế, như là đối với các phương pháp sản xuất kháng thể bằng cách nuôi cấy tế bào chủ trong điều kiện cho phép sản xuất kháng thể, và thu hồi kháng thể được sản xuất.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc đoạn của nó chứa HCVR được mã hoá bởi trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 241, 257, 273,

289, và 307, hoặc trình tự về cơ bản đồng nhất có mức tương đồng ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể hoặc đoạn của nó chứa LCVR được mã hoá bởi trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281, 297, và 315, hoặc trình tự về cơ bản đồng nhất có mức tương đồng ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể chứa miền HCDR3 được mã hoá bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 7, 23, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 151, 167, 183, 199, 215, 231, 247, 263, 279, 295, và 313, hoặc trình tự về cơ bản đồng nhất có mức tương đồng ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%; và miền LCDR3 được mã hoá bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 15, 31, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 159, 175, 191, 207, 223, 239, 255, 271, 287, 303, và 321, hoặc trình tự về cơ bản đồng nhất có mức tương đồng ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể hoặc đoạn của nó mà còn chứa miền HCDR1 được mã hoá bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3, 19, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147, 163, 179, 195, 211, 227, 243, 259, 275, 291, và 309, hoặc trình tự về cơ bản đồng nhất có mức tương đồng ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%; miền HCDR2 được mã hoá bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 5, 21, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 149, 165, 181, 197, 213, 229, 245, 261, 277, 293, và 311, hoặc trình tự về cơ bản đồng nhất có mức tương đồng ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%; miền LCDR1 được mã hoá bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 11, 27, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155, 171, 187, 203, 219, 235, 251, 267, 283, 299, và 317, hoặc trình tự về cơ bản đồng nhất có mức tương đồng ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%; và miền LCDR2 được mã hoá bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 13, 29, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 157, 173, 189, 205, 221, 237, 253, 269, 285, 301, và 319, hoặc trình tự về cơ bản đồng nhất có mức tương

đồng ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc đoạn của nó chứa các trình tự CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mã hoá bởi các trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 1 và 9 (ví dụ, H1M9559N), 17 và 25 (ví dụ, H1M9566N), 33 và 41 (ví dụ, H1M9568N), 49 và 57 (ví dụ, H4H9629P), 65 và 73 (ví dụ, H4H9633P), 81 và 89 (ví dụ, H4H9640P), 97 và 105 (ví dụ, H4H9659P), 113 và 121 (ví dụ, H4H9660P), 129 và 137 (ví dụ, H4H9662P), 145 và 153 (ví dụ, H4H9663P), 161 và 169 (ví dụ, H4H9664P), 177 và 185 (ví dụ, H4H9665P), 193 và 201 (ví dụ, H4H9666P), 209 và 217 (ví dụ, H4H9667P), 225 và 233 (ví dụ, H4H9670P), 241 và 249 (ví dụ, H4H9671P), 257 và 265 (ví dụ, H4H9672P), 273 và 281 (ví dụ, H4H9675P), 289 và 297 (ví dụ, H4H9676P), hoặc 307 và 315 (H1M9565N).

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng IL-33 có mẫu hình glycosyl hoá được cải biến. Trong một số ứng dụng, việc cải biến để loại bỏ các vị trí glycosyl hoá không mong muốn có thể là hữu ích, hoặc kháng thể thiếu gốc fucoza có mặt trên chuỗi oligosacarit, ví dụ, để làm tăng chức năng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular cytotoxicity-ADCC) (xem tài liệu: Shield et al. (2002) JBC 277:26733). Trong các ứng dụng khác, có thể tiến hành việc cải biến quá trình galactosyl hoá để cải biến tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity-CDC).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa kháng thể tái tổ hợp của người hoặc đoạn của nó, liên kết đặc hiệu với IL-33 và chất mang được dụng. Theo một khía cạnh có liên quan, sáng chế đề cập đến chế phẩm là dạng kết hợp của kháng thể kháng IL-33 và một chất trị liệu thứ hai. Theo một phương án, chất trị liệu thứ hai là chất bất kỳ mà được kết hợp một cách thuận lợi với kháng thể kháng IL-33. Chất tiêu biểu mà có thể được kết hợp một cách thuận lợi với kháng thể kháng IL-33, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất khác có chức năng ức chế hoạt tính IL-33 (kể cả các kháng thể khác hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng, chất ức chế peptit, chất đối kháng phân tử nhỏ, v.v.) và/hoặc chất không liên kết trực tiếp với IL-33 nhưng cản trở, phong bế hoặc làm giảm mức truyền tín hiệu qua trung gian IL-33. Theo một phương án, chất trị liệu thứ hai có thể được chọn từ nhóm bao gồm chất chống viêm không steroid (non-steroidal anti-

inflammatory-NSAID), corticosteroid, chất làm giãn phế quản, chất kháng histamin, epinephrin, chất làm thông mũi, chất đối kháng lymphopoietin như mô tuyến ức (thymic stromal lymphopoietin-TSLP), chất đối kháng IL-13, chất đối kháng IL-4, chất đối kháng kép IL-4/IL-13, chất đối kháng IL-5, chất đối kháng IL-6, chất đối kháng IL-12/23, chất đối kháng IL-22, chất đối kháng IL-25, chất đối kháng IL-17, chất đối kháng IL-31, chất ức chế PDE4 dùng qua đường miệng và chất đối kháng IL-33 khác hoặc kháng thể kháng IL-33 khác.

Theo các phương án nhất định, chất đối kháng xytokin có thể là chất ức chế phân tử nhỏ (tổng hợp hoặc có nguồn gốc tự nhiên), hoặc protein (ví dụ, kháng thể) mà tương tác với chính xytokin, hoặc với thụ thể của xytokin, hoặc với phức hợp gồm cả xytokin và (các) thụ thể của nó (ví dụ, kháng thể kháng IL-4 hoặc IL-6, hoặc kháng thể kháng thụ thể của IL-4 hoặc IL-6). Các liệu pháp kết hợp và các đồng chế phẩm bổ sung có liên quan đến kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế được bộc lộ nơi khác trong tài liệu này.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp trị liệu dùng để ức chế hoạt tính IL-33 bằng cách sử dụng kháng thể kháng IL-33 hoặc phần liên kết với kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế, trong đó phương pháp trị liệu này bao gồm việc cho dùng một lượng hữu hiệu trị liệu của dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế. Rối loạn được điều trị là bệnh hoặc tình trạng bệnh bất kỳ mà được cải thiện, làm giảm, ức chế hoặc phòng ngừa bằng cách loại bỏ, ức chế hoặc làm giảm hoạt tính hoặc quá trình truyền tín hiệu qua trung gian IL-33. Kháng thể kháng IL-33 hoặc các đoạn kháng thể theo sáng chế có thể có chức năng phong bế sự tương tác giữa IL-33 và thành phần liên kết với IL-33 (ví dụ, thành phần thụ thể IL-33), hoặc mặt khác ức chế hoạt tính truyền tín hiệu của IL-33.

Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp trị liệu rối loạn hoặc bệnh viêm, hoặc ít nhất là một triệu chứng gắn liền với rối loạn hoặc bệnh viêm, trong đó phương pháp này bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng kháng thể liên kết đặc hiệu với IL-33, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, hoặc dược phẩm chứa kháng thể liên kết đặc hiệu với IL-33, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, trong đó rối loạn hoặc bệnh viêm được làm giảm hoặc giảm bớt về

mức độ nghiêm trọng, thời gian hoặc tần suất xuất hiện bệnh, hoặc ít nhất một triệu chứng gắn liền với rối loạn hoặc bệnh viêm được làm giảm hoặc giảm bớt về mức độ nghiêm trọng, thời gian hoặc tần suất xuất hiện bệnh.

Theo một phương án, bệnh hoặc tình trạng viêm được chọn từ nhóm bao gồm bệnh hen, bệnh viêm da dị ứng, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (chronic obstructive pulmonary disease-COPD), bệnh viêm ruột, bệnh đa xơ cứng, bệnh viêm khớp, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh viêm thực quản do bạch cầu ưa eosin và bệnh vảy nến.

Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp trị liệu bệnh nhân mà thể hiện tính nhạy cảm với dị ứng nguyên, trong đó phương pháp này bao gồm việc cho bệnh nhân cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu của kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với IL-33, hoặc được phẩm chứa kháng thể liên kết đặc hiệu với IL-33, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, trong đó bệnh nhân này sau khi sử dụng kháng thể hoặc chế phẩm chứa kháng thể có biểu hiện tính nhạy cảm giảm, hoặc phản ứng dị ứng giảm đối với dị ứng nguyên, hoặc không biểu hiện tính nhạy cảm hoặc phản ứng dị ứng, hoặc đáp ứng phản vệ đối với dị ứng nguyên.

Theo một phương án, sáng chế mô tả việc sử dụng lượng hữu hiệu của chất trị liệu thứ hai hữu ích để làm giảm rối loạn hoặc bệnh viêm, hoặc ít nhất một triệu chứng của rối loạn hoặc bệnh viêm, hoặc để làm giảm đáp ứng dị ứng với dị ứng nguyên. Như được nêu trên đây, chất trị liệu thứ hai có thể được chọn từ nhóm bao gồm chất chống viêm không steroid (non-steroidal anti-inflammatory-NSAID), corticosteroid, chất làm giãn phế quản, chất kháng histamin, epinephrin, chất làm thông mũi, chất đối kháng lymphopoietin nhu mô tuyến ức (TSLP), chất đối kháng IL-13, chất đối kháng IL-4, chất đối kháng IL-5, chất đối kháng IL-6, chất đối kháng IL-25, chất đối kháng IL-17, và chất đối kháng IL-33 khác hoặc kháng thể khác kháng IL-33.

Theo một khía cạnh có liên quan, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó để sử dụng trong việc điều trị bệnh hoặc rối loạn có liên quan đến, hoặc do IL-33 ở bệnh nhân. Theo một

phương án, rối loạn hoặc bệnh có liên quan đến, hoặc do hoạt tính IL-33 ở bệnh nhân là rối loạn hoặc bệnh viêm, trong đó rối loạn hoặc bệnh viêm này được chọn từ nhóm bao gồm bệnh hen, bệnh viêm da dị ứng, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh viêm ruột, bệnh đa xơ cứng, bệnh viêm khớp, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh viêm thực quản do bạch cầu ưa eosin và bệnh vẩy nến.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng kháng thể kháng IL-33 hoặc phần liên kết với kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị rối loạn hoặc bệnh có liên quan đến hoặc do hoạt tính IL-33 gây ra ở bệnh nhân. Theo một phương án, rối loạn hoặc bệnh có liên quan đến, hoặc do hoạt tính IL-33 gây ra ở bệnh nhân là rối loạn hoặc bệnh viêm, trong đó rối loạn hoặc bệnh viêm này được chọn từ nhóm bao gồm bệnh hen, bệnh viêm da dị ứng, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD), bệnh viêm ruột, bệnh đa xơ cứng, bệnh viêm khớp, bệnh viêm mũi dị ứng, bệnh viêm thực quản do bạch cầu ưa eosin và bệnh vẩy nến.

Các phương án khác sẽ trở nên sáng tỏ nhờ việc xem xét đến phần mô tả chi tiết dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1. Thể hiện sự cạnh tranh chéo giữa các kháng thể kháng IL-33 đối với IL-33 của người

Fig.2. Thể hiện sự cạnh tranh chéo giữa các kháng thể kháng IL-33 đối với IL-33 tái tổ hợp của khỉ

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi sáng chế được mô tả, cần phải hiểu rằng sáng chế này không bị giới hạn ở phương pháp và các điều kiện thử nghiệm cụ thể được mô tả, như vậy phương pháp và điều kiện thử nghiệm này có thể thay đổi. Cũng cần phải hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng trong tài liệu này chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể mà thôi, và không được dự định là làm giới hạn phạm vi của sáng chế, vì phạm vi của sáng chế chỉ bị giới hạn ở yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Trừ khi được quy định khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong tài liệu này có nghĩa như thường được hiểu bởi chuyên gia trong lĩnh

vực kỹ thuật này. Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ "khoảng," nếu được sử dụng cùng với giá trị bằng số được trích dẫn cụ thể, có nghĩa là trị số này có thể thay đổi không quá 1% so với trị số được trích dẫn. Ví dụ, như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ "khoảng 100" bao gồm cả 99 và 101 và tất cả các trị số nằm trong khoảng này (ví dụ, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, v.v.).

Mặc dù có thể sử dụng các phương pháp và nguyên liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và nguyên liệu được mô tả trong tài liệu này để thực hiện hoặc thử nghiệm sáng chế, nhưng bây giờ, các phương án và nguyên liệu được ưu tiên được mô tả.

Các định nghĩa

Thuật ngữ "intolokin-33," "IL-33," và các thuật ngữ tương tự, như được sử dụng trong tài liệu này, được dùng để chỉ protein IL-33 của người có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:307. Tất cả các phân viện dẫn đến các protein, polypeptit và đoạn protein trong tài liệu này được dùng để chỉ phiên bản của protein, polypeptit hoặc đoạn protein tương ứng của người trừ khi được chỉ rõ là có nguồn gốc từ các loài không phải là người (ví dụ, "IL-33 của chuột," "IL-33 của khỉ" v.v.).

Như được sử dụng trong tài liệu này, "kháng thể liên kết với IL-33" hoặc "kháng thể kháng IL-33" bao gồm các kháng thể, và đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng, mà liên kết với đoạn protein IL-33 hòa tan. Phân tử IL-33 hòa tan bao gồm protein IL-33 tự nhiên cũng như là các biến thể protein IL-33 tái tổ hợp như, ví dụ, các cấu trúc IL-33 dạng monome và dimer.

Thuật ngữ "kháng thể", như được sử dụng trong tài liệu này, có nghĩa là phân tử hoặc phức hợp phân tử liên kết với kháng nguyên bất kỳ chứa ít nhất một vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining region-CDR) mà liên kết đặc hiệu hoặc tương tác với kháng nguyên cụ thể (ví dụ, IL-33). Thuật ngữ "kháng thể" bao gồm các phân tử globulin miễn dịch có bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (heavy-H) và hai chuỗi nhẹ (light-L) được nối với nhau bằng liên kết disulfua, cũng như là các multime của chúng (ví dụ, IgM). Mỗi chuỗi nặng gồm có vùng biến đổi chuỗi nặng (được viết tắt trong tài liệu này là HCVR hoặc V_H) và vùng ổn định chuỗi nặng. Vùng ổn định chuỗi nặng gồm có ba miền, C_H1, C_H2 và C_H3. Mỗi chuỗi

nhẹ gồm có vùng biến đổi chuỗi nhẹ (được viết tắt trong tài liệu này là LCVR hoặc V_L) và vùng ổn định chuỗi nhẹ. Vùng ổn định chuỗi nhẹ gồm có một miền (C_L1). Các vùng V_H và V_L còn có thể được chia nhỏ thành các vùng có tính siêu biến, được gọi là vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining region-CDR), nằm xen lẫn với các vùng mà được bảo toàn nhiều hơn, được gọi là các vùng khung (framework region-FR). Mỗi V_H và V_L gồm có ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu cuối amin đến đầu cuối carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo các phương án khác của sáng chế, các FR của kháng thể kháng IL-33 (hoặc phần liên kết với kháng nguyên của nó) có thể đồng nhất với các trình tự dòng mầm của người, hoặc có thể được cải biến theo cách nhân tạo hoặc tự nhiên. Trình tự liên ứng axit amin có thể được xác định dựa vào phân tích từng bên một của hai hoặc nhiều CDR hơn nữa.

Thuật ngữ "kháng thể", như được sử dụng trong tài liệu này, còn bao gồm các đoạn liên kết với kháng nguyên của phân tử kháng thể đầy đủ. Thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể, "đoạn liên kết với kháng nguyên" của kháng thể, và các thuật ngữ tương tự, như được sử dụng trong tài liệu này, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein có nguồn gốc trong tự nhiên, thu được bằng phản ứng enzym, tổng hợp, hoặc được thao tác gen mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo thành phức hợp. Đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể có thể thu được, ví dụ, từ các phân tử kháng thể đầy đủ bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp bất kỳ như các kỹ thuật phân cắt thủy phân protein hoặc kỹ thuật thao tác gen tái tổ hợp có liên quan đến việc thao tác và biểu hiện ADN mã hoá các vùng biến đổi và vùng ổn định tùy ý của kháng thể. ADN này thì đã biết và/hoặc dễ tìm từ, ví dụ, các nguồn thương mại, các thư viện ADN (bao gồm, ví dụ, thư viện thể thực khuẩn-kháng thể), hoặc có thể được tổng hợp. ADN có thể được giải trình tự và được xử lý hoá học hoặc sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử, ví dụ, để sắp xếp một hoặc nhiều vùng biến đổi và/hoặc vùng ổn định thành cấu hình thích hợp, hoặc đưa các codon vào, tạo ra các gốc xystein, thay đổi, bổ sung hoặc loại bỏ các axit amin, v.v..

Các ví dụ không hạn chế về đoạn liên kết với kháng nguyên bao gồm: (i) đoạn Fab; (ii) đoạn $F(ab')_2$; (iii) đoạn Fd; (iv) đoạn Fv; (v) phân tử Fv mạch đơn

(single-chain Fv-scFv); (vi) đoạn dAb; và (vii) các đơn vị nhận biết tối thiểu gồm các gốc axit amin mà bắt chước vùng siêu biến của kháng thể (ví dụ, vùng quyết định tính hỗ trợ (CDR) được phân lập như peptit CDR3), hoặc peptit FR3-CDR3-FR4 bị giới hạn. Các phân tử được thao tác gen khác, như kháng thể đặc hiệu miễn, kháng thể một miền, kháng thể bị xóa bỏ miền, kháng thể thể khảm, kháng thể được ghép CDR, song thể, thể ba, thể bốn, tiểu kháng thể, kháng thể nano (ví dụ, kháng thể nano hóa trị một, kháng thể nano hóa trị hai, v.v.), các được chất miễn dịch cấu kiện nhỏ (small modular immunopharmaceutical-SMIP), miền IgNAR biến đổi của cá mập, cũng được bao gồm trong thuật ngữ "đoạn liên kết với kháng nguyên", như được sử dụng trong tài liệu này.

Đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể thường có ít nhất là một miền biến đổi. Miền biến đổi có thể có kích thước hoặc thành phần axit amin bất kỳ và thường chứa ít nhất là một CDR liền kề với hoặc nằm trong khung với một hoặc nhiều trình tự khung. Trong đoạn liên kết với kháng nguyên có miền V_H gắn liền với miền V_L , thì các miền V_H và V_L có thể được nằm cân xứng với nhau theo cách sắp xếp thích hợp bất kỳ. Ví dụ, vùng biến đổi có thể là đime và bao gồm các đime V_H - V_H , V_H - V_L hoặc V_L - V_L . Theo cách khác, đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể có thể chứa miền V_H hoặc V_L dạng monome.

Theo các phương án nhất định, đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất một miền biến đổi được liên kết cộng hoá trị với ít nhất một miền ổn định. Các cấu hình không giới hạn tiêu biểu của các miền biến đổi và ổn định mà có thể được tìm thấy trong đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bao gồm: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; và (xiv) V_L - C_L . Theo một cấu hình bất kỳ của các miền biến đổi và ổn định, kể cả cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình tiêu biểu được nêu trên đây, các miền biến đổi và ổn định có thể được liên kết trực tiếp với nhau hoặc có thể được liên kết bằng vùng liên kết hoặc vùng bản lề một phần hoặc toàn bộ. Vùng bản lề có thể chứa ít nhất là 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều hơn) axit amin mà tạo ra liên kết linh động hoặc bán linh động giữa các miền biến đổi và/hoặc ổn định liền kề trong một phân tử

polypeptit đơn lẻ. Hơn thế nữa, đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể là đime cùng loại hoặc đime khác loại (hoặc multime khác) của cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình vùng biến đổi và ổn định được liệt kê trên đây được liên kết không cộng hoá trị với nhau và/hoặc với một hoặc nhiều miền V_H hoặc V_L monome (ví dụ, bằng (các) liên kết disulfua).

Đối với phân tử kháng thể đầy đủ, đoạn liên kết với kháng nguyên có thể có tính đặc hiệu đơn hoặc tính đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Đoạn liên kết với kháng nguyên đa đặc hiệu của kháng thể thường chứa ít nhất là hai miền biến đổi khác nhau, trong đó mỗi miền biến đổi có khả năng liên kết đặc hiệu với một kháng nguyên riêng rẽ hoặc với epitop khác trên cùng một kháng nguyên. Dạng thức kháng thể đa đặc hiệu bất kỳ, kể cả các dạng thức kháng thể đặc hiệu kép tiêu biểu được bộc lộ trong tài liệu này, có thể được điều chỉnh để sử dụng trong phạm vi đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường sẵn có trong lĩnh vực này.

Kháng thể theo sáng chế có thể thực hiện chức năng nhờ gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement-dependent cytotoxicity-CDC) hoặc gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity-ADCC). Thuật ngữ "gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể" (CDC) được dùng để chỉ việc phân giải tế bào biểu hiện kháng nguyên bằng kháng thể theo sáng chế khi có mặt bổ thể. Thuật ngữ "gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể" (ADCC) được dùng để chỉ phản ứng qua trung gian tế bào trong đó các tế bào gây độc tế bào không đặc hiệu mà biểu hiện thụ thể Fc (FcR) (ví dụ, tế bào tiêu diệt tự nhiên (Natural Killer-NK), bạch cầu trung tính, và đại thực bào) nhận biết kháng thể đã liên kết trên tế bào đích và nhờ đó dẫn tới quá trình phân giải tế bào đích này. Có thể đo mức CDC và ADCC bằng cách sử dụng các thử nghiệm đã biết rõ và sẵn có trong lĩnh vực này. (ví dụ, xem Patent Mỹ số 5,500,362 và 5,821,337, và Clynes *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656). Vùng ổn định của kháng thể là quan trọng đối với khả năng của kháng thể trong việc cố định bổ thể và làm trung gian cho tính gây độc tế bào phụ thuộc tế bào. Do đó, có thể lựa chọn kiểu tương đương của kháng thể trên cơ sở có mong muốn kháng thể làm trung gian gây độc tế bào hay không.

Theo các phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế là kháng thể của người. Thuật ngữ "kháng thể của người", như được sử dụng trong tài liệu này, được dự định là bao gồm kháng thể có các vùng biến đổi và ổn định thu được từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Kháng thể của người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hoá bởi các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng phương pháp gây đột biến ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc gây đột biến tế bào sinh dưỡng *in vivo*), ví dụ, ở các CDR và cụ thể là CDR3. Tuy nhiên, thuật ngữ "kháng thể của người", như được sử dụng trong tài liệu này, không được dự định là bao gồm kháng thể trong đó các trình tự CDR thu được từ dòng mầm của các loài động vật có vú khác, như chuột, đã được ghép lên các trình tự khung của người.

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể tái tổ hợp của người. Thuật ngữ "kháng thể tái tổ hợp của người", như được sử dụng trong tài liệu này, được dự định là bao gồm tất cả các kháng thể của người mà được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng các phương tiện tái tổ hợp, như kháng thể được biểu hiện bằng vector biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào tế bào chủ (được mô tả thêm dưới đây), kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể tổ hợp, tái tổ hợp của người (được mô tả thêm dưới đây), kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột), động vật này là chuyển gen đối với các gen globulin miễn dịch của người (ví dụ, xem tài liệu: Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) hoặc kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng các phương tiện bất kỳ khác mà có liên quan đến việc cắt ghép intron của các trình tự gen globulin miễn dịch của người với các trình tự ADN khác. Kháng thể tái tổ hợp của người như vậy có các vùng biến đổi và ổn định thu được từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Tuy nhiên, theo các phương án nhất định, kháng thể tái tổ hợp của người như vậy được gây đột biến *in vitro* (hoặc, khi động vật chuyển gen đối với các trình tự Ig của người được sử dụng, gây đột biến tế bào sinh dưỡng *in vivo*) và do đó các trình tự axit amin của các vùng V_H và V_L của kháng thể tái tổ hợp là các trình tự mà, trong khi thu được từ và có liên quan đến các trình tự V_H và V_L dòng mầm của người, có thể không tồn tại theo cách tự nhiên trong kho dòng

mầm kháng thể của người *in vivo*.

Các kháng thể của người có thể tồn tại ở hai dạng mà gắn liền với tính không đồng nhất vùng bản lề. Ở một dạng, phân tử globulin miễn dịch là cấu trúc gồm bốn chuỗi ổn định có kích thước xấp xỉ 150-160kDa trong đó các dime được gắn với nhau bằng liên kết disulfua chuỗi nặng liên chuỗi. Ở dạng thứ hai, các dime không được liên kết với nhau thông qua liên kết disulfua liên chuỗi và phân tử có kích thước khoảng 75-80kDa được tạo thành gồm có chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được liên kết cộng hoá trị (nửa kháng thể). Các dạng này rất khó để tách ra ngay cả sau khi tinh chế ái lực.

Tần suất xuất hiện dạng thứ hai ở các kiểu tương đương IgG nguyên vẹn khác nhau là do, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự khác nhau về cấu trúc gắn liền với kiểu tương đương vùng bản lề của kháng thể. Sự thay thế một axit amin ở vùng bản lề của bản lề IgG4 của người có thể làm giảm đáng kể sự xuất hiện dạng thứ hai (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) xuống mức thường được quan sát thấy ở bản lề IgG1 của người. Sáng chế đề cập đến các kháng thể có một hoặc nhiều đột biến ở vùng bản lề, vùng C_H2 hoặc C_H3, ví dụ, mà có thể là thích hợp trong quá trình sản xuất, để cải thiện năng suất của dạng kháng thể mong muốn.

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể được phân lập. Thuật ngữ "kháng thể được phân lập", như được sử dụng trong tài liệu này, có nghĩa là kháng thể mà được nhận diện và tách và/hoặc thu hồi từ ít nhất một thành phần trong môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, kháng thể được tách ra hoặc được lấy ra từ ít nhất một thành phần của sinh vật, hoặc từ mô hoặc tế bào trong đó kháng thể tồn tại tự nhiên hoặc được sản xuất tự nhiên, là "kháng thể được phân lập" để dùng cho các mục đích của sáng chế. Kháng thể được phân lập còn bao gồm kháng thể *in situ* trong tế bào tái tổ hợp. Kháng thể được phân lập là kháng thể mà được tiến hành ít nhất một bước phân lập hoặc tinh chế. Theo các phương án nhất định, kháng thể được phân lập hầu như không chứa các hoá chất và/hoặc nguyên liệu tế bào khác.

Sáng chế đề cập đến việc trung hoà và/hoặc phong bế kháng thể kháng IL-33. Thuật ngữ "trung hoà" hoặc "phong bế" kháng thể, như được sử dụng trong tài liệu này, được dùng để chỉ kháng thể mà quá trình liên kết với IL-33 của nó: (i) cản trở quá trình tương tác giữa IL-33 hoặc đoạn IL-33 và thành phần thụ thể IL-33 (ví

dụ, ST2, IL-1RAcP, v.v.); và/hoặc (ii) dẫn đến ức chế ít nhất một chức năng sinh học của IL-33. Hiện tượng ức chế do kháng thể phong bế hoặc trung hoà IL-33 gây ra không cần thiết phải là hoàn chỉnh miễn là hiện tượng này có thể phát hiện được bằng thử nghiệm thích hợp. Các thử nghiệm tiêu biểu dùng để phát hiện hiện tượng ức chế IL-33 được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế trong tài liệu này.

Kháng thể kháng IL-33 được bộc lộ trong tài liệu này có thể có một hoặc nhiều đoạn thay thế, thêm và/hoặc xóa bỏ axit amin ở vùng khung và/hoặc vùng CDR của các miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng so với các trình tự dòng mầm tương ứng mà thu được kháng thể từ đó. Các đột biến này có thể dễ dàng được xác định bằng cách so sánh các trình tự axit amin được bộc lộ trong tài liệu này với các trình tự dòng mầm sẵn có từ cơ sở dữ liệu trình tự kháng thể công cộng. Sáng chế đề cập đến kháng thể, và đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng, thu được từ trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin được bộc lộ trong tài liệu này, trong đó một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều vùng khung và/hoặc vùng CDR được gây đột biến thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm mà thu được kháng thể từ đó, hoặc thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm của người khác, hoặc thành đoạn thay thế axit amin bảo toàn của (các) gốc dòng mầm tương ứng (các thay đổi trình tự như vậy trong tài liệu này được gọi chung là "các đột biến dòng mầm"). Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, bắt đầu bằng các trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ trong tài liệu này, có thể dễ dàng sản xuất nhiều kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên khác nhau mà có một hoặc nhiều đột biến dòng mầm riêng biệt hoặc các dạng kết hợp của chúng. Theo các phương án nhất định, tất cả các gốc trong vùng khung và/hoặc vùng CDR trong các miền V_H và/hoặc V_L được gây đột biến ngược thành các gốc được tìm thấy trong trình tự dòng mầm gốc mà thu được kháng thể từ đó. Theo các phương án khác, chỉ các gốc nhất định được gây đột biến ngược thành trình tự dòng mầm gốc, ví dụ, chỉ các gốc đột biến được tìm thấy trong 8 axit amin đầu tiên của FR1 hoặc trong 8 axit amin cuối của FR4, hoặc chỉ các gốc đột biến được tìm thấy trong CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều gốc trong vùng khung và/hoặc vùng CDR được gây đột biến thành (các) gốc tương ứng trong trình tự dòng mầm khác (tức là, trình tự dòng mầm mà khác so với

trình tự dòng mầm mà ban đầu thu được kháng thể từ đó). Hơn thế nữa, kháng thể theo sáng chế có thể chứa dạng kết hợp bất kỳ của từ hai đột biến dòng mầm trở lên trong các vùng khung và/hoặc CDR, ví dụ, trong đó các gốc riêng biệt nhất định được gây đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng mầm cụ thể trong khi các gốc còn lại nhất định mà khác với trình tự dòng mầm gốc được giữ nguyên hoặc được gây đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác. Một khi đã thu được, kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm có thể dễ dàng được thử nghiệm về một hoặc nhiều thuộc tính mong muốn như, tính đặc hiệu liên kết tốt hơn, ái lực liên kết cao hơn, các đặc tính sinh học chủ vận hoặc đối kháng tốt hơn hoặc mạnh hơn (tùy theo từng trường hợp), khả năng gây miễn dịch giảm, v.v.. Kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên thu được theo phương thức tổng quát này nằm trong phạm vi sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể kháng IL-33 chứa biến thể của trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin của HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được bộc lộ trong tài liệu này có một hoặc nhiều đoạn thay thế axit amin bảo toàn. Ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng IL-33 có các trình tự axit amin của HCVR, LCVR, và/hoặc CDR với 10 đoạn thay thế axit amin bảo toàn trở xuống, 8 đoạn thay thế axit amin bảo toàn trở xuống, 6 đoạn thay thế axit amin bảo toàn trở xuống, 4 đoạn thay thế axit amin bảo toàn trở xuống, v.v. so với trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin của HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được bộc lộ trong tài liệu này.

Thuật ngữ "epitop" được dùng để chỉ quyết định tổ kháng nguyên mà tương tác với vị trí liên kết kháng nguyên đặc hiệu ở vùng biến đổi của phân tử kháng thể được biết đến với tên gọi là paratop. Một kháng nguyên có thể có nhiều epitop. Do đó, các kháng thể khác nhau có thể liên kết với các vùng khác nhau trên kháng nguyên và có thể có các tác dụng sinh học khác nhau. Epitop có thể có hình thể hoặc mạch thẳng. Epitop hình thể được tạo ra bởi các axit amin liền kề trong không gian từ các đoạn khác nhau của chuỗi polypeptit mạch thẳng. Epitop mạch thẳng là epitop được tạo ra bởi các gốc axit amin liền kề trong chuỗi polypeptit. Trong trường hợp nhất định, epitop có thể chứa các gốc sacarit, các nhóm phosphoryl, hoặc các nhóm sulfonyl trên kháng nguyên.

Thuật ngữ "mức đồng nhất cơ bản" hoặc "về cơ bản đồng nhất" khi nói đến axit nucleic hoặc đoạn của nó, biểu đạt rằng khi được xếp thẳng hàng tối ưu với các đoạn thêm hoặc các đoạn xóa bỏ nucleotit thích hợp bằng một axit nucleic khác (hoặc mạch bổ trợ của nó), thì có mức đồng nhất trình tự nucleotit ít nhất là 95%, và tốt hơn, nếu là ít nhất 96%, 97%, 98% hoặc 99% bazơ nucleotit, như được đo bằng thuật toán đã biết rõ bất kỳ về mức đồng nhất trình tự, như FASTA, BLAST hoặc Gap, như được bàn dưới đây. Phân tử axit nucleic có mức đồng nhất cơ bản với phân tử axit nucleic tham chiếu có thể, trong các trường hợp nhất định, mã hóa polypeptit có cùng một trình tự axit amin hoặc có trình tự axit amin về cơ bản tương đồng với polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic tham chiếu.

Khi áp dụng cho polypeptit, thuật ngữ "mức tương đồng cơ bản" hoặc "về cơ bản tương đồng" có nghĩa là hai trình tự peptit, khi được xếp thẳng hàng tối ưu bằng chương trình GAP hoặc BESTFIT sử dụng độ lớn khoảng trống mặc định, có chung ít nhất là 95% mức đồng nhất trình tự, thậm chí tốt hơn là có chung ít nhất là 98% hoặc 99% mức đồng nhất trình tự. Tốt hơn, nếu các vị trí gốc mà không đồng nhất khác nhau bởi các đoạn thay thế axit amin bảo toàn. "Thay thế axit amin bảo toàn" là kiểu thay thế trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin khác có mạch bên (nhóm R) có các thuộc tính hóa học tương tự (ví dụ, điện tích hoặc tính kỵ nước). Nhìn chung, sự thay thế axit amin bảo toàn về cơ bản sẽ không làm thay đổi các thuộc tính chức năng của protein. Trong các trường hợp mà hai trình tự axit amin trở lên khác biệt với nhau bởi các đoạn thay thế axit amin bảo toàn, thì phần trăm mức đồng nhất trình tự hoặc mức tương đồng trình tự có thể được điều chỉnh tăng lên để phù hợp với bản chất bảo toàn của việc thay thế. Phương tiện để thực hiện việc điều chỉnh này thì chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rõ. Ví dụ, xem tài liệu: Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Các ví dụ về nhóm axit amin mà có mạch bên có các thuộc tính hóa học tương tự bao gồm (1) mạch bên béo: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; (2) mạch bên hydroxyl-béo: serin và threonin; (3) mạch bên chứa amit: asparagin và glutamin; (4) mạch bên thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; (5) mạch bên bazơ: lysin, arginin, và histidin; (6) mạch bên axit: aspartat và glutamat, và (7) mạch bên chứa lưu huỳnh là xystein và methionin. Các nhóm đoạn thay thế axit amin bảo toàn được ưu

tiên là: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat, và asparagin-glutamin. Theo cách khác, thay thế bảo toàn là sự thay đổi bất kỳ có trị số dương trong ma trận logarit hợp lý PAM250 được bộc lộ trong tài liệu: Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443-1445. Thay thế "bảo toàn vừa phải" là sự thay đổi bất kỳ có trị số không âm trong ma trận logarit hợp lý PAM250.

Mức tương đồng trình tự của các polypeptit, mà cũng được gọi là mức đồng nhất trình tự, thường được đo bằng cách sử dụng phần mềm phân tích trình tự. Phần mềm phân tích protein so khớp các trình tự tương đồng bằng cách sử dụng các số đo mức tương đồng được gán cho các đoạn thay thế axit amin, xóa bỏ axit amin khác nhau và các đoạn cải biến khác, kể cả các đoạn thay thế axit amin bảo toàn. Ví dụ, phần mềm GCG có các chương trình như Gap và Bestfit mà có thể được sử dụng với các thông số mặc định để xác định mức tương đồng trình tự hoặc mức đồng nhất trình tự giữa các polypeptit có quan hệ gần, như các polypeptit tương đồng có nguồn gốc từ các loài sinh vật khác nhau hoặc giữa protein kiểu hoang dại và dạng đột biến của nó. Ví dụ, xem GCG phiên bản 6.1. Cũng có thể so sánh các trình tự polypeptit bằng cách sử dụng FASTA có sử dụng các thông số mặc định hoặc được khuyến nghị, chương trình trong GCG phiên bản 6.1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) cung cấp các phép xếp thẳng hàng và phần trăm mức đồng nhất trình tự của các vùng có mức chồng lấn nhiều nhất giữa trình tự truy vấn và trình tự tra cứu (Pearson (2000) trên đây). Thuật toán được ưu tiên khác khi so sánh trình tự theo sáng chế với cơ sở dữ liệu chứa số lượng lớn trình tự có nguồn gốc từ các sinh vật khác nhau là chương trình máy vi tính BLAST, đặc biệt là BLASTP hoặc TBLASTN, có sử dụng các thông số mặc định. Ví dụ, xem tài liệu: Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 và Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402.

Thuật ngữ "rối loạn hoặc bệnh viêm", như được sử dụng trong tài liệu này, được dùng để chỉ bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh lý trong đó bệnh lý này hình thành, một phần hoặc toàn bộ, từ sự thay đổi số lượng, sự thay đổi tỷ lệ di chuyển, hoặc sự thay đổi mức hoạt hóa của các tế bào của hệ miễn dịch. Các tế bào của hệ miễn dịch bao gồm, ví dụ, tế bào T, tế bào B, bạch cầu đơn nhân hoặc đại thực bào, tế bào trình diện kháng nguyên (antigen presenting cell-APC), tế bào có đuôi gai, tế

bào thần kinh đệm, tế bào NK, bạch cầu trung tính, bạch cầu ưa eosin, tế bào mast, hoặc tế bào bất kỳ khác có liên quan đặc biệt đến miễn dịch, ví dụ, tế bào nội mô hoặc biểu mô sản xuất xytokin. Như được sử dụng trong tài liệu này, theo một phương án, "rối loạn hoặc bệnh viêm" là rối loạn miễn dịch hoặc tình trạng bệnh lý miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm bệnh hen, (kể cả bệnh hen kháng steroid, bệnh hen nhạy cảm với steroid, bệnh hen do bạch cầu ưa eosin hoặc bệnh hen không do bạch cầu ưa eosin, bệnh dị ứng, sốc phản vệ, bệnh đa xơ cứng, bệnh viêm ruột (ví dụ, bệnh Crohn hoặc bệnh viêm loét ruột kết), bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD, mà có thể có hoặc không liên quan đến, một phần do, hoặc hình thành từ, quá trình tiếp xúc với khói thuốc lá thụ động hoặc chủ động), bệnh luput, bệnh viêm da dị ứng, bệnh vẩy nến, bệnh xơ cứng bì và các bệnh xơ hóa khác, hội chứng sjogren, bệnh viêm mạch (bệnh behcet, bệnh viêm động mạch tế bào khổng lồ, ban xuất huyết Henoch-Schonlein và hội chứng Churg Strauss) và bệnh viêm khớp. Theo một phương án khác, bệnh viêm khớp được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, và bệnh viêm khớp vẩy nến. Theo một phương án khác, "rối loạn hoặc bệnh viêm" là tình trạng bệnh lý hoặc rối loạn miễn dịch bao gồm đáp ứng kiểu TH₁ hoặc đáp ứng kiểu TH₂.

Thuật ngữ "ức chế hoặc làm giảm mức truyền tín hiệu qua trung gian IL-33", như được sử dụng trong tài liệu này, được dùng để chỉ mức mà IL-33 kích thích quá trình tải nạp tín hiệu qua ST2 và IL-1RAcP được làm giảm khi có mặt chất đối kháng, như kháng thể kháng IL-33 được mô tả trong tài liệu này, so với mức mà IL-33 kích thích quá trình tải nạp tín hiệu qua ST2 và IL-1RAcP khi không có mặt chất đối kháng như kháng thể kháng IL-33 được mô tả trong tài liệu này. Để đánh giá mức ức chế, một mẫu được xử lý bằng chất ức chế/chất đối kháng tiềm năng và được đem so sánh với mẫu đối chứng không được xử lý bằng chất ức chế/chất đối kháng này. Các mẫu đối chứng, tức là không được xử lý bằng chất đối kháng, được gán có trị số hoạt tính tương đối bằng 100%. Đạt được mức ức chế khi trị số hoạt tính so với đối chứng là 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, hoặc 20% hoặc ít hơn nữa. Điểm kết thúc trong quá trình ức chế có thể là lượng hoặc tỷ lệ phần trăm được xác định trước của, ví dụ, chỉ thị về chứng viêm, hoặc mức mất hạt nhỏ, mức tiết hoặc mức hoạt hóa tế bào, như giải

phóng xytokin. Có thể xác định mức ức chế quá trình tải nạp tín hiệu IL-33 qua ST2 và IL-1RAcP bằng cách thử nghiệm đối với quá trình tải nạp tín hiệu IL-33 trong thử nghiệm *in vitro*, như thử nghiệm được mô tả trong tài liệu này ở ví dụ 6. Ngoài ra, cũng có thể sử dụng các thử nghiệm *in vivo* để xác định xem liệu một phân tử nào đó có phải là chất đối kháng của IL-33 hay không. Ví dụ, thử nghiệm *in vivo* như thử nghiệm được mô tả trong các ví dụ 11 và 12 có thể được sử dụng để đánh giá tác dụng của kháng thể kháng IL-33 đối với bệnh viêm phổi ở động vật được làm cho nhạy cảm với dị ứng nguyên mà có tính đồng hợp tử đối với quá trình biểu hiện IL-33 của người. Sau khi làm cho các con vật nhạy cảm với dị ứng nguyên, một phân nhóm của các con vật này được điều trị bằng kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế hoặc kháng thể tham chiếu kiểu tương đương âm tính. Sau đó, các con vật được làm chết và phổi được thu hoạch để đánh giá các phản ứng thâm nhiễm tế bào, cũng như là đo hàm lượng xytokin (IL-4 và IL-5). Kháng thể kháng IL-33 mà hữu hiệu làm chất đối kháng cần thể hiện được xu hướng làm giảm lượng tế bào gây viêm ở phổi, cũng như là xu hướng làm giảm lượng xytokin như IL-4 và IL-5.

Các đặc tính sinh học của kháng thể

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng IL-33 và đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng mà liên kết với IL-33 của người và ức chế hoặc làm giảm mức truyền tín hiệu qua trung gian IL-33. Kháng thể kháng IL-33 được cho là có "ức chế hoặc làm giảm mức truyền tín hiệu qua trung gian IL-33" nếu, ví dụ, kháng thể này biểu hiện một hoặc nhiều thuộc tính được chọn từ nhóm bao gồm: (1) ức chế quá trình truyền tín hiệu qua trung gian IL-33 trong thử nghiệm sinh học trên cơ sở tế bào; (2) ức chế quá trình mất hạt nhỏ của bạch cầu ưa bazơ của người do IL-33 gây ra; (3) ức chế quá trình sản xuất IFN γ từ PBMC của người do IL-33 gây ra; (4) làm giảm mức xytokin mà bị tăng do tiếp xúc với dị ứng nguyên ở động vật có vú, ví dụ, IL-4 hoặc IL-5; và (5) ức chế bệnh viêm phổi do phơi nhiễm cấp tính hoặc mạn tính với dị ứng nguyên (ví dụ, mạt bụi nhà (house dust mite-HDM)).

Ức chế quá trình truyền tín hiệu qua trung gian IL-33 trong thử nghiệm sinh học trên cơ sở tế bào có nghĩa là kháng thể kháng IL-33 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó ức chế hoặc làm giảm tín hiệu được tạo ra trong các tế bào biểu hiện thụ thể IL-33 và yếu tố thông báo mà tạo ra tín hiệu có thể phát hiện được

khi đáp ứng với việc liên kết với IL-33, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thức thử nghiệm như được mô tả trong ví dụ 6 trong tài liệu này, hoặc một thử nghiệm về cơ bản tương tự. Ví dụ, sáng chế đề cập đến các kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng mà phong bế quá trình truyền tín hiệu qua trung gian IL-33 ở tế bào biểu hiện ST2 của người, với IC_{50} nhỏ hơn 2nM, nhỏ hơn 1nM, nhỏ hơn 900pM, nhỏ hơn 800pM, nhỏ hơn 700pM, nhỏ hơn 600pM, nhỏ hơn 500pM, nhỏ hơn 400pM, nhỏ hơn 350pM, nhỏ hơn 300pM, nhỏ hơn 250pM, nhỏ hơn 200pM, nhỏ hơn 150pM, nhỏ hơn 100pM, nhỏ hơn 90pM, nhỏ hơn 80pM, nhỏ hơn 70pM, nhỏ hơn 60pM, nhỏ hơn 50pM, nhỏ hơn 40pM, nhỏ hơn 30pM, nhỏ hơn 20pM, hoặc nhỏ hơn 10pM, như được đo trong thử nghiệm sinh học phong bế trên cơ sở tế bào, ví dụ, sử dụng dạng thức thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 5 trong tài liệu này, hoặc một thử nghiệm về cơ bản tương tự.

Ức chế quá trình mất hạt nhỏ của bạch cầu ưa bazơ của người do IL-33 gây ra có nghĩa là kháng thể kháng IL-33 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó ức chế hoặc làm giảm mức mất hạt nhỏ của bạch cầu ưa bazơ do IL-33 gây ra *in vitro*, ví dụ, như được đo bằng hệ thử nghiệm nêu trong ví dụ 7 hoặc một thử nghiệm về cơ bản tương tự. Ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng mà ức chế quá trình mất hạt nhỏ của bạch cầu ưa bazơ của người khi có mặt IL-33 của người (ví dụ, nồng độ cuối 100pM), với IC_{50} nhỏ hơn 500pM, nhỏ hơn 400pM, nhỏ hơn 350pM, nhỏ hơn 300pM, nhỏ hơn 250pM, nhỏ hơn 200pM, nhỏ hơn 150pM, nhỏ hơn 100pM, nhỏ hơn 90pM, nhỏ hơn 80pM, nhỏ hơn 70pM, nhỏ hơn 60pM, nhỏ hơn 50pM, nhỏ hơn 40pM, nhỏ hơn 30pM, nhỏ hơn 20pM, hoặc nhỏ hơn 10pM, như được đo trong thử nghiệm quá trình mất hạt nhỏ của bạch cầu ưa bazơ của người *in vitro*, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thức thử nghiệm như được mô tả trong ví dụ 7 trong tài liệu này, hoặc một thử nghiệm về cơ bản tương tự.

Ức chế quá trình sản xuất IFN γ từ PBMC của người do IL-33 gây ra có nghĩa là kháng thể kháng IL-33 hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó ức chế hoặc làm giảm lượng IFN γ được giải phóng ra từ PBMC đã được xử lý bằng IL-33 của người khi có mặt IL-12 của người, ví dụ, như được đo bằng hệ thử nghiệm nêu trong ví dụ 8 hoặc một thử nghiệm về cơ bản tương tự. Ví dụ, sáng chế đề cập đến

kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng mà ức chế sự giải phóng IFN γ do IL-33 gây ra, khi có mặt IL-12 của người, với IC₅₀ nhỏ hơn 50nM, nhỏ hơn 25nM, nhỏ hơn 20nM, nhỏ hơn 15nM, nhỏ hơn 10nM, nhỏ hơn 5nM, nhỏ hơn 1nM, nhỏ hơn 900pM, nhỏ hơn 800pM, nhỏ hơn 700pM, nhỏ hơn 600pM, nhỏ hơn 500pM, nhỏ hơn 400pM hoặc nhỏ hơn 300pM, như được đo trong thử nghiệm giải phóng IFN γ do IL-33 gây ra, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thức thử nghiệm như được mô tả trong ví dụ 8 trong tài liệu này, hoặc một thử nghiệm về cơ bản tương tự.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng IL-33 và đoạn liên kết với kháng nguyên theo sáng chế phong bế quá trình liên kết IL-33 với thụ thể IL-33 (ví dụ, ST2). Ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng IL-33 mà phong bế quá trình liên kết IL-33 với ST2 *in vitro*, với trị số IC₅₀ nhỏ hơn 15nM, như được đo bằng thử nghiệm miễn dịch trên cơ sở ELISA, ví dụ, bằng dạng thức thử nghiệm như được mô tả trong ví dụ 4 trong tài liệu này, hoặc một thử nghiệm về cơ bản tương tự. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo sáng chế phong bế quá trình liên kết IL-33 với ST2 *in vitro* với trị số IC₅₀ nhỏ hơn 10nM, nhỏ hơn 5nM, nhỏ hơn 900pM, nhỏ hơn 800pM, nhỏ hơn 700pM, nhỏ hơn 600pM, nhỏ hơn 500pM, nhỏ hơn 400pM, nhỏ hơn 300pM, nhỏ hơn 280pM, nhỏ hơn 260pM, nhỏ hơn 250pM, nhỏ hơn 240pM, nhỏ hơn 230pM, nhỏ hơn 220pM, nhỏ hơn 200pM, nhỏ hơn 180pM, nhỏ hơn 160pM, hoặc nhỏ hơn 150pM, như được đo bằng thử nghiệm miễn dịch trên cơ sở ELISA, ví dụ, bằng dạng thức thử nghiệm như được mô tả trong ví dụ 4 trong tài liệu này, hoặc một thử nghiệm về cơ bản tương tự.

Tuy nhiên, theo các phương án khác, kháng thể kháng IL-33 nhất định và đoạn liên kết với kháng nguyên theo sáng chế, mặc dù có khả năng ức chế hoặc làm giảm mức truyền tín hiệu qua trung gian IL-33, nhưng không phong bế hoặc chỉ phong bế một phần sự tương tác giữa IL-33 và ST2. Kháng thể này và đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng, trong tài liệu này, có thể được gọi là "các chất phong bế gián tiếp." Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, có ý kiến cho rằng các chất phong bế gián tiếp theo sáng chế thực hiện chức năng bằng cách liên kết với IL-33 ở epitop mà chồng lấn hoặc chỉ chồng lấn một phần với miền liên kết với ST2 của IL-

33, nhưng dù sao cũng cản trở việc truyền tín hiệu qua trung gian IL-33 mà không trực tiếp phong bế sự tương tác IL-33/ST2.

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng IL-33 và đoạn liên kết với kháng nguyên của nó mà liên kết với các phân tử IL-33 hòa tan với ái lực cao. Ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể mà liên kết với IL-33 (ví dụ, ở 25°C hoặc 37°C) với K_D nhỏ hơn 10nM như được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thức thử nghiệm như được mô tả trong ví dụ 3 trong tài liệu này. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo sáng chế liên kết với IL-33 với K_D nhỏ hơn 5nM, nhỏ hơn 2nM, nhỏ hơn 1nM, nhỏ hơn 800pM, nhỏ hơn 600pM, nhỏ hơn 500pM, nhỏ hơn 400pM, nhỏ hơn 300pM, nhỏ hơn 200pM, nhỏ hơn 180pM, hoặc nhỏ hơn 160pM, như được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thức thử nghiệm như được mô tả trong ví dụ 3 trong tài liệu này, hoặc một thử nghiệm về cơ bản tương tự.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể kháng IL-33 và đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng mà liên kết đặc hiệu với IL-33 với thời gian bán hủy phân ly ($t_{1/2}$) lớn hơn 10 phút như được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C hoặc 37°C, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thức thử nghiệm như được mô tả trong ví dụ 3 trong tài liệu này, hoặc một thử nghiệm về cơ bản tương tự. Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo sáng chế liên kết với IL-33 với $t_{1/2}$ lớn hơn 20 phút, lớn hơn 30 phút, lớn hơn 40 phút, lớn hơn 50 phút, lớn hơn 60 phút, lớn hơn 70 phút, lớn hơn 80 phút, lớn hơn 90 phút, lớn hơn 100 phút, như được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C hoặc 37°C, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thức thử nghiệm như được mô tả trong ví dụ 3 trong tài liệu này, hoặc một thử nghiệm về cơ bản tương tự.

Kháng thể theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều đặc tính sinh học được đề cập trên đây, hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Các đặc tính sinh học khác của kháng thể theo sáng chế thì sẽ sáng tỏ đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này nhờ việc xem xét đến bản mô tả sáng chế kể cả phần ví dụ thực hiện sáng chế được mô tả trong tài liệu này.

Kháng thể kháng IL-33 chứa các biến thể Fc

Theo các phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng IL-33 được đề cập chứa miền Fc gồm có một hoặc nhiều đột biến mà làm tăng hoặc làm giảm khả năng liên kết của kháng thể với thụ thể FcRn, ví dụ, ở độ pH axit so với độ pH trung tính. Ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng IL-33 có đột biến ở vùng C_H2 hoặc C_H3 của miền Fc, trong đó (các) đột biến này làm tăng ái lực của miền Fc với FcRn trong môi trường axit (ví dụ, trong thể nội bào có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0). Các đột biến này có thể làm tăng thời gian bán hủy của kháng thể trong huyết thanh khi được sử dụng cho động vật. Các ví dụ không hạn chế về các cải biến Fc này bao gồm, ví dụ, cải biến ở vị trí 250 (ví dụ, E hoặc Q); 250 và 428 (ví dụ, L hoặc F); 252 (ví dụ, L/Y/F/W hoặc T), 254 (ví dụ, S hoặc T), và 256 (ví dụ, S/R/Q/E/D hoặc T); hoặc cải biến ở vị trí 428 và/hoặc 433 (ví dụ, H/L/R/S/P/Q hoặc K) và/hoặc 434 (ví dụ, H/F hoặc Y); hoặc cải biến ở vị trí 250 và/hoặc 428; hoặc cải biến ở vị trí 307 hoặc 308 (ví dụ, 308F, V308F), và 434. Theo một phương án, cải biến này bao gồm cải biến 428L (ví dụ, M428L) và 434S (ví dụ, N434S); cải biến 428L, 259I (ví dụ, V259I), và 308F (ví dụ, V308F); cải biến 433K (ví dụ, H433K) và 434 (ví dụ, 434Y); cải biến 252, 254, và 256 (ví dụ, 252Y, 254T, và 256E); cải biến 250Q và 428L (ví dụ, T250Q và M428L); và cải biến 307 và/hoặc 308 (ví dụ, 308F hoặc 308P). Theo một phương án khác nữa, cải biến này bao gồm cải biến 265A (ví dụ, D265A) và/hoặc 297A (ví dụ, D297A).

Ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng IL-33 chứa miền Fc có một hoặc nhiều cặp hoặc nhóm đột biến được chọn từ nhóm bao gồm: 250Q và 248L (ví dụ, T250Q và M248L); 252Y, 254T và 256E (ví dụ, M252Y, S254T và T256E); 428L và 434S (ví dụ, M428L và N434S); và 433K và 434F (ví dụ, H433K và N434F). Tất cả các dạng kết hợp có thể có của các đột biến miền Fc trên đây, và các đột biến khác trong các miền biến đổi của kháng thể được bộc lộ trong tài liệu này, được dự liệu trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể kháng IL-33 chứa vùng ổn định (C_H) thể khảm của chuỗi nặng, trong đó vùng C_H thể khảm chứa các đoạn thu được từ các vùng C_H của nhiều kiểu tương đương globulin miễn dịch. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng C_H thể khảm bao gồm một phần hoặc toàn bộ miền C_H2 thu được từ phân tử IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người, được

kết hợp với một phần hoặc toàn bộ miền C_H3 thu được từ phân tử IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người. Theo các phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế chứa vùng C_H thể khảm có vùng bản lề thể khảm. Ví dụ, vùng bản lề thể khảm có thể bao gồm trình tự axit amin "vùng bản lề trên" (các gốc axit amin từ vị trí 216 đến 227 theo cách đánh số EU) thu được từ vùng bản lề của IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người, kết hợp với trình tự "vùng bản lề dưới" (các gốc axit amin từ vị trí 228 đến 236 theo cách đánh số EU) thu được từ vùng bản lề của IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người. Theo các phương án nhất định, vùng bản lề thể khảm bao gồm các gốc axit amin thu được từ vùng bản lề trên của IgG1 của người hoặc IgG4 của người và các gốc axit amin thu được từ vùng bản lề dưới của IgG2 của người. Theo các phương án nhất định, kháng thể chứa vùng C_H thể khảm như được mô tả trong tài liệu này có thể thể hiện các chức năng kích thích Fc cải biến mà không tác động bất lợi đến các thuộc tính trị liệu hoặc dược động học của kháng thể. (ví dụ, xem tài liệu: U.S. Provisional Appl. No. 61/759,578, được nộp ngày 1 tháng 2 năm 2013).

Lập bản đồ epitop và các công nghệ có liên quan

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng IL-33 tương tác với một hoặc nhiều axit amin của IL-33. Ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng IL-33 tương tác với một hoặc nhiều axit amin nằm ở miền tương tác với ST2 của IL-33. Epitop mà các kháng thể liên kết có thể bao gồm một trình tự liên tiếp gồm 3 hoặc nhiều hơn nữa (ví dụ, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều hơn nữa) axit amin của IL-33. Theo cách khác, epitop có thể gồm nhiều axit amin không liên tiếp (hoặc các trình tự axit amin) của IL-33.

Có thể sử dụng các kỹ thuật khác nhau mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết để xác định xem liệu một kháng thể nào đó có "tương tác với một hoặc nhiều axit amin" trong polypeptit hoặc protein hay không. Các kỹ thuật tiêu biểu bao gồm, ví dụ, thử nghiệm phong bế chéo thông thường như thử nghiệm được mô tả trong tài liệu Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), phân tích đột biến quét alanin, phân tích thẩm tách peptit (Reineke, 2004, Methods Mol Biol 248:443-463), và phân tích phân cắt peptit. Ngoài ra, các phương pháp như cắt epitop, chiết epitop và cải biến hóa học kháng

nguyên có thể được sử dụng (Tomer, 2000, Protein Science 9:487-496). Một phương pháp khác mà có thể được sử dụng để nhận diện axit amin trong polypeptit mà tương tác với kháng thể là trao đổi hydro/đoteri được phát hiện bằng phép đo phổ khối. Nhìn chung, phương pháp trao đổi hydro/đoteri có liên quan đến việc đánh dấu đoteri protein đang được quan tâm, sau đó là liên kết kháng thể với protein đã đánh dấu đoteri. Tiếp đó, phức hợp protein/kháng thể được chuyển vào nước để cho phép hiện tượng trao đổi hydro-đoteri xảy ra ở tất cả các gốc ngoại trừ các gốc được bảo vệ bởi kháng thể (mà vẫn được đánh dấu đoteri). Sau khi phân tách kháng thể, protein đích được phân cắt bằng proteaza và phân tích phổ khối, nhờ đó phát hiện được các gốc được đánh dấu đoteri mà tương ứng với axit amin đặc hiệu tương tác với kháng thể. Ví dụ, xem tài liệu: Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể kháng IL-33 liên kết với cùng một epitop với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể tiêu biểu cụ thể được mô tả trong tài liệu này (ví dụ, H1M9559N, H1M9566N, H1M9568N, H4H9629P, H4H9633P, H4H9640P, H4H9659P, H4H9660P, H4H9662P, H4H9663P, H4H9664P, H4H9665P, H4H9666P, H4H9667P, H4H9670P, H4H9671P, H4H9672P, H4H9675P, H4H9676P, H1M9565N, v.v.). Mặt khác, sáng chế còn đề cập đến kháng thể kháng IL-33 mà cạnh tranh với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể tiêu biểu cụ thể được mô tả trong tài liệu này để liên kết với IL-33 (ví dụ, H1M9559N, H1M9566N, H1M9568N, H4H9629P, H4H9633P, H4H9640P, H4H9659P, H4H9660P, H4H9662P, H4H9663P, H4H9664P, H4H9665P, H4H9666P, H4H9667P, H4H9670P, H4H9671P, H4H9672P, H4H9675P, H4H9676P, H1M9565N, v.v.).

Ta có thể dễ dàng xác định liệu một kháng thể nào đó có liên kết với cùng một epitop với, hoặc cạnh tranh để liên kết với kháng thể kháng IL-33 tham chiếu hay không bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được lấy làm ví dụ trong tài liệu này. Ví dụ, để xác định xem liệu kháng thể thử nghiệm có liên kết với cùng một epitop với kháng thể kháng IL-33 tham chiếu theo sáng chế hay không, thì kháng thể tham chiếu này được phép liên

kết với protein IL-33. Tiếp đó, đánh giá khả năng liên kết với phân tử IL-33 của kháng thể thử nghiệm. Nếu kháng thể thử nghiệm có khả năng liên kết với IL-33 sau khi liên kết bão hòa với kháng thể kháng IL-33 tham chiếu, có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm liên kết với epitop khác với kháng thể kháng IL-33 tham chiếu. Mặt khác, nếu kháng thể thử nghiệm không có khả năng liên kết với phân tử IL-33 sau khi liên kết bão hòa với kháng thể kháng IL-33 tham chiếu, thì có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với cùng một epitop với epitop được liên kết bởi kháng thể kháng IL-33 tham chiếu theo sáng chế. Sau đó, thử nghiệm thông thường khác (ví dụ, các phân tích liên kết và đột biến peptit) có thể được tiến hành để khẳng định liệu nguyên nhân dẫn đến việc kháng thể thử nghiệm không có khả năng liên kết thực tế có phải là do liên kết với cùng epitop như kháng thể tham chiếu hay không hay là do sự phong bế trong không gian (hoặc hiện tượng khác) dẫn đến việc kháng thể thử nghiệm không có khả năng liên kết. Các thử nghiệm kiểu này có thể được tiến hành bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA, RIA, Biacore, đếm tế bào theo dòng chảy hoặc thử nghiệm liên kết kháng thể định tính hoặc định lượng bất kỳ khác có sẵn trong lĩnh vực này. Theo các phương án nhất định của sáng chế, hai kháng thể liên kết với cùng một epitop (hoặc chồng lấn) nếu, ví dụ, một lượng dư gấp 1, 5, 10, 20 hoặc 100 lần của một kháng thể ức chế sự liên kết của kháng thể kia ít nhất là 50%, nhưng tốt hơn, nếu là 75%, 90% hoặc thậm chí 99% như được đo bằng thử nghiệm liên kết cạnh tranh (ví dụ, xem tài liệu: Junghans et al., Cancer Res. 1990:50:1495-1502). Theo cách khác, hai kháng thể được cho là liên kết với cùng một epitop nếu về cơ bản tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên mà làm giảm hoặc làm mất khả năng liên kết của một kháng thể làm giảm hoặc làm mất khả năng liên kết của kháng thể kia. Hai kháng thể được cho là có "epitop chồng lấn" nếu chỉ một phân nhóm các đột biến axit amin mà làm giảm hoặc làm mất khả năng liên kết của một kháng thể làm giảm hoặc làm mất khả năng liên kết của kháng thể kia.

Để xác định xem liệu một kháng thể nào đó có cạnh tranh để liên kết (hoặc cạnh tranh chéo để liên kết) với kháng thể kháng IL-33 tham chiếu hay không, phương pháp liên kết được mô tả trên đây được tiến hành theo hai hướng. Theo hướng thứ nhất, kháng thể tham chiếu được cho phép liên kết với protein IL-33

trong các điều kiện bảo hoà, sau đó đánh giá khả năng liên kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử IL-33. Theo hướng thứ hai, kháng thể thử nghiệm được cho phép liên kết với phân tử IL-33 trong các điều kiện bảo hoà, sau đó đánh giá khả năng liên kết của kháng thể tham chiếu với phân tử IL-33. Nếu, trong cả hai trường hợp này, chỉ kháng thể thứ nhất (bảo hoà) có khả năng liên kết với phân tử IL-33, thì kết luận rằng kháng thể thử nghiệm và kháng thể tham chiếu cạnh tranh để liên kết với IL-33. Theo đánh giá của chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, kháng thể mà cạnh tranh để liên kết với kháng thể tham chiếu có thể không cần liên kết với cùng một epitop với kháng thể tham chiếu, nhưng có thể phong bế khả năng liên kết của kháng thể tham chiếu trong không gian bằng cách liên kết với epitop chồng lấn hoặc liền kề.

Quy trình điều chế kháng thể của người

Phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng, kể cả kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người thì đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp đã biết này có thể được sử dụng trong phạm vi sáng chế để tạo ra các kháng thể của người mà liên kết đặc hiệu với IL-33.

Sử dụng công nghệ VELOCIMMUNE™, ví dụ, hoặc phương pháp đã biết bất kỳ khác để tạo ra kháng thể đơn dòng đầy đủ của người, kháng thể thể khảm có ái lực cao đối với IL-33 được phân lập đầu tiên có vùng biến đổi của người và vùng ổn định của chuột. Như trong phần thử nghiệm dưới đây, các kháng thể được xác định đặc tính và được lựa chọn về các đặc tính mong muốn, bao gồm ái lực, tính chọn lọc, epitop, v.v.. Nếu cần, vùng ổn định của chuột được thay thế bằng vùng ổn định mong muốn của người, ví dụ, IgG1 hoặc IgG4 kiểu hoang dại hoặc đã cải biến, để tạo ra kháng thể kháng IL-33 hoàn toàn của người. Trong khi vùng ổn định được chọn có thể thay đổi theo mục đích sử dụng cụ thể, các đặc tính liên kết với kháng nguyên có ái lực cao và đặc tính đặc hiệu đích nằm ở vùng biến đổi. Theo các trường hợp nhất định, kháng thể kháng IL-33 hoàn toàn của người được phân lập trực tiếp từ các tế bào B dương tính với kháng nguyên.

Tương đương sinh học

Kháng thể và đoạn kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế bao gồm các protein có trình tự axit amin mà thay đổi so với các trình tự axit amin của các kháng thể

được mô tả nhưng giữ lại khả năng liên kết với IL-33 của người. Các kháng thể biến thể và đoạn kháng thể như vậy chứa một hoặc nhiều đoạn thêm, xóa bỏ hoặc đoạn thay thế axit amin so với trình tự cha mẹ, nhưng thể hiện hoạt tính sinh học về cơ bản tương đương với hoạt tính sinh học của các kháng thể đã được mô tả. Cũng vậy, các trình tự ADN mã hoá các kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế bao gồm các trình tự mà chứa một hoặc nhiều đoạn thêm, xóa bỏ hoặc đoạn thay thế nucleotit so với trình tự được mô tả, nhưng vẫn có khả năng mã hoá kháng thể hoặc đoạn kháng thể kháng IL-33 mà về cơ bản tương đương sinh học với kháng thể hoặc đoạn kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế. Các ví dụ về các trình tự ADN và trình tự axit amin biến thể này được bàn trên đây.

Hai protein hoặc kháng thể liên kết với kháng nguyên được coi là tương đương sinh học, ví dụ, nếu chúng là đương lượng được phẩm hoặc lựa chọn thay thế được phẩm mà tốc độ và mức độ hấp thu của chúng không thể hiện sự chênh lệch đáng kể nếu được sử dụng ở cùng một mức liều theo mol trong các điều kiện thử nghiệm tương tự, ở dạng liều đơn hoặc liều đa. Một số kháng thể sẽ được coi là đương lượng hoặc lựa chọn thay thế được học nếu chúng tương đương về mức độ hấp thu nhưng không tương đương về tốc độ hấp thu và được coi là tương đương sinh học bởi vì các khác biệt về tốc độ hấp thu này là có chủ đích và được phản ánh ở nhãn, không thiết yếu để đạt được nồng độ thuốc trong cơ thể có hiệu quả đối với việc sử dụng kinh niên chẳng hạn, và được coi là không đáng kể về mặt y học đối với sản phẩm thuốc cụ thể được nghiên cứu.

Theo một phương án, hai protein liên kết với kháng nguyên là tương đương sinh học nếu độ an toàn, độ tinh khiết và độ hiệu nghiệm của chúng không có sự chênh lệch có ý nghĩa về mặt lâm sàng.

Theo một phương án, hai protein liên kết với kháng nguyên là tương đương sinh học nếu bệnh nhân được chuyển thuốc một hoặc nhiều lần giữa sản phẩm tham chiếu và sản phẩm sinh học mà không làm tăng nguy cơ mắc các tác dụng có hại, kể cả thay đổi về tính gây miễn dịch có ý nghĩa về mặt lâm sàng, hoặc hiệu quả giảm, so với liệu pháp điều trị liên tục không đổi thuốc.

Theo một phương án, hai protein liên kết với kháng nguyên là tương đương sinh học nếu chúng đều có tác dụng thông qua một hoặc nhiều cơ chế tác dụng

chung đối với một hoặc nhiều tình trạng bệnh, đến mức mà các cơ chế này thì đã biết.

Mức tương đương sinh học có thể được chứng minh bằng các phương pháp in vivo và in vitro. Các phương pháp đo mức tương đương sinh học bao gồm, ví dụ, (a) thử nghiệm in vivo ở người hoặc động vật có vú khác, trong đó nồng độ của kháng thể hoặc chất chuyển hoá của nó được đo trong máu, huyết tương, huyết thanh hoặc dịch sinh học khác ở dạng hàm số thời gian; (b) thử nghiệm in vitro mà đã tương quan với và có tính dự báo hợp lý về dữ liệu sinh khả dụng in vivo ở người; (c) thử nghiệm in vivo ở người hoặc động vật có vú khác trong đó tác dụng dược lý tức thời thích hợp của kháng thể (hoặc đích của nó) được đo ở dạng hàm số thời gian; và (d) trong thử nghiệm lâm sàng được kiểm soát tốt để xác lập được độ an toàn, hiệu quả hoặc tính sinh khả dụng hoặc tương đương sinh học của kháng thể.

Các biến thể tương đương sinh học của kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế có thể được kiến tạo bằng cách tạo ra các thay thế gốc hoặc trình tự khác nhau hoặc loại bỏ các gốc hoặc trình tự tận cùng hoặc bên trong không cần thiết cho hoạt tính sinh học. Ví dụ, các gốc cysteine không thiết yếu cho hoạt tính sinh học có thể được loại bỏ hoặc được thay thế bằng axit amin khác để ngăn ngừa sự tạo thành các cầu nối disulfua nội phân tử không đúng hoặc không cần thiết sau quá trình hồi tính. Trong các trường hợp khác, các kháng thể tương đương sinh học có thể là các biến thể của kháng thể kháng IL-33 có các thay đổi axit amin mà cải biến các đặc tính glycosyl hoá của kháng thể, ví dụ, các đột biến mà làm mất hoặc loại bỏ quá trình glycosyl hoá.

Tính chọn lọc loài và phản ứng chéo giữa các loài

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng IL-33 mà liên kết với IL-33 của người nhưng không liên kết với IL-33 của loài khác. Sáng chế còn đề cập đến kháng thể kháng IL-33 mà liên kết với IL-33 của người và với IL-33 của một hoặc nhiều loài không phải người. Ví dụ, kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế có thể liên kết với IL-33 của người và có thể liên kết hoặc không liên kết, tùy theo từng trường hợp, với một hoặc nhiều trong số IL-33 của chuột nhắt, chuột cống, chuột lang, chuột đồng, chuột nhảy, lợn, mèo, chó, thỏ, dê, cừu, bò, ngựa, lạc

đà, khi ăn cua, khi đuôi sóc, khi rezut hoặc tinh tinh. Theo các phương án tiêu biểu nhất định theo sáng chế, kháng thể kháng IL-33 được đề cập mà có thể liên kết đặc hiệu với IL-33 của người và IL-33 của khi ăn cua (ví dụ, *Macaca fascicularis*).

Các thể tiếp hợp miễn dịch

Sáng chế đề cập đến kháng thể đơn dòng kháng IL-33 được tiếp hợp với một gốc trị liệu ("thể tiếp hợp miễn dịch"), như chất gây độc tế bào, chất hoá trị, chất ức chế miễn dịch hoặc đồng vị phóng xạ. Chất gây độc tế bào là chất mà gây hại cho tế bào. Các ví dụ về các chất gây độc tế bào và chất hoá trị thích hợp để tạo nên thể tiếp hợp miễn dịch thì đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, (ví dụ, xem công bố đơn quốc tế số WO 05/103081).

Các kháng thể đa đặc hiệu

Các kháng thể theo sáng chế có thể là đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu. Các kháng thể đa đặc hiệu có thể đặc hiệu với các epitop khác nhau của một polypeptit đích hoặc có thể chứa các vùng liên kết kháng nguyên đặc hiệu với nhiều polypeptit đích. Ví dụ, xem tài liệu: Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế có thể được liên kết với hoặc được đồng biểu hiện với phân tử có chức năng khác, ví dụ, peptit hoặc protein khác. Ví dụ, kháng thể hoặc đoạn của nó có thể được liên kết chức năng (ví dụ, bằng liên hợp hoá học, dung hợp gen, liên kết không cộng hoá trị hoặc liên kết khác) với một hoặc nhiều thực thể phân tử khác, như kháng thể hoặc đoạn kháng thể khác để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu có tính đặc hiệu liên kết thứ hai. Ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép, trong đó một nhánh của globulin miễn dịch đặc hiệu với IL-33 của người hoặc đoạn của nó, và nhánh còn lại của globulin miễn dịch đặc hiệu với đích trị liệu thứ hai hoặc được tiếp hợp với gốc trị liệu.

Dạng thức kháng thể đặc hiệu kép tiêu biểu mà có thể được sử dụng trong phạm vi sáng chế có liên quan đến việc sử dụng miền C_{H3} của globulin miễn dịch (Ig) thứ nhất và miền C_{H3} của Ig thứ hai, trong đó các miền C_{H3} của Ig thứ nhất và thứ hai khác biệt với nhau bởi ít nhất một axit amin, và trong đó sự khác biệt ít nhất một axit amin này làm giảm khả năng liên kết của kháng thể đặc hiệu kép với protein A so với kháng thể đặc hiệu kép không có sự khác biệt axit amin này. Theo

một phương án, miền C_H3 của Ig thứ nhất liên kết với protein A và miền C_H3 của Ig thứ hai có đột biến làm giảm hoặc làm mất khả năng liên kết với protein A như cải biến H95R (theo cách đánh số exon IMGT; H435R theo cách đánh số EU). C_H3 thứ hai còn có cải biến Y96F (theo cách đánh số IMGT; Y436F theo cách đánh số EU). Các cải biến khác mà có thể được tìm thấy trong C_H3 thứ hai bao gồm: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, và V82I (theo IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, và V422I theo cách đánh số EU) trong trường hợp kháng thể IgG1; N44S, K52N, và V82I (theo cách đánh số IMGT; N384S, K392N, và V422I theo cách đánh số EU) trong trường hợp kháng thể IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, và V82I (theo cách đánh số IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, và V422I theo cách đánh số EU) trong trường hợp kháng thể IgG4. Các thay đổi của dạng thức kháng thể đặc hiệu kép được mô tả trên đây được dự liệu trong phạm vi của sáng chế.

Các dạng đặc hiệu kép tiêu biểu khác mà có thể được sử dụng trong phạm vi sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, các dạng thức đặc hiệu kép của song thể hoặc dựa trên scFv, thể dung hợp IgG-scFv, vùng biến đổi kép (dual variable domain-DVD)-Ig, Quadroma, kháng thể dạng chốt trong lỗ (knobs-into-holes), chuỗi nhẹ thông thường (ví dụ, chuỗi nhẹ thông thường có dạng chốt trong lỗ (knobs-into-holes), v.v.), CrossMab, CrossFab, thể(SEED), khóa kéo leuxin, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG tác dụng kép, và các dạng thức đặc hiệu kép Mab² (ví dụ, xem tài liệu: Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, và các tài liệu tham chiếu được trích dẫn trong đó, để xem tổng quan các dạng thức trước đó). Kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể được tạo ra bằng cách tiếp hợp peptit/axit nucleic, ví dụ, trong đó axit amin không tự nhiên có tính phản ứng hóa học trực giao được sử dụng để tạo ra các thể tiếp hợp kháng thể-oligonucleotit đặc hiệu vị trí, mà sau đó tự lắp ghép thành các phức hợp multime với cấu tạo, hoá trị và hình dạng xác định. (ví dụ, xem tài liệu: Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: Dec. 4, 2012]).

Liên kết phụ thuộc vào độ pH

Sáng chế đề cập đến kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng mà liên kết với IL-33 theo phương thức phụ thuộc độ pH. Ví dụ, kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế có thể thể hiện khả năng liên kết giảm với IL-33 ở độ pH axit

so với độ pH trung tính. Theo cách khác, kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế có thể thể hiện khả năng liên kết cao hơn với kháng nguyên của nó ở độ pH axit so với độ pH trung tính.

Trong các trường hợp nhất định, "khả năng liên kết giảm với IL-33 ở độ pH axit so với độ pH trung tính" được thể hiện bằng tỷ lệ giữa trị số K_D của mức liên kết kháng thể với IL-33 ở độ pH axit và trị số K_D của mức liên kết kháng thể với IL-33 ở độ pH trung tính (hoặc ngược lại). Ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có thể được coi là có "khả năng liên kết giảm với IL-33 ở độ pH axit so với độ pH trung tính" theo các mục đích của sáng chế nếu kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó có tỷ lệ K_D axit/trung tính bằng 3,0 hoặc cao hơn. Theo các phương án tiêu biểu nhất định, tỷ lệ K_D axit/trung tính của kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo sáng chế có thể là 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 hoặc lớn hơn.

Có thể thu được các kháng thể có các đặc tính liên kết phụ thuộc độ pH, ví dụ, bằng cách sàng lọc một quần thể kháng thể về khả năng liên kết giảm (hoặc tăng) với kháng nguyên cụ thể ở độ pH axit so với độ pH trung tính. Ngoài ra, cải biến miền liên kết kháng nguyên ở cấp độ axit amin có thể thu được kháng thể có các đặc tính liên kết phụ thuộc độ pH. Ví dụ, bằng cách thay thế một hoặc nhiều axit amin của miền liên kết kháng nguyên (ví dụ, trong CDR) bằng gốc histidin, có thể thu được kháng thể có khả năng liên kết với kháng nguyên giảm ở độ pH axit so với độ pH trung tính. Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ "độ pH axit" có nghĩa là độ pH bằng 6,0 hoặc nhỏ hơn, 5,5 hoặc nhỏ hơn, hoặc 5,0 hoặc nhỏ hơn. Thuật ngữ "độ pH axit" bao gồm các trị số pH bằng 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0, hoặc nhỏ hơn. Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ "độ pH trung tính" có nghĩa là độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 7,4. Thuật ngữ "độ pH trung tính" bao gồm các trị số pH bằng 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35, và 7,4.

Dạng chế phẩm trị liệu và phương thức cho dùng

Sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể kháng IL-33 hoặc đoạn liên

kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế. Dược phẩm theo sáng chế được bào chế với chất mang, tá dược và các chất khác thích hợp mà giúp cải thiện việc vận chuyển, phân phối, dung nạp, v.v.. Nhiều dạng chế phẩm thích hợp có thể được tìm ra trong công thức mà các nhà hoá dược đã biết: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Các chế phẩm này bao gồm, ví dụ, bột, bột nhão, thuốc mỡ, gel, sáp, dầu, lipit, túi chứa lipit (cation hoặc anion) (như LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), các thể tiếp hợp ADN, bột nhão hấp thu khan, nhũ tương dầu trong nước và nước trong dầu, nhũ tương carbovac (polyetylen glycol có khối lượng phân tử khác nhau), gel bán rắn, và hỗn hợp bán rắn chứa carbovac. Xem thêm tài liệu: Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Liều của kháng thể được sử dụng cho bệnh nhân có thể thay đổi tùy thuộc vào độ tuổi và thể trọng của bệnh nhân, bệnh đích, tình trạng bệnh, đường dùng, và các yếu tố tương tự. Liều được ưu tiên thường được tính theo thể trọng hoặc diện tích bề mặt cơ thể. Khi kháng thể theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh gắn liền với IL-33 ở bệnh nhân là người lớn, thì có thể là thuận lợi khi cho dùng kháng thể theo sáng chế qua đường tĩnh mạch thường với liều đơn nằm trong khoảng từ 0,01 đến 20mg/kg thể trọng, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 0,02 đến 7, với lượng nằm trong khoảng từ 0,03 đến 5, hoặc với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 3mg/kg thể trọng. Tùy thuộc vào mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh, tần suất và thời gian điều trị có thể được điều chỉnh. Liều hữu hiệu và chế độ dùng thuốc kháng thể kháng IL-33 có thể được xác định bằng thực nghiệm; ví dụ, sự tiến triển ở bệnh nhân có thể được theo dõi bằng cách đánh giá định kỳ, và liều lượng được điều chỉnh theo đó. Hơn thế nữa, việc lập thang đo liều giữa các loài có thể được tiến hành bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này (ví dụ, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

Nhiều hệ phân phối thuốc thì đã biết và có thể được sử dụng để cho dùng dược phẩm theo sáng chế, ví dụ, bao nang trong liposom, vi hạt, vi nang, tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện virus đột biến, nhập bào qua trung gian thụ thể (ví dụ, xem tài liệu: Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Các phương pháp đưa

thuốc vào cơ thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đường dung vào trong da, trong bắp, trong màng bụng, trong tĩnh mạch, dưới da, trong mũi, ngoài màng cứng, và qua đường miệng. Chế phẩm có thể được sử dụng bằng đường thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách truyền hoặc tiêm tĩnh mạch nhanh, bằng cách hấp thu qua biểu mô hoặc lớp niêm mạc (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và niêm mạc ruột, v.v.) và có thể được cho dùng cùng với hoạt chất sinh học khác. Có thể sử dụng toàn thân hoặc khu trú.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được phân phối dưới da hoặc qua đường tĩnh mạch bằng kim và bơm tiêm tiêu chuẩn. Ngoài ra, nếu phân phối dưới da, thiết bị phân phối dạng bút sẽ dễ dàng phân phối dược phẩm theo sáng chế. Thiết bị phân phối dạng bút này có thể tái sử dụng hoặc sử dụng một lần. Thiết bị phân phối dạng bút tái sử dụng thường sử dụng hộp có thể thay thế mà chứa dược phẩm. Ngay khi toàn bộ lượng dược phẩm trong hộp được sử dụng và hộp này rỗng, thì hộp rỗng này dễ dàng được lấy ra và thay bằng hộp mới chứa dược phẩm. Thiết bị phân phối dạng bút sau đó có thể được tái sử dụng. Trong thiết bị phân phối dạng bút sử dụng một lần, không có hộp có thể thay thế. Đúng hơn là, thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần được nạp trước dược phẩm và được giữ trong khoang chứa trong thiết bị này. Một khi khoang chứa không còn dược phẩm, thì thiết bị này được bỏ đi.

Nhiều thiết bị phân phối thuốc dạng bút tái sử dụng và tiêm tự động có thể được sử dụng để phân phối dược phẩm theo sáng chế dưới da. Ví dụ về các thiết bị này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), bút DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Thụy Sĩ), bút HUMALOG MIX 75/25™, bút HUMALOG™, bút HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Đan Mạch), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Đan Mạch), bút BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, và OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Đức), trong số rất nhiều sản phẩm khác. Ví dụ về thiết bị phân phối thuốc dạng bút dùng một lần có các ứng dụng trong việc phân phối dược phẩm theo sáng chế dưới da bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở bút SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), và KWIKPEN™ (Eli Lilly), dụng

cụ tiêm tự động SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Đức), EPIPEN (Dey, L.P.), và bút HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), trong số rất nhiều sản phẩm khác.

Trong các trường hợp nhất định, dược phẩm có thể được phân phối trong hệ giải phóng có kiểm soát. Theo một phương án, có thể sử dụng bơm (xem tài liệu: Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). Theo một phương án khác, có thể sử dụng các vật liệu polyme; xem tài liệu: Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Tuy nhiên, theo một phương án khác, hệ giải phóng có kiểm soát có thể được đặt gần đích của dược phẩm, do đó chỉ cần một phần liều toàn thân (ví dụ, xem tài liệu: Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138). Các hệ giải phóng có kiểm soát khác được bàn trong tài liệu Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Các chế phẩm tiêm có thể bao gồm các dạng liều để tiêm tĩnh mạch, dưới da, trong da, tiêm bắp, truyền nhỏ giọt, v.v.. Các chế phẩm tiêm này có thể được bào chế bằng các phương pháp đã biết rộng rãi. Ví dụ, các chế phẩm tiêm có thể được bào chế, ví dụ, bằng cách hoà tan, tạo huyền phù hoặc nhũ hoá kháng thể hoặc muối của nó được mô tả trên đây trong môi trường chứa nước hoặc môi trường chứa dầu vô trùng thường được dùng để tiêm. Môi trường chứa nước dùng cho thuốc tiêm bao gồm dung dịch nước muối sinh lý, dung dịch đẳng trương chứa glucoza và chất phụ trợ khác, v.v., mà có thể được sử dụng cùng với chất hoà tan thích hợp như rượu (ví dụ, etanol), rượu đa chức (ví dụ, propylen glycol, polyetylen glycol), chất hoạt động bề mặt không ion [ví dụ, polysorbat 80, HCO-50 (polyoxyetylen (50mol) sản phẩm cộng của dầu thầu dầu hydro hoá], v.v.. Môi trường chứa dầu được sử dụng bao gồm dầu vừng, dầu đậu tương, v.v., mà có thể được sử dụng cùng với chất hoà tan như benzyl benzoat, rượu benzylic, v.v.. Tốt hơn, nếu thuốc tiêm được bào chế như vậy được đựng trong ống thuốc tiêm thích hợp.

Thuận lợi hơn, nếu dược phẩm để dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hoá được mô tả trên đây được bào chế thành các dạng liều ở dạng liều đơn vị được làm phù hợp với liều của các hoạt chất. Các dạng liều ở dạng liều đơn vị như vậy bao gồm, ví dụ, viên nén, viên tròn, viên nang, thuốc tiêm (ống thuốc tiêm),

thuốc đạn, v.v.. Lượng kháng thể nói trên thường nằm trong khoảng từ 5 đến 500mg trong mỗi dạng liều ở dạng liều đơn vị; đặc biệt là ở dạng thuốc tiêm, tốt hơn là lượng kháng thể nói trên thường nằm trong khoảng từ 5 đến 100mg và nằm trong khoảng từ 10 đến 250mg đối với dạng liều khác.

Công dụng trị liệu của kháng thể

Các thử nghiệm có sử dụng các hệ mô hình chuột nhắt, được tiến hành bởi các tác giả sáng chế, đã góp phần nhận diện được nhiều loại bệnh và tình trạng bệnh mà có thể được điều trị, phòng ngừa và/hoặc làm thuyên giảm nhờ tính đối kháng IL-33. Ví dụ, phân phối thủy động ADN IL-33 của chuột nhắt dẫn đến tích tụ dịch nhày ở phổi và làm tăng tổng lượng IgE trong huyết thanh ở chuột. Ngoài ra, phân phối ADN mIL-33 dẫn đến điều hoà tăng ST2 và nhiều xytokin phía cuối dòng như được đo bằng phân tích vi đàn. Các thử nghiệm được tiến hành bởi các tác giả sáng chế sử dụng chuột bất hoạt IL-33 cũng cho thấy nhiều lợi ích trị liệu tiềm tàng của tính đối kháng IL-33. Ví dụ, điểm số tổn thương đại thể và lượng tế bào thâm nhiễm ở da được nhận thấy là có thể so sánh được giữa chuột kiểu hoang dại và chuột khuyết thiếu IL-33 ở mẫu bệnh vảy nến do IMQ gây ra. Hơn thế nữa, chuột khuyết thiếu IL-33 có biểu hiện giảm mức tăng bạch cầu ưa eosin và giảm tích tụ dịch nhày quá nhiều ở mẫu viêm phổi do dị ứng nguyên gây ra.

Các kháng thể theo sáng chế là hữu ích, không kể các tính hữu ích khác, để điều trị, phòng ngừa và/hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn bất kỳ có liên quan đến hoặc do sự biểu hiện, quá trình truyền tín hiệu, hoặc hoạt tính của IL-33 gây ra, hoặc có thể điều trị bằng cách phong bế quá trình tương tác giữa IL-33 và phối tử IL-33 (ví dụ, ST2) hoặc mặt khác ức chế hoạt tính và/hoặc truyền tín hiệu qua trung gian IL-33. Ví dụ, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị, bệnh hen (ví dụ, bệnh hen dị ứng, bệnh hen không do dị ứng, bệnh hen dai dẳng nặng, đợt bùng phát bệnh hen, bệnh hen kháng steroid, bệnh hen nhạy cảm với steroid, bệnh hen do bạch cầu ưa eosin hoặc bệnh hen không do bạch cầu ưa eosin, v.v.), bệnh viêm da dị ứng, bệnh vảy nến, các bệnh viêm khác, bệnh dị ứng, tình trạng phản vệ, bệnh tim mạch, bệnh hệ thần kinh trung ương, đau, bệnh viêm khớp (ví dụ, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm khớp vảy nến, v.v.), bệnh viêm động mạch tế bào khổng lồ, bệnh viêm mạch (bệnh behcet và hội chứng Churg Strauss),

ban xuất huyết Henoch-Schonlein, bệnh đa xơ cứng, bệnh viêm ruột (ví dụ, bệnh Crohn hoặc bệnh viêm loét ruột kết), luput, và hội chứng sjogren.

Kháng thể theo sáng chế cũng hữu ích để điều trị, phòng ngừa và/hoặc làm thuyên giảm một hoặc nhiều bệnh xơ hoá. Bệnh xơ hoá tiêu biểu mà có thể điều trị được bằng cách sử dụng kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế bao gồm bệnh xơ hoá phổi (ví dụ, bệnh xơ hoá phổi tự phát, bệnh xơ hoá phổi do bleomycin gây ra, xơ hoá phổi do amiăng gây ra, và hội chứng viêm màng cuống phổi), bệnh hen mạn tính, bệnh xơ hoá gắn liền với tổn thương phổi cấp tính và suy hô hấp cấp tính (ví dụ, bệnh xơ hoá do viêm phổi do vi khuẩn gây ra, bệnh xơ hoá do chấn thương, bệnh xơ hoá do viêm khối do virus gây ra, bệnh xơ hoá do máy hô hấp nhân tạo, bệnh xơ hóa do nhiễm khuẩn không phải ở phổi và bệnh xơ hóa do hít phải vật thể lạ), bệnh nhiễm bụi silic phổi, bệnh xơ hoá do chiếu xạ gây ra, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (COPD, mà có thể có hoặc không liên quan đến, một phần do, hoặc hình thành từ, quá trình tiếp xúc với khói thuốc lá thụ động hoặc chủ động), bệnh xơ cứng bì, bệnh xơ hóa mắt, bệnh xơ da (ví dụ, bệnh xơ cứng bì), bệnh xơ gan (ví dụ, bệnh xơ gan, bệnh xơ gan do rượu, bệnh viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (non-alcoholic steatohepatitis-NASH), tổn thương ống mật, bệnh xơ gan mật nguyên phát, bệnh xơ gan do virus hoặc do nhiễm trùng, bệnh viêm gan tự miễn, bệnh xơ hóa thận, bệnh xơ hóa tim, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh tái phát hẹp trong ống thông, và bệnh xơ hóa tủy xương.

Trong phạm vi phương pháp điều trị được mô tả trong sáng chế, kháng thể kháng IL-33 có thể được sử dụng như là liệu pháp đơn (tức là, ở dạng chất trị liệu duy nhất) hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu khác (các ví dụ về các chất này được mô tả nơi khác trong tài liệu này).

Liệu pháp kết hợp và dạng chế phẩm

Sáng chế đề cập đến hỗn hợp và dạng chế phẩm trị liệu chứa kháng thể kháng IL-33 bất kỳ được mô tả trong tài liệu này kết hợp với một hoặc nhiều hoạt chất trị liệu khác, và phương pháp điều trị bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị sử dụng hỗn hợp này.

Kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế có thể được đồng bào chế và/hoặc được sử dụng kết hợp với, ví dụ, chất ức chế xytokin, bao gồm các chất ức chế

xytokin phân tử nhỏ và các kháng thể mà liên kết với xytokin như IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IL-25, IL-26, hoặc chất đối kháng thụ thể tương ứng của chúng.

Kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế cũng có thể được sử dụng và/hoặc đồng bào chế kết hợp với chất kháng virus, kháng sinh, chất giảm đau, corticosteroid, steroid, oxy, chất chống oxy hóa, chất tạo chelat kim loại, IFN-gama, và/hoặc NSAID.

(Các) hoạt chất trị liệu bổ sung có thể được sử dụng trước, đồng thời, hoặc ngay sau khi sử dụng kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế; (theo các mục đích của sáng chế, các chế độ dùng thuốc này được coi như là sử dụng kháng thể kháng IL-33 "kết hợp với" hoạt chất trị liệu khác). Sáng chế đề cập đến được phẩm, trong đó kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế được đồng bào chế với một hoặc nhiều hoạt chất trị liệu khác như được mô tả nơi khác trong tài liệu này.

Chế độ dùng thuốc

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến liều đa của kháng thể kháng IL-33 (hoặc được phẩm chứa hỗn hợp gồm kháng thể kháng IL-33 và hoạt chất trị liệu bất kỳ trong số các hoạt chất trị liệu bổ sung được đề cập trong tài liệu này) có thể được sử dụng cho đối tượng trong một khoảng thời gian xác định. Các phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm cho đối tượng sử dụng liên tiếp liều đa kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế. Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ "sử dụng liên tiếp" có nghĩa là mỗi liều kháng thể kháng IL-33 được sử dụng cho đối tượng ở thời điểm khác nhau, ví dụ, vào các ngày khác nhau phân cách với nhau bởi một khoảng thời gian gián cách định trước (ví dụ, tính bằng giờ, ngày, tuần hoặc tháng). Sáng chế đề cập đến phương pháp mà bao gồm việc cho bệnh nhân dùng liên tiếp một liều ban đầu của kháng thể kháng IL-33, sau đó là một hoặc nhiều liều thứ hai của kháng thể kháng IL-33, và tùy ý sau đó là một hoặc nhiều liều thứ ba của kháng thể kháng IL-33.

Thuật ngữ "liều ban đầu", "liều thứ hai", và "liều thứ ba", được dùng để chỉ trình tự sử dụng kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế theo thời gian. Do đó, "liều ban đầu" là liều mà được sử dụng ở thời điểm bắt đầu chế độ điều trị (còn được gọi là "liều đường chuẩn"); "liều thứ hai" là liều mà được sử dụng sau liều ban đầu; và

"liều thứ ba" là liều mà được sử dụng sau liều thứ hai. Liều ban đầu, liều thứ hai và liều thứ ba có thể đều chứa cùng một lượng kháng thể kháng IL-33, nhưng thông thường có thể khác nhau về tần suất sử dụng. Theo các phương án nhất định, lượng kháng thể kháng IL-33 trong liều ban đầu, liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba khác nhau (ví dụ, được điều chỉnh lên hoặc xuống khi cần) trong thời gian điều trị. Theo các phương án nhất định, hai hoặc nhiều liều hơn nữa (ví dụ, 2, 3, 4, hoặc 5) được sử dụng ở thời điểm bắt đầu chế độ điều trị trong vai trò là "liều nạp" sau đó là các liều tiếp theo mà được sử dụng với tần suất thưa hơn (ví dụ, "liều duy trì").

Theo các phương án tiêu biểu nhất định của sáng chế, mỗi liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba được sử dụng từ 1 đến 26 (ví dụ, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, hoặc hơn) tuần sau liều ngay trước. Thuật ngữ "liều ngay trước," như được sử dụng trong tài liệu này, có nghĩa là, theo trình tự sử dụng nhiều liều, liều kháng thể kháng IL-33 mà được sử dụng cho bệnh nhân trước khi sử dụng liều tiếp theo theo trình tự sử dụng mà không có liều nào xen vào.

Phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế có thể bao gồm việc cho bệnh nhân dùng một số liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba bất kỳ của kháng thể kháng IL-33. Ví dụ, theo các phương án nhất định, chỉ duy nhất một liều thứ hai được sử dụng cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều liều thứ hai hơn nữa (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn) được sử dụng cho bệnh nhân. Mặt khác, theo các phương án nhất định, chỉ duy nhất một liều thứ ba được sử dụng cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều liều thứ ba hơn nữa (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn) được sử dụng cho bệnh nhân.

Theo các phương án liên quan đến nhiều liều thứ hai, mỗi liều thứ hai có thể được sử dụng ở cùng một tần suất với liều thứ hai khác. Ví dụ, mỗi liều thứ hai có thể được sử dụng cho bệnh nhân sau liều ngay trước từ 1 đến 2 tuần hoặc từ 1 đến 2 tháng. Tương tự, theo các phương án có liên quan đến liều thứ ba, mỗi liều thứ ba có thể được sử dụng ở cùng một tần suất với liều thứ ba khác. Ví dụ, mỗi liều thứ ba có thể được sử dụng cho bệnh nhân sau liều ngay trước từ 2 đến 12 tuần. Theo các phương án nhất định của sáng chế, tần suất sử dụng liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba

cho bệnh nhân có thể khác nhau trong chế độ điều trị. Tần suất sử dụng cũng có thể được bác sĩ điều chỉnh trong thời gian điều trị tùy thuộc vào nhu cầu của từng bệnh nhân sau khám lâm sàng.

Sáng chế đề cập đến chế độ dùng thuốc, trong đó 2 đến 6 liều nạp được sử dụng cho bệnh nhân với tần suất thứ nhất (ví dụ, một lần mỗi tuần, hai tuần một lần, ba tuần một lần, một tháng một lần, hai tháng một lần, v.v.), sau đó sử dụng hai hoặc nhiều liều duy trì hơn nữa cho bệnh nhân với tần suất thưa hơn. Ví dụ, theo khía cạnh này của sáng chế, nếu liều nạp được sử dụng ở tần suất một lần mỗi tháng, thì liều duy trì được sử dụng cho bệnh nhân sáu tuần một lần, hai tháng một lần, ba tháng một lần, v.v.).

Công dụng chẩn đoán của kháng thể

Kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để phát hiện và/hoặc đo lường IL-33, hoặc tế bào biểu hiện IL-33 trong mẫu, ví dụ, nhằm mục đích chẩn đoán. Ví dụ, kháng thể kháng IL-33, hoặc đoạn của nó, có thể được sử dụng để chẩn đoán tình trạng bệnh hoặc bệnh đặc trưng bởi sự biểu hiện khác thường (ví dụ, biểu hiện quá mức, biểu hiện dưới mức, không biểu hiện, v.v.) của IL-33. Các thử nghiệm chẩn đoán tiêu biểu đối với IL-33 có thể bao gồm, ví dụ, việc cho mẫu thu được từ bệnh nhân tiếp xúc với kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế, trong đó kháng thể kháng IL-33 được đánh dấu bằng phân tử đánh dấu hoặc phân tử thông báo dễ phát hiện. Theo cách khác, kháng thể kháng IL-33 không được đánh dấu có thể được sử dụng trong các ứng dụng chẩn đoán kết hợp với kháng thể thứ hai mà bản thân kháng thể này được đánh dấu để phát hiện. Phân tử đánh dấu hoặc phân tử thông báo dễ phát hiện có thể là đồng vị phóng xạ, như ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , hoặc ^{125}I ; gốc huỳnh quang hoặc phát quang hóa học như florescein isothioxyanat, hoặc rođamin; hoặc enzym như phosphataza kiềm, beta-galactosidaza, peroxidaza củ cải ngựa, hoặc luxiferaza. Các thử nghiệm tiêu biểu cụ thể mà có thể được sử dụng để phát hiện hoặc đo lường IL-33 trong mẫu bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay-RIA), và thử nghiệm phân loại tế bào có hoạt hoá hiện tượng huỳnh quang (fluorescence-activated cell sorting-FACS).

Các mẫu mà có thể được sử dụng trong các thử nghiệm chẩn đoán IL-33 theo sáng chế bao gồm mẫu mô hoặc dịch bất kỳ thu được từ bệnh nhân mà chứa một lượng protein IL-33 để phát hiện, hoặc đoạn của nó, trong các điều kiện bình thường hoặc bệnh lý. Nhìn chung, lượng IL-33 trong một mẫu cụ thể thu được từ bệnh nhân khoẻ mạnh (ví dụ, bệnh nhân không bị bệnh hoặc tình trạng bệnh gắn liền với mức hoặc hoạt tính IL-33 bất thường) sẽ được đo để ban đầu xác lập mức IL-33 đường chuẩn hay tiêu chuẩn. Sau đó, mức IL-33 đường chuẩn có thể được đem so sánh với mức IL-33 đo được ở các mẫu thu được từ từng bệnh nhân bị nghi ngờ mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh có liên quan đến IL-33.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây được đưa ra nhằm cung cấp cho chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này một bản mô tả và bộc lộ hoàn chỉnh về cách tạo ra và sử dụng phương pháp và chế phẩm theo sáng chế, và không có ý làm giới hạn những gì mà tác giả sáng chế cho là thuộc phạm vi của sáng chế của mình. Đã có các nỗ lực nhằm đảm bảo độ chính xác của các con số sử dụng (ví dụ, lượng, nhiệt độ, v.v.), tuy nhiên một vài sai số và độ lệch thử nghiệm cần phải được giải thích. Trừ khi được quy định khác, các phần là phần khối lượng, khối lượng phân tử là khối lượng phân tử trung bình, nhiệt độ là theo độ C, và áp suất là bằng hoặc gần áp suất khí quyển.

Ví dụ 1. Tạo kháng thể của người kháng IL-33 của người

Chất sinh miễn dịch bao gồm IL-33 của người được sử dụng trực tiếp, với tá được để kích thích đáp ứng miễn dịch, cho chuột VELOCIMMUNE[®] chứa ADN mã hoá các vùng biến đổi chuỗi nhẹ kapa và chuỗi nặng của globulin miễn dịch của người. Đáp ứng miễn dịch với kháng thể được theo dõi bằng thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu IL-33. Khi thu được đáp ứng miễn dịch mong muốn, các tế bào lách được thu hoạch và được dung hợp với tế bào u tuỷ của chuột để duy trì khả năng sống và tạo ra các dòng tế bào lai. Các dòng tế bào lai được sàng lọc và được lựa chọn để nhận diện các dòng tế bào mà sản xuất kháng thể đặc hiệu IL-33. Việc sử dụng kỹ thuật này tạo ra được một vài kháng thể thể khảm kháng IL-33 (tức là, kháng thể có vùng biến đổi của người và vùng ổn định của chuột); kháng thể tiêu biểu được tạo

ra theo phương thức này được đặt tên như sau: H1M9559N, H1M9566N, H1M9568N và H1M9565N. Sau đó, vùng biến đổi của người từ kháng thể thể khảm được tạo dòng thuần lên vùng ổn định của người để tạo ra kháng thể kháng IL-33 hoàn toàn của người như được mô tả trong tài liệu này.

Kháng thể kháng IL-33 cũng được phân lập trực tiếp từ các tế bào B dương tính với kháng nguyên mà không cần dung hợp với tế bào u tủy, như được mô tả trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2007/0280945A1. Việc sử dụng phương pháp này, một vài kháng thể kháng IL-33 hoàn toàn của người (tức là, các kháng thể có vùng biến đổi của người và vùng ổn định của người) được tạo ra; kháng thể tiêu biểu được tạo ra theo phương thức này được đặt tên như sau: H4H9629P, H4H9633P, H4H9640P, H4H9659P, H4H9660P, H4H9662P, H4H9663P, H4H9664P, H4H9665P, H4H9666P, H4H9667P, H4H9670P, H4H9671P, H4H9672P, H4H9675P, và H4H9676P.

Các thuộc tính sinh học nhất định của kháng thể kháng IL-33 tiêu biểu được tạo ra theo các phương pháp nêu trong ví dụ này được mô tả chi tiết trong các ví dụ nêu dưới đây.

Ví dụ 2. Trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

Bảng 1 thể hiện các cặp trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và các trình tự CDR, của kháng thể kháng IL-33 đã được lựa chọn và ký hiệu nhận diện kháng thể tương ứng của chúng.

Bảng 1

	SEQ ID NO:							
Tên gọi kháng thể	HCV R	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3	LCV R	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
9559 N	2	4	6	8	10	12	14	16
9566 N	18	20	22	24	26	28	30	32
9568 N	34	36	38	40	42	44	46	48
9629P	50	52	54	56	58	60	62	64
9633P	66	68	70	72	74	76	78	80
9640P	82	84	86	88	90	92	94	96

9659P	98	100	102	104	106	108	110	112
9660P	114	116	118	120	122	124	126	128
9662P	130	132	134	136	138	140	142	144
9663P	146	148	150	152	154	156	158	160
9664P	162	164	166	168	170	172	174	176
9665P	178	180	182	184	186	188	190	192
9666P	194	196	198	200	202	204	206	208
9667P	210	212	214	216	218	220	222	224
9670P	226	228	230	232	234	236	238	240
9671P	242	244	246	248	250	252	254	256
9672P	258	260	262	264	266	268	270	272
9675P	274	276	278	280	282	284	286	288
9676P	290	292	294	296	298	300	302	304
9565 N	308	310	312	314	316	318	320	322

Thông thường, các kháng thể được đề cập trong tài liệu này là theo danh pháp sau: Tiền tố Fc (ví dụ, "H1M," hoặc "H4H"), sau đó là ký hiệu nhận diện bằng số (ví dụ, "9559," "9566," hoặc "9629" như được thể hiện trong bảng 1), sau đó là hậu tố "P," hoặc "N". Do đó, theo danh pháp này, kháng thể trong tài liệu này có thể được gọi là, ví dụ, "H1M9559N," "H1M9566N," "H4H9629P," v.v. Tiền tố H1M và H4H trên các tên gọi kháng thể được sử dụng trong tài liệu này chỉ kiểu tương đương vùng Fc cụ thể của kháng thể. Ví dụ, kháng thể "H1M" có Fc IgG1 của chuột, trong khi đó kháng thể "H4H" có Fc IgG4 của người. Như chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhìn nhận, kháng thể có kiểu tương đương Fc cụ thể có thể được chuyển hoá thành kháng thể có kiểu tương đương Fc khác (ví dụ, kháng thể có Fc IgG1 của chuột có thể được chuyển hoá thành kháng thể có Fc IgG4 của người, v.v.), nhưng trong trường hợp bất kỳ, các vùng biến đổi (kể cả các CDR) – mà có thể được chỉ rõ bằng các ký hiệu nhận diện bằng số được thể hiện trong bảng 1 – sẽ vẫn như nhau, và các thuộc tính liên kết được dự kiến là đồng nhất hoặc về cơ bản tương đồng bất kể bản chất của vùng Fc.

Ví dụ 3. Kháng thể liên kết với IL-33 của người như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt

Hằng số phân ly cân bằng (trị số K_D) của IL-33 liên kết với kháng thể đơn dòng kháng IL-33 đã được tinh chế được xác định bằng bộ cảm biến cộng hưởng

plasmon bề mặt thời gian thực có sử dụng thiết bị Biacore 4000. Bề mặt cảm biến Biacore đầu tiên được tạo dẫn xuất bằng quá trình liên hợp amin với kháng thể đa dòng của chó kháng của chuột (GE, # BR-1008-38) hoặc với kháng thể Fc đơn dòng của chuột kháng của người (GE, # BR-1008-39) để lần lượt bắt giữ các kháng thể đơn dòng kháng IL-33 được biểu hiện với vùng ổn định IgG4 của chuột hoặc của người. Tất cả các nghiên cứu liên kết Biacore được tiến hành trong ADA 0,01M độ pH=7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, và 0,05% thể tích/thể tích chất hoạt động bề mặt Tween-20 (dung dịch đệm chạy ABS-ET). Các nồng độ khác nhau của IL-33 của người (hIL-33; R&D Systems, # 3625-IL-010/CF) hoặc IL-33 của khỉ ăn của được biểu hiện với thể hexahistidin có đầu cuối C (MfIL-33-6His; SEQ ID NO:xx) được điều chế trong dung dịch đệm chạy ABS-ET (có nồng độ nằm trong khoảng từ 100nM đến 3,7nM, pha loãng gấp 3 lần) được tiêm lên bề mặt đã bắt giữ kháng thể đơn dòng kháng IL-33 ở tốc độ dòng 30 μ l/phút. Sự gắn kết của hIL-33 hoặc MfIL-33-6His với kháng thể đơn dòng đã bị bắt giữ được theo dõi trong 4 phút và sự gắn kết của chúng trong dung dịch đệm chạy ABS-ET được theo dõi trong 10 phút. Tác dụng của độ pH giảm đối với khả năng liên kết của mỗi kháng thể kháng IL-33 với hIL-33 hoặc MfIL-33-6His được nghiên cứu bằng cách sử dụng thử nghiệm theo độ pH trực tiếp trong ADA 0,01M độ pH=6,0, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, và 0,05% thể tích/thể tích chất hoạt động bề mặt Tween-20 (dung dịch đệm ABS-ET độ pH=6). Để đạt được điều này, sự gắn kết hIL-33 hoặc MfIL-33-6His với kháng thể đơn dòng đã bắt giữ được theo dõi trong 4 phút trong dung dịch đệm chạy ABS-ET. Sau 30 giây phân ly hIL-33 hoặc MfIL-33-6His trong dung dịch đệm chạy ABS-ET, dung dịch đệm ABS-ET pH=6 được tiêm vào trong 3 phút, và sự phân ly chất phân tích trong điều kiện độ pH thấp được đo. Tất cả các thử nghiệm động học liên kết được thực hiện ở cả 25°C và 37°C. Hằng số liên kết (k_a) và phân ly (k_d) động học được xác định bằng cách làm khớp các biểu đồ cảm biến thời gian thực vào mô hình liên kết 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm làm khớp đường cong Scrubber 2.0c. Hằng số cân bằng phân ly liên kết (K_D) và thời gian bán huỷ phân ly ($t_{1/2}$) được tính từ hằng số tỷ số động học như sau:

$$K_D \text{ (M)} = k_d/k_a \quad \text{và} \quad t_{1/2} \text{ (phút)} = \ln(2)/(60 * k_d)$$

Các thông số động học liên kết của hIL-33 và MfIL-33-6His liên kết với các

kháng thể đơn dòng kháng IL-33 khác nhau ở 25°C và 37°C được thể hiện trong các bảng 2 đến 5. Ở 25°C, hIL-33 liên kết với kháng thể kháng IL-33 với các trị số K_D nằm trong khoảng từ 78pM đến 757pM, như được thể hiện trong bảng 2. Ở 37°C, hIL-33 liên kết với kháng thể kháng IL-33 với trị số K_D nằm trong khoảng từ 411pM đến 2,03nM, như được thể hiện trong bảng 3. Ở cả 25°C và 37°C, một kháng thể kháng IL-33 thể hiện khả năng liên kết yếu và do đó các thông số động học liên kết của nó có thể không được khớp bằng cách sử dụng mô hình liên kết 1:1. Ở 25°C, MfIL-33-6His liên kết với kháng thể kháng IL-33 với trị số K_D nằm trong khoảng từ 333pM đến 38nM, như được thể hiện trong bảng 4. Ở 37°C, MfIL-33-6His liên kết với kháng thể kháng IL-33 với trị số K_D nằm trong khoảng từ 1nM đến 48,6nM, như được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 2: Các thông số động học liên kết của các kháng thể đơn dòng kháng IL-33 liên kết với IL-33 của người ở 25°C.

	Các thông số động học liên kết với IL-33 của người trong dung dịch đệm chạy ABS-ET				Các thông số của thử nghiệm theo độ pH trực tiếp trong dung dịch đệm ABS-ET pH=6		
Kháng thể được bắt giữ	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (phút)	$t_{1/2}$ tỷ lệ (pH7,4 /pH6,0)
H4H9675P	1,02E+06	2,58E-04	2,54E-10	45	1,11E-03	10	4,3
H4H9662P	8,11E+05	2,50E-04	3,08E-10	46	8,26E-04	14	3,3
H4H9640P	9,12E+05	2,37E-04	2,60E-10	49	6,57E-04	18	2,8
H4H9629P	7,77E+05	2,26E-04	2,90E-10	51	1,28E-03	9	5,7
H4H9659P	5,26E+05	1,72E-04	3,27E-10	67	6,64E-04	17	3,9
H4H9660P	6,96E+05	2,24E-04	3,22E-10	52	7,08E-04	16	3,2
H4H9667P	6,37E+05	2,52E-04	3,95E-10	46	5,66E-04	20	2,2
H4H9670P	7,86E+05	2,89E-04	3,68E-10	40	8,25E-04	14	2,9
H4H9663P	1,36E+06	4,14E-04	3,05E-10	28	1,10E-03	11	2,7

H4H9666P	5,08E+05	2,80E-04	5,51E-10	41	1,34E-03	9	4,8
H4H9676P	1,03E+06	3,45E-04	3,34E-10	33	1,21E-03	10	3,5
H4H9633P	6,56E+05	2,83E-04	4,32E-10	41	8,10E-04	14	2,9
H4H9671P	7,71E+05	3,49E-04	4,53E-10	33	1,62E-03	7	4,6
H4H9672P	6,68E+05	3,52E-04	5,27E-10	33	1,41E-03	8	4,0
H4H9665P	8,88E+05	4,74E-04	5,33E-10	24	2,12E-03	5	4,5
H4H9664P	3,39E+05	2,57E-04	7,57E-10	45	8,23E-04	14	3,2
H1M9568N	7,02E+05	1,30E-04	1,84E-10	89	1,78E-04	65	1,4
H1M9566N	1,27E+05	1,00E-05**	7,88E-11**	1155*	1,10E-04	105	11,0
H1M9559N	4,04E+05	2,74E-04	6,78E-10	42	1,87E-04	62	0,7
H1M9565N	IC*	IC*	IC*	IC*	IC*	IC*	IC*

*IC: không xác định vì quan sát thấy liên kết rất yếu trong các điều kiện thử nghiệm và dữ liệu liên kết thời gian thực không được khớp một cách đáng tin cậy với mô hình liên kết 1:1.

** trong các điều kiện thử nghiệm không quan sát thấy có sự phân ly IL33 khỏi kháng thể đơn dòng bất giữ do đó trị số k_d được cố định là 1,00E-05, và các trị số $t_{1/2}$ và K_D thu được lần lượt là các giới hạn trên và giới hạn dưới.

Bảng 3: Các thông số động học liên kết của các kháng thể đơn dòng kháng IL-33 liên kết với IL-33 của người ở 37°C.

	Các thông số động học liên kết với IL-33 của người trong dung dịch đệm chạy ABS-ET				Các thông số của thử nghiệm theo độ pH trực tiếp trong dung dịch đệm ABS-ET pH=6		
Kháng thể bất giữ	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (phút)	$t_{1/2}$ tỷ lệ (pH7,4 /pH6,0)
H4H9675P	2,12E+06	8,72E-04	4,11E-10	13	4,63E-03	2	5,3

H4H9662P	1,40E+06	6,20E-04	4,43E-10	19	3,83E-03	3	6,2
H4H9640P	1,15E+06	5,73E-04	4,98E-10	20	2,65E-03	4	4,6
H4H9629P	1,27E+06	6,46E-04	5,08E-10	18	5,82E-03	2	9,0
H4H9659P	7,07E+05	4,03E-04	5,70E-10	29	2,99E-03	4	7,4
H4H9660P	8,03E+05	4,79E-04	5,96E-10	24	3,23E-03	4	6,8
H4H9667P	9,76E+05	6,03E-04	6,18E-10	19	2,44E-03	5	4,0
H4H9670P	1,16E+06	7,83E-04	6,76E-10	15	3,83E-03	3	4,9
H4H9663P	1,83E+06	1,24E-03	6,77E-10	9	4,62E-03	3	3,7
H4H9666P	1,13E+06	7,70E-04	6,81E-10	15	6,80E-03	2	8,8
H4H9676P	1,38E+06	1,28E-03	9,22E-10	9	5,24E-03	2	4,1
H4H9633P	7,40E+05	6,89E-04	9,31E-10	17	2,40E-03	5	3,5
H4H9671P	1,21E+06	1,14E-03	9,38E-10	10	5,85E-03	2	5,1
H4H9672P	1,09E+06	1,15E-03	1,05E-09	10	5,41E-03	2	4,7
H4H9665P	1,21E+06	1,44E-03	1,19E-09	8	9,65E-03	1	6,7
H4H9664P	5,19E+05	7,21E-04	1,39E-09	16	2,79E-03	4	3,9
H1M9568N	6,72E+05	9,61E-04	1,43E-09	12	1,10E-03	10	1,1
H1M9566N	1,66E+05	2,83E-04	1,70E-09	41	9,67E-04	12	3,4
H1M9559N	4,73E+05	9,62E-04	2,03E-09	12	9,92E-04	12	1,0
H1M9565N	IC*	IC*	IC*	IC*	IC*	IC*	IC*

*IC: không xác định vì quan sát thấy sự liên kết rất yếu trong các điều kiện thử nghiệm và dữ liệu liên kết thời gian thực không được khớp một cách đáng tin cậy với mô hình liên kết 1:1.

Bảng 4: Các thông số động học liên kết của các kháng thể đơn dòng kháng IL-33 liên kết với MfIL-33-6His ở 25°C.

	Các thông số động học liên kết với MfIL-33-6His trong dung dịch đậm chạy ABS-ET				Các thông số của thử nghiệm theo độ pH trực tiếp trong dung dịch đậm ABS-ET pH=6		
Kháng thể bắt giữ	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (phút)	$t_{1/2}$ tỷ lệ (pH7,4 /pH6,0)
H4H9675P	5,06E+05	1,29E-03	2,55E-09	9	1,56E-03	7	1,2
H4H9662P	3,53E+05	4,42E-04	1,25E-09	26	1,17E-04	99	0,3
H4H9640P	4,50E+05	1,37E-03	3,06E-09	8	5,01E-04	23	0,4
H4H9629P	5,62E+05	1,35E-02	2,39E-08	0,9	3,58E-02	0,3	2,7
H4H9659P	3,25E+05	4,86E-04	1,50E-09	24	1,23E-04	94	0,3
H4H9660P	4,26E+05	1,49E-03	3,49E-09	8	1,08E-03	11	0,7
H4H9667P	3,43E+05	9,91E-04	2,89E-09	12	6,96E-04	17	0,7
H4H9670P	4,40E+05	2,10E-03	4,77E-09	6	3,93E-04	29	0,2
H4H9663P	8,69E+05	9,25E-04	1,06E-09	12	6,83E-04	17	0,7
H4H9666P	2,22E+05	3,54E-03	1,59E-08	3,3	8,09E-03	1,4	2,3
H4H9676P	8,52E+05	4,12E-03	4,84E-09	2,8	1,45E-03	8	0,4
H4H9633P	2,62E+05	9,97E-03	3,80E-08	1,2	2,87E-03	4	0,3
H4H9671P	5,87E+05	1,50E-03	2,55E-09	8	1,61E-03	7	1,1
H4H9672P	4,37E+05	3,60E-03	8,22E-09	3,2	2,67E-03	4	0,7
H4H9665P	5,57E+05	5,66E-04	1,02E-09	20	7,53E-04	15	1,3
H4H9664P	1,40E+05	1,65E-03	1,18E-08	7	4,80E-04	24	0,3
H1M9568N	2,44E+05	2,61E-04	1,07E-09	44	3,02E-04	38	1,2
H1M9566N	2,93E+05	9,75E-05	3,33E-10	119	1,26E-04	91	1,3
H1M9559N	3,21E+05	1,23E-03	3,82E-09	9	1,52E-	8	1,2

					03		
H1M9565N	4,06E+04	7,20E-05	1,77E-09	160	1,43E-04	81	2,0

Bảng 5: Các thông số động học liên kết của kháng thể đơn dòng kháng IL-33 liên kết với MfIL-33-6His ở 37°C.

	Các thông số động học liên kết với MfIL-33-6His trong dung dịch đệm chạy ABS-ET				Các thông số của thử nghiệm theo độ pH trực tiếp trong dung dịch đệm ABS-ET pH=6		
Kháng thể bắt giữ	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (phút)	$t_{1/2}$ tỷ lệ (pH7,4 /pH6,0)
H4H9675P	1,02E+06	4,91E-03	4,81E-09	2,4	7,35E-03	1,6	1,5
H4H9662P	7,07E+05	1,58E-03	2,24E-09	7	1,68E-03	7	1,1
H4H9640P	8,10E+05	4,36E-03	5,38E-09	2,6	2,26E-03	5	0,5
H4H9629P	1,07E+06	3,47E-02	3,24E-08	0,3	FT*	FT*	FT*
H4H9659P	5,98E+05	1,86E-03	3,11E-09	6	1,02E-03	11	0,5
H4H9660P	6,80E+05	4,44E-03	6,53E-09	2,6	4,63E-03	2,5	1,0
H4H9667P	6,81E+05	3,17E-03	4,66E-09	4	2,68E-03	4	0,8
H4H9670P	7,35E+05	5,03E-03	6,84E-09	2,3	1,65E-03	7	0,3
H4H9663P	1,62E+06	3,61E-03	2,22E-09	3,2	3,54E-03	3,3	1,0
H4H9666P	4,32E+05	1,41E-02	3,27E-08	0,8	FT*	FT*	FT*
H4H9676P	1,87E+06	1,44E-02	7,70E-09	0,8	FT*	FT*	FT*
H4H9633P	4,68E+05	2,27E-02	4,86E-08	0,5	FT*	FT*	FT*
H4H9671P	1,20E+06	6,07E-03	5,08E-09	1,9	8,19E-03	1,4	1,3
H4H9672P	9,46E+05	1,30E-02	1,37E-08	0,9	FT*	FT*	FT*
H4H9665P	1,10E+06	2,10E-03	1,91E-09	5	4,00E-03	2,9	1,9
H4H9664P	3,61E+05	5,84E-03	1,62E-08	2,0	1,93E-03	6	0,3
H1M9568N	3,89E+05	1,73E-03	4,46E-09	7	2,24E-03	5	1,3

H1M9566N	3,99E+05	4,00E-04	1,00E-09	29	1,15E-03	10	2,9
H1M9559N	4,93E+05	3,47E-03	7,04E-09	3,3	3,07E-03	4	0,9
H1M9565N	7,82E+04	2,02E-04	2,59E-09	57	2,28E-04	51	1,1

*FT: t $\frac{1}{2}$ nhanh sao cho MfIL-33-6His liên kết với kháng thể đơn dòng kháng IL-33 bắt giữ

Ví dụ 4. Kháng thể kháng IL-33 phong bế quá trình liên kết của IL-33 với thụ thể ST2 của người

Khả năng kháng thể kháng IL-33 phong bế IL-33 của người (hIL-33) hoặc IL-33 của khi ăn của liên kết với thụ thể ST2 của người được đo bằng thử nghiệm ELISA bán cạnh tranh. Một phần của vùng ngoại bào protein ST2 của người mà được biểu hiện với thể Fc IgG1 của người có đầu cuối C (hST2-hFc; SEQ ID NO:306), được phủ ở nồng độ 1 μ g/ml trong dung dịch đệm PBS trên đĩa vi chuẩn độ có 96 lỗ qua đêm ở 4°C. Kế tiếp, các vị trí liên kết không đặc hiệu được phong bế bằng cách sử dụng dung dịch 0,5% (trọng lượng/thể tích) chứa BSA trong PBS. Các nồng độ ổn định của protein hIL-33 được biotinyl hoá 30pM (hệ R&D, Cat #3625-IL/CF) (biotin-hIL-33) hoặc IL-33 của khi ăn của 150pM được biểu hiện với thể hexahistidin (MfIL-33-6His; SEQ ID NO:305) được bổ sung riêng rẽ vào các dung dịch kháng thể pha loãng theo dãy sao cho nồng độ cuối cùng của kháng thể nằm trong khoảng từ 0 đến 100nM. Hỗn hợp kháng thể/IL-33 được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trước khi chúng được chuyển sang đĩa vi chuẩn độ đã phủ hST2-hFc. Sau khi ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng, các lỗ được rửa, và biotin-hIL-33 gắn vào đĩa được phát hiện bằng streptavidin được tiếp hợp với peroxidaza củ cải ngựa (horse-radish peroxidase-HRP) (Thermo Scientific, Cat # N200), và MfIL-33-6His gắn vào đĩa được phát hiện bằng kháng thể đơn dòng kháng His được tiếp hợp với HRP (Qiagen, #34460). Tất cả các mẫu được xử lý bằng dung dịch TMB (BD biosciences, # 51-2607KC) để tạo ra phản ứng đo màu và sau đó dập tắt phản ứng bằng cách axit hoá bằng axit sulfuric 1M trước khi đo mức hấp thụ ở bước sóng 450nm trên máy đọc đĩa Victor X5. Phương pháp phân tích dữ liệu được tiến hành bằng cách sử dụng mô hình đáp ứng liều xichma trong phần mềm Prism™. Trị số IC₅₀ được tính, được xác định là nồng độ của kháng thể cần thiết để

làm giảm 50% so với mức tín hiệu tối đa biotin-hIL-33 hoặc MfIL-33-6His liên kết với hST2-hFc được phủ trên đĩa, được sử dụng làm chỉ thị về hiệu quả phong bế. Phần trăm phong bế được tính bằng tỷ lệ của mức giảm tín hiệu được quan sát khi có mặt kháng thể so với mức chênh lệch giữa tín hiệu có một mình IL-33 và tín hiệu nền (tín hiệu từ kháng thể thứ cấp được tiếp hợp với HRP hoặc một mình streptavidin). Mức hấp thụ đo được ở nồng độ ổn định của một mình biotin-hIL-33 hoặc MfIL-33-6His được xác định là mức phong bế bằng 0% và mức hấp thụ đo được khi không bổ sung IL-33 được xác định là mức phong bế bằng 100%. Các trị số hấp thụ của các lỗ chứa nồng độ mỗi kháng thể cao nhất được sử dụng để xác định phần trăm mức phong bế tối đa.

Bảng 6: ELISA phong bế biotin-hIL-33 hoặc MfIL-33-6His liên kết với hST2-hFc bằng kháng thể kháng IL-33

Ký hiệu nhận diện kháng thể	phong bế biotin-hIL-33 30pM trên hST2-hFc, IC ₅₀ (M)	% mức phong bế tối đa biotin-hIL-33 trên hST2-hFc	phong bế Mf-IL-33-6His 150pM trên hST2-hFc, IC ₅₀ (M)	% mức phong bế tối đa Mf-IL-33-6His trên hST2-hFc
H1M9559 N*	1,4E-10	88	1,0E-08	53
H1M9566 N*	3,2E-10	69	2,2E-10	41
H1M9565 N*	2,2E-08	68	1,2E-08	86
H1M9568 N*	1,9E-10	55	8,4E-10	38
H4H9629P	4,5E-10	80	N/A	NBI
H4H9633P	4,4E-10	66	N/A	NBI
H4H9640P	3,5E-10	78	3,5E-09	73
H4H9659P	4,0E-10	78	6,0E-10	92
H4H9660P	3,1E-10	57	4,2E-09	68
H4H9662P	1,0E-09	77	8,6E-10	87
H4H9663P	5,0E-10	74	1,2E-09	81
H4H9664P	3,0E-10	73	3,8E-09	67
H4H9665P	8,7E-10	55	4,2E-10	81
H4H9666P	6,0E-10	71	1,3E-08	40
H4H9667P	4,1E-10	78	4,1E-09	72
H4H9670P	4,8E-10	69	3,5E-09	69
H4H9671P	4,6E-10	46	5,8E-10	62
H4H9672P	4,4E-10	63	5,5E-09	48

H4H9675P	4,4E-10	58	1,5E-09	72
H4H9676P	4,6E-10	54	3,2E-09	57

N/A= không áp dụng được

NBI= không chất phong bế

*= thử nghiệm được tiến hành vào một ngày riêng biệt

Các thử nghiệm liên kết của 20 kháng thể được tiến hành trên hai ngày riêng biệt, như được thể hiện trong bảng 6. Tất cả 20 kháng thể kháng IL-33 đều phong bế biotin-hIL-33 liên kết với hST2-hFc với trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 140pM đến 22nM và phần trăm mức phong bế tối đa nằm trong khoảng từ 46% đến 88%. 18 trong số 20 kháng thể kháng IL-33 phong bế MfIL-33-6His liên kết với hST2-hFc với trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 220pM đến 13nM và phần trăm mức phong bế tối đa nằm trong khoảng từ 38% đến 92%, như được thể hiện trong bảng 6. Hai trong số các kháng thể được thử nghiệm, H4H9629P và H4H9633P, không thể hiện được mức phong bế MfIL-33-6His liên kết với hST2-hFc có thể đo được.

Ví dụ 5. Ước chế IL-33 liên kết với kháng thể đơn dòng kháng IL-33 bằng ST2 như được thể hiện bằng phân tích Biacore

Khả năng kháng thể kháng IL-33 liên kết với phức hợp được tạo trước giữa IL-33 với ST2 được thử nghiệm bằng cách sử dụng thiết bị Biacore T-200 được trang bị bộ cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt thời gian thực. Thử nghiệm này được tiến hành ở 25°C với dung dịch đệm chạy chứa HEPES 0,01M độ pH=7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, và 0,05% thể tích/thể tích chất hoạt động bề mặt Tween-20 (HBS-ET). Bề mặt cảm biến Biacore đầu tiên được tạo dẫn xuất bằng amin liên kết với kháng thể đơn dòng đặc hiệu với thể kháng myc (Clone# 9E10), và trên cảm biến đã được tạo xuất này thu được gần 160 đơn vị đáp ứng (response unit-RU) của protein ST2 của người được biểu hiện có thể myc-myc-hexahistadin có đầu cuối C (hST2-MMH; SEQ ID NO: 323). Sau đó bề mặt hST2-MMH đã bắt giữ được làm bão hoà bằng cách tiêm IL-33 của người 100nM (hIL-33; R&D Systems, # 3625-IL-010/CF) trong 3 phút, sau đó tiêm dung dịch kháng thể đơn dòng kháng IL-33 100nM trong 3 phút. Đáp ứng liên kết thời gian thực được theo dõi trong suốt toàn bộ thời gian thử nghiệm, và đáp ứng liên kết quan sát được ở thời điểm 3 phút sau khi tiêm kháng thể kháng IL-33 với phức hợp được tạo

trước của hIL-33 và hST2-MMH bắt giữ được ghi lại và được lập bảng và được thể hiện trong bảng 7. Không quan sát thấy có sự liên kết không đặc hiệu giữa kháng thể đơn dòng kháng IL-33 với bề mặt bắt giữ thể kháng myc. Như được thể hiện trong bảng 7, 17 trong số các kháng thể thử nghiệm không thể hiện mức liên kết có thể đo được với hIL-33 sau khi nó được tạo phức trước với hST2-MMH, trong khi đó ba kháng thể (H1M9565N, H1M9566N, và H1M9568N) đã liên kết với hIL-33 sau khi nó được tạo phức trước với hST2-MMH.

Bảng 7: Sự liên kết của kháng thể kháng IL-33 với phức hợp được tạo trước của hIL-33 và hST2-MMH

Kháng thể	Đáp ứng liên kết với kháng thể (RU)
H4H9629P	-1
H4H9633P	-1
H4H9640P	-1
H4H9659P	-1
H4H9660P	-1
H4H9662P	0
H4H9663P	-1
H4H9664P	-1
H4H9665P	0
H4H9666P	-1
H4H9667P	-1
H4H9670P	-1
H4H9671P	-1
H4H9672P	-1
H4H9675P	-1
H4H9676P	-1
H1M9559N	-4
H1M9565N	11
H1M9566N	13
H1M9568N	131

Ví dụ 6. Ước chế quá trình truyền tín hiệu thụ thể qua trung gian IL-33 bằng kháng thể kháng IL-33

Interleukin-33 (IL-33) là một phối tử của ST2, một thành viên của siêu họ thụ

thể giống toll/intolokine-1 mà gắn liền với protein phụ, IL-1RAcP (để xem tổng quan, xem tài liệu: Kakkar and Lee, 2008). Sau quá trình hoạt hoá ST2/IL-1RAcP bởi IL-33, một dòng thác truyền tín hiệu được khởi động bởi các phân tử phía cuối dòng như MyD88 (yếu tố biệt hoá tế bào dòng tuỷ 88) và TRAF6 (yếu tố gắn liền với thụ thể TNF 6), dẫn đến hoạt hoá NF κ B (yếu tố nhân κ B), trong số các yếu tố khác. Để phát triển hệ thống thử nghiệm sinh học thích hợp để kiểm tra kháng thể kháng IL-33, tế bào thận phôi thai của người (HEK293) được chuyển nhiễm ổn định để biểu hiện ST2 của người (axit amin 1-556 có số truy cập NP_057316) cùng với phân tử thông báo luxiferaza [yếu tố đáp ứng NF κ B (5x)-luxiferaza-IRES-GFP] (dòng tế bào HEK293/hST2/NF κ B-luxiferaza). Dòng tế bào HEK293 biểu hiện IL-1RAcP nội sinh và quá trình hoạt hoá NF κ B bởi IL-33 trong tế bào HEK293 đã được bộc lộ trước đó (Schmitz *et al.*, *Immunity* 23:479-490 (2005)). Dòng tế bào ổn định được phân lập và được nuôi cấy trong 10% FBS, DMEM, NEAA, penicilin/streptomycin, và G418.

Đối với thử nghiệm sinh học, các tế bào HEK293/hST2/NF κ B-luxiferaza được uơm trên đĩa thử nghiệm có 96 lỗ ở nồng độ 10.000 tế bào mỗi lỗ trong môi trường có nồng độ huyết thanh thấp chứa 0,1% trọng lượng/thể tích FBS và OPTIMEM (Invitrogen, #31985-070) và sau đó được ủ ở 37°C trong 5% CO₂ qua đêm. Ngày tiếp theo, để xác định đáp ứng liều của IL-33, IL-33 của người (hIL-33; R&D Systems, #3625-IL) hoặc IL-33 của khỉ ăn của được biểu hiện với thể hexahistidin có đầu cuối C (MfIL-33-6His; SEQ ID NO:305) được pha loãng theo dãy theo tỷ lệ 1:3 và được bổ sung vào các tế bào bắt đầu từ nồng độ 10nM và điều chỉnh xuống 0,0002nM, cùng với mẫu đối chứng không chứa IL-33. Để đo mức ức chế, các kháng thể được pha loãng theo dãy và được bổ sung vào các tế bào sau đó bổ sung tiếp IL-33 ở nồng độ ổn định (hIL-33 10pM đối với thử nghiệm trên người và MfIL-33-6His 5pM đối với thử nghiệm trên khỉ). Tiến hành pha loãng theo dãy kháng thể gấp ba lần, trước khi bổ sung vào tế bào, bắt đầu từ 100pM và điều chỉnh xuống 0,002nM hoặc bắt đầu từ 10nM và điều chỉnh xuống 0,0002nM. Ngoài dãy pha loãng kháng thể, một lỗ chứa IL-33 ở nồng độ ổn định nhưng không chứa kháng thể bất kỳ cũng được lấy vào. Sau 5,5 giờ ủ ở 37°C trong 5% CO₂, hoạt tính luxiferaza được phát hiện bằng cách sử dụng máy đọc đĩa Victor X (Perkin Elmer),

và các kết quả được phân tích bằng phép hồi quy không tuyến tính (lôgistic 4 thông số) với phần mềm Prism 5. Các kết quả được thể hiện trong bảng 8.

Bảng 8:Ức chế quá trình hoạt hoá tế bào HEK293/hST2/NFkB-luxiferaza qua trung gian IL-33 của người và IL-33 của khỉ bằng kháng thể kháng IL33

Loài	Người				Khỉ		
EC ₅₀ [M]	2,2E-12	3,5E-12	2,4E-11		8,2E-13	3,5E-12	
IL-33 ở nồng độ ổn định	hIL-33 10pM				MfIL-33-6His 5pM		
AbPID	IC ₅₀ [M]	Ghi chú	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	IC ₅₀ [M]	Ghi chú	IC ₅₀ [M]
H1M9559 N	2,0E-09				4,9E-08		
H1M9566 N	9,5E-10	Ức chế một phần (tối đa ở mức 66%)			1,5E-09	Ức chế một phần (tối đa ở mức 61%)	
H1M9565 N	2,9E-08				1,7E-08		
H1M9568 N	2,5E-10	Ức chế một phần (tối đa ở mức 48%)			3,5E-09	Ức chế một phần (tối đa ở mức 34%)	
H4H9629 P				1,3E-11			5,5E-08
H4H9633 P			2,2E-10				1,3E-07
H4H9640 P			3,0E-11				1,4E-08
H4H9659 P			4,7E-11				3,3E-09
H4H9660 P			3,5E-11				1,9E-08
H4H9662 P				2,0E-11			1,5E-09
H4H9663 P			1,3E-10				2,7E-09
H4H9664 P			5,0E-11				2,6E-08
H4H9665 P			9,0E-11				6,6E-10
H4H9666 P			3,5E-11				7,8E-08

H4H9667 P			7,1E-11				1,2E-08
H4H9670 P			1,2E-10				1,7E-08
H4H9671 P				2,5E-11			4,8E-09
H4H9672 P			2,5E-11				2,0E-08
H4H9675 P				7,5E-12			4,1E-09
H4H9676 P			3,5E-11				8,4E-09

Mười tám trong tổng số 20 kháng thể kháng IL33 phong bế quá trình kích thích các tế bào HEK293/hST2/NFkB-luxiferaza qua IL-33 của người với các trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 7,5pM đến 29nM, như được thể hiện trong bảng 8. Hai trong số các kháng thể được thử nghiệm, H1M9566N và H1M9568N, ức chế một phần hIL-33 với mức ức chế tối đa bằng 48% và 66%, lần lượt với các trị số IC_{50} bằng 950pM và 250pM. Mười tám trong tổng số 20 kháng thể kháng IL33 phong bế quá trình kích thích các tế bào HEK293/hST2/NFkB-luxiferaza qua MfIL-33-6His với các trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 660pM đến 130nM như được thể hiện trong bảng 8. Hai trong số các kháng thể thử nghiệm, H1M9566N và H1M9568N, ức chế một phần MfIL-33-6His với mức ức chế tối đa bằng 61% và 34%, lần lượt với trị số IC_{50} bằng 1,5nM và 3,5nM.

Ví dụ 7. Ức chế quá trình mất hạt nhỏ của các bạch cầu ưa bazơ của người do IL-33 gây ra bằng kháng thể kháng IL-33

Để đánh giá tiếp các đặc tính *in vitro* của kháng thể kháng IL-33 chọn lọc theo sáng chế, khả năng phong bế quá trình mất hạt nhỏ của bạch cầu ưa bazơ do IL-33 gây ra được đánh giá. Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell-PBMC) được tinh chế từ máu toàn phần mới thu được từ hai người cho khác nhau bằng cách ly tâm gradien mật độ. Máu toàn phần K2 EDTA được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 trong RPMI 1640, được phân lớp cẩn thận trên Ficoll-Paque (GE Healthcare, # 17-1440-03) và được quay ly tâm để tách PBMC. Lớp giữa các pha chứa PBMC được hút ra, được chuyển sang một ống mới, và được rửa hai lần bằng dung dịch đệm MACS mà là dung dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:20 của

dung dịch MACS BSA (Miltenyi Biotec, #130-091-376) trong dung dịch rửa MACS (Miltenyi Biotec, #130-091-222). Sau đó, PBMC đã tinh chế được dàn vào đĩa có 96 lỗ có đáy hình chữ V ở nồng độ cuối bằng $\sim 3,0 \times 10^6$ tế bào/ml trong 100 μ l dung dịch đệm MACS. Để gây miễn cảm sơ bộ bạch cầu ưa bazơ trong quần thể PBMC, 1ng IL-3 (Sigma, # H7166-10UG) trong 50 μ l dung dịch nước muối đệm phosphat của Dulbecco không có Ca^{++} hoặc Mg^{++} (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline-DPBS) được bổ sung vào huyền phù tế bào, và sau đó ủ ở 37°C trong 10 phút.

Các dung dịch pha loãng theo dãy (theo tỷ lệ 1:3) của hai kháng thể kháng IL-33 tiêu biểu khác nhau theo sáng chế (H4H9675P và H4H9659P) hoặc kháng thể đối chứng kiểu tương đương được tạo ra, có nồng độ nằm trong khoảng từ 10nM đến 4,6pM, cùng với mẫu đối chứng không có kháng thể. Các dung dịch này được trộn với IL-33 của người có nồng độ ổn định bằng 100pM (nồng độ cuối) (R&D Systems, # 6325-IL/CF) hoặc đối chứng âm tính không có IL-33 trước khi bổ sung vào PBMC. Tất cả các trường hợp này được thử nghiệm hai lần.

Sau khi bổ sung IL-33 của người và kháng thể vào tế bào, các tế bào được ủ ở 37°C trong 20 phút để tạo thuận lợi cho quá trình mất hạt nhỏ của bạch cầu ưa bazơ. Sau đó, quá trình mất hạt nhỏ được dừng bằng cách làm lạnh các đĩa thử nghiệm này trên nước đá trong 5 phút. Để cho phép phân tích quần thể bạch cầu ưa bazơ được sử dụng để đánh giá quá trình mất hạt nhỏ, 20 μ l mỗi kháng thể trong số (theo hướng dẫn của nhà sản xuất) kháng thể kháng HLA-DR-FITC (Beckman Coulter, # IM0463U), kháng thể kháng CD123-APC (BD, # 560087), và kháng thể kháng CD203c-PE (Beckman Coulter, # IM3575) được bổ sung vào mỗi mẫu, và các mẫu được giữ ở 4°C trong 20 phút trong bóng tối. Sau đó, các tế bào được quay ly tâm, được rửa bằng DPBS, và sau đó được tái tạo huyền phù trong 2% formaldehyt (dung dịch đệm cố định) ở 4°C. Ngày tiếp theo, các tế bào đã cố định được phân tích trên thiết bị BD FACSCanto II để xác định mức mất hạt nhỏ của bạch cầu ưa bazơ. Các kết quả được tóm tắt trong các bảng 9 và 10.

Bảng 9: Mức mất hạt nhỏ của bạch cầu ưa bazơ của người do thử với IL-33 của người gây ra tính theo phần trăm

Người	100pM IL-33	Không có IL-33
-------	-------------	----------------

cho				
	Trung bình	SD	Trung bình	SD
655687	68,800	2,263	10,295	0,856
655688	61,600	0,849	9,915	0,969

Bảng 10: Kháng thể kháng IL-33 phong bế quá trình mất hạt nhỏ của bạch cầu ưa bazơ của người do IL-33 của người gây ra

	Người cho 655687	Người cho 655688
Kháng thể	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)
H4H9675P	1,329E-10	9,712E-11
H4H9659P	5,786E-10	4,465E-10
Đối chứng kiểu tương đương	Không phong bế	Không phong bế

Như được thể hiện trong bảng 9, ở nồng độ 100pM, IL-33 của người đã kích thích quá trình mất hạt nhỏ của bạch cầu ưa bazơ ở hai người cho khác nhau với mức mất hạt nhỏ trung bình tính theo phần trăm là 68,8% đối với người cho 655687 và 61,6% đối với người cho 655688.

Như được thể hiện trong bảng 10, một kháng thể kháng IL33, H4H9675P, phong bế quá trình mất hạt nhỏ của bạch cầu ưa bazơ do thử với 100pM IL-33 của người gây ra với trị số IC₅₀ bằng 132,9pM đối với người cho 655687, và trị số IC₅₀ bằng 97,12pM đối với người cho 655688. Kháng thể kháng IL33 khác, H4H9659P, phong bế quá trình mất hạt nhỏ của bạch cầu ưa bazơ do thử với 100pM IL-33 của người với trị số IC₅₀ bằng 578,6pM đối với người cho 655687, và trị số IC₅₀ bằng 446,5pM đối với người cho 655688. Ngược lại, đối chứng kiểu tương đương đã không phong bế quá trình mất hạt nhỏ của bạch cầu ưa bazơ từ người cho bất kỳ trong số các người cho được thử nghiệm.

Ví dụ 8. Ức chế quá trình sản xuất IFN-gamma từ PBMC của người được kích thích bởi IL-33 bằng kháng thể kháng IL-33

Để xác định đặc tính của kháng thể kháng IL-33 theo sáng chế, thử nghiệm trên cơ sở tế bào sơ cấp sử dụng tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được sử dụng. Thử nghiệm sử dụng trong ví dụ này là trên cơ sở các kết quả được công bố bởi Smithgall *et al.* trong tài liệu *International Immunology*, 2008, vol. 20 (8) pp.

1019-1030. Đối với thử nghiệm này, PBMC được tinh chế từ máu toàn phần mới thu được từ ba người cho khác nhau bằng cách quay ly tâm gradien mật độ. Nói tóm lại, máu toàn phần K2 EDTA được pha loãng gấp hai trong RPMI 1640, được phân lớp cẩn thận trên Ficoll-Paque (GE Healthcare, #17-1440-03) và được quay ly tâm trong 20 phút. Lớp giữa các pha chứa PBMC được hút ra, được chuyển sang ống mới, và được rửa hai lần bằng PBS. PBMC đã phân lập được dàn vào đĩa có đáy tròn có 96 lỗ ở nồng độ cuối bằng 5×10^5 tế bào/ml trong RPMI 1640 được bổ sung 10% FBS, L-glutamin 2mM, 100U/ml penixilin, và 100 μ g/ml streptomycin. Sau đó, các tế bào được ủ với 50g/ml IL-12 của người (hIL-12; R&D Systems, #219-IL-025/CF) và một mình dung dịch pha loãng theo dãy của IL-33 của người (hIL-33; R&D Systems, #3625-IL-010/CF) với nồng độ nằm trong khoảng từ 10nM đến 0,64pM, hoặc với 260pM IL-33 kết hợp với dung dịch pha loãng theo dãy của kháng thể có nồng độ nằm trong khoảng từ 100nM đến 6,4pM. Thể tích cuối cùng là 200 μ l mỗi lỗ. Mỗi trường hợp được thử nghiệm ba lần. Khi các kháng thể có mặt, chúng được bổ sung vào các tế bào sau 30 phút ủ sơ bộ với hIL-33.

Các tế bào được ủ qua đêm ở 37°C trong tủ ủ được làm ẩm với 5% CO₂, và sau đó lượng IFN γ trong dịch nổi nuôi cấy được đo bằng ELISA (R&D Systems, #DY285). Đối với ELISA, đĩa đáy tròn có 96 lỗ được phủ kháng thể bắt giữ, theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi rửa và phong bế, 100 μ l dịch nổi nuôi cấy không được pha loãng được bổ sung vào đĩa và ủ trong 2 giờ. Các bước rửa và phát hiện kế tiếp được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

IL-33 của người, khi có mặt hIL-12, đã kích thích quá trình giải phóng IFN γ từ toàn bộ PBMC của người có nguồn gốc từ ba người cho khác nhau được thử nghiệm, với trị số EC₅₀ nằm trong khoảng từ 274pM đến 39pM như được thể hiện trong bảng 11. Mười một kháng thể kháng IL-33 được thử nghiệm bằng cách sử dụng PBMC từ các người cho #603486 và #603487, trong khi đó 3 kháng thể kháng IL-33 được thử nghiệm với PBMC từ người cho #603491. Tất cả 11 kháng thể kháng IL-33 được thử nghiệm trên các người cho #603486 và #603487 đều phong bế quá trình giải phóng IFN γ từ PBMC của người được kích thích bởi 260pM IL-33, với trị số IC₅₀ nằm trong khoảng từ 175pM đến 22nM, như được thể hiện trong bảng 12. Không có kháng thể nào trong số ba kháng thể kháng IL-33 được thử

nghiệm trên người cho #603491 phong bế quá trình giải phóng IFN γ từ PBMC của người được kích thích bởi 260pM hIL-33 và thay vào đó làm tăng mức giải phóng IFN γ với trị số EC₅₀ nằm trong khoảng từ 56,1pM đến 189nM.

Bảng 11: hIL-33 kích thích quá trình giải phóng IFN γ từ PBMC của người thu được từ ba người cho.

[IL-33]	Người cho 603486	Người cho 603487	Người cho 603491
EC ₅₀ (M)	1,101E-10	3,878E-11	2,739E-10

Bảng 12: Kháng thể kháng IL-33 phong bế quá trình giải phóng IFN- γ từ PBMC của người thu được từ người cho #603486 và #603487 được kích thích bởi IL-33

Kháng thể	Người cho #603486 IC ₅₀ (M)	Người cho #603487 IC ₅₀ (M)
H4H9629P	8,154E-10	5,205E-09
H4H9640P	4,419E-09	1,224E-08
H4H9659P	1,252E-09	2,710E-09
H4H9660P	6,669E-10	2,913E-09
H4H9662P	9,640E-10	3,021E-09
H4H9663P	1,236E-08	2,203E-08
H4H9664P	3,984E-09	6,081E-09
H4H9665P	1,044E-08	2,337E-08
H4H9667P	8,066E-09	1,876E-08
H4H9671P	2,968E-09	8,622E-09
H4H9675P	1,754E-10	4,715E-10

Bảng 13: Kháng thể kháng IL-33 phong bế quá trình giải phóng IFN- γ từ PBMC của người thu được từ người cho #603491 được kích thích bởi IL-33.

Kháng thể	Người cho #603491 IC ₅₀ (M)
H1M9559N	Không phong bế
H1M9566N	Không phong bế
H1M9568N	Không phong bế

Sáng chế này không bị giới hạn ở phạm vi các phương án cụ thể được mô tả trong tài liệu này. Thực vậy, các cải biến khác của sáng chế ngoài các phương án

được mô tả trong tài liệu này thì chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết nhờ phần mô tả trên đây và hình vẽ đi kèm. Các cải biến này được cho là thuộc phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 9. Đánh giá sự cạnh tranh chéo để liên kết với IL-33 của người bằng cách sử dụng thử nghiệm giao thoa lớp sinh học

Sự cạnh tranh liên kết giữa một bộ thử nghiệm gồm các kháng thể đơn dòng kháng IL-33 khác nhau được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm giao thoa lớp sinh học không đánh dấu, thời gian thực trên bộ cảm biến sinh học Octet® HTX (ForteBio, A Division of Pall Life Sciences). Thử nghiệm được tiến hành ở 25°C bằng cách sử dụng dung dịch đệm chứa HEPES 0,01M độ pH=7,4, NaCl 0,15M, 0,05% thể tích/thể tích chất hoạt động bề mặt Tween-20, và 0,1mg/ml BSA (dung dịch đệm động học HBS-ET) trong đó đĩa được lắc ở tốc độ 1000 vòng/phút. Để đánh giá xem hai kháng thể có thể cạnh tranh với nhau để liên kết với IL-33 của người hay không, dạng thức thử nghiệm trộn trước được sử dụng trong đó IL-33 của người 100nM (R&D Systems; # 3625-IL-010/CF) được trộn trước với 500nM kháng thể đơn dòng kháng IL-33 khác nhau (sau đây được gọi là mAb-2) trong ít nhất 2 giờ trước khi tiến hành thử nghiệm cạnh tranh liên kết. Bộ cảm biến sinh học Octet được phủ kháng thể đa dòng Fc kháng của chuột (Pall ForteBio Corp., # 18-5088; dưới đây được gọi là AMC) hoặc kháng thể đa dòng Fc kháng của người (Pall ForteBio Corp., # 18-5060; dưới đây được gọi là AHC) đầu tiên được nhúng vào các lỗ chứa 20µg/ml kháng thể đơn dòng kháng IL-33 riêng lẻ trong 3 phút để bắt giữ kháng thể đơn dòng kháng IL-33 được biểu hiện lần lượt với Fc của chuột hoặc với Fc của người (dưới đây được gọi là mAb-1). Sau bước bắt giữ, kháng thể đa dòng Fc kháng của chuột và kháng thể đa dòng Fc kháng của người không bị chiếm chỗ trên bộ cảm biến sinh học Octet được làm bão hoà bằng cách nhúng chúng trong 4 phút vào các lỗ chứa 200µg/ml kháng thể đơn dòng không đặc hiệu lần lượt có Fc của chuột hoặc có Fc của người. Cuối cùng, bộ cảm biến sinh học Octet được ngâm trong 4 phút vào các lỗ chứa các mẫu trộn trước gồm IL-33 của người 100nM và mAb-2 500nM. Cuối mỗi chu kỳ, kháng thể kháng IL-33 bắt giữ không cộng hoá trị cùng với tiền phức hợp đã liên kết của IL-33 của người và mAb-2 được loại khỏi bộ cảm biến sinh học bằng cách ngâm ba lần kế tiếp mỗi lần 20 giây vào HCl

10mM sau đó nhúng vào dung dịch đệm động học HBS-ET. Rửa bộ cảm biến trong dung dịch đệm động học HBS-ET giữa mỗi bước của thử nghiệm. Đáp ứng liên kết thời gian thực được theo dõi trong các trường hợp liên kết, và đáp ứng liên kết (tính bằng đơn vị nM) ở cuối mỗi bước được ghi lại. Trong thời gian phân tích, tín hiệu nền tự liên kết của mAb-2 nhất định (trong đó mAb-1 = mAb-2, tức là, dọc theo đường chéo của ma trận) được trừ đi trên mức tín hiệu quan sát được của tất cả các trường hợp liên kết với mAb-2 (ngang qua cột trong ma trận cạnh tranh chéo), và các kết quả đã hiệu chỉnh tín hiệu nền được thể hiện trong Fig.1. Đáp ứng của mAb-1 liên kết với tiền phức hợp của IL-33 của người và mỗi mẫu trong số các mẫu mAb-2 khác nhau được đo để xác định đặc tính cạnh tranh/không cạnh tranh của các kháng thể đơn dòng kháng IL-33 khác nhau đối với nhau.

Như được thể hiện trong Fig.1 các ô màu xám nhạt với phông chữ màu đen thể hiện đáp ứng liên kết đối với trường hợp tự cạnh tranh. Các kháng thể cạnh tranh với nhau theo cả hai hướng, không phụ thuộc vào thứ tự liên kết, được thể hiện bằng ô màu đen và phông chữ màu trắng. Các ô màu xám đậm với phông chữ màu đen thể hiện kháng thể đơn dòng kháng IL-33 mà liên kết yếu với IL-33 của người, dẫn đến hiện tượng cạnh tranh chéo một chiều đã quan sát được. Các mẫu đối chứng kiểu tương đương được sử dụng trong thử nghiệm này được thể hiện bằng ô màu xám đậm với phông chữ màu trắng. Các ô màu trắng với phông chữ màu đen thể hiện là không có sự cạnh tranh giữa các kháng thể, điều này cho thấy mỗi kháng thể có epitop liên kết riêng.

Ví dụ 10. Đánh giá sự cạnh tranh chéo để liên kết với IL-33 của khí bằng thử nghiệm giao thoa lớp sinh học

Cạnh tranh liên kết giữa một bộ thử nghiệm gồm các kháng thể đơn dòng kháng IL-33 khác nhau được xác định bằng thử nghiệm giao thoa lớp sinh học không đánh dấu, thời gian thực trên bộ cảm biến sinh học Octet® HTX (ForteBio, A Division of Pall Life Sciences). Thử nghiệm được tiến hành ở 25°C bằng cách sử dụng dung dịch đệm chứa HEPES 0,01M pH=7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, 0,05% thể tích/thể tích chất hoạt động bề mặt Tween-20, và 0,1mg/ml BSA (dung dịch đệm động học HBS-ET) trong đó đĩa được lắc ở tốc độ 1000 vòng/phút. Để đánh giá liệu hai kháng thể có thể cạnh tranh với nhau để liên kết với IL-33 tái tổ

hợp của khi được biểu hiện với thể hexahistidin có đầu cuối C (MfIL-33-6His; SEQ ID: xx) hay không, đầu tiên gắn 0,15nm đơn vị liên kết của MfIL-33-6His được bắt giữ trên bộ cảm biến sinh học Octet được phủ kháng thể kháng năm His (Fortebio Inc, # 18-5079) bằng cách ngâm bộ cảm biến sinh học trong 85 giây vào các lỗ chứa 2µg/ml MfIL-33-6His. Sau đó, bộ cảm biến sinh học bắt giữ kháng nguyên được làm bão hòa bằng kháng thể đơn dòng kháng IL-33 thứ nhất (dưới đây được gọi là mAb-1) bằng cách nhúng vào lỗ chứa dung dịch 50µg/ml mAb-1 trong 5 phút. Sau đó, bộ cảm biến sinh học được nhúng vào lỗ chứa dung dịch 50µg/ml kháng thể đơn dòng kháng IL-33 thứ hai (dưới đây được gọi là mAb-2) trong 4 phút. Bộ cảm biến sinh học được rửa trong dung dịch đệm học HBS-ET giữa mỗi bước thử nghiệm. Đáp ứng liên kết thời gian thực được theo dõi trong suốt thử nghiệm, và đáp ứng liên kết tối đa ở mỗi bước liên kết được ghi lại. Đáp ứng của mAb-2 liên kết với MfIL-33-6His được tạo phức trước với mAb-1 được đánh giá, và đặc tính cạnh tranh/không cạnh tranh của các kháng thể đơn dòng kháng IL-33 khác nhau đối với nhau được xác định.

Như được thể hiện trong Fig.2, ô xám nhạt với phông chữ màu đen (theo đường chéo) thể hiện sự tự cạnh tranh (trong đó mAb-1=mAb-2). Các kháng thể cạnh tranh theo cả hai hướng, không phụ thuộc vào thứ tự liên kết, được thể hiện bằng các ô màu đen và phông chữ màu trắng. Ô màu trắng với phông chữ màu đen thể hiện là không có sự cạnh tranh giữa các kháng thể, điều này cho thấy rằng mỗi kháng thể có epitop liên kết riêng. Ô màu xám đậm với phông chữ màu trắng thể hiện mẫu đối chứng kiểu tương đương được sử dụng trong thử nghiệm.

Ví dụ 11. Thử nghiệm mAb ở mô hình *in vivo*; mô hình viêm phổi cấp tính do HDM gây ra để nghiên cứu vai trò của IL-33 ở bệnh viêm phổi

Để xác định tác dụng của kháng thể kháng IL-33, H4H9675P, ở mô hình *in vivo* thích hợp, nghiên cứu bệnh viêm phổi cấp tính do HDM gây ra được tiến hành ở chuột mà có tính đồng hợp tử đối với quá trình biểu hiện IL-33 của người thay vì IL-33 của chuột (chuột IL-33 HumIn).

Chuột IL-33 HumIn được cho dùng qua đường vào trong mũi 50µg chất chiết mật bụi nhà (HDM; Greer, #XPB70D3A2.5) được pha loãng trong 20µl dung dịch nước muối được đệm phosphat 1X (PBS) (n=17) hoặc 20µl dung dịch PBS 1X

(n=3) trong 5 ngày mỗi tuần trong hai tuần. Một phân nhóm chuột đã thử HDM được tiêm dưới da 25mg/kg kháng thể kháng IL-33, H4H9675, (n=6) hoặc kháng thể đối chứng kiểu tương đương (n=6) bắt đầu ở thời điểm ba ngày trước khi dùng HDM đầu tiên và sau đó sử dụng hai lần một tuần cho đến khi kết thúc thử HDM. Vào ngày thứ 15 sau khi sử dụng HDM qua đường trong mũi đầu tiên, tất cả các con chuột được làm chết và phổi của chúng được thu hoạch. Quy trình điều trị và dùng liều thử nghiệm ở các nhóm chuột được thể hiện trong bảng 14.

Bảng 14: Quy trình điều trị và dùng liều thử nghiệm ở các nhóm chuột

Nhóm	Chuột	Thử trong mũi	Thời gian thử trong mũi	Kháng thể
1	Chuột IL-33 HumIn	PBS 1X	2 tuần	Không có
2	Chuột IL-33 HumIn	50µg HDM trong 20µl PBS 1X	2 tuần	Không có
3	Chuột IL-33 HumIn	50µg HDM trong 20µl PBS 1X	2 tuần	Đối chứng kiểu tương đương
4	Chuột IL-33 HumIn	50µg HDM trong 20µl PBS 1X	2 tuần	Kháng thể kháng IL-33 (H4H9675)

Thu hoạch phổi để phân tích lượng cytokin:

Sau khi kiệt máu, thùy trước và thùy giữa của phổi phải từ mỗi con chuột được lấy ra và được đặt vào trong các ống chứa dung dịch chất chiết protein mô (chất T-PER 1X; Pierce, #78510) được bổ sung dung dịch hỗn hợp chất ức chế proteaza Halt 1X (Pierce, #78430). Tất cả các bước tiếp theo được tiến hành trên nước đá. Thể tích của chất T-PER (chứa dung dịch hỗn hợp chất ức chế proteaza) được điều chỉnh cho mỗi mẫu để khớp với tỷ lệ mô so với T-PER là 1:8 (trọng lượng/thể tích). Các mẫu phổi được làm đồng đều thủ công trong các ống, bằng cách sử dụng chày dùng một lần (Kimble Chase, # 749625-0010). Sản phẩm phân giải thu được được quay ly tâm để kết viên mảnh vỡ. Dịch nổi chứa dịch chiết protein hoà tan được chuyển sang các ống mới và được bảo quản ở 4°C cho đến lần

phân tích tiếp theo.

Tổng lượng protein trong dịch chiết protein phổi được đo bằng thử nghiệm Bradford. Đối với thử nghiệm này, 10 μ l các mẫu dịch chiết đã pha loãng được dàn vào đĩa có 96 lỗ làm hai lần và được trộn với 200 μ l chất phản ứng Dye 1X (Biorad, #500-0006). Các dung dịch pha loãng theo dãy của albumin huyết thanh bò (Sigma, #A7979), bắt đầu ở nồng độ 700 μ g/ml trong chất phản ứng T-Per 1X được sử dụng làm chuẩn để xác định nồng độ protein chính xác trong các dịch chiết. Sau khi ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng, phổ hấp thụ ở bước sóng 595nm được đo trên máy đọc đĩa Molecular Devices SpectraMax M5. Việc phân tích dữ liệu để xác định tổng lượng protein được tiến hành bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism™.

Nồng độ xytokin trong các dịch chiết protein phổi được đo bằng cách sử dụng kit thử nghiệm miễn dịch đa thành phần Proinflammatory Panel 1 (chuột) (MesoScale Discovery, # K15048D-2), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nói tóm lại, 50 μ l/lỗ chất chuẩn hóa và mẫu (được pha loãng trong chất pha loãng 41) được bổ sung vào đĩa đã phủ trước kháng thể bắt giữ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong khi vẫn lắc ở tốc độ 700 vòng/phút trong 2 giờ. Sau đó, các đĩa này được rửa ba lần bằng dung dịch PBS 1X chứa 0,05% (trọng lượng/thể tích) Tween-20, sau đó bổ sung 25 μ l dung dịch phát hiện kháng thể được pha loãng trong dung dịch pha loãng 45. Sau khi ủ thêm 2 giờ nữa ở nhiệt độ trong phòng trong khi vẫn lắc, đĩa được rửa ba lần, và 150 μ l dung dịch đệm đọc 2X được bổ sung vào mỗi lỗ. Mức điện phát quang hóa học được đọc ngay trên thiết bị MSD Spector®. Việc phân tích dữ liệu được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism™.

Mỗi nồng độ xytokin trong các dịch chiết chứa tổng lượng protein phổi từ tất cả các con chuột trong mỗi nhóm được chuẩn hoá theo tổng lượng protein của các dịch chiết được đo bằng thử nghiệm Bradford và được thể hiện dưới dạng lượng pg xytokin trung bình trong mỗi mg tổng lượng protein phổi (pg/mg protein phổi, $\pm$ SD) đối với mỗi nhóm như được thể hiện trong bảng 15.

Thu hoạch phổi để phân tích lượng xytokin:

Lượng xytokin IL-4 và IL-5 được giải phóng ở phổi của chuột IL-33 HumIn tiếp nhận HDM trong hai tuần là cao hơn đáng kể so với ở chuột IL-33 HumIn được

thử dung dịch đệm nước muối. Ngược lại, có xu hướng lượng IL-4 và IL-5 giảm ở phổi của chuột IL-33 HumIn được điều trị bằng kháng thể kháng IL-33 trong thời gian thử HDM cấp tính so với chuột IL-33 HumIn được sử dụng HDM mà không được điều trị hoặc được điều trị bằng đối chứng kiểu tương đương.

Bảng 15: Nồng độ xytokin trong các dịch chiết protein phổi

Nhóm thử nghiệm	Lượng [IL-4] trung bình trong các dịch chiết protein phổi (pg/mg protein phổi) ($\pm$ SD)	Lượng [IL-5] trung bình trong các dịch chiết protein phổi (pg/mg protein phổi) ($\pm$ SD)
1, Thử PBS 1X (n=3)	0,01 ($\pm$ 0,01)	0,03 ($\pm$ 0,01)
2, Thử HDM (n=5)	1,77 ($\pm$ 1,63) *	4,72 ($\pm$ 4,14) **
3, Thử HDM + kháng thể tham chiếu kiểu tương đương (n=6)	0,79 ($\pm$ 0,52) *	2,03 ($\pm$ 1,05) *
4, Thử HDM + H4H9675P (n=6)	0,30 ($\pm$ 0,18)	0,81 ($\pm$ 0,67)

Ghi chú: Mức ý nghĩa thống kê được xác định bởi ANOVA một chiều Kruskal-Wallis với kiểm nghiệm hậu định đa so sánh của Dunn được chỉ rõ (*= $p<0,05$, **= $p<0,01$, so với nhóm 1: chuột IL33 HumIn, thử dung dịch nước muối).

Thu hoạch phổi để phân tích lượng tế bào thâm nhiễm trong phổi

Sau khi kiệt máu, thùy sau của phổi phải từ mỗi con chuột được lấy ra, được cắt thành lát có kích thước xấp xỉ từ 2 đến 3mm, và sau đó đặt vào ống chứa dung dịch 20 μ g/ml ADNza (Roche, #10104159001) và 0,7U/ml Liberase TH (Roche, #05401151001) được pha loãng trong dung dịch muối được làm cân bằng của Hank (HBSS) (Gibco, #14025), mà được ủ trong bể nước ở 37°C trong 20 phút và trộn xoáy mỗi 5 phút. Phản ứng được dừng bằng cách bổ sung axit etylenđiamintetraaxetic (Gibco, #15575) ở nồng độ cuối bằng 10mM. Mỗi lát phổi được phân ly sau đó bằng cách sử dụng thiết bị phân ly gentleMACS dissociator® (Miltenyi Biotec, #130-095-937), sau đó lọc qua màng lọc có kích thước lỗ màng bằng 70 μ m và quay ly tâm. Viên kết phổi thu được được tái tạo huyền phù trong

1ml dung dịch đệm phân giải tế bào hồng cầu 1X (Sigma, #R7757) để loại bỏ tế bào hồng cầu. Sau khi ủ trong 3 phút ở nhiệt độ trong phòng, 3ml DMEM 1X được bổ sung để khử kích hoạt dung dịch đệm phân giải tế bào hồng cầu. Sau đó, huyền phù tế bào được quay ly tâm, và các viên kết tế bào thu được được tái tạo huyền phù trong 5ml dung dịch đệm MACS (dung dịch đệm chạy MACS tự động; Miltenyi Biotec, #130-091-221). Các mẫu đã tái tạo huyền phù được lọc qua màng lọc có kích thước lỗ lọc bằng 70µm và 1×10^6 tế bào mỗi lỗ được dàn vào đĩa có đáy hình chữ V có 96 lỗ. Sau đó, các tế bào được quay ly tâm và viên kết được rửa trong dung dịch PBS 1X. Sau khi quay ly tâm lần thứ hai, viên kết tế bào được tái tạo huyền phù trong 100µl dung dịch nhuộm tế bào chết chứa nước cố định được LIVE/DEAD® (Life Technologies, #L34957) được pha loãng trong dung dịch PBS 1X theo tỷ lệ 1:1000 để xác định khả năng sống sót của tế bào và ủ trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng đồng thời tránh ánh sáng. Sau khi rửa một lần trong dung dịch PBS 1X, các tế bào được ủ trong dung dịch đệm MACS chứa 10µg/ml dung dịch phong bế CD16/CD32 Fc của chuột cống kháng chuột nhất đã tinh chế, (Dòng: 2.4G2; BD Biosciences, #553142) trong 10 phút ở 4°C. Các tế bào được rửa một lần và sau đó được ủ trong dung dịch hỗn hợp kháng thể thích hợp (được mô tả trong bảng 16) được pha loãng trong dung dịch đệm MACS trong 30 phút ở 4°C đồng thời tránh ánh sáng. Sau khi ủ với kháng thể, các tế bào được rửa hai lần trong dung dịch đệm MACS, tái tạo huyền phù trong dung dịch cố định tế bào BD (BD Biosciences, #554655) và sau đó ủ trong 15 phút ở 4°C đồng thời tránh ánh sáng. Sau đó các tế bào được rửa, tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm MACS, và sau đó chuyển sang ống BD FACS (BD Biosciences, #352235) để phân tích bạch cầu ưa eosin, tế bào bạch huyết bẩm sinh typ 2 (ILC2) và các tế bào lympho bằng kỹ thuật đếm tế bào theo dòng chảy.

Các tế bào T CD4 đã hoạt hoá được xác định là các tế bào sống, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁺, CD19⁻, CD4⁺, CD8⁻, và CD69⁺. Tế bào B đã hoạt hoá được xác định là các tế bào sống, CD45⁺, SSC^{Lo}, FSC^{Lo}, CD3⁻, CD19⁺, và CD69⁺. Bạch cầu ưa eosin được xác định là sống, CD45⁺, GR1⁻, CD11c^{lo}, SiglecF^{hi}. Tế bào ILC2 được xác định là sống, CD45⁺, chuỗi thể hệ tế bào-(chuỗi thể hệ tế bào: CD19, CD3, CD11b, CD11c, F4/80), CD127⁺, Sca-1⁺, ST2⁺. Dữ liệu của các tế bào CD4

đã hoạt hoá, được biểu hiện dưới dạng tần suất tế bào đã hoạt hoá (CD69⁺) trong quần thể cha mẹ (CD4, $\pm$ SD), được thể hiện trong bảng 17.

Bảng 16: Các kháng thể được sử dụng trong phân tích đếm tế bào theo dòng chảy

Kháng thể	Chất phát huỳnh quang	Nhà sản xuất	Số trong danh mục	Tỷ lệ pha loãng cuối cùng
CD11c	APC	BD Biosciences	550261	1/100
CD45	PerCP Cy5.5	eBiosciences	45-0454-82	1/800
F4/80	Pacific Blue	eBiosciences	48-4801-82	1/200
Siglec-F	PE	BD Biosciences	552126	1/100
Ly6G (Gr-1)	APC-eFluor780	eBiosciences	47-5931-82	1/200
CD3	PE-Cy7	BD Biosciences	552774	1/200
CD19	eFluor 450	eBiosciences	48-0193-82	1/200
CD4	APC-H7	BD Biosciences	560181	1/200
CD8	APC	eBiosciences	17-0081-82	1/200
CD69	PE	eBiosciences	12-0691-82	1/200
CD3	eFluor 450	eBiosciences	48-0031-82	1/200
CD11b	eFluor450	eBiosciences	40-0112-82	1/100
CD11c	eFluor450	eBiosciences	48-0114-82	1/100
CD127	APC-eFluor780	eBiosciences	47-1271-82	1/200
Sca-1	FITC	BD Biosciences	557405	1/200
ST2	APC	Biolegend	145306	1/200

Phân tích lượng tế bào thâm nhiễm trong phổi:

Như được thể hiện trong bảng 17, tần suất của các tế bào T CD4⁺ đã hoạt hoá, bạch cầu ưa eosin, và ILC2 trong phổi của chuột IL-33 HumIn tiếp nhận HDM trong 2 tuần là cao hơn đáng kể so với ở chuột IL-33 HumIn được thử dung dịch đối chứng PBS 1X. Ngược lại, quan sát thấy xu hướng giảm tần suất các tế bào thâm

nhiễm này ở chuột IL-33 HumIn khi được điều trị bằng kháng thể kháng IL-33 trong suốt thời gian thử HDM cấp tính so với chuột IL-33 HumIn được sử dụng HDM mà không được điều trị hoặc được điều trị bằng đối chứng kiểu tương đương.

Quan sát thấy xu hướng tăng tần suất các tế bào B đã hoạt hoá ở phổi của chuột IL33 HumIn được thử HDM trong 2 tuần so với ở chuột IL33 Humin được thử dung dịch đối chứng PBS 1X. Sau khi điều trị bằng kháng thể kháng IL-33, quan sát thấy có sự giảm đáng kể tần suất các tế bào B đã hoạt hoá ở phổi của chuột IL33 HumIn được thử HDM, so với chuột IL-33 HumIn được sử dụng HDM mà không được điều trị hoặc được điều trị bằng đối chứng kiểu tương đương.

Bảng 17: Tần suất của tế bào thâm nhiễm ở phổi như được xác định bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy

Nhóm thử nghiệm	Tần suất trung bình của các tế bào CD4 ⁺ T đã hoạt hoá trong quần thể CD4 ⁺ ($\pm$ SD)	Tần suất trung bình của các tế bào B đã hoạt hoá trong quần thể tế bào B ($\pm$ SD)	Tần suất trung bình của bạch cầu ưa eosin trong quần thể CD45 ⁺ ($\pm$ SD)	Tần suất trung bình của ILC2 trong quần thể tế bào bạch huyết ($\pm$ SD)
1. Thử với dung dịch PBS 1X (n=3)	6,17 ($\pm$ 0,59)	6,85 ($\pm$ 3,09)	2,55 ($\pm$ 0,79)	0,33 ($\pm$ 0,05)
2. Thử với HDM (n=5)	29,52 ($\pm$ 8,57) *	10,13 ($\pm$ 3,30)	17,28 ($\pm$ 3,97) *	1,15 ($\pm$ 0,37) *
3. Thử với HDM + kháng thể tham chiếu kiểu tương đương (n=6)	29,68 ($\pm$ 9,84) *	11,01 ($\pm$ 2,31)	19,19 ($\pm$ 11,55)*	1,57 ($\pm$ 0,78) *
4. thử HDM + H4H9675P (n=6)	16,38 ($\pm$ 3,30)	4,88 ($\pm$ 1,70) [†]	10,32 ($\pm$ 4,63)	0,53 ($\pm$ 0,12)

Ghi chú: Mức ý nghĩa thống kê được xác định bằng ANOVA một chiều Kruskal-Wallis với kiểm nghiệm hậu định đa so sánh của Dunn được chỉ rõ (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, so với nhóm 1: chuột IL33 HumIn, thử dung dịch nước muối;

[†]p<0,05, so với nhóm 3: chuột IL33 Humin, thử HDM 2 tuần + kháng thể tham chiếu kiểu tương đương).

Ví dụ 12: thử nghiệm mAb ở mẫu in vivo; mẫu viêm phổi nặng và xơ hoá mạn tính do HDM gây ra để nghiên cứu vai trò của IL-33 ở bệnh viêm phổi

Để xác định tác dụng của kháng thể kháng IL-33, H4H9675P, ở mô hình *in vivo* thích hợp, nghiên cứu bệnh viêm phổi nặng và xơ hoá mạn tính do HDM gây ra được tiến hành ở chuột mà có tính đồng hợp tử đối với quá trình biểu hiện IL-33 của người thay vì IL-33 của chuột (chuột IL-33 HumIn).

Chuột IL-33 HumIn được sử dụng qua đường vào trong mũi 50µg chất chiết mật bụi nhà (HDM; Greer, #XPB70D3A2.5) được pha loãng trong 20µl dung dịch nước muối đệm phosphat 1X (PBS) hoặc 20µl dung dịch PBS 1X trong 5 ngày mỗi tuần trong 12 tuần. Nhóm đối chứng thứ hai gồm các con chuột IL33 HumIn được cho dùng 50µg chất chiết HDM được pha loãng trong 20µl dung dịch PBS 1X trong 5 ngày mỗi tuần trong 4 tuần, để đánh giá mức độ nghiêm trọng của bệnh lúc bắt đầu điều trị bằng kháng thể. Hai nhóm chuột đã thử HDM được tiêm dưới da 25mg/kg kháng thể kháng IL-33, H4H9675P, hoặc kháng thể tham chiếu kiểu tương đương sau 4 tuần thử HDM và sau đó hai lần mỗi tuần cho đến khi kết thúc thử HDM (8 tuần điều trị bằng kháng thể). Vào ngày 85 của nghiên cứu, tất cả các con chuột được làm chết và phổi của chúng được thu hoạch. Chế độ điều trị và dùng liều thử nghiệm của các nhóm chuột được thể hiện trong bảng 18.

Bảng 18: Chế độ điều trị và dùng liều thử nghiệm của các nhóm chuột

Nhóm	Chuột	Thử trong mũi	Thời gian thử trong mũi	Kháng thể
1	Chuột IL-33 HumIn	Dung dịch PBS 1X	12 tuần	Không có
2	Chuột IL-33 HumIn	50µg HDM trong 20µl dung dịch PBS 1X	4 tuần	Không có
3	Chuột IL-33 HumIn	50µg HDM trong 20µl dung dịch	12 tuần	Không có

		PBS 1X		
4	Chuột IL-33 HumIn	50µg HDM trong 20µl dung dịch PBS 1X	12 tuần	Kháng thể tham chiếu kiểu tương đương
5	Chuột IL-33 HumIn	50µg HDM trong 20µl dung dịch PBS 1X	12 tuần	Kháng thể kháng IL-33 (H4H9675P)

Thu hoạch phổi để phân tích lượng xytokin:

Sau khi kiệt máu, thùy trước và thùy giữa của phổi phải từ mỗi con chuột được lấy ra và được đặt vào ống chứa dung dịch chất chiết protein mô (chất T-PER 1X; Pierce, #78510) được bổ sung dung dịch hỗn hợp chất ức chế proteaza Halt 1X (Pierce, #78430). Tất cả các bước khác được tiến hành trên nước đá. Thê tích của chất T-PER (chứa dung dịch hỗn hợp chất ức chế proteaza) được điều chỉnh cho mỗi mẫu để khớp với tỷ lệ mô so với T-PER là 1:8 (trọng lượng/thể tích). Các mẫu phổi được làm đồng đều thủ công trong các ống, bằng cách sử dụng chày dùng một lần (Kimble Chase, # 749625-0010). Sản phẩm phân giải thu được được quay ly tâm để kết viên mảnh tế bào. Dịch nổi chứa dịch chiết protein hoà tan được chuyển sang các ống mới và được bảo quản ở 4°C cho đến lần phân tích tiếp theo.

Tổng lượng protein trong dịch chiết protein phổi được đo bằng thử nghiệm Bradford. Đối với thử nghiệm này, 10µl các mẫu dịch chiết đã pha loãng được dàn vào các đĩa có 96 lỗ làm hai lần và được trộn với 200µl chất Dye 1X (Biorad, #500-0006). Các dung dịch pha loãng theo dãy của albumin huyết thanh bò (BSA; Sigma, #A7979), bắt đầu ở nồng độ 700µg/ml trong chất T-Per 1X được sử dụng làm chuẩn để xác định nồng độ protein trong các dịch chiết. Sau khi ủ trong 5 phút ở nhiệt độ trong phòng, đo mức hấp thụ ở bước sóng 595nm trên máy đọc đĩa Molecular Devices SpectraMax M5. Phân tích dữ liệu để xác định tổng lượng protein trong dịch chiết phổi dựa vào chuẩn BSA được tiến hành bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism™.

Nồng độ xytokin trong các dịch chiết protein phổi được đo bằng cách sử dụng kit thử nghiệm miễn dịch đa thành phần Proinflammatory Panel 1 (chuột) (MesoScale Discovery, # K15048D-2), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nói tóm lại, 50µl/lỗ chất chuẩn hóa và mẫu (được pha loãng trong chất pha loãng 41) được bổ sung vào đĩa đã phủ trước kháng thể bắt giữ và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong khi vẫn lắc ở tốc độ 700 vòng/phút trong 2 giờ. Sau đó, các đĩa được rửa ba lần bằng dung dịch PBS 1X chứa 0,05% (trọng lượng/thể tích) Tween-20, sau đó bổ sung 25µl dung dịch phát hiện kháng thể đã pha loãng trong chất pha loãng 45. Sau khi ủ thêm 2 giờ nữa ở nhiệt độ trong phòng trong khi vẫn lắc, đĩa được rửa ba lần, và 150µl dung dịch đệm đọc 2X được bổ sung vào mỗi lỗ. Mức điện phát quang hóa học được đọc ngay trên thiết bị MSD Spector[®]. Phân tích dữ liệu được tiến hành bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad Prism.

Mỗi nồng độ xytokin trong các dịch chiết chứa tổng lượng protein phổi thu được từ tất cả các con chuột trong mỗi nhóm được chuẩn hoá theo tổng lượng protein của dịch chiết được đo bằng thử nghiệm Bradford, và được biểu diễn ở dạng pg xytokin trung bình trong mỗi mg tổng lượng protein phổi (pg/mg protein phổi, $\pm$ SD) đối với mỗi nhóm như được thể hiện trong bảng 19.

Bảng 19: Nồng độ xytokin trong các dịch chiết protein phổi

Nhóm thử nghiệm	[IL-4] trung bình trong dịch chiết protein phổi (pg/mg protein phổi) ($\pm$ SD)	[IL-5] trung bình trong các dịch chiết protein phổi (pg/mg protein phổi) ($\pm$ SD)
1. Thử bằng dung dịch PBS 1X, 12 tuần (n=5)	0,03 ($\pm$ 0,01)	0,08 ($\pm$ 0,05)
2. Thử bằng HDM, 4 tuần (n=6)	2,84 ($\pm$ 2,22) *	4,44 ($\pm$ 4,00) **
3. Thử bằng HDM, 12 tuần (n=3)	7,31 ($\pm$ 3,94) **	6,23 ($\pm$ 3,81) *
4. Thử bằng HDM, 12 tuần + kháng thể tham chiếu kiểu tương đương	2,28 ($\pm$ 1,94)	3,39 ($\pm$ 3,29)

(n=2)		
5. Thử bằng HDM, 12 tuần + H4H9675P (n=5)	0,38 ($\pm 0,21$)	0,48 ($\pm 0,17$)

Ghi chú: Mức ý nghĩa thống kê được xác định bằng ANOVA một chiều Kruskal-Wallis với kiểm nghiệm hậu định đa so sánh của Dunn được chỉ rõ (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, so với nhóm 1: chuột IL33 HumIn, thử bằng dung dịch nước muối).

Phân tích lượng xytokin trong phổi:

Lượng xytokin IL-4 và IL-5 được giải phóng trong phổi của chuột IL-33 HumIn tiếp nhận HDM trong 4 và 12 tuần là cao hơn đáng kể so với chuột IL-33 HumIn được thử dung dịch PBS 1X. Ngược lại, có xu hướng giảm lượng IL-4 và IL-5 trong phổi của chuột IL-33 được điều trị bằng kháng thể kháng IL-33 trong suốt thời gian thử HDM kinh niên so với chuột IL-33 HumIn được cho dùng HDM mà không điều trị hoặc điều trị bằng kháng thể tham chiếu kiểu tương đương.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng được phân lập của người hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng mà liên kết đặc hiệu với intolokin-33 của người (IL-33), trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên chứa: (a) vùng quyết định tính bổ trợ (complementarity determining region-CDR) của vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable region-HCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 50, 82, 98, 130, 178, và 274; và (b) CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (light chain variable region-LCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 58, 90, 106, 138, 186, và 282.
2. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên chứa các CDR chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có cặp trình tự axit amin của HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 50/58, 82/90, 98/106, 130/138, 178/186, và 274/282.
3. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên chứa các miền HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, lần lượt được chọn từ nhóm bao gồm: các SEQ ID NO: 52-54-56-60-62-64; 84-86-88-92-94-96; 100-102-104-108-110-112; 132-134-136-140-142-144; 180-182-184-188-190-192; và 276-278-280-284-286-288.
4. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 1, và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.
5. Kháng thể đơn dòng được phân lập của người hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng mà liên kết đặc hiệu với intolokin-33 của người (IL-33), trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên chứa: (a) vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable region - HCVR) chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 50, 82, 98, 130, 178, và 274; và (b) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (light chain variable region - LCVR) chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 58, 90, 106, 138, 186, và 282.
6. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 5, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên chứa cặp trình tự axit amin

HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm: các SEQ ID NO: 50/58, 82/90, 98/106, 130/138, 178/186, và 274/282.

7. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 6, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR có các SEQ ID NO: 50/58.

8. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 6, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR có các SEQ ID NO: 82/90.

9. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 6, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR có các SEQ ID NO: 98/106.

10. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 6, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR có các SEQ ID NO: 130/138.

11. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 6, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR có các SEQ ID NO: 178/186.

12. Kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 6, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR có các SEQ ID NO: 274/282.

13. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 7, và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.

14. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 8, và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.

15. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 9, và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.

16. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 10, và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.

17. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 11, và chất mang hoặc chất pha loãng được dụng.

18. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 12, và chất mang hoặc chất pha loãng được dụng.

19. Kháng thể đơn dòng được phân lập của người hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng mà liên kết đặc hiệu với intolokin-33 của người (IL-33), trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable region - HCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 50, 82, 98, 130, 178, và 274.

20. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 19, và chất mang hoặc chất pha loãng được dụng.

21. Kháng thể đơn dòng được phân lập của người hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng mà liên kết đặc hiệu với intolokin-33 của người (IL-33), trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên chứa các miền HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 lần lượt chứa trình tự axit amin có SEQ ID NO: 276-278-280-284-286-288.

22. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo điểm 21, và chất mang hoặc chất pha loãng được dụng.

mAb		mAb-1 liên kết với tiền phức hợp của mAb và hIL-33																					
mAb	mAb tổng cộng	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
H4H562P	1.88 ± 0.11	0.00	0.03	0.02	0.01	0.03	0.01	0.00	0.02	0.04	0.02	0.00	0.03	0.09	0.05	0.03	0.10	-0.10	1.45	1.00	0.1	0.12	0.14
H4H563P	1.75 ± 0.04	0.02	0.06	0.01	-0.01	0.00	-0.03	-0.01	0.00	0.02	-0.01	-0.01	0.00	0.07	0.02	0.03	0.07	-0.10	1.32	0.69	0.36	0.21	0.15
H4H564P	1.44 ± 0.03	-0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	-0.02	0.01	0.03	0.01	-0.01	-0.01	0.10	0.05	0.02	0.09	-0.11	1.20	0.70	0.1	0.16	0.10
H4H565P	1.4 ± 0.03	-0.02	-0.01	0.01	0.00	0.01	-0.01	0.00	0.00	0.03	0.00	-0.01	0.00	0.10	0.04	0.03	0.09	-0.09	1.00	0.59	0.2	0.17	0.09
H4H566P	1.96 ± 0.13	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	-0.02	0.02	0.04	0.02	0.03	0.08	0.09	0.05	0.03	0.10	-0.08	1.06	0.71	0.3	0.21	0.15
H4H567P	1.51 ± 0.05	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.03	0.01	0.01	0.04	0.07	0.04	0.03	0.10	-0.08	1.12	0.89	0.3	0.19	0.17
H4H568P	1.51 ± 0.04	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	-0.01	0.00	0.02	0.01	-0.01	0.04	0.07	0.03	0.02	0.10	-0.09	1.09	0.85	0.3	0.17	0.09
H4H569P	1.85 ± 0.04	-0.02	-0.01	-0.02	0.00	0.01	-0.01	-0.01	0.00	0.02	0.00	-0.01	0.01	0.05	0.03	0.03	0.08	-0.09	0.97	0.38	0.16	0.16	0.10
H4H570P	1.88 ± 0.03	-0.02	0.01	-0.01	-0.01	0.02	-0.02	-0.01	-0.01	0.09	0.00	-0.01	0.00	0.07	0.03	0.01	0.05	-0.09	1.28	0.80	0.24	0.14	0.09
H4H571P	1.53 ± 0.03	-0.05	-0.02	-0.02	-0.03	0.01	-0.02	-0.03	-0.02	0.00	0.00	-0.02	-0.03	-0.06	0.02	0.00	0.05	-0.09	1.17	0.99	0.1	0.15	0.08
H4H572P	1.47 ± 0.1	-0.01	0.01	0.02	-0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.04	0.01	0.00	0.01	0.05	0.03	0.02	0.08	-0.10	1.09	0.57	0.16	0.13	0.12
H4H573P	1.48 ± 0.05	-0.02	0.01	0.00	0.00	-0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.00	0.00	0.04	0.01	0.00	0.05	-0.09	1.13	0.64	0.2	0.19	0.12
H4H574P	1.82 ± 0.04	-0.03	0.00	0.00	0.01	0.00	-0.01	-0.01	-0.03	-0.02	-0.02	-0.01	0.00	0.00	-0.01	0.01	0.02	-0.08	1.17	0.95	0.17	0.13	0.07
H4H575P	1.67 ± 0.04	-0.03	-0.02	-0.01	-0.02	-0.02	-0.01	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	0.01	0.03	0.01	0.00	0.01	0.05	-0.08	1.11	0.86	0.2	0.18	0.08
H4H576P	1.84 ± 0.14	-0.01	0.01	-0.01	-0.02	-0.03	-0.02	-0.05	-0.03	-0.03	0.04	0.01	0.02	0.02	0.00	0.00	0.01	-0.07	1.11	0.99	0.1	0.13	0.11
H4H577P	1.75 ± 0.07	-0.03	-0.01	-0.03	-0.03	0.05	0.05	-0.05	-0.05	-0.07	-0.05	0.01	-0.02	-0.05	-0.04	-0.03	0.00	-0.08	1.87	0.74	0.1	0.11	0.10
H4H578P	0.34 ± 0.14	-0.15	-0.16	-0.05	-0.09	-0.15	-0.11	-0.14	-0.13	0.19	-0.15	-0.05	-0.09	-0.15	-0.15	-0.15	-0.15	-0.15	0.60	0.86	0.49	0.1	0.06
H4H579P	0.75 ± 0.02	0.46	0.46	0.47	0.52	0.41	0.48	0.58	0.47	0.57	0.52	0.47	0.46	0.62	0.49	0.47	0.57	0.58	0.00	0.40	0.1	0.05	0.10
H4H580P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H581P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H582P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H583P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H584P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H585P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H586P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H587P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H588P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H589P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H590P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H591P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H592P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H593P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H594P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H595P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H596P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H597P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H598P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H599P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H600P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H601P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H602P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H603P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H604P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H605P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H606P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H607P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H608P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H609P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H610P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H611P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H612P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05	0.10	0.10
H4H613P	0.66 ± 0.02	0.44	0.57	0.53	0.65	0.45	0.55	0.58	0.51	0.63	0.56	0.59	0.55	0.56	0.58	0.50	0.64	0.62	0.67	0.00	0.05		

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Kháng thể kháng IL-33 và cách sử dụng kháng thể này

<130> 1850-WO

<140> TBA

<141>

<150> 61/778,687

<151> 2013-03-13

<150> 61/819,018

<151> 2013-05-03

<160> 323

<170> FastSEQ dùng cho Windows phiên bản 4.0

<210> 1

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 1

```
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatggca tgcattgggt ccgccagggt 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagaaa taaatactat 180
acagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatgg acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagagg 300
tatatcagca gctattatgg ggggttcgac ccctggggcc agggagccct ggtcaccgtc 360
tcctca
```

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 2

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


Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Glu	Arg	Tyr	Ile	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Phe	Asp	Pro	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Ala	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120								

<210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 3
 ggattcacct tcagtagtta tggc

24

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 4
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 5
 atatggtatg atggaagaaa taaa

24

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 6
 Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys
 1 5

<210> 7
 <211> 45
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 7

gcgagagaga ggtatatcag cagctattat ggggggttcg acccc

45

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 8

Ala Arg Glu Arg Tyr Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Asp Pro
1 5 10 15

<210> 9

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 9

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca ggggtattagt agttggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaggctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccattcac tttcggccct 300
gggaccaaac tggatatcaa g 321

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 10

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

100

105

<210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 11
 caggggtatta gtagttgg

18

<210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 12
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 13
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 13
 gctgcatcc

9

<210> 14
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 14
 Ala Ala Ser
 1

<210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 15
caacaggcta acagtttccc attcact

27

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 16
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 17
<211> 357
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 17
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagac ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attagtggta gtggaagtag cacagactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatt tccagagaca attccaggga cacgctgcat 240
ctgcaaata acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaacgttc 300
tactacttct acggtttgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctctca 357

<210> 18
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 18
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asp Thr Leu His
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Thr Phe Tyr Tyr Phe Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 19
 ggattcacct tcagcagcta tgcc

24

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 20
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 21
 attagtggta gtggaagtag caca

24

<210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 22
 Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr
 1 5

<210> 23
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 23
 gcgaaaacgt tctactactt ctacggtttg gacgtc

36

<210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 24
 Ala Lys Thr Phe Tyr Tyr Phe Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10

<210> 25
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 25
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctttaagaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgagtca gggcatttag aattatttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagtgc ctaagggtcct aatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
 cgggttcagtg gcagtggatc tgggacagtt ttcactctca ccatcagcag cctgcagact 240
 gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaaag tatagcagtg ccccatcac ttcgggcct 300
 gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 26
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 26
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Arg
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Thr
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 27
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 27

cagggcatta gcaattat

18

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 28

Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

1

5

<210> 29

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 29

gctgcatcc

9

<210> 30

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 30

Ala Ala Ser

1

<210> 31

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 31

caaaagtata gcagtgcctt attcact

27

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 32

Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Phe Thr

1

5

<210> 33

<211> 351

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 33

```

caggtgcttc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggccac agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggatc cactttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagt gatgggatgg atcaacccta acaatgggtg cacaaactat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggaattga gcaggctgag atctgacgac acggccgtat attactgtgc gagagagttg 300
cgggtataact ggaagtcctg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc a 351

```

<210> 34

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 34

```

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

```

<210> 35

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 35
 ggatccactt tcaccggcta ctat
 <210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 36
 Gly Ser Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr
 1 5

24

<210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 37
 atcaacccta acaatggtgg caca

24

<210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 38
 Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr
 1 5

<210> 39
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 39
 gcgagagagt tgcggtataa ctggaagtcc

30

<210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 40

Ala Arg Glu Leu Arg Tyr Asn Trp Lys Ser
 1 5 10

<210> 41

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 41

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagtcacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtggtggc aggccctact tagcctggta ccaacagata 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tgacatccca 180
 gacaggttca gtggcaatgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag tagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatgata attcccctta tacttttggc 300
 caggggacca ggctggagat caaa 324

<210> 42

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 42

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

<210> 43

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 43

cagagtgttg gcagggcccta c

21

<210> 44

<211> 7

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 44
 Gln Ser Val Gly Arg Pro Tyr
 1 5

<210> 45
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 45
 ggtgcatcc

9

<210> 46
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 46
 Gly Ala Ser
 1

<210> 47
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 47
 cagcagtatg ataattcccc ttatact

27

<210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 48
 Gln Gln Tyr Asp Asn Ser Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 49
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 49
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacaac ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttaga agctttgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggaatt ggtctcagat ctcaggacta gtgggtggtag tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gctcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagccac 300
 tatagcacca gctgggttcgg gggctttgac tactgggggcc agggaaccct ggtcactgtc 360
 tcctca 366

<210> 50
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 50
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
 35 40 45
 Ser Asp Leu Arg Thr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser His Tyr Ser Thr Ser Trp Phe Gly Gly Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 51
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 51
 ggattcacct ttagaagctt tgcc

24

<210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe Ala
 1 5

<210> 53

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 53

ctcaggacta gtggtggttag taca

24

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 54

Leu Arg Thr Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 55

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 55

gcgaaaagcc actatagcac cagctgggttc gggggctttg actac

45

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 56

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

<210> 57

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 57

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgctt ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggtttttag agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcaccaa cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

```

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 58

```

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

```

<210> 59

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 59

cagggttttta gcagctgg

18

<210> 60

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 60

Gln Gly Phe Ser Ser Trp
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 61
gctgcatcc

9

<210> 62
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 62
Ala Ala Ser
1

<210> 63
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 63
caacaggcta acagtttccc tctcact

27

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 64
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 65
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 65
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacgttttagc agctatgtca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaagt attagtggta atgggtggtag cacaaactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240
 ctggaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaatcactg 300
 ggaactacca cgactttttt ggggtttgac tattggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 66
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 66
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Asn Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Leu Gly Thr Thr Thr Thr Phe Leu Gly Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 67
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 67
 ggattcacgt ttagcagcta tgtc 24

<210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 68
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val
 1 5

<210> 69
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 69
 attagtggta atggtggtag caca

24

<210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 70
 Ile Ser Gly Asn Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 71
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 71
 gcgaaatcac tgggaactac cacgactttt ttgggggttg actat

45

<210> 72
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 72
 Ala Lys Ser Leu Gly Thr Thr Thr Thr Phe Leu Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 73
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 73

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgct gggcgagtca ggggtattag agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacatat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

```

<210> 74
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

```

<400> 74
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1             5             10             15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
             20             25             30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
             35             40             45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
             50             55             60
Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65             70             75             80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu
             85             90             95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
             100             105

```

<210> 75
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

```

<400> 75
cagggattata gcagctgg 18

```

<210> 76
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

```

<400> 76
Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1             5

```

<210> 77
 <211> 9
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 77

gctgcatcc

9

<210> 78

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 78

Ala Ala Ser

1

<210> 79

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 79

caacaggcta acagtttccc tctcact

27

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 80

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr

1

5

<210> 81

<211> 363

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 81

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcaactg tctctggtgg ctccatcagt agttattact ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtt gattgggtat atttattaca gtgggagcac caattataac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatct gtagacacgt ccaagaacca cttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtatatt actgtgagag atcccagtat 300

accagtagtt ggtacggttc ttttgatatac tggggccaag ggacaatggc caccgtctct 360
tca 363

<210> 82
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 82
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn His Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ser Gln Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Ser Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 83
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 83
ggtggctcca tcagtagtta ttac

24

<210> 84
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 84
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 85
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 85

atttattaca gtgggagcac c

21

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 86

Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr

1

5

<210> 87

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 87

gcgagatccc agtataccag tagttggtac gggtcttttg atatac

45

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 88

Ala Arg Ser Gln Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Ser Phe Asp Ile

1

5

10

15

<210> 89

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 89

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggcgagtc ggggtattag acctggtag cctggtttca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccactt tacaaggtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggccagaa ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgtaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 90
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 90
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Thr Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Pro Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 91
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 91
 caggggtatta gcacctgg

18

<210> 92
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 92
 Gln Gly Ile Ser Thr Trp
 1 5

<210> 93
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 93
 gctgcatcc

9

<210> 94
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 94
 Ala Ala Ser
 1

<210> 95
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 95
 caacaggcta acagtttccc gtggacg

27

<210> 96
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 96
 Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp Thr
 1 5

<210> 97
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 97
 caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cctctgggta cacctttaac agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagctccc acaatggtaa cagtcactat 180
 gtacagaagt tccagggcag agtctccatg accacagaca catccacgag tacagcctac 240
 atggaactga ggagccttag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagacactcg 300
 tataccacca gctggtacgg gggttttgac tattggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca

<210> 98
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 98

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

<210> 99

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 99

ggttacacct ttaacagcta tgggt

24

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 100

Gly	Tyr	Thr	Phe	Asn	Ser	Tyr	Gly
1				5			

<210> 101

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 101

atcagctccc acaatggtaa cagt

24

<210> 102

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 102
 Ile Ser Ser His Asn Gly Asn Ser
 1 5

<210> 103
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 103
 gcgagacact cgtataccac cagctggtac gggggttttg actat

45

<210> 104
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 104
 Ala Arg His Ser Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 105
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 105
 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca gggtttttag agctggtag cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctcagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggtcagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccctctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 106
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 106

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

<210> 107

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 107

cagggtttta gcagctgg

18

<210> 108

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 108

Gln	Gly	Phe	Ser	Ser	Trp
1				5	

<210> 109

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 109

gctgcatcc

9

<210> 110

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 110
Ala Ala Ser
1

<210> 111
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 111
caacaggcta acagtttccc tctcact

27

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 112
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 113
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 113
gaggtgcagc tgggtggagtc cggggggaggc ttggttcagc cggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggaat caccttgagc agctatggca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gactggagtg ggctcgcatcc atttttggtg gtgggtgggtg cccatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatg tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ttgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attattgtgc gaaagatcga 300
tacagtggga gctactacgg aggttttgac tactggggcc ggggaaccct ggtcaccgctc 360
tcctca 366

<210> 114
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 114
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

<210> 115
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 115
 ggaatcacct tgagcagcta tggc

24

<210> 116
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 116
 Gly Ile Thr Leu Ser Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 117
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 117
 atttttggtg gtggtggtgg ccca

24

<210> 118
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 118

Ile Phe Gly Ser Gly Gly Gly Pro
1 5

<210> 119

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 119

gcgaaagatc gatacagtgaggagctactac ggagggttttg actac

45

<210> 120

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 120

Ala Lys Asp Arg Tyr Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 121

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 121

gacatccaga	tgacccagtc	tccatcttcc	gtgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgtc	gggcgagtc	gggtattacc	agctgggttag	cctgggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctacactcct	gatctatgct	gcatccagtt	tgcaaactgg	gggtcccatca	180
aggttcagcg	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagcct	240
gaacattttg	caacttacta	ttgtcaacag	gctaacagtt	tcctctctac	tttcggcgga	300
gggaccaagg	tggagatcaa	a				321

<210> 122

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 122

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

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

<210> 123
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 123
 cagggtatta ccagctgg

18

<210> 124
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 124
 Gln Gly Ile Thr Ser Trp
 1 5

<210> 125
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 125
 gctgcatcc

9

<210> 126
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 126
 Ala Ala Ser
 1

<210> 127
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 127
 caacaggcta acagtttccc tcctact

27

<210> 128
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 128
 Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr
 1 5

<210> 129
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 129
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctaagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agttatgcct tgacctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctctttt attagtggta gtgggtggtag gccattctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa catgctgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccatat attactgtgc gaagtcacctg 300
 tataccacca gctggtacgg gggggttcgac tcctggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 130
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 130
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Leu Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Phe Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Leu Tyr

65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Lys	Ser	Leu	Tyr	Thr	Thr	Ser	Trp	Tyr	Gly	Gly	Phe	Asp	Ser	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120								

<210> 131
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 131
 ggattcacct ttagcagtta tgcc

24

<210> 132
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 132
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 133
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 133
 attagtggta gtggtggttag gccca

24

<210> 134
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 134
 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Pro
 1 5

<210> 135
 <211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 135

gcgaagtccc tgtataccac cagctggtac ggggggttcg actcc

45

<210> 136

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 136

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

<210> 137

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 137

gacatccaga	tgacccagtc	tccatcttcc	gtgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgtc	gggcgagtc	gggtgtcgtc	agctggtag	cctggtagtca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaagctcct	gatctatgct	gcatccagtt	tgcaaagtgg	gggtcccatca	180
aggttcagcg	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagcct	240
gaagattttg	caacttatta	ttgtcaacag	tctaacagtt	cccctttcac	tctcggccct	300
gggaccaaag	tggatatcaa	a				321

<210> 138

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 138

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

Thr Leu Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 139
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 139
caggggtgtcg tcagctgg

18

<210> 140
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 140
Gln Gly Val Val Ser Trp
1 5

<210> 141
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 141
gctgcatcc

9

<210> 142
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 142
Ala Ala Ser
1

<210> 143
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 143
caacagtcta acagtttccc tttc

24

<210> 144
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 144
Gln Gln Ser Asn Ser Phe Pro Phe
1 5

<210> 145
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 145
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggccactata tgtactggat gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtgggtg cacaaactat 180
gcacagaagt ttcaggacag ggtcaccatg accaggga cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagggaga 300
tatggcagta gctggtacgg ggggtttgag tactggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctca 366

<210> 146
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 146
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly His
20 25 30
Tyr Met Tyr Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Arg Tyr Gly Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Glu Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 147
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 147
 ggatacacct tcaccggcca ctat

24

<210> 148
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 148
 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly His Tyr
 1 5

<210> 149
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 149
 atcaacccta acagtgggtgg caca

24

<210> 150
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 150
 Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
 1 5

<210> 151
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 151

gcgagagggga gatatggcag tagctggtac gggggggtttg agtac

45

<210> 152

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 152

Ala	Arg	Gly	Arg	Tyr	Gly	Ser	Ser	Trp	Tyr	Gly	Gly	Phe	Glu	Tyr
1				5					10				15	

<210> 153

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 153

gacatccaga	tgacccagtc	tccatcttcc	gtgtctgcat	ctggtggaga	cagagtcacc	60
atcacttgtc	gggcgagtca	gggtattacc	agctggtag	cctgggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaacctcct	gatctatgct	gcagccagtt	tacaaagtgg	ggccccatca	180
aggttcagcg	gcagtggatc	tgggacggat	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagcct	240
gaagacttta	caacttacta	ttgtcaacag	gcttacagtc	cccctctcac	tttcggcgga	300
gggaccaagg	tggagatcaa	a				321

<210> 154

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 154

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

<210> 155

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 155

caggggtatta ccagctgg

18

<210> 156

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 156

Gln Gly Ile Thr Ser Trp

1

5

<210> 157

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 157

gctgcagcc

9

<210> 158

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 158

Ala Ala Ala

1

<210> 159

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 159

caacaggctt acagtctccc tctcact

27

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 160

Gln Gln Ala Tyr Ser Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 161

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 161

```
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggct tgcactgggt ccgccagtct 120
ccaggcaagg ggctggaatg ggtggcactt atatcatatg acggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag acctgaggac acggctggat atttctgtgc gaaatcccta 300
tataacaacca gctggtacgg gggctttgac tattggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctca 366
```

<210> 162

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 162

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

<210> 163

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 163

ggattcacct tcagtagcta tggc

24

<210> 164

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 164

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 165

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 165

atatcatatg acggaagtaa taaa

24

<210> 166

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 166

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 167

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 167

gcgaaatccc tatatacaac cagctggtac gggggcctttg actat

45

<210> 168

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 168

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

<210> 169

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 169

gacatccaga	tgacccagtc	tccatcttcc	gtgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgtc	gggcgagtc	gggtattaga	agctgggttag	cctgggtatca	gcaaaaacca	120
gggaaagccc	ctaacctcct	gatctatgct	gcgtccagtt	tgcaaagtgg	gggtcccatca	180
aggttcagcg	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagcct	240
gaagattttg	caacttacta	ttgtcaacag	gctaacagtt	tcctctccac	tttcgggcct	300
gggaccaaag	tgatatcaa	a				321

<210> 170

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 170

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

<210> 171

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 171

cagggtatta gaagctgg

18

<210> 172
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 172
 Gln Gly Ile Arg Ser Trp
 1 5

<210> 173
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 173
 gctgcggtcc

9

<210> 174
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 174
 Ala Ala Ser
 1

<210> 175
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 175
 caacaggcta acagtttccc tcccact

27

<210> 176
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 176
 Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr

1

5

<210> 177
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 177
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggggtt caccttcagc aactatgccg tgacctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaact atcagtggca gtggtgataa cacatactac 180
 gcagactccg tgcaggggccg gttcaccatc tccagaggcc attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaacctacg 300
 tatagcagaa gctggtacgg tgcttttgat ttctggggcc aagggacaat ggtcaccgctc 360
 tcttca 366

<210> 178
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 178
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gly His Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Pro Thr Tyr Ser Arg Ser Trp Tyr Gly Ala Phe Asp Phe Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 179
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 179
 gggttcacct tcagcaacta tgcc

24

<210> 180

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 180
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
 1 5

<210> 181
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 181
 atcagtggca gtggtgataa caca

24

<210> 182
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 182
 Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr
 1 5

<210> 183
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 183
 gcgaaaccta cgtatagcag aagctggtac ggtgcttttg atttc

45

<210> 184
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 184
 Ala Lys Pro Thr Tyr Ser Arg Ser Trp Tyr Gly Ala Phe Asp Phe
 1 5 10 15

<210> 185
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 185
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtc ggggtattag agctgggttag cctgggtatca gcagaaaccg 120
 gggaaagccc ctcaactcct gatctatgct gcatccagat tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttctggg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacaatt tcccattcac tttcggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 186
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 186
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Trp Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Asn Phe Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 187
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 187
 cagggtatta gcagctgg 18

<210> 188
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 188

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 189

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 189

gctgcatcc

9

<210> 190

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 190

Ala Ala Ser
1

<210> 191

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 191

caacaggcta acaatttccc attcact

27

<210> 192

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 192

Gln Gln Ala Asn Asn Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 193

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 193

```

caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctgggggcctc agtgaagggtc 60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agttatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag gccttgagtg gatgggatgg atccgcgctt acaatggta cacaaactat 180
gcacagaagt ttcagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgaa caccgcctac 240
atggagctga ggaccctgaa ttctgacgat acggccgctt attactgtgc gagagatcga 300
tatagtggga gcttccacgg taactttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctca                                     366

```

<210> 194

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 194

```

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

```

<210> 195

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 195

ggttacacct ttaccagtta tgggt

24

<210> 196

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 196

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly
1 5

<210> 197

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 197

atccgcgcgtt acaatgggtta caca

24

<210> 198

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 198

Ile Arg Ala Tyr Asn Gly Tyr Thr
1 5

<210> 199

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 199

gcgagagatc gatatagtgaggagcttccac ggtaactttg actac

45

<210> 200

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 200

Ala Arg Asp Arg Tyr Ser Gly Ser Phe His Gly Asn Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 201

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 201

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcgt ctgtaggaga cagagtgacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggatatttc agctggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaggtcct aatctatgct gcatccaatt tggaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt taccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321
```

<210> 202

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 202

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

<210> 203

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 203

caggtattt tcagctgg

18

<210> 204

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 204

```
Gln Gly Ile Phe Ser Trp
1 5
```

<210> 205
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 205
 gctgcatcc

9

<210> 206
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 206
 Ala Ala Ser
 1

<210> 207
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 207
 caacaggcta acagtttacc gctcact

27

<210> 208
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 208
 Gln Gln Ala Asn Ser Leu Pro Leu Thr
 1 5

<210> 209
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 209
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctattcta tgcactgggt ccgccaggct 120

```

ccaggggaagg gactggaata tgtttcaact attaataata atgggggatac cacatattat 180
gcagactctg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
cttcaactgg gcagcctgag acctgaggac atggctgtgt attactgtgc gagacagacg 300
tataccagca gctggtacgg ggggttcgac tcctggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctca 366

```

<210> 210
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

```

<400> 210
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20          25          30
Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
35          40          45
Ser Thr Ile Asn Asn Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Leu Gly Ser Leu Arg Pro Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Gln Thr Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Trp
100         105         110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 211
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

```

<400> 211
ggattcacct tcagtaccta ttct 24

```

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

<220>
 <223> Tổng hợp

```

<400> 212
Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ser
1          5

```

<210> 213
 <211> 24

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 213
 attaataata atggggatac caca

24

<210> 214
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 214
 Ile Asn Asn Asn Gly Asp Thr Thr
 1 5

<210> 215
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 215
 gcgagacaga cgtataccag cagctggtac ggggggttcg actcc

45

<210> 216
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 216
 Ala Arg Gln Thr Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ser
 1 5 10 15

<210> 217
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 217
 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggcga cagagtcacc 60
 atcacttgctc gggcgagtca ggggtattacc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccaatt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaccag cctgcagcct 240

gaggattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtc tcccattcac tttcggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 218
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 218
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Thr Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Leu Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 219
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 219
 cagggattatta ccagctgg 18

<210> 220
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 220
 Gln Gly Ile Thr Ser Trp
 1 5

<210> 221
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 221
gctgcatcc

9

<210> 222
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 222
Ala Ala Ser
1

<210> 223
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 223
caacaggcta acagtctccc attcact

27

<210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 224
Gln Gln Ala Asn Ser Leu Pro Phe Thr
1 5

<210> 225
<211> 366
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 225
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacccttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccagggt 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtggcag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa ctcgctgtat 240
ctgcaattga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaagacgctg 300
tatactacca gctgggtacgg gggcttccag cactggggcc agggcaccct gggtcactgtc 360
tcctca 366

<210> 226

<211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 226
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Thr Leu Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Gln His Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 227
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 227
 ggattcacccc ttagcagcta tgcc

24

<210> 228
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 228
 Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 229
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 229

attagtggta gtggtggcag caca

24

<210> 230

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 230

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr

1

5

<210> 231

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 231

gcgaagacgc tgtatactac cagctggtac gggggcttcc agcac

45

<210> 232

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 232

Ala Lys Thr Leu Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Gln His

1

5

10

15

<210> 233

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 233

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctataggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggaatcagc agttggtag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagtcc ctaagctcct gatctatgct gcgtcctctt tgcaaagtgg gttcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtag cctgcagccc 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag actcacagtt tcccgtggac ggtcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 234

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 234

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

<210> 235

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 235

cagggaatca gcagttgg

18

<210> 236

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 236

Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp
1				5	

<210> 237

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 237

gctgcgtcc

9

<210> 238

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 238

Ala Ala Ser

1

<210> 239

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 239

caacagactc acagtttccc gtgg

24

<210> 240

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 240

Gln Gln Thr His Ser Phe Pro Trp

1

5

<210> 241

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 241

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacccttagg agctatttca tgacctgggt ccgccagggt 120
ccagggaagg ggctggaggg ggtctcagct attagtggca ttagtggtgg cacatactac 180
acagactccg ttaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgtgc gagaacgggtg 300
tatagtagta gttactacgg gggcttccag cactggggcc agggcaccct ggtcaccgtc 360
tcctca 366

<210> 242

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 242

```

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

```

<210> 243

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 243

ggattcaccc ttaggagcta tttc

24

<210> 244

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 244

```

Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr Phe
 1           5

```

<210> 245

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 245

attagtggca ttagtggtgg caca

24

<210> 246

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 246

Ile Ser Gly Ile Ser Gly Gly Thr

1

5

<210> 247

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 247

gcgagaacgg tgtatagtag tagttactac gggggccttc agcac

45

<210> 248

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 248

Ala Arg Thr Val Tyr Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Gln His

1

5

10

15

<210> 249

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 249

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgtat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtc ggggtattag agttggtag cctggtagtca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgtt gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag actaacagtt tccctctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tgagatcaa a 321

<210> 250

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 250

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

1

5

10

15

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

<210> 251
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 251
 cagggattatta gcagttgg

18

<210> 252
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 252
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 253
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 253
 gttgcatcc

9

<210> 254
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 254
 Val Ala Ser

1

<210> 255
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 255
 caacagacta acagtttccc tctcact

27

<210> 256
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 256
 Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu Thr
 1 5

<210> 257
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 257
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacccttagg agttatgtca tgtactgggt ccgccagggc 120
 ccaggggaagg ggctggaggg ggtctcaggt attagtggca gtagtgggtg cacatactac 180
 acagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgtgc gagatcggcg 300
 tatagtacca cctggtacgg gggccttcag cactgggggc agggcaccct ggtcaccgtc 366
 tcctca

<210> 258
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 258
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met Tyr Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Val Tyr Ser Thr Thr Trp Tyr Gly Gly Phe Gln His Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 259
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 259
 ggattcaccc ttaggagtta tgtc

24

<210> 260
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 260
 Gly Phe Thr Leu Arg Ser Tyr Val
 1 5

<210> 261
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 261
 attagtggca gtagtgggtgg caca

24

<210> 262
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 262
 Ile Ser Gly Ser Ser Gly Gly Thr
 1 5

<210> 263
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 263
 gcgagatcgg tgtatagtag cacctggtag gggggcttcc agcac 45

<210> 264
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 264
 Ala Arg Ser Val Tyr Ser Thr Thr Trp Tyr Gly Gly Phe Gln His
 1 5 10 15

<210> 265
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 265
 gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgtat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca gggtatttag agttgggttag cctgggtatca gctgaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcgg cctgcagcct 240
 gaagattttg cagtttacta ttgtcaacag actaacagtt tccctctcac ttccggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 266
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 266
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro

65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Asn	Ser	Phe	Pro	Leu
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
				100				105							

<210> 267
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 267
 caggttatta gcagttgg 18

<210> 268
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 268
 Gln Val Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 269
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 269
 gctgcatcc 9

<210> 270
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 270
 Ala Ala Ser
 1

<210> 271
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 271

caacagacta acagtttccc tctcact

27

<210> 272

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 272

Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Leu Thr

1

5

<210> 273

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 273

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaaac ttggaacagc ctgggggggtc ccttagactc 60
 tcctgtacag cctctggatt caccttttagc agatctgcc tgaactgggt ccgccgggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagga attagtggta gtgggtggctg aacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa tacgctatat 240
 ctgcaaataga acagcctgag cgccgaggac acggccgcat attactgtgc gaaagattcg 300
 tatactacca gttggtacgg aggtatggac gtctggggcc acgggaccac ggtcaccgctc 360
 tcctca 366

<210> 274

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 274

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

			100					105		110
Gly	His	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
		115					120			

<210> 275
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 275
 ggattcacct ttagcagatc tgcc

24

<210> 276
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 276
 Gly Phe Thr Phe Ser Arg Ser Ala
 1 5

<210> 277
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 277
 attagtggta gtggtggtcg aaca

24

<210> 278
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 278
 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr
 1 5

<210> 279
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 279

gcgaaagatt cgtatactac cagttggtac ggaggtatgg acgtc

45

<210> 280

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 280

Ala Lys Asp Ser Tyr Thr Thr Ser Trp Tyr Gly Gly Met Asp Val

1

5

10

15

<210> 281

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 281

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggatatttc agctggtag cctggatatca gcagaaacca 120
ggaaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcttccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
agattcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaggattttg caatttacta ttgtcaacag gctaacagtg tcccgatcac ctccggccaa 300
gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 282

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 282

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

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Phe Ser Trp

20

25

30

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

35

40

45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Val Pro Ile

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 283
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 283
 caggggtatttt tcagctgg

18

<210> 284
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 284
 Gln Gly Ile Phe Ser Trp
 1 5

<210> 285
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 285
 gctgcttcc

9

<210> 286
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 286
 Ala Ala Ser
 1

<210> 287
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 287
 caacaggcta acagtgtccc gatcacc

27

<210> 288
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 288
 Gln Gln Ala Asn Ser Val Pro Ile Thr
 1 5

<210> 289
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 289
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgttcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtcaccgct attagtggca gtgggtgggtg cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa ctcgctgttt 240
 ctgcaattga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaacaaacg 300
 tataaccagca gctggtacgg tggctttgat atctggggcc aggggacaat ggtcaccgct 360
 tcttca 366

<210> 290
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 290
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Thr Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gln Thr Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ile Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 291
 <211> 24

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 291
 ggattcacct ttagcagcta tgcc

24

<210> 292
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 292
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 293
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 293
 attagtggca gtggtggtgg caca

24

<210> 294
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 294
 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr
 1 5

<210> 295
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 295
 gcgaaacaaa cgtataccag cagctggtac ggtggctttg atatc

45

<210> 296
 <211> 15

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 296
 Ala Lys Gln Thr Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Gly Gly Phe Asp Ile
 1 5 10 15

<210> 297
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 297
 gacatccaga tgacccagtc gccatcttcc gtgtccgcgt ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca gggtttttagt tcctggtttag cctgggtatca gcagatacca 120
 gggaaagccc ccaagctcct gatctatgct gcatcaaggt tgcaaagtgg ggtcccatcc 180
 aggttccgcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaggattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgcctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 298
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 298
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Phe Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 299
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 299
cagggtttta gttcctgg

18

<210> 300
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 300
Gln Gly Phe Ser Ser Trp
1 5

<210> 301
<211> 9
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 301
gctgcatca

9

<210> 302
<211> 3
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 302
Ala Ala Ser
1

<210> 303
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 303
caacaggcta acagtttccc gctcact

27

<210> 304
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 304

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr

1

5

<210> 305

<211> 167

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 305

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

1

5

10

15

Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr

20

25

30

Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Lys Lys Lys Asp Lys Val

35

40

45

Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Ser Glu Ser Gly Asp

50

55

60

Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp

65

70

75

80

Phe Trp Leu Gln Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys

85

90

95

Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Arg

100

105

110

Ser Phe Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe

115

120

125

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

130

135

140

Glu Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Ile Leu

145

150

155

160

Glu His His His His His His

165

<210> 306

<211> 167

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 306

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

1

5

10

15

Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr

20

25

30

Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Lys Lys Lys Asp Lys Val

35

40

45

Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Ser Glu Ser Gly Asp

50

55

60

Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp

65

70

75

80

Phe Trp Leu Gln Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys

				85						90					95		
Cys	Glu	Lys	Pro	Leu	Pro	Asp	Gln	Ala	Phe	Phe	Val	Leu	His	Asn	Arg		
			100					105					110				
Ser	Phe	Asn	Cys	Val	Ser	Phe	Glu	Cys	Lys	Thr	Asp	Pro	Gly	Val	Phe		
		115					120						125				
Ile	Gly	Val	Lys	Asp	Asn	His	Leu	Ala	Leu	Ile	Lys	Val	Asp	Tyr	Ser		
	130					135						140					
Glu	Asn	Leu	Gly	Ser	Glu	Asn	Ile	Leu	Phe	Lys	Leu	Ser	Glu	Ile	Leu		
145					150					155					160		
Glu	His	His	His	His	His	His											
				165													

<210> 307
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 307
 cagggtcacct tgaaggagtc tggctcctgtg ctgggtgaaac ccacagagag cctcacgctg 60
 acctgctccg tctctggatt ctactcagt aatgttagaa tgggtgtgag ctggatccgt 120
 cagtccccag ggaaggccct ggagtggctt gcacacattt tttcgaatga cgaaaaatcc 180
 tacaccacat ctctgaagac caggctcacc atctccaagg acacctccag aagccagggtg 240
 gtccttacca tgaccgacat ggaccctggg gacacagcca catattactg tgcacggata 300
 cggaatttgg cctttaatta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 308
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 308
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Val
 20 25 30
 Arg Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Asn Asp Glu Lys Ser Tyr Thr Thr Ser
 50 55 60
 Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Val Leu Thr Met Thr Asp Met Asp Pro Gly Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ile Arg Asn Leu Ala Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 309
 <211> 30
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 309

ggattctcac tcagtaatgt tagaatgggt

30

<210> 310

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 310

Gly Phe Ser Leu Ser Asn Val Arg Met Gly
1 5 10

<210> 311

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 311

attttttcga atgacgaaaa a

21

<210> 312

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 312

Ile Phe Ser Asn Asp Glu Lys
1 5

<210> 313

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 313

gcacggatac ggaatttggc ctttaattac

30

<210> 314

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 314

Ala Arg Ile Arg Asn Leu Ala Phe Asn Tyr
1 5 10

<210> 315

<211> 339

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 315

gacttcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gagtgtgtta cacaggcca gcaataagaa ctacttagct 120
tggtatcagc agaagccagg acagcctcct aacctgtctca tttactgggc atctaccgg 180
gaatccggggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatggtact 300
ctatttactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

<210> 316

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 316

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

<210> 317

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 317

cagagtgtgt tacacaggtc cagcaataag aactac

36

<210> 318

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 318

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

1

5

10

<210> 319

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 319

tgggcatct

9

<210> 320

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 320

Trp Ala Ser

1

<210> 321

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 321

cagcaatatt atgtactct atttact

27

<210> 322

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 322

Gln Gln Tyr Tyr Gly Thr Leu Phe Thr
1 5

<210> 323

<211> 338

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> tổng hợp

Axit amin 1-310: ST2 của người (K19-S328 có số truy cập
NP_057316.3)

Axit amin 311-338: thể Myc-Myc-hexahistidin

<400> 323

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

28991

Gly	Gly	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	His	His	His	His
				325					330					335	
His	His														