



(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)



1-0030818

(51)⁷ C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2014-04150

(22) 17/05/2013

(86) PCT/US2013/041656 17/05/2013

(87) WO/2013/173761 21/11/2013

(30) 61/649,147 18/05/2012 US; 61/792,619 15/03/2013 US

(45) 25/01/2022 406

(43) 25/03/2015 324A

(73) Amgen Inc. (US)

One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, California 91320-1799, United States of America

(72) SMITH, Dirk E (US); FOLTZ, Ian (CA); KING, Chadwick T. (CA); LIM, Ai Ching (US); CLARK, Rutilio (US); COMEAU, Michael R. (US); KETCHEM, Randal R. (US); SHI, Donghui (US); MIN, Xiaoshan (US); WANG, Zhulun (US).

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

(54) KHÁNG THỂ ST2 ĐƯỢC PHÂN LẬP, AXIT NUCLEIC MÃ HÓA KHÁNG THỂ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ ST2

(57) Sáng chế đề xuất các chế phẩm và các phương pháp có liên quan đến các protein liên kết kháng nguyên mà các protein này liên kết với ST2 ở người, bao gồm cả kháng thể. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng ST2 ở người đầy đủ và các dẫn xuất và các biến thể của chúng. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất các axit nucleic mã hóa các kháng thể này và các đoạn kháng thể, các biến thể, và các dẫn xuất. Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp sản xuất kháng thể này kháng ST2 để ngăn ngừa và điều trị các rối loạn tự miễn và rối loạn viêm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất các chế phẩm và các phương pháp có liên quan đến các protein liên kết kháng nguyên mà mà các protein này liên kết với ST2 ở người, bao gồm cả kháng thể. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng ST2 ở người đầy đủ và các dẫn xuất và các biến thể của chúng. Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất các axit nucleic mã hóa các kháng thể này và các đoạn kháng thể, các biến thể, và các dẫn xuất. Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp sản xuất kháng thể này kháng ST2 để ngăn ngừa và điều trị các rối loạn tự miễn và rối loạn viêm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

ST2 là thụ thể liên kết đại diện cho interleukin-33 (IL-33), cytokin có liên quan đến IL-1 và IL-18 và còn được gọi là NF-HEV hoặc IL-1F11. ST2 được biểu hiện dưới dạng cả biến thể không truyền tín hiệu hòa tan được (ST2 hoặc sST2 dạng có thể hòa tan) và dạng màng kéo dài có độ dài đầy đủ (FL ST2, ST2 hoặc ST2L) làm trung gian để điều chỉnh các đáp ứng tế bào với IL-33. Dạng màng kéo dài có độ dài đầy đủ được biểu hiện trên một loạt các loại tế bào liên quan đến viêm bệnh lý trong một số trường hợp bệnh. Các loại tế bào này bao gồm các tế bào lympho, cụ thể là các tế bào hỗ trợ T biểu hiện IL-13 và IL-15, các tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK) và các tế bào T tiêu diệt tự nhiên (NKT), cũng như nhiều tế bào gọi là các tế bào miễn dịch bẩm sinh, như là các dưỡng bào, các bạch cầu ưa kiềm, các tế bào ưa eozin, đại thực bào và các tế bào hỗ trợ bẩm sinh (còn được gọi là các nuocyte (Neill, Wong et al. 2010)). IL-33 liên kết với ST2 trên các tế bào này dẫn đến việc bổ sung đồng thụ thể được biểu hiện rộng được gọi là protein phụ trợ IL-1R (AcP) và sự hoạt hóa của tín hiệu gây viêm, tương tự như IL-1 và IL-18. Vì vậy, IL-33 có thể trực tiếp hoạt hóa các tế bào biểu hiện ST2 hoặc tăng cường quá trình hoạt hóa của chúng khi có tác dụng kích thích hoạt hóa khác. Các ví dụ về các đáp ứng tế bào do IL-33 gây ra bao gồm sự sản xuất các cytokin viêm, như là IL-5, IL-6, IL-13, TNF, IFN- γ và GM-CSF cũng như sự sản xuất chemokin, như là CXCL8, CCL17 và CCL24. IL-33 cũng đã được chứng minh là làm tăng cường các phản ứng dị ứng cấp tính bằng cách gia tăng sự hoạt hóa bạch cầu ưa kiềm và dưỡng bào được kích hoạt bởi tín hiệu thụ thể IgE hoặc các chất kích hoạt dưỡng bào và bạch cầu ưa kiềm khác. IL-33 cũng sẽ làm tăng cường các đặc tính tuyển chọn, sống sót và

kết dính của các tế bào miễn dịch biểu hiện ST2 và do đó quan trọng trong việc gây viêm tế bào và duy trì viêm tế bào in các mô cục bộ.

Các tác dụng gây viêm của IL-33 lên các tế bào miễn dịch bẩm sinh và tế bào miễn dịch thích nghi lên đến cực điểm để thúc đẩy một số quá trình bệnh lý. Trong phổi, những tác dụng này bao gồm tình trạng viêm đường hô hấp, sinh chất nhầy, tăng phản ứng đường hô hấp và sự tái cấu trúc xơ tăng cao. IL-33 cũng có thể góp phần vào viêm cục bộ trong các khớp xương cũng như đau thực thể quá mức da và khớp, bằng cách thúc đẩy sự sản xuất các cytokin tiền viêm (Verri, Guerrero et al. 2008; Xu, Jiang et al. 2008). IL-33 quá mức có liên quan đến tình trạng lắng đọng collagen bệnh lý và bệnh xơ hóa và cũng góp phần vào sự tổn hại biểu mô trong trường hợp bệnh viêm ruột. Thông qua các tác động mạnh của mình lên các bạch cầu ưa kiềm và các dưỡng bào được làm nhạy bởi IgE, IL-33 có thể cũng gây ra sốc phản vệ (Pushparaj, Tay et al. 2009) và có thể đóng vai trò góp phần vào bệnh dị ứng. Nhiều bệnh trong số những bệnh này là ở thể mãn tính và tiến triển trong tự nhiên và khó điều trị và cần có nhu cầu về các phương pháp điều trị hiệu quả hơn.

Phù hợp với các tác dụng sinh học được dẫn chứng bằng tài liệu, có một số dòng bằng chứng cho thấy rằng con đường của IL-33/ST2 góp phần vào bệnh lý ở người. Ví dụ, sự biểu hiện cao bất thường của IL-33 được tìm thấy trong các bệnh liên quan đến viêm trong các mô niêm mạc và viêm khớp. Các bệnh này bao gồm bệnh hen (Prefontaine, Lajoie-Kadoch et al. 2009; Prefontaine, Nadigel et al. 2010), bệnh viêm đường ruột (Beltran, Nunez et al. 2010; Pastorelli, Garg et al. 2010; Sponheim, Pollheimer et al. 2010) và viêm khớp dạng thấp (Palmer, Talabot-Ayer et al. 2009; Matsuyama, Okazaki et al. 2010). Biểu hiện của IL-33 được tăng cao trong da vẩy nến (Theoharides, Zhang et al. 2010) và da của các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng (Pushparaj, Tay et al. 2009) và cũng tăng lên trong các trường hợp bệnh lý của bệnh xơ hóa, như bệnh xơ cứng toàn thân (Yanaba, Yoshizaki et al. 2011) (Manetti, Ibbamanneschi et al. 2009) và bệnh xơ hóa gan (Marvie, Lisbonne et al. 2009). Nồng độ của ST2 dạng có thể hòa tan tuần hoàn cũng được tăng cao trong nhiều trường hợp bệnh, điều này còn cho thấy mối liên hệ giữa con đường cytokin và các bệnh này. Các ví dụ bao gồm bệnh hen (Kuroiwa, Arai et al. 2001; Oshikawa, Kuroiwa et al. 2001; Ali, Zhang et al. 2009), bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính (Hacker, Lambers et al. 2009), bệnh

xơ hóa phổi (Tajima, Oshikawa et al. 2003), bệnh nhiễm trùng máu và chấn thương (Brunner, Krenn et al. 2004), bệnh nhiễm HIV (Miyagaki, Sugaya et al. 2011), Lupus ban đỏ hệ thống (Mok, Huang et al. 2010), bệnh viêm đường ruột (Beltran, Nunez et al. 2010) cũng như viêm khớp dạng thấp, bệnh xơ cứng, bệnh u hạt Wegener và bệnh Behcet (Kuroiwa, Arai et al. 2001) và bệnh tim mạch (Shah and Januzzi 2010). IL-33 có thể dẫn đến viêm bạch cầu ái toan và có bằng chứng con đường này có liên quan đến bệnh liên quan đến bạch cầu ái toan, như viêm mũi xoang và bệnh polip mũi (Plager, Kahl et al. 2010) và bệnh viêm phế quản tăng bạch cầu ái toan (Oshikawa, Kuroiwa et al. 2001).

Bằng chứng bổ sung liên kết con đường của IL-33/ST2 với bệnh ở người được cung cấp bởi các nghiên cứu di truyền, mà những nghiên cứu này đã xác định hiện tượng đa hình gen IL-33 và/hoặc ST2 trong quần thể nói chung có liên quan đáng kể đến việc làm tăng nguy cơ bệnh hoặc các thông số về mức độ nghiêm trọng của bệnh. Một số lượng lớn các nghiên cứu kết hợp toàn bộ hệ gen đã liên kết biến dị di truyền trong ST2 (IL1RL1) hoặc IL-33 có nguy cơ tăng bệnh hen suyễn (Gudbjartsson, Bjornsdottir et al. 2009; Moffatt, Gut et al. 2010; Wu, Romieu et al. 2010) và các nghiên cứu khác đã liên kết di truyền con đường này với mức độ bệnh hen gia tăng (Ali, Zhang et al. 2009) và đáp ứng phế quản quá mức (Reijmerink, Postma et al. 2008). Các kết quả tương tự về mặt di truyền liên quan đến con đường này trong các rối loạn dị ứng như bệnh viêm da dị ứng (Shimizu, Matsuda et al. 2005), viêm mũi xoang (Sakashita, Yoshimoto et al. 2008; Castano R 2009) cũng như bệnh polip mũi (Buysschaert, Grulois et al. 2010).

Đồng thời, những liên kết này liên quan đến một số bệnh ở người và khả năng loại bỏ cytokin gây nhiều dạng viêm có hại là một mục tiêu hữu ích để có thể can thiệp điều trị.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất đến các protein liên kết kháng nguyên kháng ST2, ví dụ, các kháng thể và các đoạn nhóm chức của chúng, có các đặc tính tuân theo quá trình sản xuất thương mại và dùng làm tác nhân điều trị ở người. Cụ thể, các protein liên kết kháng nguyên kháng ST2 có ích trong các phương pháp điều trị các bệnh và các rối loạn liên quan đến trục IL-33/ST2. Trong tài liệu này, sáng chế đề xuất các kháng thể liên kết

ST2 mà liên kết ST2 với ái lực cao và ức chế có hiệu quả liên kết IL-33, do đó làm giảm tín hiệu do IL-33 gây ra trong tế bào.

Theo khía cạnh thứ nhất, protein liên kết kháng nguyên ST2 bao gồm a) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:164, hoặc SEQ ID NO:165; b) vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:146, hoặc SEQ ID NO:147; hoặc c) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của a) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của b).

Các protein liên kết kháng nguyên được ưu tiên theo khía cạnh thứ nhất bao gồm các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:95 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:96 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:97 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:31; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:98 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:32; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:99 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID

[illegible]

đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:147.

Theo khía cạnh thứ hai, protein liên kết kháng nguyên ST2 bao gồm a) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, loại bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:164, hoặc SEQ ID NO:165; b) vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:146, hoặc SEQ ID NO:147; hoặc c) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của a) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của b).

Các protein liên kết kháng nguyên được ưu tiên theo khía cạnh thứ hai bao gồm các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:95 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:96 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:97 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:31; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:98 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:32; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin

[illegible]

và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:146; và các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:165 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:147.

Theo khía cạnh thứ ba, protein liên kết kháng nguyên ST2 chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm a) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:106; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:117; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:128; b) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:107; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:118; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:129; c) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:108; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:119; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:130; d) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:109; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:120; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:131; e) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:110; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:121; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:132; f) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:111; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:122; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong

[illegible]

chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:174; và vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm o) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:40; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:51; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:62; p) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:41; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:52; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:63; q) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:42; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:53; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:64; r) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:43; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:54; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:65; s) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:44; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:55; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:66; t) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:45; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:56; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:67; u) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:46; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:57; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:68; v) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID

NO:47; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:58; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:69; w) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:48; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:59; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:70; x) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:49; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:60; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:71; y) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:50; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:61; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:72; z) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:148; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:151; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:154; aa) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:149; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:152; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:155; hoặc bb) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:150; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:153; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:156.

Các protein liên kết kháng nguyên ST2 được ưu tiên theo khía cạnh thứ ba bao gồm các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của a) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của o); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của b) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của p); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của c) và vùng

biến đổi của chuỗi nặng của q); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của d) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của r); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của e) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của s); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của f) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của t); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của g) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của u); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của h) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của v); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của i) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của w); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của j) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của x); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của k) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của y); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của l) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của z); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của m) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của aa); và các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của n) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của bb).

Theo khía cạnh thứ tư của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên ST2 theo khía cạnh thứ nhất, thứ hai, hoặc thứ ba liên kết với ST2 ở người với ái lực nhỏ hơn hoặc bằng $1 \times 10^{-10}M$.

Theo khía cạnh thứ năm của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên ST2 theo khía cạnh thứ nhất, thứ hai, thứ ba hoặc thứ tư ức chế sự liên kết của ST2 ở người với IL-33 ở người.

Theo khía cạnh thứ sáu của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên ST2 theo khía cạnh thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư hoặc thứ năm làm giảm tín hiệu ST2 do IL-33 ở người gây ra trong các tế bào biểu hiện ST2 ở người.

Theo khía cạnh thứ bảy của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên ST2 theo khía cạnh thứ sáu, làm giảm tín hiệu ST2 ở khi đuôi dài do IL-33 gây ra trong các tế bào biểu hiện ST2 ở khi đuôi dài.

Theo khía cạnh thứ tám của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên ST2 theo khía cạnh thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm, thứ sáu hoặc thứ bảy là kháng thể, như là kháng thể ở người. Các kháng thể được ưu tiên bao gồm các kháng thể đó mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID:84 và chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:18; các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit

amin nêu trong SEQ ID:85 và chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:19; các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID:86 và chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20; các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID:87 và chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21; các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID:88 và chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:22; các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID:89 và chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:23; các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID:90 và chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:24; các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID:91 và chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:25; các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID:92 và chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:26; các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID:93 và chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27; các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID:94 và chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28; các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID:160 và chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:142; các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID:161 và chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:143; và các kháng thể mà bao gồm chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID:162 và chuỗi nặng có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:144.

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế đề xuất các axit nucleic tách ly mã hóa một hoặc nhiều thành phần polypeptit của protein liên kết kháng nguyên ST2, ví dụ, chuỗi nhẹ của kháng thể hoặc chuỗi nặng của kháng thể. Theo các phương án được ưu tiên axit nucleic mã hóa polypeptit bao gồm:

a) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 95% tính đồng dạng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:164, hoặc SEQ ID NO:165;

b) vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 95% tính đồng dạng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:146, hoặc SEQ ID NO:147;

c) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:164, hoặc SEQ ID NO:165;

d) vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:146, hoặc SEQ ID NO:147;

e) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm:

i) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:106; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:117; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:128;

ii) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:107; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:118; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:129;

iii) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:108; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:119; và LCDR3

chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:130;

iv) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:109; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:120; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:131;

v) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:110; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:121; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:132;

vi) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:111; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:122; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:133;

vii) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:112; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:123; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:134;

viii) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:113; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:124; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:135;

ix) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:114; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:125; và LCDR3

chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:136;

x) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:115; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:126; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:137;

xi) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:116; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:127; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:138;

xii) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:166; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:169; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:172;

xiii) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:167; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:170; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:173; hoặc

xiv) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:168; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:171; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:174; hoặc

f) vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm:

i) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:40; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc

thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:51; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:62;

ii) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:41; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:52; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:63;

iii) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:42; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:53; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:64;

iv) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:43; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:54; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:65;

v) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:44; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:55; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:66;

vi) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:45; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:56; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:67;

vii) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:46; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc

thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:57; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:68;

viii) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:47; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:58; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:69;

ix) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:48; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:59; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:70;

x) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:49; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:60; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:71;

xi) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:50; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:61; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:72;

xii) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:148; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:151; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:154;

xiii) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:149; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ

hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:152; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:155; hoặc

xiv) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:150; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:153; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:156.

Theo một số phương án nhất định của khía cạnh thứ chín, polypeptit mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể và có độ tương đồng ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc 100% đồng dạng với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:158, hoặc SEQ ID NO:159. Theo các phương án khác của khía cạnh thứ chín, polypeptit mã hóa chuỗi nặng của kháng thể và có độ tương đồng ít nhất 80%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc có 100% đồng dạng với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:140, hoặc SEQ ID NO:141.

Theo khía cạnh thứ mười, sáng chế đề xuất vector biểu hiện bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic tách ly theo khía cạnh thứ chín. Theo một số phương án nhất định, vector biểu hiện mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể, chuỗi nặng của kháng thể, hoặc cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể.

Theo khía cạnh thứ mười một, sáng chế đề xuất tế bào vật chủ tái tổ hợp bao gồm một hoặc nhiều axit nucleic tách ly theo khía cạnh thứ chín có thể được liên kết phù hợp với trình tự khởi đầu, trong đó có các tế bào vật chủ tái tổ hợp bao gồm một hoặc nhiều vector biểu hiện theo khía cạnh thứ chín của sáng chế. Theo các phương án được ưu tiên, tế bào vật chủ tái tổ hợp tiết ra kháng thể liên kết ST2. Các tế bào vật chủ được ưu tiên là các tế bào vật chủ của loài động vật có vú, bao gồm cả các dòng tế bào CHO.

Theo khía cạnh thứ mười hai, sáng chế đề xuất các phương pháp điều trị rối loạn tự miễn hoặc rối loạn viêm, phương pháp nói trên bao gồm việc cấp lượng hữu hiệu trị liệu của protein liên kết kháng nguyên ST2 theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm, thứ sáu, thứ bảy, hoặc thứ tám cho bệnh nhân cần điều trị các bệnh đó. Theo các phương án được ưu tiên, protein liên kết kháng nguyên ST2 là kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:95 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:29 (ví dụ, Ab1), kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:96 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:30 (ví dụ, Ab2), kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:97 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:31 (ví dụ, Ab3), kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:98 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:32 (ví dụ, Ab4), kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:99 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:33 (ví dụ, Ab5), kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:100 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:34 (ví dụ, Ab6), kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:101 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:35 (ví dụ, Ab7), kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:102 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:36 (ví dụ, Ab8), kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:103 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:37 (ví dụ, Ab9), kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:104 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:38 (ví dụ, Ab10), kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:105 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:39 (ví dụ, Ab11); kháng thể bao

gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:163 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:145 (ví dụ, Ab30); kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:164 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:146 (ví dụ, Ab32); hoặc kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:165 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:147 (ví dụ, Ab33). Theo các phương án được ưu tiên, protein liên kết kháng nguyên ST2 ức chế sự liên kết của IL-33 với ST2. Theo các phương án được ưu tiên cụ thể, rối loạn tự miễn hoặc rối loạn viêm là bệnh hen, bệnh viêm đường ruột, viêm khớp dạng thấp, bệnh vẩy nến, bệnh viêm da dị ứng, bệnh xơ hóa, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính, Lupus ban đỏ hệ thống, bệnh xơ cứng, bệnh u hạt Wegener, bệnh Behchet, viêm mũi xoang, bệnh polip mũi, bệnh viêm phế quản tăng bạch cầu ái toan, và bệnh tim mạch.

Theo khía cạnh thứ mười ba, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất protein liên kết kháng nguyên ST2 theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm, thứ sáu, thứ bảy, hoặc thứ tám bằng cách nuôi cấy tế bào vật chủ tái tổ hợp theo khía cạnh thứ mười một và tách ly protein liên kết kháng nguyên ST2 ra khỏi môi trường nuôi cấy nói trên.

Theo khía cạnh thứ mười bốn, sáng chế đề xuất các protein liên kết kháng nguyên ST2 theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm, thứ sáu, thứ bảy, hoặc thứ tám mà các protein này cạnh tranh chéo với kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm:

- a) kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID:84 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:18;
- b) kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID:85 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:19;
- c) kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID:86 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:20;
- d) kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID:87 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:21;

e) kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID:88 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:22;

f) kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID:89 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:23;

g) kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID:90 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:24;

h) kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID:91 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:25;

i) kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID:92 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:26;

j) kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID:93 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:27;

k) kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID:94 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:28;

l) kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID:160 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:142;

m) kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID:161 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:143; và

n) kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID:162 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:144.

Theo khía cạnh thứ mười năm, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên ST2 tách ly, tốt hơn nếu kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của chúng, mà liên kết polypeptit bao gồm ST2 ở người vùng 1 và vùng 2 (SEQ ID NO:175), trong đó sự liên kết được ức chế đáng kể khi đột biến đơn được đưa vào ST2 ở người vùng 1 hoặc vùng 2 của polypeptit, trong đó đột biến đơn được chọn từ nhóm bao gồm L14R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, D97R, V104R, G138R, N152R, và V176R. Thuật ngữ “được ức chế đáng kể” có nghĩa là độ lệch đo được trong quá trình liên kết có ý nghĩa thống kê. Theo các phương án được ưu tiên, sự liên kết được ức chế đáng kể cho hai hoặc nhiều phần tử của nhóm trong đó có tất cả các phần tử của nhóm. Theo một

số phương án nhất định của khía cạnh thứ mười năm, sự liên kết cũng được hoạt hóa đáng kể khi đưa đột biến đơn vào ST2 ở người vùng 1 hoặc vùng 2 của polypeptit, trong đó đột biến đơn được chọn từ nhóm bao gồm L53R, R72A, và S73R. Thuật ngữ “được hoạt hóa đáng kể” có nghĩa là độ lệch đo được trong quá trình liên kết có ý nghĩa thống kê. Theo các phương án được ưu tiên, sự liên kết được hoạt hóa đáng kể cho tất cả các phần tử của nhóm. Theo một số phương án nhất định của khía cạnh thứ mười năm, protein liên kết ST2 cạnh tranh chéo để liên kết ST2 ở người với kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID:85 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:19. Theo các phương án được ưu tiên cụ thể, protein liên kết kháng nguyên là protein liên kết kháng nguyên của khía cạnh thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm, thứ sáu, thứ bảy, hoặc thứ tám.

Theo khía cạnh thứ mười sáu, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên của khía cạnh thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm, thứ sáu, thứ bảy, thứ tám, thứ mười bốn, hoặc thứ mười năm trong đó protein liên kết ST2 nói trên, tốt hơn là đoạn liên kết kháng nguyên hoặc kháng thể của chúng, liên kết một phần ST2 bao gồm các axit amin 33-44 và/hoặc 88-94 thuộc SEQ ID NO:1 được xác định bằng phép phân tích trao đổi hydro/đơteri.

Theo khía cạnh thứ mười bảy, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên, tốt hơn là đoạn liên kết kháng nguyên hoặc kháng thể của chúng, của khía cạnh thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm, thứ sáu, thứ bảy, thứ tám, thứ mười bốn, thứ mười năm, hoặc thứ mười sáu mà liên kết với ST2 tạo ra bề mặt phân chia, trong đó bề mặt phân chia này được tạo ra bằng sự liên kết nói trên bao gồm gốc của ST2 được chọn từ nhóm bao gồm K1, F2, P19, R20, Q21, G22, K23, Y26, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79, và Y81. Theo các phương án được ưu tiên của khía cạnh thứ mười bảy, bề mặt phân chia được tạo ra bằng sự liên kết nói trên bao gồm gốc của ST2 P19, R20, Q21, G22, K23, và/hoặc Y26, gốc của ST2 I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79, và/hoặc Y81, hoặc các gốc của ST2 P19, R20, Q21, G22, K23, Y26, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79, và Y81. Bề mặt phân chia có thể được xác định bằng độ chênh lệch tiếp xúc dung môi giữa ST2 đã liên kết và chưa liên kết và các gốc ở bề mặt phân chia được định nghĩa là các axit amin của chúng có hiệu số lớn hơn 10% và chúng tạo thành các liên kết hydro do nước gây ra với kháng thể nói trên

hoặc được xác định bằng các axit amin này có độ tương đồng ít nhất một nguyên tử trong khoảng 5Å của kháng thể.

Theo khía cạnh thứ mười một, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên ST2 tách ly, tốt hơn là đoạn liên kết kháng nguyên hoặc kháng thể của chúng, bao gồm a) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90% hoặc ít nhất 95% tính đồng dạng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:96, b) vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90% hoặc ít nhất 95% tính đồng dạng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30; c) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của a) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của b), d) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:96; e) vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30; f) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của d) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của e), g) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:107; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:118; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:129, h) vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:41; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:52; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:63, hoặc i) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của g) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của h).

Theo các phương án được ưu tiên của khía cạnh thứ mười tám, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm D28 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, I29 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, S30 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, N31 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, Y32 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, Y49 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, D50 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, N53 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, E55 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, T56 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, D91 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, D92 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, N93 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, F94 hoặc đột biến thay

thể bảo thủ của nó, hoặc L96 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó. Theo các phương án được ưu tiên khác, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm D28 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, N31 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, D50 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, N53 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, E55 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, D91 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, và D92 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó. Theo các phương án được ưu tiên khác nữa, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm D28, N31, D50, N53, E55, D91, và D92.

Khía cạnh thứ mười tám cũng bao gồm các protein liên kết ST2, tốt hơn là đoạn liên kết kháng nguyên hoặc kháng thể của chúng, trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm W33 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, I50 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, D57 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, R59 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, H99 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, G100 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, T101 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, S102 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, S103 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, D104 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, Y105 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, hoặc Y106 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó; trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm S102 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, S103 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, D104 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó, và Y105 hoặc đột biến thay thế bảo thủ của nó; và trong đó vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm S102, S103, D104, và Y105.

Theo một số phương án nhất định của khía cạnh thứ mười tám, protein liên kết kháng nguyên ST2 liên kết đặc hiệu ST2 ở người với ái lực nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M, ức chế sự liên kết của ST2 ở người với IL-33 ở người, làm giảm tín hiệu ST2 do IL-33 ở người gây ra trong các tế bào biểu hiện ST2 ở người, ức chế sự liên kết của ST2 ở khi đuôi dài IL-33 khi đuôi dài, làm giảm tín hiệu ST2 ở khi đuôi dài do IL-33 gây ra trong các tế bào biểu hiện ST2 ở khi đuôi dài, và/hoặc là kháng thể như là kháng thể ở người.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1. Phương pháp điều trị bằng mAb ST2 ức chế đáng kể IL-5 do IL-33 gây ra ở chuột nhắt Balb/c và C57Bl/6 trong dịch rửa phế quản (BALF).

FIG. 2. Phương pháp điều trị bằng mAb ST2 là có hiệu lực trong mô hình do chất gây dị ứng cho loài gián (CRA) gây ra của bệnh hen. Chuột được điều trị bằng kháng thể ST2 có các tế bào ưa eozin trong BALF ít hơn đáng kể so với chuột được điều trị bằng mẫu đối chứng isotyp Ig.

FIG. 3 Các mAb ST2 trong việc ức chế sự sản xuất IL-5 do IL-33 ở người gây ra từ các tế bào CD4⁺ T của các vật cho khác nhau. Đường (—) minh họa giá trị của đối chứng dương của IL-33 ở người kết hợp với IL-2 ở người mà không có sự ức chế. Đường (····) minh họa giá trị của đối chứng dương của IL-2 ở người. Đường (--) minh họa giá trị của đối chứng môi trường.

FIG. 4 Đáp ứng liều của IL-33 ở người trong thử nghiệm tế bào NK ở người.

FIG. 5 Sự giảm hoạt tính của IL-33 trong thử nghiệm tế bào NK ở người do các kháng thể ST2 có sẵn trên thị trường kháng lại Ab2 gây ra. Các dòng HB12, FB9 và 2A5 được lấy từ Công ty cổ phần Quốc tế MBL (MBL International Corporation). Dòng B4E6 được lấy từ hãng MD Biosciences. Dòng 97203 được lấy từ hãng R&D Systems.

FIG. 6 Vị trí của các vùng thuộc ST2 được liên kết bởi Ab2 như được xác định bằng HDX (xem Ví dụ 12). Vùng tương ứng với các axit amin 15-26 thuộc miền ngoại bào của ST2 được đánh dấu màu đỏ và vùng tương ứng với các axit amin 70-76 thuộc miền ngoại bào của ST2 được đánh dấu màu hồng đậm.

FIG. 7 Cấu trúc tổng thể của phức hợp ST2/Ab2 sc-dsFv. Hai phân tử Ab2 sc-dsFv được thể hiện dưới dạng tượng trưng bằng hình ảnh và được tô màu xanh lá mạ/màu xanh lá cây hoặc màu vàng nhạt/vàng cho cặp chuỗi nhẹ (LC)/chuỗi nặng (HC) theo tương ứng. Hai phân tử ST2 được thể hiện trong hình màu đỏ tươi và màu xanh.

FIG. 8 Bề mặt liên kết. ST2 được thể hiện bằng hình ảnh màu vàng. Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của Ab2 được thể hiện trong hình màu xám và màu vàng lúa mì. Các vòng CDR cho chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được tô màu theo thứ tự sau: CDR1: đỏ (HC) hoặc đỏ nhạt (LC); CDR2: xanh lá cây (HC) hoặc xanh lá cây nhạt (LC); và CDR3: xanh (HC) hoặc xanh nhạt (LC).

FIG. 9 Bản đồ tiềm năng bề mặt tĩnh điện của ST2 và Ab2 sc-dsFv. FIG. 9A) Tính bổ sung điện tích và bề mặt của ST2 và Ab2 sc-dsFv. Bề mặt phân chia liên kết được tô đậm trong vòng tròn. FIG. 9B) Bên trái: Ab2 (hình màu xám/màu vàng lúa mì) liên kết

với mảnh tích điện dương trên ST2 (bề mặt); Bên phải: ST2 (hình màu vàng) liên kết với mảnh có tính axit của Ab2 sc-dsFv (bề mặt). Đối với bản đồ tiềm năng tĩnh điện, bề mặt màu đỏ đại diện cho điện tích âm và bề mặt màu xanh da trời đại diện cho điện tích dương.

FIG. 10 Các phần còn lại nằm trong các miền biến đổi của Ab2 mà các miền này tạo thành bề mặt phân chia với ST2 khi được liên kết với kháng nguyên này. Các vùng CDR được đóng khung. Các phần còn lại nằm trong phạm vi bề mặt phân chia được in đậm. Các phần còn lại mà tạo thành các liên kết hydro hoặc các cầu nối muối với các axit amin ở trong ST2 được in nghiêng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tiêu đề của từng phần được sử dụng trong tài liệu này chỉ nhằm mục đích sắp xếp và không được hiểu là làm hạn chế đối tượng được mô tả của sáng chế. Toàn bộ các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong phần nội dung của bản mô tả này chỉ để được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các phương pháp kỹ thuật tiêu chuẩn có thể được sử dụng cho ADN tái tổ hợp, tổng hợp oligonucleotit, nuôi cấy và biến nạp mô, tinh chế protein, v. v.. Các phản ứng enzym và các phương pháp kỹ thuật tinh chế có thể được thực hiện theo các thông số kỹ thuật của nhà sản xuất hoặc như thường được thực hiện trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc như được mô tả trong tài liệu này. Nhìn chung, các quy trình và phương pháp kỹ thuật sau đây có thể được thực hiện theo các phương pháp thông thường được biết đến phổ biến trong lĩnh vực kỹ thuật này và như được mô tả trong nhiều tài liệu tham khảo tổng quát và cụ thể hơn khác nhau được trích dẫn và được mô tả trong toàn bộ bản mô tả. Xem, ví dụ, Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, xuất bản lần thứ ba, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn cho mục đích bất kỳ. Trừ khi có định nghĩa cụ thể được đề xuất, các thuật ngữ được sử dụng có liên quan đến, và các quy trình trong phòng thí nghiệm và các phương pháp kỹ thuật thuộc, hóa học phân tích, hóa học hữu cơ, và hóa học y dược được mô tả ở đây là những thuật ngữ được biết đến phổ biến và thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp kỹ thuật tiêu

chuẩn có thể được sử dụng để tổng hợp hóa học, phân tích hóa học, điều chế dược phẩm, xây dựng công thức bào chế chế phẩm, và phân phối thuốc và điều trị cho bệnh nhân.

ST2

Các protein liên kết kháng nguyên được mô tả ở đây liên kết với ST2. ST2 được biểu hiện dưới dạng cả biến thể không truyền tín hiệu dạng có thể hòa tan (ST2 hoặc sST2 dạng có thể hòa tan) và dạng màng kéo dài có độ dài đầy đủ (FL ST2, ST2 hoặc ST2L). Trình tự axit amin của ST2L ở người dùng làm ví dụ minh họa được đề cập ở đây trong Bảng 1. Protein cũng được tạo thành từ một số miền: Các axit amin 1-18 tương ứng với trình tự dẫn đầu mà có thể được cắt trong suốt quá trình xử lý protein trong các tế bào của động vật có vú; các axit amin 19-331 tương ứng với miền ngoại bào; các axit amin 332-350 tương ứng với miền xuyên màng; và các axit amin 351-556 tương ứng với miền nội bào. Theo các phương án được ưu tiên, protein liên kết kháng nguyên liên kết với miền ngoại bào của ST2L và ngăn cản sự tương tác của ST2 với IL-33. Trình tự axit amin của IL-33 ở người được đề cập trong Bảng 1.

Các tín hiệu IL-33 thông qua thụ thể dị đime bao gồm ST2L và AcP. Trình tự axit amin của AcP ở người dùng làm ví dụ minh họa được đề cập trong Bảng 1. Protein này cũng được tạo thành từ một số miền: Các axit amin 1-20 tương ứng với trình tự dẫn đầu mà có thể được cắt trong suốt quá trình xử lý protein trong các tế bào của động vật có vú; các axit amin 21-367 tương ứng với miền ngoại bào; các axit amin 368-388 tương ứng với miền xuyên màng; và các axit amin 389-570 tương ứng với miền nội bào. Theo các phương án dùng làm ví dụ minh họa, protein liên kết kháng nguyên ST2 liên kết ST2L và ngăn cản tín hiệu do IL-33 gây ra trong các tế bào biểu hiện ST2L và AcP.

Bảng 1

Trình tự axit amin ST2 ở người (SEQ ID NO:1) MGFWILAILTILMYSTAAKFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKPSYTVDWYYS QTNKSIPTQERNRVFASGQLLKFLPAXVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTI YKKQSDCNVPDYLMYSTVSGSEKNSKIYCPTIDL YNWTAPLEWFKNCQALQ GSRYRAHKSFLVIDNVMTEDAGDYTCKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQ GFSLFPVIGAPAQNEIKEVEIGKNANLTCSACFGKGTQFLAAVLWQLNGTKI TDFGEPRIQQEEGQNQSFSNGLACLDMVLRIADVKEEDLLLQYDCLALNLH GLRRHTVRLSRKNPIDHHSIYCIIAVCSVFLMLINVLVIILKMFWIEATLLWR DIAKPYKTRNDGKLYDAYVVYPRNYKSSTDGASRVEHFVHQILPDVLENKC GYTLCIYGRDMLPGEDVVTAVETNIRKSRRHIFILTPQITHNKEFAYEQEVAL HCALIQNDAKVILIEMEALSELDMQLQAEALQDSLQHLMKVQGTIKWREDHI ANKRSLNSKFWKHVRYQMPVPSKIPRKASSLTPLAAQKQ X = E hoặc A
Trình tự axit amin AcP ở người (SEQ ID NO:2) MTLLWCVVSLYFYGILQSDASERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFE HFLKFNYSTAHSAGLTLIWYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLFWRP TLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAFFLEVQKDSFCNPSMKLPVHKL YIEYG IQRITCPNVDGYFPSSVKPTITWYMGCYKIQNFNNVIPEGMNL SFLIALISNN GNYTCVVVTPENGRTFHLTRTLTVKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHV VYEKEP GEELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDDITIDVTINESISHSRTEDETR TQILSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAKGEVAKAAKVQKVPAPRYTVELACG FGATVLLVVILIVVYHVYWLEMVLFYRAHFGTDETILDGKEYDIYVSYARN AEEEEFVLLTLRGVLENEFGYKLCIFDRDSLPGGIVTDETL SFIQKSRRLLVVL SPNYVLQGTQALLELKAGLENMASRGNINVILVQYKAVKETKV KELKRAK TVLTVIKWKGEKSKYPQGRFWKQLQVAMPVKKSPRRSSSDEQGLSYSSLKN V
Trình tự axit amin IL-33 ở người (SEQ ID NO:3) MKPKMKYSTNKISTAKWKNTASKALCFKLGKSQQKAKEVCPMYFMKLRS GLMIKKEACYFRRETTKRPSLKTGRKHKRHLVLAACQQQSTVECFAGISG VQKYTRALHDSSITGISPITEYLASLSTYNDQSITFALEDES YEIYVEDLKKDE KKDKVLLSYYESQHPSNESGDGVDGKMLMVTLSPTKDFWLHANNKEHSVE LHKCEKPLPDQAFFVLHNMHSNCVSFECKTDPGVFIGVKDNHLALIKVDSSE NLCTENILFKLSET

Các phương án dùng làm ví dụ minh họa của sáng chế liên kết cả ST2 ở người và ở khỉ đuôi dài với ái lực cao, trong đó có các phương án liên kết với ái lực cao và ức chế sự tương tác của IL-33 khi đuôi dài đến ST2 ở khỉ đuôi dài. Những đặc tính này cho phép các nghiên cứu về độc tính cung cấp nhiều thông tin ở các động vật linh trưởng không phải con người.

Trình tự axit amin dùng làm ví dụ minh họa của ST2L ở khi đuôi dài được đề cập trong Bảng 2. Protein này được tạo thành từ một số miền: các axit amin 1-18 tương ứng với trình tự dẫn đầu mà có thể được cắt trong suốt quá trình xử lý protein trong các tế bào của động vật có vú; các axit amin 19-331 tương ứng với miền ngoại bào; các axit amin 332-350 tương ứng với miền xuyên màng; và các axit amin 351-556 tương ứng với miền nội bào.

Trình tự axit amin dùng làm ví dụ minh họa của AcP ở khi đuôi dài được đề cập trong Bảng 2. Protein này được tạo thành từ một số miền: các axit amin 1-20 tương ứng với trình tự dẫn đầu mà có thể được cắt trong suốt quá trình xử lý protein trong các tế bào của động vật có vú; các axit amin 21-367 tương ứng với miền ngoại bào; các axit amin 368-388 tương ứng với miền xuyên màng; và các axit amin 389-570 tương ứng với miền nội bào.

Trình tự axit amin dùng làm ví dụ minh họa của khi đuôi dài IL-33 được đề cập trong Bảng 2.

Bảng 2

Trình tự axit amin của ST2 ở khi đuôi dài (SEQ ID NO:4)
MGLWILAILTILVYSTAAKFSKQSWGLENEALIVRCPRQGKSSYIVDWYYSQ TNKSIPTQERNRVFASGQLLKFLPAEVADSGIYTCIVRSPTFNRTGYANVTIY KKQPDCNVPDYLMYSTVSGSEKNSKIYCPTIDLYNWTAPLEWFKNCQALQG SRYKAHKSFLVIDNVMTDDAGDYTCKFIHNENGANYSVTATRSFTVKDEQG FSRFPVIRAPAHNETKEVEIGENTNLTCACFGKGAQFLATVQWQLNGNKIT DFSEPRIQQEEGQNSFSNGLACVNTVLRIADVKEEDLLLRYDCLALNLHGL RRHTIRLSRKNPIDHQSTYCIHAVCSVLLMLNILVIILKTFWIEATLLWRDIAK PYKTRNDGKLYDAYVIYPRNYTSSADGASRVEYFVHQILPDVLENKCGYTL CIYGRDMLPGEDVVTAVETNIRKSRRHIFILTPQITHSEEFAYEQEVALHSALI QNDSKVILIEMEALSELDMLQAEALQDSLRHLMEVQGTIKWREDHVANKRS LNSKFWKHVRYQMPVPSKMMPRKASSLTSLAAQKQ
Trình tự axit amin của AcP ở khi đuôi dài (SEQ ID NO:5)

MTLLWCVVSLYFYGILQSDASERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLFE
HFLKFNYSTAHSAGLTLIWYWTRQDRDLEEPINFRLPENRISKEKDVLFWRP
TLLNDTGNYTCMLRNTTYCSKVAFPLEVQKDSCFNSPMKLPVHKL YIEYG
IQRITCPNVDGYFPSSVKPTITWYMGCKYIQNFNNVIPEGMNLSFLIAFISNG
NYTCVVVTPENGRTFHLTRTLTVKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHVVYEKEPG
EELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPDDIPIDVTINESISHSRTEDETRT
QILSIKKVTSEDLKRSYVCHARSAKGEVAKAATVKQKVPAPRYTVELACGF
GATVLLVVILIVVYHVYWLEMVLFYRAHFGTDETILDGKEYDIYVSYARNA
EEEEFVLLTLRGVLENEFGYKLCIFDRDSLPGGIVTDETL SFIQKSRRLLVVLS
PNYVLQGTQALLELKAGLENMASQGNINVILVQYKAVKETKVKELKRAKT
VLTVIKWKGEKSKYPQGRFWKQLQVAMPVKKSPRRSSSDEQGLSYSSLKN
V

Trình tự axit amin của IL-33 khi đuôi dài (SEQ ID NO:6)

MKPKMKYSTNKISTAKRKNTASKALCFKLGKSQQKAKEVCHVYFMKLRSG
LMIKKEACYFRRETTKRPSLKTGGKHKGHLVLAACQQQSTVECFAGISGV
PKYTRALHDSSITGISPITESLASLSTYNDQSITFALEDES YEIYVEDLKKDKK
KDKVLLSYYESQHPSSSESGDGDVGKMLMVTLSPTKDFWLQANNKEHSVEL
HKCEKPLPDQAFFVLHNRSFNCVSFECKTDPGVFIGVKDNHLALIKVDHSEN
LGSENI LFKLSEI

Các protein liên kết kháng nguyên ST2

Sáng chế đề xuất các protein liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với ST2. Các phương án về các protein liên kết kháng nguyên bao gồm các peptit và/hoặc các polypeptit mà liên kết đặc hiệu với ST2. Các peptit hoặc polypeptit này có thể tùy ý bao gồm một hoặc nhiều sự biến đổi sau dịch mã. Các phương án về các protein liên kết kháng nguyên bao gồm các kháng thể và các đoạn của chúng, như được xác định ở đây theo nhiều cách khác nhau, mà liên kết đặc hiệu với ST2. Các protein này bao gồm các kháng thể liên kết đặc hiệu với ST2 ở người, trong đó có các kháng thể ức chế IL-33 khỏi sự liên kết và/hoặc hoạt hóa ST2.

Các protein liên kết kháng nguyên của sáng chế liên kết đặc hiệu với ST2. “Liên kết đặc hiệu” được sử dụng ở đây có nghĩa là protein liên kết kháng nguyên liên kết ưu tiên với ST2 so với các protein khác. Theo một số các phương án, “liên kết đặc hiệu” có nghĩa là protein liên kết kháng nguyên ST2 có ái lực cao hơn đối với ST2 so với các protein khác. Các protein liên kết kháng nguyên ST2 mà liên kết đặc hiệu với ST2 có thể có ái lực liên kết đối với ST2 ở người nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 2×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 3×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 4×10^{-7} M, nhỏ hơn

hoặc bằng 5×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 6×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 7×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 8×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 9×10^{-7} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 2×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 3×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 4×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 6×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 7×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 8×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 9×10^{-8} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 2×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 3×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 4×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 6×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 7×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 8×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 9×10^{-9} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 2×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 3×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 4×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 6×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 7×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 8×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 9×10^{-10} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 2×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 3×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 4×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 6×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 7×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 8×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 9×10^{-11} M, nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-12} M, nhỏ hơn hoặc bằng 2×10^{-12} M, nhỏ hơn hoặc bằng 3×10^{-12} M, nhỏ hơn hoặc bằng 4×10^{-12} M, nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-12} M, nhỏ hơn hoặc bằng 6×10^{-12} M, nhỏ hơn hoặc bằng 7×10^{-12} M, nhỏ hơn hoặc bằng 8×10^{-12} M, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 9×10^{-12} M.

Các phương pháp đo ái lực liên kết của protein liên kết kháng nguyên được biết đến phổ biến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp sử dụng phổ biến để xác định ái lực bao gồm Cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface Plasmon Resonance, SPR) (Morton và Myszkka “Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors” *Methods in Enzymology* (1998) 295, 268-294), Giao thoa màng sinh học, (Abdiche *et al* “Determining Kinetics and Affinities of Protein Interactions Using a Parallel Real-time Label-free Biosensor, the Octet” *Analytical Biochemistry* (2008) 377, 209-217), Thử nghiệm loại trừ động lực học (Kinetic Exclusion Assay, KinExA) (Darling và Brault “Kinetic exclusion assay technology: characterization of molecular interactions” *Assay and DrugDev Tech* (2004) 2, 647-657), nhiệt lượng đẳng nhiệt (Pierce *et al* “Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions” *Methods* (1999) 19, 213-221) và siêu ly tâm phân tích (Lebowitz

et al "Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review" *Protein Science* (2002), 11:2067–2079). Ví dụ 3 đề cập đến các phương pháp dùng làm ví dụ minh họa.

Cần hiểu rằng khi thực hiện việc tham chiếu đến các phương án khác nhau về các kháng thể liên kết ST2 ở đây, thì nó cũng bao gồm các đoạn liên kết ST2 của chúng. Đoạn liên kết ST2 bao gồm bất kỳ một trong các đoạn kháng thể hoặc các vùng được mô tả ở đây mà vẫn giữ được khả năng liên kết đặc hiệu với ST2. Đoạn liên kết ST2 có thể là bất kỳ một trong các giá đỡ được mô tả ở đây.

Theo các phương án điều trị cụ thể, protein liên kết kháng nguyên ST2 ức chế sự liên kết của ST2 với IL-33 và/hoặc ức chế một hoặc nhiều hoạt tính sinh học liên quan đến sự liên kết của ST2 với IL-33, ví dụ, tín hiệu do IL-33 gây ra. Các protein protein liên kết kháng nguyên như vậy được cho là "làm trung hòa." Theo một số phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên ST2 làm trung hòa liên kết đặc hiệu ST2 và ức chế sự liên kết của ST2 với IL-33 khỏi bất kỳ vị trí nào nằm trong khoảng 10% đến 100%, như bằng ít nhất khoảng 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% hoặc hơn. Ví dụ, các protein liên kết kháng nguyên ST2 có thể được thử nghiệm về khả năng làm trung hòa bằng cách xác định khả năng protein liên kết kháng nguyên ngăn chặn sự liên kết của IL-33 với ST2 hoặc IL-33 với các đồng thụ thể ST2 và AcP, xem, ví dụ, các thử nghiệm chặn IL-33 trong Ví dụ 6. Theo cách thay thế, các protein liên kết kháng nguyên ST2 có thể được thử nghiệm về khả năng làm trung hòa trong một thử nghiệm đo tác dụng của sự có mặt protein liên kết kháng nguyên ST2 trong thử nghiệm đo chức năng sinh học do IL-33 làm trung gian. Ví dụ, ái lực của IL-33 để tạo ra một phản ứng sinh học, như là truyền tín hiệu trong nội bào hoặc biểu hiện mRNA tăng của các chất trung gian hoặc sự bài tiết của các chất trung gian như là các cytokin và chemokin từ các tế bào như là các tế bào ưa eozin, các bạch cầu ưa kiềm, các tế bào T, các dưỡng bào, các tế bào NK, các tế bào NKT, các bạch cầu trung tính, hoặc các tế bào hỗ trợ bẩm sinh. Ngoài ra, ái lực của IL-33 để đẩy mạnh sự phân hóa, sự sinh sôi, tồn tại, hướng hóa chất, thay đổi hình dạng hoặc các đặc tính kết dính của các tế bào như là các tế bào ưa eozin,

các bạch cầu ưa kiềm, các tế bào T, các dưỡng bào, các tế bào NK, các tế bào NKT, các bạch cầu trung tính, hoặc các tế bào hỗ trợ bẩm sinh. Ngoài ra, ái lực của IL-33 để tạo ra biểu hiện bề mặt tế bào của các chỉ thị cụ thể của việc hoạt hóa tế bào, như là CD11b, trên các tế bào như là các tế bào ưa eozin, các bạch cầu ưa kiềm, các tế bào T, các dưỡng bào, các tế bào NK, các tế bào NKT, các bạch cầu trung tính, hoặc các tế bào hỗ trợ bẩm sinh. Các phương pháp dùng làm ví dụ minh họa được đề cập trong các Ví dụ 7-10.

Các phương án của các protein liên kết kháng nguyên bao gồm cấu trúc giá đỡ, như được xác định ở đây theo nhiều cách khác nhau, với một hoặc nhiều vùng xác định bổ sung (các CDR). Các phương án còn bao gồm các protein liên kết kháng nguyên bao gồm cấu trúc giá đỡ với một hoặc nhiều vùng biến đổi của kháng thể, hoặc nặng hoặc nhẹ. Các phương án bao gồm các kháng thể mà bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm Ab1 vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCv), Ab2 LCv, Ab3 LCv, Ab4 LCv, Ab5 LCv, Ab6 LCv, Ab7 LCv, Ab8 LCv, Ab9 LCv, Ab10LCv, Ab11 LCv, Ab30 LCv, Ab32 LCv, và Ab33 LCv (SEQ ID NO:95-105, 163-165, lần lượt theo tương ứng) và/hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm Ab1 vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCv), Ab2 HCv, Ab3 HCv, Ab4 HCv, Ab5 HCv, Ab6 HCv, Ab7 HCv, Ab8 HCv, Ab9 HCv, Ab10 HCv, Ab11HCv, Ab30HCv, Ab32HCv, và Ab33HCv (SEQ ID NO:29-39, 145-147, lần lượt theo tương ứng), và các đoạn, các dẫn xuất, các mutein, và các biến thể của chúng.

Chuỗi nhẹ dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab1 LCv là chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:84.

Chuỗi nhẹ dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab2 LCv là chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:85.

Chuỗi nhẹ dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab3 LCv là chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:86.

Chuỗi nhẹ dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab4 LCv là chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:87.

Chuỗi nhẹ dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab5 LCv là chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:88.

Chuỗi nhẹ dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab6 LCv là chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:89.

Chuỗi nhẹ dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab7 LCv là chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:90.

Chuỗi nhẹ dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab8 LCv là chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:91.

Chuỗi nhẹ dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab9 LCv là chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:92.

Chuỗi nhẹ dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab10 LCv là chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:93.

Chuỗi nhẹ dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab11 LCv là chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:94.

Chuỗi nhẹ dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab30 LCv là chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:160.

Chuỗi nhẹ dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab32 LCv là chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:161.

Chuỗi nhẹ dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab33 LCv là chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:162.

Chuỗi nặng dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab1 HCv là chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:18.

Chuỗi nặng dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab2 HCv là chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:19.

Chuỗi nặng dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab3 HCv là chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20.

Chuỗi nặng dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab4 HCv là chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:21.

Chuỗi nặng dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab5 HCv là chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:22.

Chuỗi nặng dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab6 HCv là chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:23.

Chuỗi nặng dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab7 HCv là chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:24.

Chuỗi nặng dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab8 HCv là chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:25.

Chuỗi nặng dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab9 HCv là chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:26.

Chuỗi nặng dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab10 HCv là chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27.

Chuỗi nặng dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab11 HCv là chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28.

Chuỗi nặng dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab30 HCv là chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:142.

Chuỗi nặng dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab32 HCv là chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:143.

Chuỗi nặng dùng làm ví dụ minh họa bao gồm Ab33 HCv là chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:144.

Các ví dụ bổ sung về các giá đỡ được hình dung bao gồm: fibronectin, neocarzinostatin CBM4-2, các lipocalin, thụ thể tế bào T, vùng protein -A (protein Z), Im9, các protein TPR, các miền ngón tay kẽm, pVIII, polypeptit tụy của chim, GCN4, miền WW, miền tương đồng Src 3, các miền PDZ, TEM-1 beta-lactamaza, thioredoxin, nucleaza tụ cầu khuẩn, các miền ngón tay PHD, CL-2, BPTI, APPI, HPSTI, ecotin, LACI-D1, LDTI, MTI-II, các độc tố bọt cạp, peptit defensin-A côn trùng, EETI-II, Min-23, CBD, PBP, xytocrom b-562, các miền thụ thể Ldl, gama-crystallin, ubiquitin, transferrin, và hoặc các miền giống lectin loại C. Các giá đỡ không phải của kháng thể và cách sử dụng chúng được xem xét trong tài liệu của Gebauer và Skerra, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13:245-255 (2009) và Binz et al., *Nat. Biotech.*, 23 (10):1257-1268 (2005), toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các khía cạnh của sáng chế bao gồm các kháng thể bao gồm các vùng biến đổi sau đây: Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO:95/SEQ ID NO:29), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO:96/SEQ ID NO:30), Ab3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO:97/SEQ ID NO:31), Ab4 LCv/Ab4 HCv (SEQ ID NO:98/SEQ ID NO:32), Ab5 LCv/Ab5 HCv (SEQ ID NO:99/SEQ ID NO:33), Ab6 LCv/Ab6 HCv (SEQ ID NO:100/SEQ ID NO:34), Ab7 LCv/Ab7 HCv (SEQ ID NO:101/SEQ ID NO:35), Ab8 LCv/Ab8 HCv (SEQ ID NO:102/SEQ ID NO:36), Ab9 LCv/Ab9 HCv (SEQ ID NO:103/SEQ ID NO:37), Ab10 LCv/Ab10 HCv (SEQ ID NO:104/SEQ ID NO:38), Ab11 LCv/Ab11 HCv (SEQ ID NO:105/SEQ ID NO:39), Ab30 LCv/Ab30 HCv (SEQ ID NO:163/SEQ ID NO:145), Ab32 LCv/Ab32 HCv (SEQ ID NO:164/SEQ ID NO:146), Ab33 LCv/Ab33 HCv (SEQ ID NO:165/SEQ ID NO:147), và các dạng kết hợp của chúng, cũng như các đoạn, các dẫn xuất, các mutein và các biến thể của chúng.

Các kháng thể dùng làm ví dụ minh họa của sáng chế bao gồm Ab1 (SEQ ID NO:84/SEQ ID NO:18), Ab2 (SEQ ID NO:85/SEQ ID NO:19), Ab3 (SEQ ID NO:86/SEQ ID NO:20), Ab4 (SEQ ID NO:87/SEQ ID NO:21), Ab5 (SEQ ID NO:88/SEQ ID NO:22), Ab6 (SEQ ID NO:89/SEQ ID NO:23), Ab7 (SEQ ID NO:90/SEQ ID NO:24), Ab8 (SEQ ID NO:91/SEQ ID NO:25), Ab9 (SEQ ID NO:92/SEQ ID NO:26), Ab10 (SEQ ID NO:93/SEQ ID NO:27), Ab11 (SEQ ID NO:94/SEQ ID NO:28), Ab30 (SEQ ID NO:160/SEQ ID NO:142), Ab32 (SEQ ID NO:161/SEQ ID NO:143), và Ab33 (SEQ ID NO:162/SEQ ID NO:144).

Diễn hình, mỗi vùng biến đổi của chuỗi nhẹ hoặc nặng của kháng thể bao gồm ba CDR. Vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR1 của chuỗi nặng (HCDR1), CDR2 của chuỗi nặng (HCDR2), và CDR3 của chuỗi nặng (HCDR3). Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ (LCDR1), CDR2 của chuỗi nhẹ (LCDR2), và CDR3 của chuỗi nhẹ (LCDR3). Theo một số phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên bao gồm một hoặc nhiều CDR chứa trong các vùng biến đổi được ưu tiên được mô tả ở đây.

Các ví dụ về các CDR này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở:

các CDR của Ab1 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:106), LCDR2 (SEQ ID NO:117), và LCDR3 (SEQ ID NO:128);

các CDR của Ab2 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:107), LCDR2 (SEQ ID NO:118), và LCDR3 (SEQ ID NO:129);

các CDR của Ab3 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:108), LCDR2 (SEQ ID NO:119), và LCDR3 (SEQ ID NO:130);

các CDR của Ab4 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:109), LCDR2 (SEQ ID NO:120), và LCDR3 (SEQ ID NO:131);

các CDR của Ab5 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:110), LCDR2 (SEQ ID NO:121), và LCDR3 (SEQ ID NO:132);

các CDR của Ab6 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:111), LCDR2 (SEQ ID NO:122), và LCDR3 (SEQ ID NO:133);

các CDR của Ab7 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:112), LCDR2 (SEQ ID NO:123), và LCDR3 (SEQ ID NO:134);

các CDR của Ab8 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:113), LCDR2 (SEQ ID NO:124), và LCDR3 (SEQ ID NO:135);

các CDR của Ab9 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:114), LCDR2 (SEQ ID NO:125), và LCDR3 (SEQ ID NO:136);

các CDR của Ab10 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:115), LCDR2 (SEQ ID NO:126), và LCDR3 (SEQ ID NO:137);

các CDR của Ab11 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:116), LCDR2 (SEQ ID NO:127), và LCDR3 (SEQ ID NO:138);

các CDR của Ab30 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:166), LCDR2 (SEQ ID NO:169), và LCDR3 (SEQ ID NO:172);

các CDR của Ab32 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:167), LCDR2 (SEQ ID NO:170), và LCDR3 (SEQ ID NO:173);

các CDR của Ab33 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:168), LCDR2 (SEQ ID NO:171), và LCDR3 (SEQ ID NO:174);

các CDR của Ab1 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:40), HCDR2 (SEQ ID NO:51), và HCDR3 (SEQ ID NO:62);

các CDR của Ab2 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:41), HCDR2 (SEQ ID NO:52), và HCDR3 (SEQ ID NO:63);

các CDR của Ab3 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:42), HCDR2 (SEQ ID NO:53), và HCDR3 (SEQ ID NO:64);

các CDR của Ab4 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:43), HCDR2 (SEQ ID NO:54), và HCDR3 (SEQ ID NO:65);

các CDR của Ab5 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:44), HCDR2 (SEQ ID NO:55), và HCDR3 (SEQ ID NO:66);

các CDR của Ab6 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:45), HCDR2 (SEQ ID NO:56), và HCDR3 (SEQ ID NO:67);

các CDR của Ab7 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:46), HCDR2 (SEQ ID NO:57), và HCDR3 (SEQ ID NO:68);

các CDR của Ab8 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:47), HCDR2 (SEQ ID NO:58), và HCDR3 (SEQ ID NO:69);

các CDR của Ab9 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:48), HCDR2 (SEQ ID NO:59), và HCDR3 (SEQ ID NO:70);

các CDR của Ab10 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:49), HCDR2 (SEQ ID NO:60), và HCDR3 (SEQ ID NO:71);

các CDR của Ab11 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:50), HCDR2 (SEQ ID NO:61), và HCDR3 (SEQ ID NO:72);

các CDR của Ab30 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:148), HCDR2 (SEQ ID NO:151), và HCDR3 (SEQ ID NO:154);

các CDR của Ab32 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:149), HCDR2 (SEQ ID NO:152), và HCDR3 (SEQ ID NO:155); và

các CDR của Ab33 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:150), HCDR2 (SEQ ID NO:153), và HCDR3 (SEQ ID NO:156).

Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên bao gồm: A) polypeptit, ví dụ, chuỗi nhẹ, mà bao gồm LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm

các SEQ ID NO:106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 166, 167, và 168;LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 169, 170, và 171; và/hoặc LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 172, 173, và 174; và/hoặc B) polypeptit, ví dụ, chuỗi nặng, mà bao gồm HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 148, 149, và 150;HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 151, 152, và 153; và/hoặcHCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 154, 155, và 156.

Theo các phương án khác nữa, protein liên kết kháng nguyên bao gồm A) trình tự axit amin của chuỗi nhẹ mà bao gồm LCDR1, LCDR2, và LCDR3 của bất kỳ một trong Ab1 LCv, Ab2 LCv, Ab3 LCv, Ab4 LCv, Ab5 LCv, Ab6 LCv, Ab7 LCv, Ab8 LCv, Ab9 LCv, Ab10 LCv, Ab11 LCv, Ab30 LCv, Ab32 LCv, và Ab33 LCv và B) trình tự axit amin của chuỗi nặng mà bao gồm HCDR1, HCDR2, và HCDR3 của bất kỳ một trong Ab1 HCv, Ab2 HCv, Ab3 HCv, Ab4 HCv, Ab5 HCv, Ab6 HCv, Ab7 HCv, Ab8 HCv, Ab9 HCv, Ab10 HCv, Ab11 HCv, Ab30 HCv, Ab32 HCv, và Ab33 HCv.

Theo một số phương án nhất định, các CDR bao gồm chỉ có một, chỉ có hai, chỉ có ba, chỉ có bốn, chỉ có năm, chỉ có sáu đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ CDR dùng làm ví dụ minh họa trình bày ở đây.

Các khía cạnh của sáng chế bao gồm các kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164, và 165. Các khía cạnh của sáng chế bao gồm các kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146, và 147. Các khía cạnh khác nữa của sáng chế bao gồm các kháng thể bao gồm A) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164, và 165, và B) vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146, và 147.

Các kháng thể của sáng chế có thể bao gồm vùng hằng định bất kỳ được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Vùng hằng định của chuỗi nhẹ có thể là, ví dụ, vùng hằng định của chuỗi nhẹ loại kapa hoặc lamda, ví dụ, vùng hằng định của chuỗi nhẹ loại kapa hoặc lamda ở người. Vùng hằng định của chuỗi nặng có thể là, ví dụ, vùng hằng định của chuỗi nặng loại alpha, delta, epsilon, gama, hoặc mu, ví dụ, vùng hằng định của chuỗi nặng loại alpha, delta, epsilon, gama, hoặc mu ở người. Theo một phương án, vùng hằng định của chuỗi nhẹ hoặc nặng là một đoạn, dẫn xuất, biến thể, hoặc mutein của vùng hằng định có trong tự nhiên.

Các khía cạnh của sáng chế bao gồm các kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164, và 165 chỉ có một, chỉ có hai, chỉ có ba, chỉ có bốn, chỉ có năm, chỉ có sáu, chỉ có bảy, chỉ có tám, chỉ có chín, hoặc chỉ có mười đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin. Các khía cạnh của sáng chế bao gồm các kháng thể bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146, và 147 chỉ có một, chỉ có hai, chỉ có ba, chỉ có bốn, chỉ có năm, chỉ có sáu, chỉ có bảy, chỉ có tám, chỉ có chín, hoặc chỉ có mười đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin. Các khía cạnh khác nữa của sáng chế bao gồm các kháng thể bao gồm A) bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164, và 165 chỉ có một, chỉ có hai, chỉ có ba, chỉ có bốn, chỉ có năm, chỉ có sáu, chỉ có bảy, chỉ có tám, chỉ có chín, hoặc chỉ có mười đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin, và B) vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146, và 147 chỉ có một, chỉ có hai, chỉ có ba, chỉ có bốn, chỉ có năm, chỉ có sáu, chỉ có bảy, chỉ có tám, chỉ có chín, hoặc chỉ có mười đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin.

Trong một biến thể, protein liên kết kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% đồng dạng với trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164, và 165.

Trong một biến thể, protein liên kết kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% đồng dạng với trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146, và 147. Theo một phương án khác nữa, protein liên kết kháng nguyên bao gồm A) trình tự axit amin mà ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% đồng dạng với trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 163, 164, và 165, và B) trình tự axit amin mà ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% đồng dạng với trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 145, 146, và 147.

Theo một số phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên bao gồm CDR3 của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng. Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 172, 173, 174, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 154, 155, và 156. Theo một số phương án nhất định, trình tự axit amin bao gồm chỉ có một, chỉ có hai, chỉ có ba, chỉ có bốn, chỉ có năm, chỉ có sáu đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự dùng làm ví dụ minh họa được nêu trong các SEQ ID NO: 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 172, 173, 174, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 154, 155, và 156. Vì vậy, các phương án của sáng chế bao gồm protein liên kết kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%,

hoặc ít nhất 99% đồng dạng với trình tự axit amin được chọn từ nhóm các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 172, 173, 174, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 154, 155, và 156.

Theo một số phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên bao gồm CDR2 của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng. Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 169, 170, 171, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 151, 152, và 153. Theo một số phương án nhất định, trình tự axit amin gồm chỉ có một, chỉ có hai, chỉ có ba, chỉ có bốn, chỉ có năm, chỉ có sáu đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự dùng làm ví dụ minh họa được nêu trong các SEQ ID NO: 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 169, 170, 171, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 151, 152, và 153. Vì vậy, các phương án của sáng chế bao gồm protein liên kết kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% đồng dạng với trình tự axit amin được chọn từ nhóm các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 169, 170, 171, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 151, 152, và 153.

Theo một số phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên bao gồm CDR1 của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng. Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 166, 167, 168, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 148, 149, và 150. Theo một số phương án nhất định, trình tự axit amin bao gồm chỉ có một, chỉ có hai, chỉ có ba, chỉ có bốn, chỉ có năm, chỉ có sáu đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự dùng làm ví dụ minh họa được nêu trong các SEQ ID NO: 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 166, 167, 168, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 148, 149, và 150. Vì vậy, các phương án của sáng chế bao gồm protein liên kết kháng nguyên bao gồm trình tự axit amin mà ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%,

ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% đồng dạng với trình tự axit amin được chọn từ nhóm các trình tự được nêu trong các SEQ ID NO: 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 166, 167, 168, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 148, 149, và 150.

Các protein liên kết kháng nguyên của sáng chế bao gồm các giá đỡ của các kháng thể truyền thống, trong đó có các kháng thể đơn dòng ở người, các kháng thể đặc hiệu kép, các kháng thể hóa trị hai, các kháng thể mini, các kháng thể miền, các kháng thể tổng hợp (đôi khi được gọi trong tài liệu này là “các dạng bất chức kháng thể”), các kháng thể khảm, các dạng dung hợp kháng thể (đôi khi được gọi trong tài liệu này là “các liên hợp kháng thể”), và các đoạn của mỗi loại này, theo thứ tự tương ứng. Các CDR được mô tả ở trên, bao gồm cả các dạng kết hợp khác nhau của các CDR, có thể được ghép vào giá đỡ bất kỳ trong số các giá đỡ sau đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể” chỉ các dạng khác nhau của các protein đơn hoặc phức hợp bao gồm một hoặc nhiều chuỗi polypeptit mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên, theo nhiều cách khác nhau được mô tả ở đây. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể được sản xuất bằng các phương pháp kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Theo các phương án bổ sung, các kháng thể được sản xuất bằng phương pháp phân tách hóa học hoặc enzym của các kháng thể có trong tự nhiên. Theo một khía cạnh khác, kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm: a) kháng thể ở người; b) kháng thể được làm tương thích với người; c) kháng thể khảm; d) kháng thể đơn dòng; e) kháng thể đa dòng; f) kháng thể tái tổ hợp; g) đoạn liên kết kháng nguyên; h) kháng thể chuỗi đơn; i) kháng thể hóa trị hai; j) kháng thể hóa trị ba, k) kháng thể hóa trị bốn, l) đoạn Fab; m) đoạn F (ab')₂, n) kháng thể IgA, o) kháng thể IgD, p) kháng thể IgE, q) kháng thể IgG1, r) kháng thể IgG2, s) kháng thể IgG3, t) kháng thể IgG4, và u) kháng thể IgM.

Vùng hoặc miền biến đổi bao gồm ít nhất ba CDR của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ được đặt vào trong vùng khung (các vùng khung được chỉ định FR1, FR2, FR3, và FR4). Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Protein of Immunological Interest*, Public Health Service N. I. H., Bethesda, MD. Các đơn vị cấu trúc của kháng thể truyền thống thông thường bao gồm bốn đơn vị cấu thành (tetrame). Mỗi cấu trúc tetrame thông thường bao gồm hai cặp giống hệt nhau của chuỗi polypeptit, mỗi cặp có một chuỗi "nhẹ" và một chuỗi "nặng". Phần đầu amin của mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi gồm khoảng 100

đến 110 hoặc hơn các axit amin chủ yếu chịu trách nhiệm nhận diện kháng nguyên. Phần đầu cacboxy của mỗi chuỗi xác định vùng hằng định chủ yếu chịu trách nhiệm về vai trò đáp ứng lại kích thích. Các chuỗi nhẹ ở người được phân loại là các chuỗi nhẹ kappa hoặc lamda. Các chuỗi nặng được phân loại là mu, delta, gama, alpha, hoặc epsilon, và xác định các lớp kháng thể là IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE, tương ứng. IgG có một số tiểu lớp, bao gồm, nhưng không giới hạn ở IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. IgM có các tiểu lớp, bao gồm, nhưng không giới hạn ở IgM1 và IgM2. Các phương án của sáng chế bao gồm tất cả các lớp và tiểu lớp của các kháng thể mà chứa vùng biến đổi hoặc CDR của các protein liên kết kháng nguyên, như được mô tả ở đây.

Một số kháng thể có trong tự nhiên, như các kháng thể được tìm thấy trong lạc đà và lạc đà không bướu, là các đime bao gồm hai chuỗi nặng và không bao gồm chuỗi nhẹ nào. Sáng chế bao gồm các kháng thể dạng đime của hai chuỗi nặng, hoặc các đoạn của chúng, mà chúng có thể liên kết với ST2.

Các vùng biến đổi của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ thông thường biểu hiện cùng một cấu trúc tổng quát của các vùng khung (FR) tương đối bảo thủ được nối lại với nhau bởi ba vùng siêu biến, tức là, các vùng xác định tính bổ khuyết hoặc các CDR. Các CDR thì chủ yếu chịu trách nhiệm nhận diện kháng nguyên và liên kết. Các CDR từ hai chuỗi của mỗi cặp được liên kết bởi các vùng khung, cho phép liên kết với một epitop đặc hiệu. Từ đầu N đến đầu C, cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng bao gồm các miền FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. Việc phân bố các axit amin tới mỗi miền là theo các định nghĩa của Kabat.

Các CDR tạo thành các điểm tiếp xúc bề mặt chính để liên kết kháng nguyên. CDR3 hoặc chuỗi nhẹ và, cụ thể là, CDR3 của chuỗi nặng có thể tạo thành các yếu tố quyết định quan trọng nhất trong việc liên kết kháng nguyên trong các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Trong một số các kháng thể, CDR3 của chuỗi nặng có vẻ tạo thành khu vực tiếp xúc chính giữa kháng nguyên và kháng thể. Các phương pháp tuyển chọn in vitro trong đó chỉ riêng có CDR3 được biến đổi có thể được sử dụng để biến đổi các đặc tính liên kết của kháng thể hoặc xác định các gốc nào góp phần vào sự liên kết của kháng nguyên.

Các kháng thể có trong tự nhiên thường bao gồm trình tự tín hiệu, trình tự này định hướng kháng thể đi vào con đường tế bào để tiết protein và trình tự này thông thường không có mặt trong kháng thể thành thực. Polynucleotit mã hóa kháng thể của sáng chế có thể mã hóa trình tự tín hiệu có trong tự nhiên hoặc trình tự tín hiệu khác loại như được mô tả dưới đây.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên là kháng thể bao gồm từ một đến sáu CDR dùng làm ví dụ minh họa được mô tả ở đây. Các kháng thể của sáng chế có thể là loại bất kỳ trong đó có kháng thể IgM, IgG (trong đó có IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgD, IgA, hoặc IgE. Theo phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên là kháng thể loại IgG, ví dụ, kháng thể IgG1.

Theo một số phương án, ví dụ khi protein liên kết kháng nguyên là kháng thể với các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng hoàn chỉnh, thì các CDR đều xuất phát từ cùng một loài, ví dụ, con người. Theo cách thay thế, ví dụ theo các phương án trong đó protein liên kết kháng nguyên chứa ít hơn sáu CDR từ các trình tự nêu trên, các CDR bổ sung có thể hoặc là xuất phát từ loài khác hoặc có thể là các CDR ở người khác biệt so với các CDR được mô tả trong các trình tự dùng làm ví dụ minh họa. Ví dụ, các vùng HCDR3 và LCDR3 từ các trình tự thích hợp được xác định ở đây có thể được sử dụng cùng với HCDR1, HCDR2, LCDR1, và LCDR2 được tùy ý lựa chọn từ các trình tự kháng thể ở người khác nhau hoặc ở loài khác thay thế, hoặc các dạng kết hợp của chúng. Ví dụ, các CDR của sáng chế có thể thay thế các vùng CDR của các kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm tương thích với người có liên quan về mặt thương mại.

Các phương án cụ thể sử dụng các thành phần giá đỡ của các protein liên kết kháng nguyên là các thành phần cấu tạo ở người. Tuy nhiên, theo một số phương án, các thành phần giá đỡ có thể là hỗn hợp của các loài khác nhau. Như vậy, nếu protein liên kết kháng nguyên là kháng thể, thì kháng thể này có thể là kháng thể khảm và/hoặc kháng thể được làm tương thích với người. Nhìn chung, cả “các kháng thể khảm” và các kháng thể được làm tương thích với người” chỉ các kháng thể mà kết hợp các vùng của một loài trở lên. Ví dụ, “các kháng thể khảm” theo truyền thống bao gồm (các) vùng biến đổi từ chuột nhắt (hoặc chuột cống, trong một số trường hợp) và (các) vùng hằng định từ người.

“Các kháng thể được làm tương thích với người” nhìn chung chỉ các kháng thể không phải ở người mà đã có các vùng khung trong miền biến đổi được trao đổi cho các trình tự được tìm thấy trong các kháng thể ở người. Nhìn chung, trong kháng thể được làm tương thích với người, toàn bộ kháng thể, ngoại trừ một hoặc nhiều CDR, được mã hóa bởi polynucleotit có nguồn gốc từ người hoặc tương đồng với kháng thể như vậy ngoại trừ trong phạm vi một hoặc nhiều CDR. Các CDR, một số hoặc toàn bộ trong số này được mã hóa bởi các axit nucleic có nguồn gốc ở một sinh vật không phải người, được ghép vào khung gấp nếp beta của vùng biến đổi của kháng thể ở người để tạo ra kháng thể, tính đặc hiệu của kháng thể được xác định bởi các CDR được ghép vào. Cách tạo ra các kháng thể này được mô tả trong, ví dụ., WO 92/11018, Jones 1986, *Nature* 321:522-525, Verhoeven *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-1536. Các kháng thể được làm tương thích với người cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chuột nhắt có hệ miễn dịch biến đổi gen. Roque *et al.*, 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654. Theo các phương án dùng làm ví dụ minh họa được mô tả ở đây, các CDR được xác định là ở người, và do đó cả các kháng thể được làm tương thích với người và kháng thể khảm trong ngữ cảnh này bao gồm một số CDR không phải ở người; Ví dụ, các kháng thể được làm tương thích với người có thể được tạo ra mà bao gồm các vùng HCDR3 và LCDR3, với một hoặc nhiều vùng CDR khác có nguồn gốc từ các loài khác nhau.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên ST2 là kháng thể đa đặc hiệu, và đặc biệt là kháng thể đặc hiệu kép, đôi khi còn được gọi là “các kháng thể hóa trị hai.” Đây là các kháng thể liên kết với hai hoặc nhiều kháng nguyên khác nhau hoặc epitop khác nhau trên một kháng nguyên duy nhất. Theo một số phương án nhất định, kháng thể đặc hiệu kép liên kết ST2 và kháng nguyên trên tế bào tác động ở người (ví dụ, tế bào T). Các kháng thể này thì hữu ích trong việc nhắm đích đáp ứng tế bào tác động đối với các tế bào biểu hiện ST2, như tế bào khối u biểu hiện ST2. Theo các phương án được ưu tiên, kháng nguyên của tế bào tác động ở người là CD3. US 7,235,641. Các phương pháp tạo các kháng thể đặc hiệu kép được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một phương pháp như vậy liên quan đến kỹ thuật biến đổi phần Fc của các chuỗi nặng như để tạo ra “những chỗ phòng” và “những lỗ trống” tạo điều kiện cho sự hình thành cấu trúc dị dimer của các chuỗi nặng khi được đồng biểu hiện trong một tế bào. US 7,695,963. Một phương pháp khác cũng liên quan đến kỹ thuật biến đổi phần Fc của chuỗi nặng

nhưng sử dụng lõi tĩnh điện để hỗ trợ sự tạo thành cấu trúc dị đime trong khi không hỗ trợ sự hình thành cấu trúc đồng đime của các chuỗi nặng khi được đồng biểu hiện trong một tế bào. WO 09/089,004, toàn bộ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên ST2 là kháng thể mini. Các kháng thể mini là các protein giống kháng thể được tối thiểu hóa bao gồm scFv được nối liền với miền CH3. Hu *et al.*, 1996, *Cancer Res.* 56:3055-3061.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên ST2 là kháng thể miền; xem, ví dụ US 6,248,516. Các kháng thể miền (dAbs) là các miền liên kết chức năng của các kháng thể, tương ứng với các vùng biến đổi của hoặc là chuỗi nặng (VH) hoặc chuỗi nhẹ (VL) của các kháng thể ở người. dAbs có trọng lượng phân tử khoảng chừng 13 kDa, hoặc nhỏ hơn một phần mười kích cỡ của kháng thể đầy đủ. dAbs được biểu hiện rõ trong nhiều loại vật chủ khác nhau bao gồm cả các hệ tế bào của vi khuẩn, nấm men, và động vật có vú. Ngoài ra, dAbs có tính ổn định cao và duy trì hoạt tính ngay cả sau khi phải chịu các điều kiện khắc nghiệt, như sấy thăng hoa hoặc biến tính nhiệt. Xem, Ví dụ, US 6,291,158; US 6,582,915; US 6,593,081; US 6,172,197; US 2004/0110941; EP 0368684; US 6,696,245, WO04/058821, WO04/003019 và WO03/002609.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên ST2 là một đoạn kháng thể, là đoạn của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được nêu trong tài liệu này mà vẫn có tính đặc hiệu liên kết với ST2. Theo nhiều phương án khác nhau, các protein liên kết kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, F (ab), F (ab'), F (ab')₂, Fv, hoặc các đoạn Fv của chuỗi đơn. Ở mức tối thiểu, kháng thể, theo ý nghĩa trong tài liệu này, bao gồm polypeptit mà có thể liên kết đặc hiệu với ST2 bao gồm tất cả hoặc một phần của vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, như một hoặc nhiều CDR.

Các ví dụ khác nữa về các đoạn kháng thể liên kết ST2 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, (i) đoạn Fab bao gồm các miền VL, VH, CL và CH1, (ii) đoạn Fd bao gồm các miền VH và CH1, (iii) đoạn Fv bao gồm các miền VL và VH của kháng thể duy nhất; (iv) đoạn dAb (Ward *et al.*, 1989, *Nature* 341:544-546) mà bao gồm một nhóm biến duy nhất, (v) các vùng CDR riêng biệt, (vi) các đoạn F (ab')₂, đoạn hóa trị hai bao gồm hai đoạn Fab liên kết (vii) các phân tử Fv chuỗi đơn (scFv), trong đó miền VH và miền VL được liên kết bởi một liên kết peptit cho phép hai miền này liên hợp lại để tạo

thành vị trí liên kết kháng nguyên (Bird *et al.*, 1988, *Science* 242:423-426, Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:5879-5883), (viii) các đime Fv chuỗi đơn đặc hiệu kép (PCT/US92/09965) và (ix) "các kháng thể hóa trị hai" hoặc "các kháng thể hóa trị ba", các đoạn đa trị hoặc đa đặc hiệu được tạo cấu trúc bằng cách dung hợp gen (Tomlinson *et al.*, 2000, *Methods Enzymol.* 326:461-479; WO94/13804; Holliger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:6444-6448). Các đoạn kháng thể có thể được biến đổi. Ví dụ, các phân tử có thể được làm ổn định bằng cách đưa vào các cầu nối disulfua liên kết các miền VH và VL (Reiter *et al.*, 1996, *Nature Biotech.* 14:1239-1245). Các khía cạnh của sáng chế bao gồm cả các phương án trong đó các thành phần không phải CDR của các đoạn này là các trình tự ở người.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên ST2 là kháng thể đầy đủ ở người. Theo phương án này, như đã nêu ở trên, các cấu trúc đặc hiệu bao gồm các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đầy đủ được mô tả bao gồm các vùng CDR. Các phương án bổ sung khác sử dụng một hoặc nhiều trong số các CDR theo sáng chế, cùng với các CDR, các vùng khung, các vùng J và D, các vùng hằng định khác, v. v., có nguồn gốc từ các kháng thể ở người khác. Ví dụ, các CDR của sáng chế có thể thay thế các CDR của một số kháng thể bất kỳ ở người, cụ thể là các kháng thể có liên quan về mặt thương mại

Các kháng thể chuỗi đơn có thể được tạo thành bằng cách liên kết các đoạn vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng (vùng Fv) thông qua cầu nối axit amin (mối liên kết peptit ngắn), tạo thành chuỗi polypeptit đơn. Fvs (scFvs) chuỗi đơn này đã được điều chế bằng cách dung hợp ADN mã hóa liên kết peptit giữa các ADN mã hóa hai polypeptit vùng biến đổi (V_L và V_H). Các polypeptit thu được có thể tự gấp nếp trở lại trên đó để tạo thành các cấu trúc monome liên kết kháng nguyên, hoặc chúng có thể tạo thành các cấu trúc đa phân (ví dụ., các đime, các trime, hoặc các tetrame), tùy thuộc vào chiều dài của mối liên kết linh động giữa hai miền biến đổi (Kortt *et al.*, 1997, *Prot. Eng.* 10:423; Kortt *et al.*, 2001, *Biomol. Eng.* 18:95-108). Bằng cách kết hợp V_L và V_H khác nhau bao gồm các polypeptit, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tạo ra scFvs đa phân liên kết với epitop khác nhau (Kriangkum *et al.*, 2001, *Biomol. Eng.* 18:31-40). Các phương pháp kỹ thuật được phát triển để sản xuất các kháng thể chuỗi đơn bao gồm các kỹ thuật được mô tả trong US 4,946,778; Bird, 1988, *Science* 242:423; Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879; Ward *et al.*, 1989,

Nature 334:544, de Graaf *et al.*, 2002, Methods Mol Biol. 178:379-87. Các kháng thể chuỗi đơn có nguồn gốc từ các kháng thể được đề xuất trong tài liệu này (bao gồm nhưng không giới hạn ở scFvs bao gồm các dạng kết hợp của miền biến đổi của Ab1 LCv/Ab1 HCv (SEQ ID NO:95/SEQ ID NO:29), Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO:96/SEQ ID NO:30), Ab3 LCv/Ab3 HCv (SEQ ID NO:97/SEQ ID NO:31), Ab4 LCv/Ab4 HCv (SEQ ID NO:98/SEQ ID NO:32), Ab5 LCv/Ab5 HCv (SEQ ID NO:99/SEQ ID NO:33), Ab6 LCv/Ab6 HCv (SEQ ID NO:100/SEQ ID NO:34), Ab7 LCv/Ab7 HCv (SEQ ID NO:101/SEQ ID NO:35), Ab8 LCv/Ab8 HCv (SEQ ID NO:102/SEQ ID NO:36), Ab9 LCv/Ab9 HCv (SEQ ID NO:103/SEQ ID NO:37), Ab10 LCv/Ab10 HCv (SEQ ID NO:104/SEQ ID NO:38), và Ab11 LCv/Ab11 HCv (SEQ ID NO:105/SEQ ID NO:39), Ab30 LCv/Ab30 HCv (SEQ ID NO:163/SEQ ID NO:145), Ab32 LCv/Ab32 HCv (SEQ ID NO:164/SEQ ID NO:146), Ab33 LCv/Ab33 HCv (SEQ ID NO:165/SEQ ID NO:147), và các dạng kết hợp của chúng được bao gồm trong sáng chế.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên ST2 là protein dung hợp kháng thể (đôi khi được gọi trong tài liệu này là "liên hợp kháng thể"). Đối tác liên hợp có thể là chứa protein hoặc không chứa protein; đối tác liên hợp không chứa protein nhìn chung được tạo ra bằng cách sử dụng các nhóm chức trên protein liên kết kháng nguyên và trên đối tác liên hợp. Theo một số phương án nhất định, kháng thể được liên hợp với hóa chất không chứa protein (thuốc) để tạo thành thể liên hợp thuốc kháng thể.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên ST2 là thể tương tự kháng thể, đôi khi được gọi là "các kháng thể tổng hợp." Ví dụ, nhiều dạng sử dụng hoặc các giá đỡ protein thay thế hoặc các giá đỡ nhân tạo với các CDR ghép. Các giá đỡ này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đột biến được đưa vào để làm ổn định cấu trúc ba chiều của protein liên kết cũng như toàn bộ các giá đỡ tổng hợp bao gồm, ví dụ, các polyme tương hợp sinh học. Xem, Ví dụ, Korndorfer *et al.*, 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Tập 53, Số 1:121-129. Roque *et al.*, 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654. Ngoài ra, peptit các dạng bắt chước kháng thể ("PAMs") có thể được sử dụng, cũng như hoạt động dựa trên các dạng bắt chước kháng thể bằng cách sử dụng các thành phần fibronectin làm giá đỡ.

Thuật ngữ "protein", như được sử dụng ở đây, có nghĩa là ít nhất hai axit amin được gắn kết đồng hóa trị, mà bao gồm các protein, các polypeptit, các oligopeptit và

các peptit. Theo một số phương án, hai hoặc nhiều axit amin được gắn kết đồng hóa trị được gắn kết bằng liên kết peptit. Protein có thể được tạo thành từ các axit amin có trong tự nhiên và các liên kết peptit, Ví dụ khi protein được tạo thành theo kiểu tái tổ hợp sử dụng các hệ biểu hiện và các tế bào vật chủ, như được nêu dưới đây. Theo cách thay thế, protein có thể bao gồm các axit amin tổng hợp (ví dụ, homophenylalanin, xitruilin, ornithin, và norleuxin), hoặc các cấu trúc bất chức peptit, tức là, “các thể tương tự peptit hoặc tương tự protein”, như các peptoid (*Xem, Simon et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:9367, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn*), mà chúng có thể kháng lại các proteaza hoặc các điều kiện sinh lý và/hoặc điều kiện bảo quản khác. Các axit amin tổng hợp này có thể được đưa vào sử dụng đặc biệt là khi protein liên kết kháng nguyên được tổng hợp *in vitro* theo các phương pháp thông thường được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, dạng kết hợp bất kỳ của các gốc/các cấu trúc bất chức peptit, tổng hợp và có trong tự nhiên có thể được sử dụng. "Axit amin" cũng bao gồm các gốc axit imino như prolin và hydroxyprolin. “Nhóm R” hoặc “chuỗi bên” của axit amin có thể có dạng cấu hình (L) hoặc cấu hình (S). Theo một phương án cụ thể, các axit amin là ở dạng cấu hình (L) hoặc cấu hình (S).

Theo một số khía cạnh nhất định, sáng chế đề xuất các protein liên kết kháng nguyên tái tổ hợp liên kết ST2 và, theo một số phương án, ST2 tái tổ hợp ở người hoặc một phần của nó. Trong ngữ cảnh này, “protein tái tổ hợp” là protein được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp sử dụng các kỹ thuật và phương pháp bất kỳ được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, tức là, thông qua sự biểu hiện của axit nucleic tái tổ hợp như được mô tả ở đây. Các phương pháp và kỹ thuật để sản xuất các protein tái tổ hợp được biết đến phổ biến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương án của sáng chế bao gồm các protein liên kết kháng nguyên tái tổ hợp liên kết ST2 kiểu đại và các biến thể của nó.

“Bao gồm chủ yếu” có nghĩa là trình tự axit amin có thể thay đổi vào khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, hoặc 15% tùy theo SEQ ID NO đã nêu: trình tự và vẫn giữ lại hoạt tính sinh học, như được mô tả ở đây.

Theo một số phương án, các protein liên kết kháng nguyên của sáng chế là các protein tách ly hoặc các protein về cơ bản là tinh khiết. Protein "tách ly" thì không có độ tương đồng ít nhất một vật liệu nào đó đi kèm với nó mà thông thường được kết hợp

ở trạng thái tự nhiên của nó, ví dụ chiếm ít nhất khoảng 5%, hoặc ít nhất khoảng 50% theo trọng lượng của protein tổng số in mẫu đã cho. Cần phải hiểu rằng protein tách ly có thể tạo thành từ 5 đến 99,9% theo trọng lượng của hàm lượng protein tổng số tùy thuộc vào các trường hợp. Ví dụ, protein có thể được thực hiện ở nồng độ cao hơn đáng kể thông qua việc sử dụng trình tự khởi đầu dễ cảm ứng hoặc trình tự khởi đầu biểu hiện cao, sao cho protein được tạo thành ở các mức nồng độ tăng. Định nghĩa bao gồm sự sản xuất protein liên kết kháng nguyên trong một loạt các sinh vật và/hoặc các tế bào vật chủ được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Đối với các trình tự axit amin, tính đồng dạng về trình tự và/hoặc tính giống nhau về trình tự được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp kỹ thuật tiêu chuẩn được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thuật toán nhận dạng trình tự cục bộ của Smith và Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482, thuật toán sắp thẳng hàng theo tính đồng dạng về trình tự của Needleman và Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443, phương pháp tìm kiếm trình tự giống nhau của Pearson và Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 85:2444, các triển khai thực hiện các thuật toán này được điện toán hóa (GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA trong Bộ Phần mềm Di truyền học Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), chương trình giải trình tự Best Fit do Devereux mô tả *et al.*, 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387-395, tốt hơn nếu sử dụng các thiết lập mặc định, hoặc qua sự xem xét kỹ. Tốt hơn nữa, phần trăm tính đồng dạng được tính toán bằng thuật toán FastDB dựa trên các thông số sau: điểm phạt cho sự ghép đôi không xứng là 1; điểm phạt cho khoảng trống là 1; điểm phạt cho kích cỡ khoảng trống là 0, 33; và điểm phạt cho chỗ nối ghép là 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis, " *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, trang 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Ví dụ về một thuật toán hữu ích là PILEUP. PILEUP tạo thành sự sắp xếp thẳng hàng đa trình tự từ nhóm gồm các trình tự liên quan sử dụng phương pháp sắp hàng lũy tiến toàn cục, sắp hàng từng cặp. Cũng có thể vẽ một cây biểu hiện các mối quan hệ phân nhóm được sử dụng để tạo ra sự sắp xếp thẳng hàng. PILEUP sử dụng dạng đơn giản hóa của phương pháp sắp hàng lũy tiến toàn cục của Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360; phương pháp tương tự như phương pháp được mô tả bởi Higgins và Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153. Các thông số PILEUP hữu ích bao gồm trọng lượng

khoảng trống mặc định là 3, 00, trọng lượng chiều dài khoảng trống mặc định là 0, 10, và các khoảng trống cuối có trọng lượng.

Một ví dụ khác về một thuật toán hữu ích là thuật toán BLAST, được mô tả trong tài liệu của: Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; và Karin *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:5873-5787. Chương trình BLAST đặc biệt hữu ích là chương trình WU-BLAST-2 được lấy từ tài liệu của Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480. WU-BLAST-2 sử dụng một số tham số tìm kiếm, hầu hết trong số đó được đặt tới các giá trị mặc định. Các tham số điều chỉnh được thiết lập với các giá trị sau: khoảng xếp chồng=1, phần xếp chồng=0, 125, ngưỡng lệnh (T)=II. Các tham số HSP S và HSP S2 là các giá trị động lực học và được thiết lập bởi chính chương trình đó tùy thuộc vào thành phần cấu tạo của trình tự cụ thể và thành phần cấu tạo của cơ sở dữ liệu cụ thể đối với trình tự quan tâm đang được tìm kiếm; tuy nhiên, các giá trị có thể được điều chỉnh để làm tăng độ nhạy cảm.

Một thuật toán hữu ích khác nữa là gapped BLAST theo báo cáo của Altschul *et al.*, 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402. Gapped BLAST sử dụng các điểm thay thế BLOSUM-62; tham số ngưỡng T được đặt đến 9; phương pháp hai lần va chạm để kích hoạt các phần mở rộng không có khoảng trống, tính các chiều dài khe là k với giá trị $10+k$; X_u được đặt đến 16, và X_g được đặt đến 40 cho giai đoạn tìm kiếm cơ sở dữ liệu và đến 67 cho tăng xuất của các thuật toán. Sự sắp xếp có khoảng trống được kích hoạt bởi điểm tương ứng với khoảng 22 bit.

Nhìn chung, tính tương đồng, tính giống nhau, hoặc tính đồng dạng về axit amin giữa các CDR biến thể riêng biệt là ít nhất 80% với các trình tự được mô tả trong tài liệu này, và thông thường hơn khi tốt hơn nếu tính tương đồng hoặc tính đồng dạng gia tăng ít nhất 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, và gần như là 100%. Theo cách tương tự, "phần trăm (%) tính đồng dạng về trình tự axit nucleic" đối với trình tự axit nucleic của các protein liên kết được xác định ở đây được định nghĩa là tỷ lệ phần trăm của các gốc nucleotit trong trình tự dự tuyển giống hệt với các gốc nucleotit trong trình tự mã hóa của protein liên kết kháng nguyên. Một phương pháp cụ thể sử dụng môđun BLASTN của WU-BLAST-2 được đặt đến các thông số mặc định,

với khoảng xếp chồng và phân xếp chồng được đặt lên 1 và 0, 125, lần lượt theo tương ứng.

Nhìn chung, tính tương đồng, tính giống nhau, hoặc tính đồng dạng về trình tự axit nucleic giữa các trình tự nucleotit mã hóa các CDR biến thể riêng biệt và các trình tự nucleotit được mô tả trong tài liệu này là ít nhất 80%, và thông thường hơn khi tốt hơn nếu tính tương đồng hoặc tính đồng dạng gia tăng ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%, và gần như 100%.

Vì vậy, “CDR biến thể” là CDR có tính tương đồng, tính giống nhau, hoặc tính đồng dạng theo danh nghĩa cùng với CDR khởi đầu của sáng chế, và có chung chức năng sinh học, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ít nhất 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tính đặc hiệu và/hoặc hoạt tính của CDR khởi đầu.

Mặc dù vị trí hoặc vùng để đưa vào biến thể của trình tự axit amin được xác định trước, đột biến về bản chất không cần phải được xác định trước. Ví dụ, để tối ưu hóa hiệu suất đột biến tại vị trí nhất định, có thể tiến hành gây đột biến ngẫu nhiên tại đơn vị mã đích hoặc vùng và các biến thể CDR của protein liên kết kháng nguyên được biểu hiện được sàng lọc để kết hợp tối ưu hoạt tính mong muốn. Các phương pháp kỹ thuật để gây các đột biến thay thế tại các vị trí được xác định trước trong ADN có trình tự đã được biết được biết đến phổ biến, Ví dụ, sự gây đột biến đoạn môi M13 và sự gây đột biến PCR. Bước sàng lọc các đột biến được thực hiện sử dụng các thử nghiệm về các hoạt tính của protein liên kết kháng nguyên, như thử nghiệm liên kết ST2.

Các đột biến thay thế axit amin là thông thường là ở các gốc đơn; các đột biến chèn thông thường sẽ nằm ở thứ tự từ khoảng một (1) đến khoảng hai mươi (20) gốc axit amin, mặc dù các đột biến chèn lớn hơn đáng kể có thể được dung nạp. Các đột biến cắt bỏ nằm trong khoảng từ khoảng một (1) đến khoảng hai mươi (20) gốc axit amin, mặc dù trong một số trường hợp các đột biến cắt bỏ có thể lớn hơn nhiều.

Các đột biến thay thế, cắt bỏ, chèn hoặc dạng kết hợp bất kỳ của chúng có thể được sử dụng để đạt được dẫn xuất hoặc biến thể cuối cùng. Nhìn chung, những thay đổi này được thực hiện trên một vài axit amin để làm giảm thiểu sự biến đổi của phân tử, cụ thể

là tính sinh miễn dịch và tính đặc hiệu của protein liên kết kháng nguyên. Tuy nhiên, các thay đổi lớn có thể được dung nạp trong một số trường hợp nhất định. Các đột biến thay thế bảo thủ nhìn chung được thực hiện theo biểu đồ sau được mô tả như Bảng 3.

Bảng 3

Gốc ban đầu	Đột biến thay thế dùng làm ví dụ minh họa
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Những thay đổi đáng kể về chức năng hoặc tính đồng dạng miễn dịch học được thực hiện bằng cách lựa chọn các đột biến thay thế mà ít có tính bảo thủ hơn so với các đột biến được thể hiện trong Bảng 3. Ví dụ, có thể thực hiện các đột biến thay thế làm ảnh hưởng đáng kể hơn đến: cấu trúc của xương sống polypeptit ở vùng có sự biến đổi, ví dụ, cấu trúc gấp nếp beta hoặc cấu trúc xoắn alpha; diện tích hoặc tính kỵ nước của phân tử tại vị trí đích; hoặc hầu hết chuỗi bên. Các đột biến thay thế mà nhìn chung được kỳ vọng là sẽ tạo ra những thay đổi lớn nhất về các đặc tính của polypeptit là các dạng đột biến mà trong đó (a) gốc ưa nước, ví dụ, seryl hoặc threonyl, được thay thế cho (hoặc bởi) gốc kỵ nước, ví dụ, leuxyl, isoleuxyl, phenylalanyl, valyl hoặc alanyl; (b) cystein hoặc prolin được thay thế cho (hoặc bởi) gốc khác bất kỳ; (c) gốc có chuỗi bên tích điện dương, ví dụ, lysyl, arginyl, hoặc histidyl, được thay thế cho (hoặc bởi) gốc tích điện âm, ví dụ, glutamyl hoặc aspartyl; hoặc (d) gốc có phần lớn chuỗi bên, ví dụ, phenylalanin, được thay thế cho (hoặc bởi) một gốc không có chuỗi bên, ví dụ, glyxin.

Thông thường, các biến thể biểu hiện cùng một hoạt tính sinh học đặc trưng và sẽ đạt được cùng một đáp ứng miễn dịch dưới dạng tương tự có trong tự nhiên, mặc dù các biến thể cũng được lựa chọn để biến đổi các đặc trưng của protein liên kết kháng nguyên các protein khi cần thiết. Theo cách thay thế, biến thể có thể được thiết kế sao cho hoạt tính sinh học của protein liên kết kháng nguyên được biến đổi. Ví dụ, các vị trí glycosyl hóa có thể được biến đổi hoặc được cắt bỏ như đã thảo luận ở đây.

Các dẫn xuất khác của các kháng thể ST2 trong phạm vi của sáng chế này bao gồm các thể liên hợp đồng hóa trị hoặc liên hợp tập hợp của các kháng thể ST2, hoặc các đoạn của chúng, với các protein hoặc các polypeptit khác, như bằng cách biểu hiện các protein dung hợp tái tổ hợp bao gồm các polypeptit khác loại được dung hợp với đầu N hoặc đầu C thuộc polypeptit của kháng thể ST2. Ví dụ, peptit liên hợp có thể là polypeptit tín hiệu khác loại (hoặc dẫn đầu), ví dụ, phần tử dẫn đầu nhân tố alpha của nấm men, hoặc peptit như đuôi epitop. Các protein dung hợp chứa kháng thể ST2 có thể bao gồm các peptit được bổ sung để tạo điều kiện cho việc tinh chế hoặc nhận dạng kháng thể ST2 (ví dụ, poly-His). Polypeptit của kháng thể ST2 cũng có thể được liên kết phù hợp với peptit FLAG theo mô tả trong tài liệu của Hopp *et al.*, *Bio/Technology* 6:1204, 1988, và US 5,011,912. Peptit FLAG là có tính kháng nguyên cao và mang lại epitop theo cách có thể đảo ngược được liên kết bởi kháng thể đơn dòng đặc hiệu (mAb), cho phép thử nghiệm nhanh chóng và tinh chế dễ dàng protein tái tổ hợp được biểu hiện. Các thuốc thử hữu ích để điều chế các protein dung hợp trong đó peptit FLAG được dung hợp với polypeptit xác định thì có sẵn trên thị trường (hãng Sigma, St. Louis, MO).

Theo một phương án, cấu trúc oligome được điều chế bằng cách sử dụng các polypeptit có nguồn gốc từ các globulin miễn dịch. Cách điều chế các protein dung hợp bao gồm một số polypeptit khác loại nhất định được dung hợp với các phần khác nhau của các polypeptit có nguồn gốc từ kháng thể (trong đó có vùng Fc) đã được mô tả, ví dụ, bởi Ashkenazi *et al.*, 1991, PNAS USA 88:10535; Byrn *et al.*, 1990, Nature 344:677; và Hollenbaugh *et al.*, 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", trong *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, các trang 10.19.1 - 10.19.11.

Một phương án của sáng chế đề cập đến cấu trúc đime bao gồm hai protein dung hợp được tạo ra bằng cách dung hợp đoạn liên kết ST2 của kháng thể ST2 với vùng Fc của kháng thể. Cấu trúc đime có thể được tạo thành bằng cách, ví dụ, chèn một gen dung

hợp mã hóa protein dung hợp vào vector biểu hiện thích hợp, biểu hiện gen dung hợp trong các tế bào vật chủ được biến nạp bởi vector biểu hiện tái tổ hợp, và cho phép protein dung hợp được biểu hiện để lắp ráp giống như các phân tử kháng thể, ngay lúc đó các liên kết disulfua xen kẽ nhau trong chuỗi tạo thành ở giữa các gốc Fc để tạo ra cấu trúc đime.

Thuật ngữ "polypeptit Fc" như được sử dụng ở đây bao gồm các dạng tự nhiên và dạng mutein của các polypeptit có nguồn gốc từ vùng Fc của kháng thể. Các dạng cắt ngắn của các polypeptit này chứa vùng bản lề thúc đẩy quá trình đime hóa cũng được bao gồm. Các protein dung hợp bao gồm các gốc Fc (và các oligome được hình thành từ đó) mang lại thuận lợi để tinh chế dễ dàng bằng phép sắc ký ái lực trên các cột Protein A hoặc Protein G.

Một polypeptit Fc thích hợp, được mô tả trong WO 93/10151 (được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), là polypeptit chuỗi đơn kéo dài từ vùng bản lề từ đầu N đến đầu C tự nhiên thuộc vùng Fc của kháng thể IgG người. Một polypeptit Fc hữu ích khác là mutein Fc được mô tả US 5,457,035 và trong Baum *et al.*, 1994, *EMBO J.* 13:3992-4001. Trình tự axit amin của mutein này thì đồng nhất với trình tự Fc tự nhiên được trình bày trong WO 93/10151, ngoại trừ axit amin 19 đã được thay đổi từ Leu đến Ala, axit amin 20 đã được thay đổi từ Leu thành Glu, và axit amin 22 đã được thay đổi từ Gly thành Ala. Mutein biểu hiện ái lực giảm đối với các thụ thể Fc.

Theo các phương án khác, phần biến của các chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể ST2 có thể được thay thế cho phần biến của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể.

Một phương pháp khác để điều chế các dẫn xuất kháng thể ST2 dạng oligome liên quan đến việc sử dụng dây kéo leuxin. Các miền dây kéo leuxin là các peptit thúc đẩy sự oligome hóa của các protein mà chúng được tìm thấy trong đó. Các dây kéo leuxin ban đầu được xác định trong một số protein liên kết ADN (Landschulz *et al.*, 1988, *Science* 240:1759), và từ đó đã được tìm thấy trong nhiều loại protein khác nhau. Trong số các dây kéo leuxin đã biết là các peptit có trong tự nhiên và các dẫn xuất của chúng đime hóa hoặc trime hóa. Các ví dụ về các miền dây kéo leuxin thích hợp để sản xuất các protein oligome hòa tan được mô tả trong Công bố đơn PCT số WO 94/10308,

và dây kéo leuxin có nguồn gốc từ protein D có hoạt tính bề mặt (SPD) ở phôi được mô tả trong Hoppe *et al.*, 1994, *FEBS Letters* 344:191, được đưa vào đây bằng cách viêt dẫn. Việc sử dụng dây kéo leuxin được biến đổi cho phép sự trime hóa ổn định protein khác loại được dung hợp thêm vào đó được mô tả trong Fanslow *et al.*, 1994, *Semin. Immunol.* 6:267-78. Theo một phương pháp tiếp cận, các protein dung hợp tái tổ hợp bao gồm đoạn kháng thể ST2 hoặc dẫn xuất được dung hợp với peptit trên dây kéo leuxin được biểu hiện trong các tế bào vật chủ thích hợp, và các đoạn kháng thể ST2 dạng oligome hòa tan được hoặc các dẫn xuất tạo thành được thu hồi từ dịch nuôi cấy.

Các dạng biến đổi cộng hóa trị của các protein liên kết kháng nguyên được bao gồm trong phạm vi của sáng chế này, và nhìn chung, nhưng không phải luôn luôn, được thực hiện theo kiểu sau dịch mã. Ví dụ, một số dạng biến đổi cộng hóa trị của protein liên kết kháng nguyên được đưa vào trong phân tử bằng cách cho các gốc axit amin đặc hiệu của protein liên kết kháng nguyên phản ứng với tác nhân tạo dẫn xuất hữu cơ mà có thể phản ứng với các chuỗi bên đã được chọn hoặc các gốc đầu N hoặc C.

Thông thường nhất là, các gốc xysteinyl được cho phản ứng với các α -haloaxetat (và các amin tương ứng), như axit cloaxetic hoặc cloaxetamid, để mang lại các dẫn xuất của cacboxymetyl hoặc cacboxyamidometyl. Các gốc xysteinyl cũng được tạo dẫn xuất bằng cách phản ứng với bromtrifloaxeton, axit α -brom- β -(5-imidazolyl)propionic, cloaxetyl phosphat, các N-alkylmaleimit, 3-nitro-2-pyridyl disulfua, metyl 2-pyridyl disulfua, p-clomercuribenzoat, 2-clomercuri-4-nitrophenol, hoặc clo-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Các gốc histidyl được tạo dẫn xuất bằng cách phản ứng với diethylpyrocacbonat ở độ pH 5,5-7,0 do tác nhân này tương đối đặc hiệu đối với chuỗi bên histidyl. Parabromphenaxyl bromua cũng hữu ích; tốt hơn nếu phản ứng này được thực hiện trong natri cacodylat 0,1M ở độ pH 6,0.

Các gốc đầu cuối lysinyl và amin được cho phản ứng với các anhidrit của axit succinic hoặc axit cacboxylic khác. Quá trình tạo dẫn xuất với các tác nhân này có tác dụng đảo ngược điện tích của các gốc lysinyl. Các thuốc thử thích hợp khác để tạo dẫn xuất các gốc chứa α -amin bao gồm các imidoeste như metyl picolinimidat; pyridoxal

phosphat; pyridoxal; cloborohydrua; axit trinitrobenzenesulfonic; O-metylisourê; 2, 4-pentanedion; và phản ứng được xúc tác bởi transaminaza với glyoxylat.

Các gốc arginyl được biến đổi bằng cách phản ứng với một hoặc một số loại thuốc thử thông thường, trong số chúng là phenylglyoxal, 2, 3-butandion, 1,2-xyclohexandion, và ninhydrin. Quá trình tạo dẫn xuất các gốc acginin yêu cầu phản ứng được thực hiện trong các điều kiện kiềm do giá trị pK_a cao của nhóm chức guanidin. Ngoài ra, các thuốc thử này có thể phản ứng với các nhóm lyzin cũng như nhóm epsilon-amino acginin.

Sự biến đổi đặc hiệu của các gốc tyrosyl có thể được thực hiện, với sự tập trung đặc biệt trong việc đưa các nhãn quang phổ vào các gốc tyrosyl bằng cách phản ứng với các hợp chất diazonium thơm hoặc tetranitrometan. Thông thường nhất là, N-axetylimidizol và tetranitrometan được sử dụng để tạo thành các loại O-axetyl tyrosyl và các dẫn xuất 3-nitro, lần lượt theo tương ứng. Các gốc tyrosyl được iot hóa sử dụng ^{125}I hoặc ^{131}I để điều chế các protein được đánh dấu để sử dụng trong thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, phương pháp cloramin T được mô tả ở trên là thích hợp.

Các nhóm bên cacboxyl (aspartyl hoặc glutamyl) được biến đổi có chọn lọc bằng cách phản ứng với các cacbodiimit ($R'-N=C=N-R''$), trong đó R và R' tùy ý là các nhóm alkyl khác nhau, như 1-xyclohexyl-3- (2-morpholiny-4-etyl) cacbodiimit hoặc 1-etyl-3- (4-azonia-4,4-dimetylpentyl) cacbodiimit. Ngoài ra, các gốc aspartyl và glutamyl được chuyển đổi thành các gốc asparaginy- và glutaminy- bằng cách phản ứng với các ion amoni.

Quá trình tạo dẫn xuất với các tác nhân chức năng kép là hữu ích để liên kết chéo các protein liên kết kháng nguyên với chất nền hoặc bề mặt hỗ trợ không tan trong nước để sử dụng trong nhiều phương pháp khác nhau. Các tác nhân liên kết chéo thông thường được sử dụng bao gồm, ví dụ, 1,1-bis (diazoxetyl)-2-phenyletan, glutarandehit, các N-hydroxysuccinimide este, ví dụ, các este với axit 4-azidosalicylic, các imidoeste cùng chức năng kép, bao gồm cả các disuccinimidyl este như 3,3'-dithiobis (succinimidylpropionat), và các maleimide chức năng kép như bis-N-maleimido-1,8-octan. Các tác nhân tạo dẫn xuất như methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimidat tạo ra các chất trung gian có tính quang hoạt có khả năng tạo thành các liên kết chéo khi có mặt ánh sáng. Theo cách thay thế, các chất kết dính phản ứng không tan trong nước như

các cacbohydrat hoạt hóa bởi xyanogen bromua và các cơ chất phản ứng được mô tả trong US 3,969,287; US 3,691,016; US 4,195,128; US 4,247,642; US 4,229,537; và US 4,330,440 được sử dụng để cố định protein.

Các gốc glutaminyl và asparaginyl thường được khử amit thành các gốc glutamyl và aspartyl tương ứng, lần lượt theo tương ứng. Theo cách thay thế, các gốc này được khử amit trong các điều kiện có tính axit nhẹ. Một trong hai dạng gốc này nằm trong phạm vi của sáng chế này.

Những dạng biến đổi khác bao gồm sự hydroxyl hóa prolin và lyzin, sự phosphoryl hóa các nhóm hydroxyl gồm các gốc seryl hoặc threonyl, sự metyl hóa các nhóm α -amin gồm các chuỗi bên lyzin, acginin, và histidin (T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, trang 79-86), sự axetyl hóa amin đầu N, và sự amit hóa nhóm cacboxyl đầu C bất kỳ.

Một dạng biến đổi cộng hóa trị khác của protein liên kết kháng nguyên có trong phạm vi của sáng chế này bao gồm sự biến đổi kiểu glycosyl hóa protein. Như được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, các kiểu glycosyl hóa có thể phụ thuộc vào cả hai trình tự của protein (ví dụ, sự có mặt hoặc không có mặt các gốc axit amin glycosyl hóa cụ thể, được thảo luận dưới đây), hoặc tế bào vật chủ hoặc sinh vật chủ trong đó protein được sản xuất. Các hệ thống biểu hiện cụ thể được thảo luận dưới đây.

Sự glycosyl hóa của các polypeptit thì thông thường hoặc có liên kết N hoặc liên kết O. Liên kết N chỉ sự gắn gốc cacbohydrat vào chuỗi bên của gốc asparagin. Các trình tự tri-peptit asparagin-X-serin và asparagin-X-threonin, trong đó X là axit amin bất kỳ ngoại trừ prolin, là các trình tự nhận diện để gắn enzym của gốc cacbohydrat vào chuỗi bên asparagin. Vì vậy, sự có mặt của một trong hai trình tự tri-peptit này trong polypeptit tạo thành vị trí glycosyl hóa tiềm năng. Sự glycosyl hóa có liên kết O chỉ sự gắn một trong số các loại đường N-axetylgalactozamin, galactosa, hoặc xyloza, vào axit hydroxyamin, thông thường nhất là serin hoặc threonin, mặc dù 5-hydroxyprolin hoặc 5-hydroxylyzin cũng có thể được sử dụng.

Sự bổ sung các vị trí glycosyl hóa vào protein liên kết kháng nguyên được thực hiện thuận tiện bằng cách biến đổi trình tự axit amin sao cho nó chứa một hoặc nhiều trong số các trình tự tri-peptit được mô tả ở trên (các vị trí glycosyl hóa có liên kết N).

Sự thay đổi này cũng có thể được thực hiện bằng cách bổ sung, hoặc thay thế bởi, một hoặc nhiều gốc serin hoặc threonin vào trình tự khởi đầu (các vị trí glycosyl hóa có liên kết O). Để thuận lợi, trình tự axit amin trên protein liên kết kháng nguyên tốt hơn nếu được biến đổi thông qua những thay đổi ở mức ADN, cụ thể bằng cách làm đột biến ADN mã hóa polypeptit đích tại các bazơ được chọn trước sao cho các đơn vị mã được tạo ra sẽ dịch mã thành các axit amin mong muốn.

Một phương tiện khác làm tăng số lượng các gốc cacbohydrat trên protein liên kết kháng nguyên là bằng cách ghép cặp hóa học hoặc ghép cặp enzym các glycozit vào protein. Các quy trình này có nhiều thuận lợi ở chỗ chúng không cần phải sản xuất protein trong tế bào vật chủ mà có khả năng glycosyl hóa đối với sự glycosyl hóa có liên kết O và N. Tùy thuộc vào phương thức ghép cặp được sử dụng, (các) đường có thể được gắn vào (a) acginin và histidin, (b) các nhóm cacboxyl tự do, (c) các nhóm sulfhydryl tự do như các nhóm xystein, (d) các nhóm hydroxyl tự do như các nhóm serin, threonin, hoặc hydroxyprolin, (e) các gốc thơm như các gốc phenylalanin, tyrozin, hoặc tryptophan, hoặc (f) nhóm amit of glutamin. Những phương pháp này được mô tả trong WO 87/05330 công bố ngày 11 tháng 9 năm 1987, và trong tài liệu của Aplin và Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, trang 259-306.

Việc cắt loại các gốc cacbohydrat có mặt trên protein liên kết kháng nguyên khởi đầu có thể được thực hiện theo phương thức hóa học hoặc enzym. Sự khử glycosyl hóa theo phương thức hóa học cần có sự tiếp xúc của protein với hợp chất axit triflometansulfonic, hoặc một hợp chất tương đương. Việc xử lý này dẫn đến cắt loại hầu hết hoặc toàn bộ các đường ngoại trừ đường liên kết (N-axetylglucozamin hoặc N-axetylgalactozamin), trong khi để lại nguyên vẹn polypeptit. Sự khử glycosyl hóa theo phương thức hóa học theo mô tả của Hakimuddin *et al.*, 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 và của Edge *et al.*, 1981, *Anal. Biochem.* 118:131. Sự phân cắt bằng enzym các gốc cacbohydrat trên các polypeptit có thể đạt được bằng cách sử dụng nhiều loại endo- và exo-glycosidaza khác nhau theo mô tả của Thotakura *et al.*, 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350. Sự glycosyl hóa tại các vị trí glycosyl hóa tiềm năng có thể được ngăn cản bằng cách sử dụng hợp chất tunicamycin theo mô tả của Duskin *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105. Tunicamycin ngăn cản sự tạo thành các liên kết protein-N-glycozit.

Một dạng biến đổi cộng hóa trị khác của protein liên kết kháng nguyên bao gồm sự liên kết protein liên kết kháng nguyên với nhiều loại polyme không chứa protein khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nhiều loại rượu đa chức khác nhau như polyetylen glycol, polypropylen glycol hoặc các polyoxyalkylen, theo cách thức được nêu trong US 4,640,835; US 4,496,689; US 4,301,144; US 4,670,417; US 4,791,192 hoặc US 4,179,337. Ngoài ra, như được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, các đột biến thay thế axit amin có thể được thực hiện ở các vị trí khác nhau trong protein liên kết kháng nguyên để tạo điều kiện cho sự bổ sung các polyme như PEG.

Theo một số phương án, sự biến đổi cộng hóa trị của các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm sự bổ sung một hoặc nhiều nhãn.

Thuật ngữ "nhóm ghi nhãn" có nghĩa là một nhãn phát hiện được bất kỳ. Các ví dụ về các nhóm ghi nhãn thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các nhóm sau: các đồng vị phóng xạ hoặc các nuclit phóng xạ (ví dụ, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), các nhóm huỳnh quang (ví dụ, FITC, rôdamin, lantanit phospho), các nhóm enzym (ví dụ, peroxidaza của cải ngựa, β -galactosidaza, luciferaza, phosphataza kiềm), các nhóm phát quang hóa học, các nhóm biotinyl, hoặc các epitop của polypeptit được xác định trước được nhận diện bằng gen thông báo thứ cấp (ví dụ, các trình tự cặp trên dây kéo leuxin, các vị trí liên kết cho các kháng thể thứ cấp, các miền liên kết kim loại, các đuôi epitop). Theo một số phương án, nhóm ghi nhãn được ghép cặp với protein liên kết kháng nguyên *thông qua* các tay đệm có các chiều dài khác nhau để làm giảm trở ngại về không gian tiềm năng. Các phương pháp khác nhau để đánh dấu các protein được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sử dụng trong việc thực hiện sáng chế.

Nhìn chung, các nhãn nằm trong nhiều lớp khác nhau, tùy thuộc vào thử nghiệm trong đó chúng cần được phát hiện: a) các nhãn đồng vị, mà có thể là các chất đồng vị nặng hoặc đồng vị phóng xạ; b) các nhãn có tính từ (ví dụ, các hạt từ tính); c) các gốc có hoạt tính oxy hóa khử; d) các thuốc nhuộm quang học; các nhóm enzym (ví dụ peroxidaza của cải ngựa, β -galactosidaza, luciferaza, phosphataza kiềm); e) các nhóm được biotinyl hóa; và f) các epitop của polypeptit được xác định trước được nhận diện bằng gen thông báo thứ cấp (ví dụ, các trình tự cặp trên dây kéo leuxin, các vị trí liên kết cho các kháng thể thứ cấp, các miền liên kết kim loại, các đuôi epitop, v. v.). Theo

một số phương án, nhóm ghi nhãn được ghép cặp với protein liên kết kháng nguyên *thông qua* các tay đệm có các chiều dài khác nhau để làm giảm trở ngại về không gian tiềm năng. Các phương pháp khác nhau để đánh dấu các protein được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sử dụng trong việc thực hiện sáng chế.

Các nhãn đặc hiệu bao gồm các thuốc nhuộm quang học, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chromophor, các phospho và fluorophor, về phần loại thuốc fluorophor thì đặc hiệu trong nhiều trường hợp. Các fluorophor có thể là hoặc là các flo "phân tử nhỏ", hoặc các flo chứa protein.

Thuật ngữ "nhãn huỳnh quang" có nghĩa là phân tử bất kỳ có thể được phát hiện *thông qua* các đặc tính huỳnh quang vốn có của nó. Các nhãn huỳnh quang thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, florescein, rôdamin, tetrametylrôdamin, eosin, erythrosin, coumarin, metyl-coumarin, pyren, Malacite xanh lá cây, xtinben, Lucifer Vàng, Cascade BlueJ, Texas Đỏ, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC đỏ 640 (LC Red 640), Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, Oregon màu xanh lá cây, thuốc nhuộm Alexa - Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Xanh da trời, Cascade Vàng và R-phycoerythrin (PE) (các đầu dò phân tử, Eugene, OR), FITC, rôdamin, và Texas Red (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Các thuốc nhuộm quang học thích hợp, bao gồm cả các fluorophor, được mô tả trong Molecular Probes Handbook của Richard P. Haugland, tài liệu này chỉ cốt để được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các nhãn huỳnh quang chứa protein thích hợp cũng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein huỳnh quang màu xanh lá cây, trong đó có Renilla, Ptilosarcus, hoặc loại Aequorea của GFP (Chalfie *et al.*, 1994, *Science* 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Genbank Accession Number U55762), protein huỳnh quang màu xanh da trời (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, *Biotechniques* 24:462-471; Heim *et al.*, 1996, *Curr. Biol.* 6:178-182), protein huỳnh quang màu vàng tăng cường (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luciferaza (Ichiki *et al.*, 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417), β galactosidaza (Nolan *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:2603-2607) và Renilla (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277,

WO99/49019, US 5292658, US 5418155, US 5683888, US 5741668, US 5777079, US 5804387, US 5874304, US 5876995, US 5925558). Tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn ở trên chỉ cốt để được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các protein liên kết kháng nguyên dùng làm ví dụ minh họa được mô tả ở đây có các đặc tính dựa trên epitop khác biệt trên ST2 được liên kết bởi protein liên kết kháng nguyên. Thuật ngữ “epitop” có nghĩa là các axit amin của phân tử đích mà được tiếp xúc bởi protein liên kết kháng nguyên, ví dụ, kháng thể, khi protein liên kết kháng nguyên được liên kết với phân tử đích. Epitop có thể là liên kề nhau hoặc không liên kề nhau (ví dụ, (i) trong polypeptit chuỗi đơn, các gốc axit amin mà không liên kề với một gốc axit amin khác trong polypeptit trình tự nhưng nằm trong phạm vi của phân tử đích được liên kết bởi protein liên kết kháng nguyên, hoặc (ii) trong gen thông báo đa phân bao gồm hai hoặc nhiều thành phần riêng lẻ, ví dụ, ST2 và AcP, các gốc axit amin thì có mặt trên một hoặc nhiều của thành phần riêng lẻ nhưng vẫn được liên kết bởi protein liên kết kháng nguyên. Các yếu tố quyết định epitop có thể bao gồm các nhóm hoạt động bề mặt hóa học của các phân tử như các axit amin, các chuỗi bên đường, các nhóm phosphoryl hoặc sulfonyl, và có thể có các đặc trưng cấu trúc ba chiều đặc hiệu, và/hoặc các đặc trưng mang điện tích đặc hiệu. Nhìn chung, các protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu đối với phân tử đích cụ thể sẽ ưu tiên nhận diện epitop trên phân tử đích trong hỗn hợp phức của các protein và/hoặc các đại phân tử.

Các phương pháp mô tả đặc điểm epitop được liên kết bởi protein liên kết kháng nguyên được biết đến phổ biến trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp chia giỏ (cạnh tranh chéo) (Miller *et al* “Epitope binning of murine monoclonal antibodies by a multiplexed pairing assay” *J Immunol Methods* (2011) 365, 118-25), lập bản đồ peptit (ví dụ, PEPSPOT™) (Albert *et al* “The B-cell Epitope of the Monoclonal Anti-Factor VIII Antibody ESH8 Characterized by Peptide Array Analysis” 2008 *Thromb Haemost* 99, 634-7), các phương pháp gây đột biến như phương pháp thể khảm (Song *et al* “Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients” *J. Virol.* (2010)84, 6935-6942), phương pháp quét alanin (Cunningham và Wells “High-resolution epitope mapping of HGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis” *Science* (1989) 244, 1081– 1085), phương pháp quét acginin (Lim *et al*

“A diversity of antibody epitopes can induce signaling through the erythropoietin receptor” *Biochemistry* (2010) 49, 3797–3804), các phương pháp trao đổi HD (Coates *et al* “Epitope mapping by amide hydrogen/deuterium exchange coupled with immobilization of antibody, on-line proteolysis, liquid chromatography and mass spectrometry” *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2009) 23 639– 647), các phương pháp bảo hòa chéo NMR (Morgan *et al* “Precise epitope mapping of malaria parasite inhibitory antibodies by TROSY NMR cross-saturation” *Biochemistry* (2005) 44, 518-23), và phương pháp tinh thể học (Gerhardt *et al* “Structure of IL-17A in complex with a potent, fully human neutralizing antibody” *J. Mol. Biol* (2009) 394, 905-21). Các phương pháp khác nhau về mức độ chi tiết chúng mang đến các thông tin về các axit amin bao gồm epitop.

Các protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm các protein có epitop xếp chồng với protein liên kết kháng nguyên dùng làm ví dụ minh họa được mô tả ở đây, ví dụ, Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32, hoặc Ab33. Theo một số phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên có epitop giống hệt như các protein liên kết kháng nguyên dùng làm ví dụ minh họa. Theo các phương án khác, protein liên kết kháng nguyên liên kết chỉ một nhóm nhỏ của các axit amin giống hệt như protein liên kết kháng nguyên dùng làm ví dụ minh họa.

Theo một số phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên ST2 có epitop xếp chồng hoặc giống nhau như Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32, hoặc Ab33 và bao gồm a) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90% tính đồng dạng, ít nhất 95% tính đồng dạng, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:164, hoặc SEQ ID NO:165; b) vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90% tính đồng dạng, ít nhất 95% tính đồng dạng, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:146, hoặc SEQ ID NO:147; hoặc c) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của a) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của b).

Theo một số phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên ST2 có epitop xếp chồng hoặc giống nhau như Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32, hoặc Ab33, và bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:95 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:96 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:97 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:31; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:98 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:32; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:99 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:33; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:100 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:34; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:101 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:35; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:102 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:36; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất

với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:103 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:37; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:104 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:38; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:105 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:39; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:163 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:145; các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:164 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:146; và các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:165 và vùng biến đổi của chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90%, ít nhất 95%, hoặc đồng nhất với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:147.

Theo một số phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên ST2 có epitop xếp chồng hoặc giống nhau như Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32, hoặc Ab33 và bao gồm a) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:164, hoặc SEQ ID NO:165; b) vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:145, SEQ ID

NO:146, hoặc SEQ ID NO:147; hoặc c) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của a) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của b).

Theo một số phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên ST2 có epitop xếp chồng hoặc giống nhau như Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32, hoặc Ab33 và bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:95 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:29; chúng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:96 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:30; chúng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:97 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:31; chúng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:98 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:32; chúng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:99 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:33; chúng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:100 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:34; chúng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:101 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin

từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:35; chúng bao gồm vùng biên đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:102 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:36; chúng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:103 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:37; chúng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:104 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:38; chúng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:105 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:39; chúng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:163 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:145; chúng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:164 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:146; và chúng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:165 và vùng biến đổi của chuỗi nặng chỉ có mười hoặc chỉ có năm đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:147.

Theo một số phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên ST2 có epitop xếp chồng hoặc giống nhau như Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10,

Ab11, Ab30, Ab32, hoặc Ab33 và bao gồm vùng biên đôi của chuỗi nhẹ bao gồm a) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:106; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:117; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:128; b) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:107; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:118; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:129; c) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:108; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:119; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:130; d) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:109; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:120; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:131; e) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:110; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:121; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:132; f) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:111; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:122; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:133; g) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:112; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:123; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:134; h) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:113; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit

amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:124; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:135; i) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:114; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:125; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:136; j) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:115; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:126; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:137; k) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:116; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:127; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:138; l) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:166; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:169; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:172; m) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:167; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:170; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:173; hoặc n) LCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR1 nêu trong SEQ ID NO:168; LCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR2 nêu trong SEQ ID NO:171; và LCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự LCDR3 nêu trong SEQ ID NO:174; và vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm o) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:40; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:51; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:62; p) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc

[illegible]

HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:70; x) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:49; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:60; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:71; y) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:50; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:61; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:72; z) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:148; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:151; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:154; aa) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:149; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:152; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:155; hoặc bb) HCDR1 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR1 nêu trong SEQ ID NO:150; HCDR2 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR2 nêu trong SEQ ID NO:153; và HCDR3 chỉ có ba đột biến bổ sung, cắt bỏ hoặc thay thế axit amin từ trình tự HCDR3 nêu trong SEQ ID NO:156.

Các protein liên kết kháng nguyên ST2 được ưu tiên được mô tả ngay ở trên bao gồm các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của a) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của o); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của b) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của p); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của c) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của q); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của d) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của r); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của e) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của s); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của f) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của t); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của g) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của u); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của h) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của v); các

protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của i) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của w); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của j) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của x); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của k) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của y); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của l) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của z); các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của m) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của aa); và các protein bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của n) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của bb).

Các protein liên kết kháng nguyên mà có epitop giống nhau hoặc epitop xếp chồng sẽ thường xuyên cạnh tranh chéo để liên kết với kháng nguyên. Do đó, theo một số phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế cạnh tranh chéo với Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab30, Ab32, hoặc Ab33. Để "cạnh tranh chéo" hoặc "sự cạnh tranh chéo" có nghĩa là các protein liên kết kháng nguyên cạnh tranh đối với cùng một epitop hoặc vị trí liên kết trên đích. Sự cạnh tranh này có thể được xác định bằng một thử nghiệm trong đó protein liên kết kháng nguyên liên quan (ví dụ, kháng thể hoặc một phần liên kết kháng nguyên của nó) ngăn cản hoặc ức chế sự liên kết đặc hiệu của protein liên kết kháng nguyên thử nghiệm, và ngược lại. Nhiều loại thử nghiệm liên kết cạnh tranh có thể được sử dụng để xác định xem phân tử thử nghiệm có cạnh tranh với phân tử liên quan để liên kết hay không. Các ví dụ về các thử nghiệm có thể được sử dụng bao gồm thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) trực tiếp hoặc gián tiếp pha rắn, thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA) trực tiếp hoặc gián tiếp pha rắn, thử nghiệm cạnh tranh sandwich (xem, ví dụ, Stahl et al. (1983) *Methods in Enzymology* 9:242-253), EIA biotin-avidin gián tiếp pha rắn (xem, ví dụ, Kirkland et al., (1986) *J. Immunol.* 137:3614-3619), thử nghiệm đánh dấu trực tiếp pha rắn, thử nghiệm sandwich đánh dấu trực tiếp pha rắn, Luminex (Jia et al "A novel method of Multiplexed Competitive Antibody Binning for the characterization of monoclonal antibodies" *J. Immunological Methods* (2004) 288, 91–98) và cộng hưởng plasmon bề mặt (Song et al "Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized Anti-CD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients" *J. Virol.* (2010) 84, 6935-6942). Phương pháp dùng làm ví dụ minh họa để xác định tính cạnh tranh chéo được mô tả trong Ví dụ 5. Thông thường, khi một protein liên kết kháng nguyên cạnh tranh có mặt quá mức, nó sẽ ức chế sự liên kết của protein liên kết kháng nguyên liên quan

với kháng nguyên thông thường vào khoảng ít nhất 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, hoặc 75%. Trong một số trường hợp, sự liên kết được ức chế ở mức ít nhất 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc lớn hơn.

Ab2 liên kết ST2 ở khi đuôi dài và ở người với ái lực cao và ngăn cản IL-33 liên kết với ST2, do đó ngăn cản tín hiệu ST2 do IL-33 gây ra. Các kháng thể có các epitop đồng dạng, giống nhau, hoặc xếp chồng với Ab2 có thể có chung những đặc trưng độc đáo này. Theo các phương án được ưu tiên, protein liên kết kháng nguyên ST2 cạnh tranh chéo với Ab2 để liên kết với ST2. Các protein liên kết kháng nguyên ST2 dùng làm ví dụ mà cạnh tranh chéo với Ab2 bao gồm Ab1, Ab3, Ab5, Ab7, Ab8, và Ab30 (xem Ví dụ 5). Nếu cố gắng tìm các kháng thể liên kết epitop xếp chồng, tương tự, hoặc giống nhau như Ab2, thì người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể sàng lọc một hoặc nhiều kháng thể để cạnh tranh chéo với Ab2. Ngoài ra, khi tạo các biến thể với kháng thể mà phản ứng chéo với Ab2, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể sàng lọc các kháng thể này để xác định xem sự cạnh tranh chéo được duy trì sau khi thay đổi, cho thấy epitop của biến thể này không bị biến đổi đáng kể so với phân tử ban đầu. Vì vậy, theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể các biến thể cạnh tranh chéo với Ab2 để liên kết với ST2.

Bên cạnh sự cạnh tranh chéo với nhau, các kháng thể có các epitop xếp chồng, tương tự, hoặc giống nhau có thể bị ảnh hưởng bởi sự gây đột biến của ST2 một cách tương tự. Một số đột biến nhất định có thể ức chế sự liên kết của kháng thể; các đột biến khác có thể làm tăng cường hoặc hoạt hóa sự liên kết. Theo Ví dụ 11, sự gây đột biến bằng cách quét acginin/alanin được thực hiện trên một phân tử thuộc miền ngoại bào của ST2 và sự ảnh hưởng đến các kháng thể dùng làm ví dụ được xác định. Được bao gồm trong phạm vi của sáng chế là các protein liên kết ST2 có các đặc tính sao cho chúng được làm ảnh hưởng theo cách tương tự với vai trò là kháng thể dùng làm ví dụ minh họa đến sự gây đột biến.

Theo một số phương án nhất định, sự liên kết của protein liên kết kháng nguyên ST2 được ức chế bởi một đột biến đơn trong ST2, trong đó đột biến đơn này được chọn từ nhóm bao gồm L14R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, D97R, V104R, G138R, N152R, và V176R. Theo các phương án được ưu tiên, bất kỳ trong số hai hoặc nhiều, ba hoặc nhiều, bốn hoặc nhiều, năm hoặc nhiều, sáu hoặc nhiều, bảy

hoặc nhiều, tám hoặc nhiều chín hoặc nhiều, mười hoặc nhiều, hoặc tất cả các đột biến đơn của nhóm ức chế riêng lẻ sự liên kết của protein liên kết ST2. Theo các phương án khác, sự liên kết của protein liên kết kháng nguyên ST2 được hoạt hóa bởi đột biến đơn trong ST2, trong đó đột biến đơn được chọn từ nhóm bao gồm L53R, R72A, và S73R. Theo các phương án được ưu tiên, tất cả các đột biến đơn của nhóm hoạt hóa riêng lẻ sự liên kết của protein liên kết ST2. Theo các phương án được ưu tiên, protein liên kết kháng nguyên ST2 có chung các thuộc tính của Ab2 và bị ức chế bởi bất kỳ trong số L14R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, D97R, V104R, G138R, N152R, và V176R và được hoạt hóa bởi bất kỳ trong số L53R, R72A, S73R.

Một phương pháp khác mô tả đặc điểm kháng thể dựa trên epitop của nó là phương pháp trao đổi hydro/đoteri (HDX) amit. HDX đã được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu thể cấu tạo và động lực học protein, các tương tác protein-phối tử và các tương tác protein-protein (Zhang và Smith 1993, Engen và Smith 2001). Việc phát hiện bằng phổ khối lượng cung cấp một công cụ mạnh mẽ để xác định mức độ trao đổi, do sự thay thế hydro đơn bằng đoteri dẫn đến làm tăng khối lượng 1 Da cho mỗi lần trao đổi. Mức độ HDX có thể được đo dễ dàng ở mức peptit bằng cách phân tích dịch thủy phân phân giải protein bằng phép sắc ký lỏng kết hợp với khối phổ song song trong các điều kiện có kiểm soát (Engen và Smith 2001, Baerga-Ortiz, Hughes et al. 2002, Codreanu, Ladner et al. 2002, Hamuro, Coales et al. 2006, Coales, Tuske et al. 2009, Zhang, Zhang et al. 2012).

Sự so sánh các mẫu HDX của kháng nguyên giữa các dịch thủy phân phân giải protein của ST2 khi không có hoặc có mặt kháng thể (trạng thái liên kết so với trạng thái tự do) có thể biểu hiện các vị trí tương tác. Theo cách đặc hiệu, khi kháng thể liên kết với ST2, các hydro của amit tiếp cận dung môi trong ST2 tự do có thể trở thành được bảo vệ, và do đó, nhận thấy các tốc độ trao đổi chậm hơn. Do đó, các vùng mà đạt được ít đoteri hơn khi có mặt của kháng thể so với khi không có mặt kháng thể là các epitop tiềm năng. Các yếu tố khác, bao gồm cả tốc độ trao đổi ở trạng thái tự do, sự hiểu biết về cấu trúc protein kháng nguyên, cũng như các kết quả thu được từ các nỗ lực lập bản đồ epitop khác, được xem xét khi các epitop được xác định.

Ab2 liên kết với ST2 được phân tích bằng phương pháp HDX như được mô tả trong Ví dụ 12. Phép phân tích này đã chứng minh rằng Ab2 liên kết với/biến đổi tốc độ

trao đổi của một phần cấu trúc ST2 bao gồm các axit amin 33-44 và 88-94 trong số các axit amin 19-322 thuộc SEQ ID NO:1 (các axit amin 15-26 và 70-76 của ST2 thành thực, lần lượt theo tương ứng). Các kháng thể có các epitop xếp chồng, các epitop tương tự, hoặc các epitop giống hệt như Ab2 cũng sẽ liên kết với/biến đổi tốc độ trao đổi của các axit amin nằm trong các vị trí 33-44 và 88-94 thuộc SEQ ID NO:1. Theo một số phương án nhất định, protein liên kết ST2, ví dụ, kháng thể, bảo vệ axit amin bất kỳ trong số các axit amin 33-44 thuộc SEQ ID NO:1 khi được liên kết với ST2 và được phân tích bằng phương pháp HDX. Theo các phương án khác, axit amin bất kỳ trong số các axit amin 88-94 được bảo vệ. Cả hai chỉ ra sự xếp chồng một phần của các epitop liên kết với Ab2. Theo các phương án được ưu tiên, axit amin bất kỳ trong số các axit amin 33-44 và trong số các axit amin 88-94 được bảo vệ. Theo một số phương án nhất định, protein liên kết ST2, ví dụ, kháng thể, bảo vệ tất cả các axit amin 33-44 thuộc SEQ ID NO:1 khi được liên kết với ST2 và được phân tích bằng phương pháp HDX. Theo các phương án khác, tất cả các axit amin 88-94 được bảo vệ. Cả hai chỉ ra epitop liên kết tương tự với Ab2. Theo các phương án được ưu tiên, tất cả các axit amin 33-44 và tất cả các axit amin 88-94 đều được bảo vệ, điều này cho thấy epitop giống hệt hoặc gần như giống hệt như Ab2.

Sự liên kết của Ab2 với ST2 còn được phân tích thêm bằng cách sử dụng phương pháp ghi hình tinh thể bằng tia X. Phương pháp ghi hình tinh thể bằng tia X thì phù hợp với phân tích HDX. Bề mặt phân chia giữa Ab và kháng nguyên có thể được xác định theo một số cách. Theo Ví dụ 13, bề mặt phân chia được xác định bằng cách sử dụng độ chênh lệch tiếp xúc dung môi và theo khoảng cách. Các góc của ST2 mà nằm trong bề mặt phân chia với Ab2 được xác định theo độ chênh lệch tiếp xúc dung môi hoặc khoảng cách nhỏ hơn 5 Å là (tương ứng với vị trí trong ST2 thành thực (không có trình tự dẫn đầu)) K1, F2, P19, R20, Q21, G22, K23, Y26, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79, và Y81. Theo một số phương án nhất định, protein liên kết ST2 tạo thành bề mặt phân chia với ST2 mà xếp chồng với bề mặt phân chia của Ab2, bao gồm cả các góc trong đó bất kỳ trong số K1, F2, P19, R20, Q21, G22, K23, Y26, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79, hoặc Y81 nằm trong bề mặt phân chia. Theo một số phương án, protein liên kết ST2 tạo thành bề mặt phân chia với ST2 trong đó P19, R20, Q21, G22, K23, và/hoặc Y26 là nằm trong bề mặt phân chia. Theo các phương án

khác, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79, và/hoặc Y81 nằm trong bề mặt phân chia. Theo các phương án được ưu tiên, K1, F2, P19, R20, Q21, G22, K23, Y26, I70, V71, R72, S73, P74, T75, F76, N77, R78, T79, và Y81 nằm trong bề mặt phân chia.

Cấu trúc tinh thể đã chỉ ra rằng một số gốc axit amin nhất định tạo thành các liên kết hydro hoặc các cầu muối với các axit amin với Ab2. Các gốc đó bao gồm K1, R20, K23, Y26, T75, N77, R78, và T79. Theo một số phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên ST2 tạo thành các liên kết hydro hoặc cầu muối với một hoặc nhiều của K1, R20, K23, Y26, T75, N77, R78, và T79.

Cấu trúc tinh thể còn cung cấp thêm thông tin về các gốc của Ab2 tạo thành bề mặt phân chia với ST2. FIG. 10 cho thấy các gốc trong vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và vùng biến đổi của chuỗi nặng tạo thành bề mặt phân chia với ST2. Cũng được chỉ ra nữa là các gốc tạo thành các liên kết hydro hoặc các cầu muối với các axit amin trong ST2. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể sử dụng thông tin này để thiết kế các biến thể của Ab2, trong đó có các biến thể chứa các vùng biến đổi có 90% tính đồng dạng, 95% tính đồng dạng, và 10 hoặc ít hơn các đột biến chèn, các đột biến cắt bỏ, và/hoặc các đột biến thay thế nằm trong vùng biến đổi của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của Ab2. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể muốn duy trì các axit amin nằm trong bề mặt phân chia trong lúc biến đổi các gốc không ở bề mặt phân chia. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thiết kế và tạo ra các biến thể của Ab2 có một hoặc nhiều đột biến bổ sung, thay thế, và/hoặc cắt bỏ axit amin nằm trong một hoặc nhiều CDR của Ab2 mà duy trì sự liên kết với ST2.

Theo một số phương án, protein liên kết ST2 bao gồm biến thể của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của Ab2 (SEQ ID NO:96) trong đó D28, I29, S30, N31, Y32, Y49, D50, N53, E55, T56, D91, D92, N93, F94, và/hoặc L96 vẫn không thay đổi hoặc bao gồm đột biến thay thế bảo thủ của nó, và/hoặc biến thể của vùng biến đổi của chuỗi nặng của Ab2 (SEQ ID NO:30) trong đó W33, I50, D57, R59, H99, G100, T101, S102, S103, D104, Y105, và/hoặc Y106 vẫn không thay đổi hoặc bao gồm một đột biến bảo thủ. Theo các phương án được ưu tiên, D28, N31, D50, N53, E55, D91 và D92 thuộc vùng biến đổi

của chuỗi nhẹ vẫn không thay đổi và S102, S103, D104, và Y105 của chuỗi nặng vẫn không thay đổi.

Các polynucleotit mã hóa các protein liên kết kháng nguyên ST2

Được bao gồm trong sáng chế là các axit nucleic mã hóa các protein liên kết kháng nguyên ST2, trong đó có các kháng thể, như được xác định ở đây. Các axit nucleic được ưu tiên bao gồm các axit nucleic mã hóa các chuỗi nhẹ và các chuỗi nặng dùng làm ví dụ minh họa được mô tả ở đây.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab1 LC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:73.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab2 LC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:74.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab3 LC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:75.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab4 LC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:76.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab5 LC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:77.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab6 LC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:78.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab7 LC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:79.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab8 LC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:80.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab9 LC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:81.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab10 LC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:82.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab11 LC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:83.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab30 LC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:157.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab32 LC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:158.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab33 LC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:159.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab1 HC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:7.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab2 HC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:8.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab3 HC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:9.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab4 HC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:10.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab5 HC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:11.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab6 HC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:12.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab7 HC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:13.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab8 HC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:14.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab9 HC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:15.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab10 HC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:16.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab11 HC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:17.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab30 HC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:139.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab32 HC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:140.

Axit nucleic dùng làm ví dụ minh họa mã hóa Ab33 HC là axit nucleic bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:141.

Các khía cạnh của sáng chế bao gồm các biến thể polynucleotit (ví dụ., do thoái hóa) mã hóa các trình tự axit amin được mô tả ở đây.

Các khía cạnh của sáng chế bao gồm nhiều phương án khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các phương án dùng làm ví dụ minh họa sau đây.

Polynucleotit tách ly, trong đó polynucleotit này mã hóa một hoặc nhiều polypeptit bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:

Nhóm A:

1. trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ mà ít nhất 90% đồng dạng với trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được nêu trong các SEQ ID NO:95-105, 163-165;

2. trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng mà ít nhất 90% đồng dạng với trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng được nêu trong các SEQ ID NO:29-39, 145-147;

3. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của (1) và vùng biến đổi của chuỗi nặng của (2); và

Nhóm B. vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm CDR1, CDR2, CDR3 và/hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm CDR1, CDR2, CDR3 mà giống hoặc khác chỉ tổng cộng ba đột biến bổ sung, thay thế, và/hoặc cắt bỏ axit amin trong từng CDR từ các trình tự sau:

1. CDR1 của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:106), CDR2 (SEQ ID NO:117), CDR3 (SEQ ID NO:128) hoặc CDR1 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:40), CDR2 (SEQ ID NO:51), CDR3 (SEQ ID NO:62) của Ab1;

2. CDR1 của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:107), CDR2 (SEQ ID NO:118), CDR3 (SEQ ID NO:129) hoặc CDR1 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:41), CDR2 (SEQ ID NO:52), CDR3 (SEQ ID NO:63) của Ab2;

3. CDR1 của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:108), CDR2 (SEQ ID NO:119), CDR3 (SEQ ID NO:130) hoặc CDR1 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:42), CDR2 (SEQ ID NO:53), CDR3 (SEQ ID NO:64) của Ab3;

4. CDR1 của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:109), CDR2 (SEQ ID NO:120), CDR3 (SEQ ID NO:131) hoặc CDR1 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:43), CDR2 (SEQ ID NO:54), CDR3 (SEQ ID NO:65) của Ab4;

5. CDR1 của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:110), CDR2 (SEQ ID NO:121), CDR3 (SEQ ID NO:132) hoặc CDR1 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:44), CDR2 (SEQ ID NO:55), CDR3 (SEQ ID NO:66) của Ab5;

6. CDR1 của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:111), CDR2 (SEQ ID NO:122), CDR3 (SEQ ID NO:133) hoặc CDR1 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:45), CDR2 (SEQ ID NO:56), CDR3 (SEQ ID NO:67) của Ab6;

7. CDR1 của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:112), CDR2 (SEQ ID NO:123), CDR3 (SEQ ID NO:134) hoặc CDR1 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:46), CDR2 (SEQ ID NO:57), CDR3 (SEQ ID NO:68) của Ab7;

8. CDR1 của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:113), CDR2 (SEQ ID NO:124), CDR3 (SEQ ID NO:135) hoặc CDR1 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:47), CDR2 (SEQ ID NO:58), CDR3 (SEQ ID NO:69) của Ab8;

9. CDR1 của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:114), CDR2 (SEQ ID NO:125), CDR3 (SEQ ID NO:136) hoặc CDR1 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:48), CDR2 (SEQ ID NO:59), CDR3 (SEQ ID NO:70) của Ab9;

10. CDR1 của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:115), CDR2 (SEQ ID NO:126), CDR3 (SEQ ID NO:137) hoặc CDR1 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:49), CDR2 (SEQ ID NO:60), CDR3 (SEQ ID NO:71) của Ab10;

11. CDR1 của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:116), CDR2 (SEQ ID NO:127), CDR3 (SEQ ID NO:138) hoặc CDR1 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:50), CDR2 (SEQ ID NO:61), CDR3 (SEQ ID NO:72) của Ab11;

12. CDR1 của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:166), CDR2 (SEQ ID NO:169), CDR3 (SEQ ID NO:172) hoặc CDR1 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:148), CDR2 (SEQ ID NO:151), CDR3 (SEQ ID NO:154) của Ab30;

13. CDR1 của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:167), CDR2 (SEQ ID NO:170), CDR3 (SEQ ID NO:173) hoặc CDR1 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:149), CDR2 (SEQ ID NO:152), CDR3 (SEQ ID NO:155) của Ab32; và

14. CDR1 của chuỗi nhẹ (SEQ ID NO:168), CDR2 (SEQ ID NO:171), CDR3 (SEQ ID NO:174) hoặc CDR1 của chuỗi nặng (SEQ ID NO:150), CDR2 (SEQ ID NO:153), CDR3 (SEQ ID NO:156) của Ab33.

Theo các phương án được ưu tiên, polypeptit được mã hóa bởi axit nucleic tách ly là một thành phần của protein liên kết kháng nguyên mà liên kết ST2.

Các trình tự nucleotit tương ứng với các trình tự axit amin được mô tả ở đây, để dùng làm các đầu dò hoặc các môi để tách ly các axit nucleic hoặc khi truy vấn các trình tự để tìm kiếm cơ sở dữ liệu, có thể thu được bằng cách “dịch mã ngược” từ các trình tự axit amin, hoặc bằng cách nhận diện các vùng chứa các axit amin đồng dạng với các polypeptit mà trình tự ADN mã hóa đã được nhận diện cho. Quy trình phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) phổ biến có thể được sử dụng để tách ly và khuếch đại trình tự ADN mã hóa các protein liên kết kháng nguyên ST2 hoặc dạng kết hợp mong muốn của các đoạn polypeptit của protein liên kết kháng nguyên ST2. Các oligonucleotit xác định trạm cuối mong muốn của dạng kết hợp của các đoạn ADN được sử dụng làm các môi 5' và 3'. Ngoài ra, các oligonucleotit có thể chứa các vị trí nhận dạng cho các endonucleaza giới hạn, để tạo điều kiện cho việc chèn dạng kết hợp khuếch đại của các đoạn ADN vào vector biểu hiện. Các kỹ thuật PCR được mô tả trong tài liệu của Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), trang 189-196; và *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Các phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm ADN và ARN ở cả hai dạng sợi đơn và sợi đôi, cũng như các trình tự bổ sung tương ứng. ADN bao gồm, ví dụ, cADN, ADN hệ gen, ADN tổng hợp hóa học, ADN được khuếch đại bằng PCR, và các dạng kết hợp của chúng. Các phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm các gen có chiều dài đầy đủ hoặc các phân tử cADN cũng như dạng kết hợp các đoạn của chúng. Các axit nucleic theo sáng chế được ưu tiên là có nguồn gốc từ các nguồn ở người, nhưng sáng chế cũng bao gồm các axit nucleic có nguồn gốc từ các loài không phải người.

"Axit nucleic tách ly" là axit nucleic đã được tách ly ra từ các trình tự gen liền kề có mặt trong hệ gen của sinh vật mà từ đó axit nucleic được tách ra, trong trường hợp các axit nucleic được tách ly ra từ các nguồn có trong tự nhiên. Trong trường hợp các axit nucleic được tổng hợp bằng phương pháp enzym từ một mẫu hoặc theo cách hóa học, như các sản phẩm PCR, các phân tử cADN, hoặc oligonucleotit ví dụ, cần phải hiểu rằng các axit nucleic thu được từ các quá trình này là các axit nucleic tách ly. Phân tử axit nucleic tách ly chỉ phân tử axit nucleic dưới dạng đoạn riêng biệt hoặc dưới dạng một thành phần của cấu trúc axit nucleic lớn. Theo một phương án được ưu tiên, các axit nucleic về cơ bản là không bị nhiễm vật liệu nội sinh. Tốt hơn nữa, phân tử axit nucleic đã có nguồn gốc từ ADN hoặc ARN được tách ly ít nhất một lần ở dạng về cơ bản là tinh khiết và với hàm lượng hoặc nồng độ làm cho có thể nhận dạng, sử dụng, và thu hồi các trình tự nucleotit thành phần của nó bằng các phương pháp sinh hóa tiêu chuẩn (như các phương pháp được nêu trong tài liệu của Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, xuất bản lần thứ hai, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Tốt hơn nữa, các trình tự này là cung cấp và/hoặc được tạo cấu trúc dưới dạng khung đọc mở không bị gián đoạn bởi các trình tự không dịch mã bên trong, hoặc các intron, mà chúng thông thường có mặt trong các gen eukaryot. Các trình tự ADN không dịch mã có thể có mặt vị trí 5' hoặc 3' từ khung đọc mở, trong đó các vị trí này không có thể thiệp vào thao tác hoặc sự biểu hiện của vùng mã hóa.

Sáng chế cũng bao gồm các axit nucleic lai trong các điều kiện vừa phải nghiêm ngặt, và tốt hơn nữa là các điều kiện nghiêm ngặt cao, với các axit nucleic mã hóa các protein liên kết kháng nguyên ST2 như được mô tả ở đây. Các thông số cơ bản làm ảnh hưởng đến việc lựa chọn các điều kiện lai và việc hướng dẫn để đưa ra các điều kiện thích hợp là trình bày trong tài liệu của Sambrook, Fritsch, và Maniatis (1989, *Molecular*

Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., các chương 9 và 11; và Current Protocols in Molecular Biology, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., các phần 2.10 và 6,3-6,4), và có thể dễ dàng được xác định bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dựa trên, ví dụ, chiều dài và/hoặc thành phần bazơ của ADN. Một cách để đạt được điều kiện tương đối nghiêm ngặt liên quan đến việc sử dụng dung dịch rửa sẵn chứa 5 x SSC, SDS 0,5%, EDTA 1,0mM (độ pH 8,0), dung dịch đệm lai gồm focmamit khoảng 50%, 6 x SSC, và nhiệt độ lai là khoảng 55°C (hoặc các dung dịch lai tương tự khác, như dung dịch chứa focmamit khoảng 50%, với nhiệt độ lai là khoảng 42°C), và các điều kiện rửa gồm khoảng 60°C, trong 0,5 x SSC, SDS 0,1%. Nhìn chung, các điều kiện nghiêm ngặt cao được định nghĩa là các điều kiện lai như trên, nhưng với điều kiện rửa ở khoảng chừng 68 độ C, 0,2 x SSC, SDS 0,1%. SSPE (1xSSPE là NaCl 0,15M, NaH₂PO₄ 10mM, và EDTA 1, 25mM, độ pH 7, 4) có thể được thay thế cho SSC (1xSSC là NaCl 0,15M và natri xitrat 15mM) trong các chất đệm lai và chất đệm rửa; thực hiện các thao tác rửa trong 15 phút sau khi kết thúc quá trình lai. Cần phải hiểu rằng nhiệt độ rửa và nồng độ muối rửa có thể được điều chỉnh khi cần thiết để đạt được mức độ nghiêm ngặt mong muốn bằng cách áp dụng các nguyên tắc cơ bản ảnh hưởng đến các phản ứng lai và độ ổn định kép, như được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả thêm dưới đây (xem, ví dụ, Sambrook et al., 1989). Khi lai axit nucleic với axit nucleic đích có trình tự chưa được biết, thì chiều dài lai được giả định là chiều dài của axit nucleic cho lai. Khi các axit nucleic có trình tự đã biết được lai, thì chiều dài lai có thể được xác định bằng cách sắp hàng các trình tự của các axit nucleic và nhận diện vùng hoặc các vùng có tính bổ sung trình tự tối ưu. Nhiệt độ lai đối với các vật lai được dự đoán là ít hơn 50 cặp bazơ về chiều dài nên là 5 đến 10 độ C nhỏ hơn nhiệt độ nóng chảy (T_m) của vật lai, trong đó T_m được xác định theo các phương trình sau. Đối với các vật lai nhỏ hơn 18 cặp bazơ về chiều dài, T_m (độ C) = 2 (# của A + các bazơ T) + 4 (# của #G + các bazơ C). Đối với các vật lai ở trên 18 cặp bazơ về chiều dài, T_m (độ C) = 81, 5 + 16,6 (log₁₀ [Na⁺]) + 0,41 (% G + C) - (600/N), trong đó N là số lượng các bazơ trong vật lai, và [Na⁺] là nồng độ của các ion natri trong chất đệm lai ([Na⁺] đối với 1xSSC = 0,165M). Tốt hơn nếu, mỗi axit nucleic cho lai này có chiều dài là ít nhất 15 nucleotit (hoặc tốt hơn nữa nếu ít nhất 18 nucleotit, hoặc ít nhất 20 nucleotit, hoặc ít

ít nhất 25 nucleotit, hoặc ít nhất 30 nucleotit, hoặc ít nhất 40 nucleotit, hoặc tốt nhất nếu ít nhất 50 nucleotit), hoặc ít nhất 25% (tốt hơn nữa nếu ít nhất 50%, hoặc ít nhất 60%, hoặc ít nhất 70%, và tốt nhất nếu ít nhất 80%) chiều dài của axit nucleic theo sáng chế mà nó lai với, và có độ tương đồng ít nhất 60% tính đồng dạng về trình tự (tốt hơn nữa nếu ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 81%, ít nhất 82%, ít nhất 83%, ít nhất 84%, ít nhất 85%, ít nhất 86%, ít nhất 87%, ít nhất 88%, ít nhất 89%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99%, và tốt nhất nếu ít nhất 99, 5%) với axit nucleic theo sáng chế mà nó lai với, trong đó tính đồng dạng về trình tự được xác định bằng cách so sánh các trình tự của các axit nucleic cho lai khi được sắp hàng để tối đa hóa tính xếp chồng và tính đồng dạng đồng thời tối thiểu hóa các khoảng trống trình tự như được mô tả chi tiết ở trên.

Các biến thể theo sáng chế thông thường được điều chế bằng cách gây đột biến đặc hiệu vị trí của nucleotit trong ADN mã hóa protein liên kết kháng nguyên, sử dụng tổ hợp gen hoặc gây đột biến PCR hoặc các phương pháp kỹ thuật khác được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, để sản xuất ADN mã hóa biến thể, và sau đó biểu hiện ADN tái tổ hợp trong môi trường nuôi cấy tế bào như được nêu trong tài liệu này. Tuy nhiên, các đoạn protein liên kết kháng nguyên bao gồm các CDR biến thể có tối đa khoảng 100-150 gốc có thể được điều chế bằng cách tổng hợp *in vitro* sử dụng các phương pháp kỹ thuật đã được xây dựng. Các biến thể thông thường biểu hiện cùng một hoạt tính sinh học đặc trưng như một dạng tương tự có trong tự nhiên, ví dụ, liên kết với ST2, mặc dù các biến thể có thể được lựa chọn mà có các đặc tính được biến đổi như sẽ được trình bày đầy đủ hơn dưới đây.

Như sẽ được đánh giá bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, do sự thoái hóa của mã di truyền, một số lượng cực kỳ lớn các axit nucleic có thể được tạo thành, tất cả trong số đó mã hóa các CDR (và các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoặc các thành phần khác của protein liên kết kháng nguyên) của sáng chế. Do đó, khi đã nhận diện trình tự axit amin cụ thể, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể tạo ra một số lượng bất kỳ các axit nucleic khác nhau, bằng cách biến đổi đơn giản trình tự của một hoặc nhiều đơn vị mã theo một cách không làm thay đổi trình tự axit amin của protein đã được mã hóa.

Sáng chế cũng đề xuất các hệ biểu hiện và các cấu trúc dưới dạng plasmit, các vectơ biểu hiện, các tổ hợp gen phiên mã hoặc tổ hợp gen biểu hiện mà bao gồm ít nhất một polynucleotit như trên. Ngoài ra, sáng chế đề xuất các tế bào vật chủ bao gồm các hệ biểu hiện hoặc các cấu trúc này.

Thông thường, các vectơ biểu hiện được sử dụng trong tế bào bất kỳ trong số các tế bào vật chủ sẽ chứa các trình tự để duy trì plasmit và để tạo dòng và biểu hiện các trình tự nucleotit ngoại sinh. Theo một số phương án nhất định, các trình tự này được gọi chung là "các trình tự chặn" sẽ thông thường bao gồm một hoặc nhiều trình tự nucleotit sau đây: trình tự khởi đầu, một hoặc nhiều các trình tự tăng cường, điểm khởi đầu sao chép, trình tự kết thúc phiên mã, trình tự intron hoàn chỉnh chứa vị trí cắt của trình tự cho và trình tự nhận, trình tự mã hóa trình tự dẫn đầu để tiết ra polypeptit, vị trí liên kết ribosom, trình tự polyadenyl hóa, vùng đa liên kết để chèn axit nucleic mã hóa polypeptit cần được biểu hiện, và phần tử đánh dấu có thể chọn được. Mỗi trình tự trong số các trình tự này được thảo luận dưới đây.

Tùy ý, vectơ có thể chứa trình tự mã hóa "đuôi", tức là, phân tử oligonucleotit nằm ở đầu 5' hoặc 3' của trình tự mã hóa protein liên kết kháng nguyên ST2; trình tự oligonucleotit này mã hóa polyHis (như hexaHis), hoặc một "đuôi" khác như FLAG, HA (virus cúm hemagglutinin), hoặc *myc*, đối với các kháng thể sẵn có trên thị trường hiện có. Đuôi này thông thường được dung hợp với polypeptit khi biểu hiện polypeptit, và có thể dùng làm phương tiện để tinh chế ái lực hoặc phát hiện protein liên kết kháng nguyên ST2 từ tế bào vật chủ. Quá trình tinh chế ái lực có thể được thực hiện, ví dụ, bằng phép sắc ký cột sử dụng các kháng thể kháng đuôi làm ma trận ái lực. Tùy ý, sau này đuôi có thể được cắt bỏ khỏi protein liên kết kháng nguyên ST2 đã qua tinh chế bằng nhiều cách khác nhau như sử dụng một số peptidaza để phân cắt.

Các trình tự chặn có thể là cùng loại (tức là, từ cùng một loài và/hoặc chủng làm tế bào vật chủ), khác loại (tức là, từ một loài khác loài hoặc chủng của tế bào vật chủ), vật lai (tức là, dạng kết hợp các trình tự chặn từ một nguồn trở lên), dạng tổng hợp hoặc tự nhiên. Như vậy, nguồn trình tự chặn có thể là sinh vật nhóm prokaryot hoặc eukaryot bất kỳ, sinh vật có xương sống hoặc không xương sống bất kỳ, hoặc loài thực vật bất kỳ, với điều kiện là trình tự chặn này là có chức năng trong, và có thể được hoạt hóa bởi, cơ chế tế bào vật chủ.

Các trình tự chặn hữu ích trong các vector theo sáng chế này có thể thu được bằng phương pháp bất kỳ trong số một vài phương pháp được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thông thường, các trình tự chặn hữu ích ở đây sẽ được nhận dạng trước bằng cách lập bản đồ và/hoặc bằng cách thủy phân nhờ endonucleaza giới hạn và vì vậy có thể được tách ly ra từ nguồn mô thích hợp sử dụng các endonucleaza giới hạn phù hợp. Trong một số trường hợp, trình tự nucleotit đầy đủ thuộc trình tự chặn có thể được biết đến. Ở đây, trình tự chặn này có thể được tổng hợp sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây để tổng hợp axit nucleic hoặc tạo dòng.

Cho dù toàn bộ hoặc chỉ một phần của trình tự chặn được biết, nó có thể thu được sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và/hoặc bằng cách sàng lọc thư viện gen với một đầu dò phù hợp như đoạn oligonucleotit và/hoặc đoạn trình tự chặn từ cùng một loài hoặc một loài khác. Trong trường hợp trình tự chặn không được biết, đoạn ADN chứa trình tự chặn có thể được tách ly ra từ một mảnh ADN lớn hơn mà có thể chứa, ví dụ, trình tự mã hóa hoặc thậm chí một gen hoặc nhiều gen khác. Có thể thực hiện tách ly bằng cách thủy phân nhờ endonucleaza giới hạn để sản xuất đoạn ADN phù hợp tiếp theo là tách ly sử dụng tinh chế gel nhờ agarosa, sắc ký cột Qiagen® (Chatsworth, CA), hoặc các phương pháp đã được biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Việc lựa chọn các enzym thích hợp để thực hiện mục đích này sẽ dễ dàng trở nên sáng tỏ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Điểm khởi đầu sao chép thông thường là một phần của các vector biểu hiện prokaryot được mua trên thị trường, và điểm khởi đầu này hỗ trợ sự khuếch đại của vector trong tế bào vật chủ. Nếu vector được chọn không chứa vị trí điểm khởi đầu sao chép, thì một vị trí có thể được tổng hợp hóa học dựa trên trình tự đã được biết, và được gắn vào vector. Ví dụ, điểm khởi đầu sao chép từ plasmit pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) là thích hợp cho hầu hết các vi khuẩn gram âm, và các nguồn virus khác nhau (ví dụ, SV40, polyoma, adenovirus, virus viêm miệng mụn nước (VSV), hoặc các papillomavirus như HPV hoặc BPV) là hữu ích để tạo dòng các vector trong các tế bào động vật có vú. Nhìn chung, thành phần của điểm khởi đầu sao chép thì không cần thiết cho các vector biểu hiện ở động vật có vú (ví dụ, điểm khởi đầu SV40 thường được sử dụng duy nhất do nó cũng chứa trình tự khởi đầu sớm của virus).

Trình tự kết thúc phiên mã thông thường nằm ở vị trí 3' đến vị trí kết thúc của vùng mã hóa polypeptit và dùng để kết thúc phiên mã. Thông thường, trình tự kết thúc phiên mã trong các tế bào prokaryot là đoạn giàu G-C tiếp theo là trình tự poly-T. Mặc dù trình tự dễ dàng được tạo dòng từ thư viện gen hoặc thậm chí được mua trên thị trường là một phần của vector, nhưng nó cũng có thể dễ dàng được tổng hợp bằng cách sử dụng các phương pháp tổng hợp axit nucleic như các phương pháp được mô tả ở đây.

Gen đánh dấu chọn lọc mã hóa protein cần thiết cho sự sống sót và sinh trưởng của tế bào vật chủ được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy chọn lọc. Các gen đánh dấu chọn lọc điển hình mã hóa các protein mà (a) có tính kháng các chất kháng sinh hoặc các độc tố khác, ví dụ, ampicillin, tetracyclin, hoặc kanamycin đối với các tế bào vật chủ prokaryot; (b) bổ sung sự thiếu hụt dinh dưỡng thụ động của tế bào; hoặc (c) cung cấp các chất dinh dưỡng quan trọng không có sẵn từ hợp phức hoặc các môi trường xác định. Các gen đánh dấu chọn lọc đặc hiệu là gen kháng kanamycin, gen kháng ampicillin, và gen kháng tetracyclin. Một cách thuận lợi, gen kháng neomycin cũng có thể được sử dụng để lựa chọn trong các tế bào vật chủ prokaryot và eukaryot.

Các gen chọn lọc khác có thể được sử dụng để khuếch đại gen mà sẽ được biểu hiện. Khuếch đại là quá trình trong đó các gen cần thiết để sản xuất một loại protein quan trọng đối với sự sinh trưởng hoặc khả năng sống sót của tế bào được lặp lại song song bên trong các nhiễm sắc thể thuộc các thế hệ kế tiếp của các tế bào tái tổ hợp. Các ví dụ về các gen đánh dấu chọn lọc thích hợp cho các tế bào động vật có vú bao gồm dihydrofolat reductaza (DHFR) và các gen thyridin kinaza không hoạt hóa. Các thể biến nạp của tế bào động vật có vú được đặt dưới áp lực chọn lọc trong đó chỉ có các thể biến nạp được làm thích nghi duy nhất để sống sót nhờ gen chọn lọc có mặt trong vector. Áp lực chọn lọc được gây bằng cách nuôi cấy các tế bào được biến nạp trong các điều kiện trong đó nồng độ của tác nhân chọn lọc trong môi trường được tăng liên tục, từ đó dẫn đến sự khuếch đại của cả gen chọn lọc và ADN mã hóa một gen khác, như protein liên kết kháng nguyên kháng thể mà liên kết với polypeptit ST2. Do đó, lượng polypeptit tăng như protein liên kết kháng nguyên ST2 được tổng hợp từ ADN khuếch đại.

Thông thường, vị trí liên kết ribosom cần thiết cho sự khởi đầu dịch mã của mARN và được đặc trưng bởi trình tự Shine-Dalgarno (các prokaryot) hoặc trình tự Kozak (các

eukaryot). Phần tử thông thường nằm ở vị trí 3' đến trình tự khởi đầu và 5' đến trình tự mã hóa của polypeptit cần được biểu hiện. Theo một số phương án nhất định, một hoặc nhiều vùng mã hóa có thể được liên kết phù hợp với vị trí liên kết ribosom bên trong (IRES), cho phép sự dịch mã hai khung đọc mở từ bản phiên mã ARN đơn.

Trong một số trường hợp, như trường hợp sự glycosyl hóa là mong muốn trong hệ biểu hiện tế bào vật chủ eukaryot, một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thao tác trên các trình tự trước hoặc sau khác nhau để cải thiện sự glycosyl hóa hoặc năng suất. Ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể biến đổi vị trí phân cắt peptidaza của peptit tín hiệu cụ thể, hoặc bổ sung các trình tự sau, điều này cũng có thể làm ảnh hưởng đến sự glycosyl hóa. Sản phẩm protein cuối cùng có thể có, ở vị trí -1 (tương ứng với axit amin đầu tiên của protein thành thực) một hoặc nhiều axit amin bổ sung vốn có cần biểu hiện, mà chúng có thể chưa được cắt bỏ hoàn toàn. Ví dụ, sản phẩm protein cuối cùng có thể có một hoặc hai gốc axit amin được tìm thấy trong vị trí phân cắt peptidaza, được gắn vào đầu cuối amin. Theo cách thay thế, việc sử dụng một số vị trí phân cắt enzyme có thể tạo thành dạng cắt ngắn một chút của polypeptit mong muốn, nếu enzyme cắt tại vùng nằm trong polypeptit thành thực.

Các vector biểu hiện và tạo dòng theo sáng chế thông thường sẽ chứa trình tự khởi đầu mà được nhận diện bằng sinh vật chủ và có thể được liên kết phù hợp với phân tử mã hóa protein liên kết kháng nguyên ST2. Các trình tự khởi đầu là các trình tự không được sao chép nằm ở đầu trình tự (tức là, 5') đến đơn vị mã khởi đầu của gen cấu trúc (nhìn chung nằm trong khoảng 100 đến 1000 bp) điều khiển sự phiên mã của gen cấu trúc. Thông thường, các trình tự khởi đầu được chia thành một trong hai loại: các trình tự khởi đầu dễ cảm ứng và các trình tự khởi đầu cơ định. Các trình tự khởi đầu dễ cảm ứng khởi đầu mức phiên mã tăng từ ADN dưới sự kiểm soát của chúng để đáp ứng một số thay đổi về các điều kiện nuôi cấy, như sự có mặt hoặc không có mặt chất dinh dưỡng hoặc sự thay đổi nhiệt độ. Mặt khác, các trình tự khởi đầu cơ định, sao chép cùng kiểu gen với các gen mà chúng có thể liên kết, tức là, trong điều kiện ít kiểm soát hoặc không kiểm soát qua biểu hiện gen. Một số lượng lớn các trình tự khởi đầu, được nhận diện bằng nhiều loại tế bào vật chủ tiềm năng, được biết đến phổ biến. Trình tự khởi đầu thích hợp có thể được liên kết phù hợp với ADN mã hóa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ bao

gồm protein liên kết kháng nguyên ST2 của sáng chế bằng cách cắt bỏ trình tự khởi đầu ra khỏi ADN nguồn phản ứng thủy phân nhờ enzym giới hạn và chèn trình tự trình tự khởi đầu mong muốn vào vector.

Các trình tự khởi đầu thích hợp để sử dụng cùng với các vật chủ nấm men cũng được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một cách thuận lợi, các chất tăng cường nấm men được sử dụng với các trình tự khởi đầu nấm men. Các trình tự khởi đầu thích hợp để sử dụng cùng với các tế bào vật chủ động vật có vú được biết đến phổ biến và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các gen thu được từ các bộ gen của virus như virus polyoma, virus fowlpox, adenovirus (như Adenovirus 2), virus u nhú bò, virus sarcoma gia cầm, cytomegalovirus, các retrovirus, virus viêm gan B và tốt nhất là Simian Virus 40 (SV40). Các trình tự khởi đầu ở động vật có vú thích hợp khác bao gồm các trình tự khởi đầu ở động vật có vú khác loại, ví dụ, các trình tự khởi đầu sốc nhiệt và các trình tự khởi đầu actin.

Các trình tự khởi đầu bổ sung mà có thể đáng quan tâm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: trình tự khởi đầu sớm SV40 (Benoist và Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); trình tự khởi đầu CMV (Thornsen *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. U. S. A.* 81:659-663); trình tự khởi đầu chứa trong trình tự lặp lại đầu cuối kéo dài 3' của virus sarcoma Rous (Yamamoto *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-797); trình tự khởi đầu thymidin kinaza herpes (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78:1444-1445); trình tự khởi đầu và các trình tự điều hòa từ gen metallothionin Prinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); và các trình tự khởi đầu prokaryot như trình tự khởi đầu beta-lactamaza (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75:3727-3731); hoặc trình tự khởi đầu tac (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80:21-25). Cũng đáng quan tâm là các vùng điều khiển phiên mã ở động vật sau đây, các vùng này biểu hiện tính đặc hiệu mô và đã được sử dụng trong các động vật biến đổi gen: vùng điều khiển gen elastaza I có hoạt tính trong các tế bào acinar ở tụy (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); vùng điều khiển gen insulin có hoạt tính trong các tế bào beta ở tụy (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); vùng điều khiển gen globulin miễn dịch có hoạt tính trong các tế bào bạch huyết (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-658; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.*

7:1436-1444); vùng điều khiển virus khối u vú ở chuột có hoạt tính trong các tế bào tinh hoàn, vú, bạch huyết và các đường bào (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-495); vùng điều khiển gen albumin có hoạt tính trong gan (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1 :268-276); vùng điều khiển gen alpha-feto-protein có hoạt tính trong gan (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 253:53-58); vùng điều khiển gen alpha 1-antitrypsin có hoạt tính trong gan (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes và Devel.* 1:161-171); vùng điều khiển gen beta-globin có hoạt tính trong các tế bào tủy (Mogam *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94); vùng điều khiển gen protein cơ bản myelin có hoạt tính trong các tế bào oligodendrocyt trong não (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-712); vùng điều khiển gen chuỗi nhẹ 2 myosin có hoạt tính trong cơ xương (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); và vùng điều khiển gen hormon phóng thích gonadotropic có hoạt tính trong vùng dưới đồi (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-1378).

Trình tự tăng cường có thể được chèn vào vector để làm tăng mức phiên mã của ADN mã hóa chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng bao gồm protein liên kết kháng nguyên ST2 theo sáng chế nhờ các eukaryot cao hơn. Các trình tự tăng cường là các phần tử hoạt động cis của ADN, thông thường khoảng 10-300 bp về chiều dài, chúng hoạt động trên trình tự khởi đầu để làm tăng mức phiên mã. Các trình tự tăng cường là tương đối độc lập về sự định hướng và vị trí, đã được tìm thấy ở các vị trí cả 5' và 3' đến đơn vị phiên mã. Một số trình tự tăng cường có sẵn từ các gen động vật có vú được biết đến (ví dụ, globin, elastaza, albumin, alpha-feto-protein và insulin). Tuy nhiên, thông thường, trình tự tăng cường từ virus được sử dụng. Trình tự tăng cường SV40, trình tự tăng cường của trình tự khởi đầu sớm cytomegalovirus, trình tự tăng cường polyoma, và các trình tự tăng cường adenovirus được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này là các phần tử tăng cường dùng làm ví dụ minh họa để hoạt hóa các eukaryot. Trong khi trình tự tăng cường có thể được đặt vào vị trí trong vector hoặc 5' hoặc 3' đến trình tự mã hóa, thông thường nó nằm ở vị trí 5' từ trình tự khởi đầu. Trình tự mã hóa trình tự tín hiệu tự nhiên thích hợp hoặc trình tự tín hiệu khác loại (trình tự dẫn đầu hoặc peptit tín hiệu) có thể được đưa vào vector biểu hiện, để thúc đẩy sự tiết kháng thể ngoại bào. Việc lựa chọn peptit tín hiệu hoặc trình tự dẫn đầu phụ thuộc vào kiểu các tế bào vật chủ trong đó kháng thể cần được sản xuất, và trình tự tín hiệu khác loại có thể thay thế trình tự tín hiệu tự nhiên.

Các ví dụ về các peptit tín hiệu mà có chức năng trong các tế bào vật chủ động vật có vú bao gồm các peptit sau: trình tự tín hiệu cho interleukin-7 (IL-7) được mô tả trong US 4,965,195; trình tự tín hiệu cho thụ thể interleukin-2 được mô tả trong tài liệu của Cosman *et al.*, 1984, *Nature* 312:768; peptit tín hiệu thụ thể interleukin-4 được mô tả trong EP 0367566; peptit tín hiệu thụ thể interleukin-1 typ I được mô tả trong US 4,968,607; peptit tín hiệu thụ thể interleukin-1 typ II được mô tả trong EP 0460846.

Vector có thể chứa một hoặc nhiều phân tử thuận lợi cho sự biểu hiện khi vector được đưa vào bộ gen tế bào vật chủ. Các ví dụ bao gồm phân tử EASE (Aldrich *et al.* 2003 *Biotechnol Prog.* 19:1433-38) và vùng gắn ma trận (MAR). Các MAR làm trung gian để điều chỉnh sự sắp xếp cấu trúc của chất nhiễm sắc và có thể cách ly vector đã được kết hợp khỏi tác động "vị trí". Do đó, các MAR đặc biệt hữu ích khi vector được sử dụng để tạo ra các thể chuyển nhiễm ổn định. Một số các axit nucleic chứa MAR tổng hợp và tự nhiên được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ., US 6,239,328; US 7,326,567; US 6,177,612; US 6,388,066; US 6,245,974; US 7,259,010; US 6,037,525; US 7,422,874; US 7,129,062.

Các vector biểu hiện theo sáng chế có thể được tạo cấu trúc từ một vector khởi đầu như vector có sẵn trên thị trường. Các vector này có thể hoặc không thể chứa tất cả các trình tự chặn mong muốn. Trong trường hợp một hoặc nhiều trong số các trình tự chặn được mô tả ở đây không phải là đã có mặt trong vector, chúng có thể đạt được một cách riêng lẻ và được gắn vào vector. Các phương pháp được sử dụng để thu được từng tự chặn được biết đến phổ biến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Sau khi vector được tạo cấu trúc và phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, hoặc chuỗi nhẹ và chuỗi nặng bao gồm trình tự liên kết kháng nguyên ST2 được chèn vào vị trí vector phù hợp, thì vector hoàn chỉnh có thể được chèn vào tế bào vật chủ thích hợp để khuếch đại và/hoặc biểu hiện polypeptit. Việc biến đổi vector biểu hiện cho protein liên kết kháng nguyên ST2 thành tế bào chủ được lựa chọn có thể được thực hiện theo các phương pháp phổ biến bao gồm cả chuyển nhiễm, gây nhiễm, canxi phosphat đồng kết tủa, điện biến nạp, vi tiêm, thể mỡ, chuyển nhiễm do DEAE-dextran làm trung gian gây ra, hoặc các kỹ thuật đã biết khác. Phương pháp được chọn một phần sẽ là chức năng của kiểu tế bào vật chủ cần được sử dụng. Những phương pháp này và các phương

pháp thích hợp khác được biết đến phổ biến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và được nêu, ví dụ, trong tài liệu của Sambrook *et al.*, 2001, ở trên.

Tế bào vật chủ, khi được nuôi cấy trong các điều kiện thích hợp, tổng hợp protein liên kết kháng nguyên ST2 mà sau đó có thể được thu gom lại từ môi trường nuôi cấy (nếu tế bào vật chủ tiết ra nó vào môi trường) hoặc trực tiếp từ tế bào vật chủ sản xuất ra nó (nếu nó không được tiết ra). Việc lựa chọn tế bào vật chủ thích hợp sẽ phụ thuộc vào các yếu tố khác nhau, như mức biểu hiện mong muốn, các dạng biến đổi polypeptit mong muốn hoặc cần thiết cho hoạt tính (như sự glycosyl hóa hoặc sự phosphoryl hóa) và dễ gấp nếp vào phân tử có hoạt tính sinh học. Tế bào vật chủ có thể là ở dạng eukaryot hoặc prokaryot.

Các dòng tế bào động vật có vú có sẵn có vai trò là các vật chủ để biểu hiện được biết đến phổ biến trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dòng tế bào bắt từ mua từ hãng American Type Culture Collection (ATCC) và các dòng tế bào bất kỳ được sử dụng trong hệ biểu hiện được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để tạo các polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế. Nhìn chung, các tế bào vật chủ được biến nạp bởi vectơ biểu hiện tái tổ hợp mà bao gồm ADN mã hóa polypeptit kháng kháng thể ST2 mong muốn. Trong số các tế bào vật chủ mà có thể được sử dụng là các prokaryot, nấm men hoặc các tế bào eukaryot cao hơn. Các prokaryot bao gồm sinh vật gram âm hoặc gram dương, ví dụ *E. coli* hoặc bacilli. Các tế bào eukaryot cao hơn bao gồm các tế bào côn trùng và các dòng tế bào có nguồn gốc từ động vật có vú đã được thiết kế. Các ví dụ về các dòng tế bào vật chủ động vật có vú thích hợp bao gồm dòng COS-7 của các tế bào thận khỉ (ATCC CRL 1651) (Gluzman *et al.*, 1981, Cell 23:175), các tế bào L, các tế bào 293, các tế bào C127, các tế bào 3T3 (ATCC CCL 163), các tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung Quốc, hoặc các dẫn xuất của chúng như Veggie CHO và các dòng tế bào liên quan phát triển trong môi trường không có huyết thanh (Rasmussen *et al.*, 1998, *Cytotechnology* 28: 31), các tế bào HeLa, các dòng tế bào BHK (ATCC CRL 10), và các dòng tế bào CVI/EBNA có nguồn gốc từ dòng tế bào CVI thận khỉ xanh châu Phi (ATCC CCL 70) theo mô tả của McMahan *et al.*, 1991, EMBO J. 10: 2821, các tế bào thận phôi thai người như 293, 293 EBNA hoặc MSR 293, các tế bào A431 biểu bì người, các tế bào Colo205 người, dòng tế bào động vật linh trưởng biến nạp khác, các tế bào lưỡng bội thông thường, các chủng

tế bào có nguồn gốc từ nuôi cấy *in vitro* mô gốc, các mô cấy bên ngoài gốc, các tế bào HL-60, U937, HaK hoặc Jurkat. Tùy ý, các dòng tế bào động vật có vú như HepG2/3B, KB, NIH 3T3 hoặc S49, ví dụ, có thể được sử dụng để biểu hiện polypeptit khi mong muốn sử dụng polypeptit trong nhiều thử nghiệm gen thông báo hoặc gen chuyển nạp tín hiệu khác nhau. Theo cách thay thế, có thể sản xuất polypeptit trong các eukaryot thấp hơn như nấm men hoặc trong các prokaryot như vi khuẩn. Các nấm men thích hợp bao gồm *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, các chủng *Kluyveromyces*, *Candida*, hoặc bất kỳ chủng nấm men nào có khả năng biểu hiện các polypeptit khác loại. Các chủng vi khuẩn thích hợp bao gồm *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, hoặc chủng vi khuẩn bất kỳ có khả năng biểu hiện các polypeptit khác loại. Nếu polypeptit được tạo ra trong nấm men hoặc vi khuẩn, thì có thể mong muốn biến đổi polypeptit được sản xuất trong đó, ví dụ bằng sự phosphoryl hóa hoặc sự glycosyl hóa các vị trí phù hợp, để thu được polypeptit chức năng. Các dạng gắn kết cộng hóa trị này có thể được thực hiện sử dụng các phương pháp hóa học hoặc enzym đã biết. Polypeptit cũng có thể được sản xuất bằng cách liên kết phù hợp axit nucleic tách ly của sáng chế với các trình tự điều khiển thích hợp trong một hoặc nhiều vector biểu hiện của côn trùng, và sử dụng hệ biểu hiện côn trùng. Các vật liệu và các phương pháp đối với các hệ biểu hiện tế bào baculovirut/côn trùng thì có sẵn trên thị trường dưới dạng bộ kit mua từ hãng, ví dụ, Invitrogen, San Diego, Calif., Hoa Kỳ. (bộ kit MaxBac®), và các phương pháp như vậy được biết đến phổ biến trong lĩnh vực kỹ thuật này, theo mô tả trong tài liệu của Summers và Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), và Luckow và Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988). Các hệ thống dịch mã ngoài tế bào cũng có thể được sử dụng để sản xuất các polypeptit bằng cách sử dụng các ARN có nguồn gốc từ các cấu trúc axit nucleic được bộc lộ trong tài liệu này. Các vector biểu hiện và tạo dòng thích hợp để sử dụng cùng với các vật chủ tế bào vi khuẩn, nấm, nấm men, và động vật có vú được mô tả bởi Pouwels *et al.* (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985). Tế bào vật chủ bao gồm axit nucleic tách ly theo sáng chế, tốt hơn nếu có thể được liên kết phù hợp với ít nhất một trình tự điều khiển biểu hiện, là “tế bào vật chủ tái tổ hợp”.

Theo một số phương án nhất định, các dòng tế bào có thể được chọn thông qua bước xác định các dòng tế bào nào có mức biểu hiện cao và chủ yếu sản xuất các protein

liên kết kháng nguyên có các đặc tính liên kết ST2. Theo một phương án khác, dòng tế bào từ dòng tế bào B mà không tạo kháng thể của chính nó nhưng có khả năng tạo và tiết ra kháng thể khác loại có thể được chọn.

Các protein liên kết kháng nguyên ST2 làm suy yếu tế bào

Theo các phương án được ưu tiên, protein liên kết kháng nguyên ST2 liên kết ST2 và ức chế sự liên kết IL-33, do đó làm giảm tín hiệu do IL-33 gây ra trong các tế bào biểu hiện ST2. Tuy nhiên, theo một số phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên ST2 liên kết ST2 và nhắm tới tế bào biểu hiện ST2 để làm suy yếu. Tất nhiên, protein liên kết kháng nguyên ST2 có thể ức chế sự liên kết IL-33 và nhắm tới tế bào ST2 để làm suy yếu.

Cụ thể, các protein liên kết kháng nguyên ST2 làm suy yếu tế bào thì hữu ích để điều trị các bệnh liên quan đến sự biểu hiện ST2 quá mức, ví dụ, bệnh viêm hoặc khối u biểu hiện ST2. Các phương pháp nhắm đích các tế bào có các protein liên kết kháng nguyên, ví dụ các kháng thể, được biết đến phổ biến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương án dùng làm ví dụ minh họa được thảo luận dưới đây.

Các thể liên hợp thuốc kháng thể

Các phương án của sáng chế bao gồm các thể liên hợp thuốc kháng thể (các ADC). Nhìn chung, ADC bao gồm kháng thể được liên hợp với tác nhân hóa trị liệu, ví dụ, tác nhân gây độc tế bào, tác nhân kim hãm tế bào, độc tố, hoặc tác nhân phóng xạ. Phân tử liên kết có thể được sử dụng để liên hợp thuốc vào kháng thể. Một loạt các môi liên kết và thuốc hữu ích trong công nghệ ADC được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sử dụng trong các phương án của sáng chế. (Xem US20090028856; US2009/0274713; US2007/0031402; WO2005/084390; WO2009/099728; US5208020; US5416064; US5475092; 5585499; 6436931; 6372738; và 6340701, toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Các môi liên kết

Theo một số phương án nhất định, ADC bao gồm một môi liên kết được tạo thành từ một hoặc nhiều thành phần liên kết. Các thành phần liên kết dùng làm ví dụ minh họa bao gồm 6-maleimidocaproyl, maleimidopropanoyl, valin-xitrulin, alanin-phenylalanin,

p-aminobenzyloxycarbonyl, và các thành phần thu được từ sự liên hợp với các thuốc thử liên kết, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, N-succinimidyl 4- (2-pyridylthio) pentanoat ("SPP"), N-succinimidyl 4- (N-maleimidomethyl) xyclohexan-1 cacboxylat ("SMCC, " dưới đây còn được gọi là "MCC"), và N-succinimidyl (4-iodo-axetyl) aminobenzoat ("SIAB").

Các mối liên kết có thể là mối liên kết "phân cắt được" hoặc mối liên kết "không phân cắt được" (Ducry và Stump, *Bioconjugate Chem.* 2010, 21, 5-13; toàn bộ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Các mối liên kết phân cắt được được thiết kế để phóng thích thuốc khi chịu một số yếu tố môi trường nhất định, ví dụ, khi được đưa vào trong tế bào đích. Các mối liên kết phân cắt được bao gồm các mối liên kết không bền axit, các mối liên kết nhạy cảm proteaza, các mối liên kết không bền quang hóa, các mối liên kết chứa liên kết dimetyl hoặc disulfua. Các mối liên kết không phân cắt được được có xu hướng vẫn còn liên kết đồng hóa trị với ít nhất một axit amin của kháng thể và thuốc khi đưa vào bởi và thoái hóa trong tế bào đích. Một mối liên kết dùng làm ví dụ minh họa là MCC.

Thuốc

Theo một số phương án nhất định, kháng thể được liên hợp với tác nhân hóa trị liệu. Các ví dụ về các tác nhân hóa trị liệu bao gồm các tác nhân ankyl hóa, như thiotepa và xyclophosphamit (CYTOXAN. TM.); các alkyl sulfonat như busulfan, improsulfan và piposulfan; các aziridin, như benzodopa, carboquon, meturedopa, và uredopa; các etylenimin và các metylamelamin bao gồm cả altretamin, trietylenmelamin, trietylenephosphoramit, trietylenothiophosphoramit và trimetylolomelamin; các axetogenin (đặc biệt là bullataxin và bullataxinon); camptothecin (trong đó có topotecan tương tự tổng hợp); bryostatin; calystatin; CC-1065 (trong đó có các dạng tương tự tổng hợp adozelesin, carzelesin và bizelesin của nó); các cryptophycin (đặc biệt là cryptophycin 1 và cryptophycin 8); dolastatin; duocarmyxin (trong đó có các dạng tương tự tổng hợp, KW-2189 và CBI-TMI); eleutherobin; pancratistatin; sarcodictyin; spongistatin; các dạng mù tạc nitơ như clorambuxil, clomaphazin, cholophosphamit, estramustin, ifosfamid, mecloetamin, mecloetamin oxit hydroclorua, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin, trofosfamid, mù tạc uraxin; các nitrosurê như carmustin, clozotocin, fotemustin, lomustin, nimustin, ranimustin; các chất kháng sinh,

như các chất kháng sinh enediyn (ví dụ calicheamixin, đặc biệt là calicheamixin . gama I và calicheamixin teta I, xem, ví dụ, Angew Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994); dynemixin, trong đó có dynemixin A; esperamixin; cũng như neocarzinostatin chromophor và các chromomophor kháng sinh chromoprotein enediyn liên quan), các aclacinomysin, actinomyxin, authramyxin, azaserin, bleomyxin, cactinomyxin, carabixin, caminomyxin, carzinophilin; các chromomyxin, dactinomyxin, daunorubixin, detorubixin, 6-diazo-5-oxo-L-norleuxin, doxorubixin (trong đó có morpholino-doxorubixin, xyanomorpholino-doxorubixin, 2-pyrrolino-doxorubixin và deoxydoxorubixin), epirubixin, esorubixin, idarubixin, marcellomyxin, các nitomyxin, axit mycophenolic, nogalamyxin, các olivomyxin, peplomyxin, potfiromyxin, puromyxin, quelamycin, rodorubixin, streptonigrin, streptozoxin, tuberxidin, ubenimex, zinostatin, zorubixin; các chất kháng chuyển hóa, như methotrexat và 5-flouraxil (5-FU); các chất tương tự axit folic, như denopterin, methotrexat, pteropterin, trimetrexat; các chất tương tự purin, như fludarabin, 6-mercaptopurin, thiamiprin, thioguanin; các chất tương tự pyrimidin như, anxitabin, azacitidin, 6-azauridin, carmofur, xytarabin, dideoxyuridin, doxifluridin, enocitabin, floxuridin, 5-FU; các hormon nam, như calusteron, dromostanolon propionat, epitiostanol, mepitiostan, testolacton; các chất kháng thượng thận, như aminoglutethimit, mitotan, trilostan; chất độn axit folic, như axit frolinic; axeglaton; aldophosphamit glycozit; axit aminolevulinic; amsacrin; bestrabuxil; bisantren; edatraxat; defofamin; demecolcin; diaziquon; elfomithin; elliptinium axetat; epothilon; etoglucid; gallium nitrat; hydroxyurê; lentinan; lonidamin; các maytansinoit, như maytansin và các ansamitoxin; mitoguazon; mitoxantron; mopidamol; nitracrin; pentostatin; phenamet; pirarubixin; axit podophyllinic; 2-etylhydrazit; procarbazin; PSK. RTM.; razoxan; rhizoxin; sizofuran; spirogermanium; axit tenuazonic; triaziquon; 2,2', 2''-trichlotrietylamin; các trichothexen (đặc biệt là T-2 toxin, verracurin A, roridin A và anguidin); uretan; vindesin; dacarbazin; mannomustin; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosin; arabinozit ("Ara-C"); xyclophosphamit; thiotepa; các taxoit, ví dụ paclitaxel (TAXOL. TM., Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.) và doxetaxel (TAXOTERE. RTM., Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambuxil; gemxitabin; 6-thioguanin; mercaptopurin; methotrexat; các chất tương tự platin như cisplatin và carboplatin; vinblastin; platin;

etopozit (VP-16); ifosfamid; mitomycin C; mitoxantron; vincristin; vinorelbin; navelbin; novantron; tenipozit; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronat; CPT-11; chất ức chế topoisomeraza RFS 2000; diflometylomithin (DMFO); axit retinoic; capecitabin; và các muối, các axit hoặc các dẫn xuất được dùng của chất bất kỳ trong số các chất trên. Cũng được bao gồm trong định nghĩa này là các chất kháng nội tiết tố có vai trò điều hòa hoặc ức chế hoạt động của hormon trên các khối u, như các chất kháng estrogen trong đó có, ví dụ, tamoxifen, raloxifen, aromataza ức chế 4 (5)-imidazol, 4-hydroxytamoxifen, trioxifen, keoxifen, LY117018, onapriston, và toremifen (Fareston); và các chất kháng hormon nam, như flutamit, nilutamit, bicalutamit, leuprolit, và goserelin; siARN và các muối, các axit hoặc các dẫn xuất được dùng của chất bất kỳ trong số các chất trên. Các tác nhân hóa trị liệu khác có thể được sử dụng cùng sáng chế được bộc lộ trong US 20080171040 hoặc US 20080305044 và toàn bộ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Sáng chế dự tính rằng kháng thể có thể được liên hợp với hai hoặc nhiều tác nhân hóa trị liệu khác nhau hoặc được phẩm có thể bao gồm hỗn hợp các kháng thể trong đó thành phần của kháng thể là giống hệt nhau ngoại trừ trường hợp được liên hợp với tác nhân hóa trị liệu khác. Các phương án này có thể là hữu ích để nhắm đích nhiều con đường sinh học với tế bào đích.

Theo các phương án được ưu tiên, ADC bao gồm kháng thể được liên hợp với một hoặc nhiều phân tử maytansinoit, chúng là các chất ức chế phân bào hoạt động bằng cách ức chế sự polyme hóa tubulin. Các maytansinoit, trong đó có nhiều dạng biến đổi khác nhau, được mô tả trong US 3896111; US 4151042; US 4137230; US 4248870; US 4256746; US 4260608; US 4265814; US 4294757; US 4307016; US 4308268; US 4309428; US 4313946; US 4315929; US 4317821; US 4322348; US 4331598; US 4361650; US 4364866; US 4424219; US 4450254; US 4362663; US 4371533; và WO 2009/099728. Các gốc thuốc maytansinoit có thể được tách ly ra từ các nguồn tự nhiên, được sản xuất sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp, hoặc được điều chế theo phương thức tổng hợp. Các maytansinoit dùng làm ví dụ minh họa bao gồm C-19-declo (US 4256746), C-20-hydroxy (hoặc C-20-demetyl) +/- C-19-declo (US 4307016 và US 4361650), C-20-demetoxy (hoặc C-20-axyloxy (-OCOR), +/- dechrolo (US 4294757), C-9-SH (US 4,424,219), C-14-alkoxymetyl (demetoxy/CH₂OR) (US 4,331,598), C-14-

hydroxymethyl hoặc axyloxymethyl (CH_2OH hoặc CH_2OAc) (US 4,450,254), C-15-hydroxy/axyloxy (US 4,364,866), C-15-metoxymethyl (US 4,313,946 và US 4,315,929), C-18-N-demethyl (US 4,362,663 và US 4,322,348), và 4,5-deoxy (US 4,371,533).

Các vị trí khác nhau trên các hợp chất maytansinoid có thể được sử dụng làm vị trí liên kết, tùy thuộc vào kiểu liên kết mong muốn. Ví dụ, để tạo thành một liên kết este, vị trí C-3 có nhóm hydroxyl, vị trí C-14 được biến đổi nhờ hydroxymethyl, vị trí C-15 được biến đổi nhờ nhóm hydroxyl, và vị trí C-20 có nhóm hydroxyl tất cả đều thích hợp (US 5208020, RE39151, và 6913748; US 20060167245, US 20070037972, và WO 2009099728).

Các maytansinoid được ưu tiên bao gồm các dạng được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này như DM1, DM3, và DM4 (US 2009030924 và US 20050276812, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Các ADC chứa các maytansinoid, các phương pháp tạo các ADC này, và việc sử dụng chúng để điều trị được bộc lộ trong US 5208020, US 5416064, US 20050276812, và WO 2009099728 (toàn bộ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Các mối liên kết hữu ích để tạo các ADC maytansinoid được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này (US 5208020, US 2005016993 và US 20090274713; toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Các ADC maytansinoid bao gồm liên kết SMCC có thể được điều chế như được bộc lộ trong US 2005/0276812.

Các kháng thể được tăng cường vai trò đáp ứng lại kích thích

Một trong các chức năng của phần Fc của kháng thể là để truyền thông tin đến hệ miễn dịch khi kháng thể liên kết đích của nó. Điều này được xem xét “vai trò đáp ứng lại kích thích.” Sự truyền thông tin dẫn đến sự gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP), và/hoặc sự gây độc tế bào phụ thuộc bổ sung (CDC). ADCC và ADCP bị gây ra thông qua sự liên kết của Fc với các thụ thể Fc trên bề mặt của các tế bào trong hệ miễn dịch. CDC bị gây ra thông qua sự liên kết của Fc với các protein trong hệ bổ sung, ví dụ, C1q.

Các lớp phụ IgG thay đổi theo khả năng điều chỉnh các vai trò đáp ứng lại kích thích của chúng. Ví dụ, IgG1 thì hiệu quả hơn nhiều so với IgG2 và IgG4 khi gây ra

ADCC và CDC. Vì vậy, theo các phương án trong đó tế bào biểu hiện ST2 được nhắm đích để phá hoại, kháng thể IgG1 kháng ST2 sẽ được ưu tiên.

Vai trò đáp ứng lại kích thích của kháng thể có thể được làm tăng lên, hoặc giảm bớt bằng cách đưa một hoặc nhiều đột biến vào Fc. Các phương án của sáng chế bao gồm các protein liên kết kháng nguyên, ví dụ, các kháng thể, có Fc được biến đổi để làm tăng vai trò đáp ứng lại kích thích (US 7,317,091 và Strohl, *Curr. Opin. Biotech.*, 20:685-691, 2009; toàn bộ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Các phân tử Fc IgG1 dùng làm ví dụ minh họa có vai trò đáp ứng lại kích thích tăng bao gồm (dựa trên sơ đồ đánh số Kabat) các phân tử có các đột biến thay thế sau đây: S239D/I332E

S239D/A330S/I332E

S239D/A330L/I332E

S298A/D333A/K334A

P247I/A339D

P247I/A339Q

D280H/K290S

D280H/K290S/S298D

D280H/K290S/S298V

F243L/R292P/Y300L

F243L/R292P/Y300L/P396L

F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L

G236A/S239D/I332E

K326A/E333A

K326W/E333S

K290E/S298G/T299A

K290N/S298G/T299A

K290E/S298G/T299A/K326E

K290N/S298G/T299A/K326E

Các phương án khác nữa của sáng chế bao gồm các protein liên kết kháng nguyên, ví dụ, các kháng thể, có Fc được biến đổi để làm giảm vai trò đáp ứng lại kích thích. Các phân tử Fc dùng làm ví dụ minh họa có vai trò đáp ứng lại kích thích giảm bao gồm (dựa trên sơ đồ đánh số Kabat) các phân tử có các đột biến thay thế sau đây:

N297A (IgG1)

L234A/L235A (IgG1)

V234A/G237A (IgG2)

L235A/G237A/E318A (IgG4)

H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2)

C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)

C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1)

L234F/L235E/P331S (IgG1)

S267E/L328F (IgG1)

Một phương pháp khác làm tăng vai trò đáp ứng lại kích thích của các protein chứa Fc IgG là bằng cách làm giảm sự fucosyl hóa của Fc. Việc cắt loại fucoza lõi ra khỏi các oligosacarit kiểu phức cấu trúc anten kép được gắn vào Fc được làm tăng rất nhiều vai trò đáp ứng lại kích thích ADCC mà không làm thay đổi vai trò liên kết kháng nguyên hoặc vai trò đáp ứng lại kích thích CDC. Một số cách được biết đến để làm giảm hoặc triệt tiêu sự fucosyl hóa của các phân tử chứa Fc, ví dụ, các kháng thể. Các cách này bao gồm biểu hiện tái tổ hợp trong một số dòng tế bào động vật có vú nhất định bao gồm cả dòng tế bào loại trực tiếp FUT8, dòng CHO biến thể Lec13, dòng tế bào lai chuột YB2/0, dòng tế bào bao gồm ARN có thể thiệp nhỏ đặc hiệu đối với gen FUT8, và dòng tế bào đồng biểu hiện β -1, 4-*N*-axetylglucosaminyltransferaza III và Golgi α -mannosidaza II. Theo cách thay thế, phân tử chứa Fc có thể được biểu hiện trong tế bào không phải của động vật có vú như tế bào thực vật, nấm men, hoặc tế bào prokaryot, ví dụ, *E. coli*. Vì vậy, theo một số phương án nhất định của sáng chế, chế phẩm bao gồm kháng thể, ví dụ, Ab1, Ab2, Ab3, Ab4, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, hoặc Ab11 đã giảm sự fucosyl hóa hoặc nhìn chung không có sự fucosyl hóa.

Dược phẩm

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất dược phẩm bao gồm lượng hữu hiệu trị liệu của một hoặc nhiều protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế cùng với chất pha loãng, chất mang, chất hòa tan, chất nhũ hóa, chất bảo quản, và/hoặc tá chất hữu hiệu được dụng. Theo một số phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên là kháng thể. Các dược phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chế phẩm dạng lỏng, đông lạnh và đông khô.

Tốt hơn nữa, các vật liệu bào chế không gây độc cho người nhận với liều lượng và nồng độ được sử dụng. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề xuất các dược phẩm bao gồm lượng hữu hiệu trị liệu của protein liên kết kháng nguyên ST2, ví dụ, kháng thể liên kết ST2.

Theo một số phương án nhất định, dược phẩm có thể chứa các vật liệu bào chế để biến đổi, duy trì hoặc bảo quản, ví dụ, độ pH, nồng độ mol, độ nhớt, độ trong, màu sắc, tính đẳng trương, mùi, độ vô trùng, độ ổn định, tốc độ hòa tan hoặc phóng thích, hấp thụ hoặc thẩm thấu của chế phẩm. Theo các phương án này, các vật liệu bào chế thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các axit amin (như glyxin, glutamin, asparagin, acginin, prolin, hoặc lyzin); các chất kháng vi sinh vật; các chất chống oxy hóa (như axit ascorbic, natri sunfit hoặc natri hydro-sunfit); các chất đệm (như borat, bicarbonat, Tris-HCl, các xitrat, các phosphat hoặc các axit hữu cơ khác); các chất độn (như mannitol hoặc glyxin); các chất tạo chelat (như axit etylenđiamin tetraaxetic (EDTA)); chất tạo phức (như cafein, polyvinyl pyrrolidon, beta-xyclodextrin hoặc hydroxypropyl-beta-xyclodextrin); chất làm đầy; monosacarit; disacarit; và các cacbohydrat khác (như glucoza, mannoza hoặc dextrin); các protein (như albumin huyết thanh, gelatin hoặc các globulin miễn dịch); chất tạo màu, chất tạo hương và chất pha loãng; chất nhũ hóa; các polyme ưa nước (như polyvinylpyrrolidon); các polypeptit trọng lượng phân tử thấp; các ion đối tạo muối (như natri); các chất bảo quản (như benzalkonium clorit, axit benzoic, axit salicylic, thimerosal, rượu phenetyl, metylparaben, propylparaben, clohexidin, axit sorbic hoặc hydro peroxit); các dung môi (như glyxerin, propylen glycol hoặc polyetylen glycol); rượu của các đường (như manitol hoặc sorbitol); chất làm lơ lửng; các hoạt chất bề mặt hoặc chất tạo ẩm (như pluronic, PEG, este sorbitan, polysorbat như polysorbat 20, polysorbat, triton, trometamin, lexithin, cholesterol, tyloxapal); chất tăng sự ổn định (như sucroza hoặc sorbitol); chất tăng tính trương (như halogenua kim loại kiềm, tốt hơn là natri hoặc kali clorua, manitol sorbitol); chất dẫn; chất pha loãng; tá dược và/hoặc tá chất dược dụng. Xem, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Tái bản lần thứ 18, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

Theo một số phương án nhất định, dược phẩm tối ưu sẽ được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này tùy thuộc vào, ví dụ, con đường dự

định cấp được phẩm, dạng phân phối và liều lượng mong muốn. Xem, ví dụ, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, ở trên. Theo một số phương án nhất định, các chế phẩm này có thể ảnh hưởng trạng thái vật lý, độ ổn định, tốc độ phóng thích in vivo và tốc độ làm trong in vivo của các protein liên kết kháng nguyên của sáng chế. Theo một số phương án nhất định, chất dẫn chính hoặc chất mang trong được phẩm có thể hoặc chứa nước hoặc không chứa nước trong tự nhiên. Ví dụ, chất dẫn hoặc chất mang thích hợp có thể là nước để tiêm, dung dịch nước muối sinh lý hoặc dịch não tủy nhân tạo có thể được bổ sung thêm với các vật liệu khác thông thường trong các chế phẩm cấp theo đường ngoài tiêu hóa. Nước muối đậm trung tính hoặc nước muối được trộn với albumin huyết thanh là các chất dẫn khác dùng làm ví dụ minh họa. Theo các phương án cụ thể, các được phẩm bao gồm chất đệm Tris có độ pH 7,0-8,5, hoặc chất đệm axetat có độ pH khoảng 4,0-5,5, và có thể bao gồm thêm sorbitol hoặc một chất thay thế thích hợp của nó. Theo một số phương án nhất định của sáng chế, các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên ST2 có thể được điều chế để dự trữ bằng cách trộn chế phẩm được chọn có có mức tinh khiết mong muốn với các chất bào chế tùy ý (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, ở trên) dưới dạng bánh đông khô hoặc dung dịch nước. Thêm nữa, theo một số phương án nhất định, chế phẩm protein liên kết kháng nguyên ST2 có thể được bào chế dưới dạng đông khô sử dụng các tá được thích hợp như sucroza.

Các được phẩm theo sáng chế có thể được chọn để phân phối theo đường tiêm. Theo cách thay thế, các chế phẩm có thể được chọn để dùng theo đường xông hít hoặc để cấp qua đường tiêu hóa, như đường miệng. Cách điều chế các chế phẩm được dụng này là nằm trong khả năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tốt hơn nếu các thành phần bào chế có mặt ở nồng độ có thể chấp nhận được đối với vị trí cấp chế phẩm. Theo một số phương án nhất định, các chất đệm được sử dụng để duy trì chế phẩm ở độ pH sinh lý hoặc độ pH thấp hơn một chút, thông thường trong phạm vi pH từ khoảng 5 tới khoảng 8.

Khi dự tính cấp chế phẩm theo đường ngoài tiêu hóa, các chế phẩm điều trị để sử dụng trong sáng chế này có thể được đề xuất dưới dạng không chứa chất gây sốt, dung dịch nước cho phép dùng ngoài tiêu hóa bao gồm protein liên kết kháng nguyên ST2 trong chất dẫn được dụng. Chất dẫn thích hợp cụ thể để tiêm ngoài tiêu hóa là nước cất

vô trùng trong đó protein liên kết kháng nguyên ST2 được bào chế dưới dạng dung dịch đẳng trương, vô trùng, được bảo quản thích hợp. Theo một số phương án nhất định, quá trình điều chế được phẩm có thể bao gồm bước xây dựng công thức bào chế của phân tử mong muốn với một tác nhân, như các trung thể có thể tiêm, hạt có thể bào mòn sinh học, các hợp chất polyme (như axit polylactic hoặc axit polyglycolic), các hạt hoặc lipoxom, mà có thể mang lại chế phẩm phóng thích chậm hoặc có kiểm soát được phân phối thông qua việc tiêm phóng thích chậm. Theo một số phương án nhất định, axit hyaluronic cũng có thể được sử dụng, có hiệu quả thúc đẩy thời gian phóng thích ổn định trong quá trình lưu thông. Theo một số phương án nhất định, thiết bị phân phối thuốc dạng mô cấy có thể được sử dụng để đưa protein liên kết kháng nguyên của sáng chế vào cơ thể.

Các dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế để xông hít. Theo các phương án này, các protein liên kết kháng nguyên ST2 được bào chế một cách thuận lợi dưới dạng bột hít, khô. Theo các phương án cụ thể, các dung dịch xông hít chứa protein liên kết kháng nguyên ST2 cũng có thể được bào chế với một chất đẩy để phân phối dưới dạng phun khí. Theo một số phương án nhất định, các dung dịch có thể được phun. Việc cấp chế phẩm qua phổi và các phương pháp bào chế được mô tả chi tiết trong US94/001875, chỉ cốt được đưa vào đây bằng cách viện dẫn và mô tả sự phân phối qua phổi các protein được biến đổi hóa học

Sáng chế cũng dự tính rằng các chế phẩm có thể được cấp theo đường miệng. Các protein liên kết kháng nguyên ST2 được cấp theo cách này có thể được bào chế cùng hoặc không cùng với các chất mang thông thường được sử dụng trong việc kết hợp các dạng bào chế thể rắn như các viên nén và viên nang. Theo một số phương án nhất định, viên nang có thể được thiết kế để phóng thích phần hoạt tính của chế phẩm tại vị trí trong đường tiêu hóa khi sinh khả dụng được tối đa hóa và sự phân hủy trước tuần hoàn được giảm thiểu. Các chất bổ sung có thể là bao gồm trong viên nang để tạo điều kiện cho sự hấp thụ protein liên kết kháng nguyên ST2. Chất pha loãng, chất tạo hương, chất sáp có điểm nóng chảy thấp, dầu thực vật, chất bôi trơn, chất tạo huyền phù, chất làm tan rã viên nén, và các chất gắn kết cũng có thể được sử dụng.

Các dược phẩm khác sẽ trở nên rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, bao gồm cả các chế phẩm có các protein liên kết kháng nguyên ST2 dưới dạng

các chế phẩm được cấp có kiểm soát hoặc phóng thích chậm. Các phương pháp kỹ thuật để xây dựng công thức bào chế nhiều dạng chế phẩm phân phối có kiểm soát hoặc phóng thích chậm khác, như các chất mang liposom, các vi hạt có thể bào mòn sinh học hoặc các hạt xốp và các dung dịch tiêm phóng thích chậm, cũng được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, PCT/US93/00829, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn và mô tả sự phóng thích có kiểm soát của các dạng vi hạt polyme xốp để phân phối các dược phẩm. Các chế phẩm phóng thích chậm có thể bao gồm các chất kết dính polyme bán thấm dưới dạng các hạt được tạo hình, ví dụ, viên nang bao phim, hoặc viên vi nang. Các chất kết dính phóng thích chậm có thể bao gồm các polyester, các hydrogel, các polylactit (như được bộc lộ trong US 3,773,919 và EP 058481, mỗi tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), các copolyme của axit L-glutamic và gamma etyl-L-glutamat (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), poly (2-hydroxyetyl-methacrylat) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 và Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etylen vinyl axetat (Langer et al., 1981, ở trên) hoặc axit poly-D (-)-3-hydroxybutyric (EP 133,988). Các chế phẩm phóng thích chậm có thể cũng bao gồm các liposom mà có thể được điều chế theo phương pháp bất kỳ trong số một vài phương pháp được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82:3688-3692; EP 036,676; EP 088,046 và EP 143,949, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Thông thường, các dược phẩm được sử dụng để cấp in vivo được đề xuất dưới dạng các chế phẩm vô trùng. Có thể thực hiện việc vô trùng bằng cách lọc thông qua các màng lọc vô trùng. Khi chế phẩm được làm khô lạnh, thì có thể tiến hành vô trùng sử dụng phương pháp này hoặc trước khi hoặc sau khi làm khô lạnh và hoàn nguyên. Các chế phẩm dùng để cấp theo đường ngoài tiêu hóa có thể được lưu trữ ở dạng khô lạnh hoặc ở dạng dung dịch. Nhìn chung, các chế phẩm dùng ngoài tiêu hóa được đặt trong vật chứa có cửa nạp vô trùng, ví dụ, túi dung dịch truyền tĩnh mạch hoặc lọ nhỏ có nút có thể đâm qua được bằng một kim tiêm dưới da.

Các khía cạnh của sáng chế bao gồm các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên ST2 tự đệm, mà có thể được sử dụng làm các dược phẩm, theo mô tả trong đơn sáng chế quốc tế WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599), toàn bộ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Như đã thảo luận ở trên, một số phương án nhất định đề xuất các chế phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên ST2 protein, cụ thể là các dược phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên ST2, mà bao gồm, ngoài protein liên kết kháng nguyên ST2 ra, còn có một hoặc nhiều tá dược như các tá dược được mô tả theo cách minh họa trong phần này và các phần khác trong bản mô tả này. Tá dược có thể được sử dụng trong sáng chế liên quan đến một loạt các mục đích, như điều chỉnh các đặc tính vật lý, hóa học, hoặc sinh học của các chế phẩm, như điều chỉnh độ nhớt, và hoặc các quá trình của sáng chế để cải thiện hiệu quả và hoặc để làm ổn định các chế phẩm này và các quá trình chống lại sự thoái biến và hư hỏng do, Ví dụ, các điều kiện khắc nghiệt xảy ra trong quá trình sản xuất, vận chuyển, bảo quản, chuẩn bị trước khi sử dụng, sử dụng chế phẩm và các quá trình sau đó.

Nhiều tài liệu bộc lộ sẵn có về phương pháp ổn định protein và các vật liệu bào chế và các phương pháp hữu ích trong vấn đề này, như tài liệu của Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations, " Pharm Res. 8 (3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution, " trong: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter và Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), và Randolph et al., "Surfactant-protein interactions, " Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), mỗi tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, đặc biệt là ở các phần liên quan đến tá dược và các quá trình tương tự đối với các chế phẩm protein tự đệm theo sáng chế này, đặc biệt là về các dược phẩm chứa protein và các quá trình để sử dụng y tế trong thú y và/hoặc người.

Theo một số phương án nhất định của sáng chế, các muối có thể được sử dụng để, ví dụ, điều chỉnh độ bền ion và/hoặc độ đẳng trương của chế phẩm và/hoặc để cải thiện độ hòa tan và/hoặc độ ổn định vật lý của protein hoặc thành phần khác trong chế phẩm theo sáng chế.

Như được biết đến phổ biến, các ion có thể làm ổn định trạng thái tự nhiên của các protein bằng cách liên kết với các gốc mang điện trên bề mặt của protein và bằng cách chắn các nhóm có cực và mang điện trong protein và làm giảm độ bền của các tương tác tĩnh điện, các tương tác hút, và đẩy của chúng. Các ion cũng có thể làm ổn định trạng thái biến tính của protein bằng cách liên kết với, đặc biệt là, các liên kết peptit biến tính

(--CONH) của protein. Ngoài ra, sự tương tác ion với các nhóm có cực và mang điện trong protein cũng có thể làm giảm sự tương tác tĩnh điện giữa các phân tử và, do đó, ngăn cản hoặc làm giảm sự kết tụ và tính không tan của protein.

Các loại ion khác nhau đáng kể về ảnh hưởng của chúng đến các protein. Một số dạng xếp loại phân loại ion và ảnh hưởng của chúng đến các protein đã được phát triển mà có thể được sử dụng trong việc xây dựng công thức bào chế các dược phẩm theo sáng chế. Một ví dụ là dãy Hofmeister, trong đó xếp loại các chất hòa tan ion và không ion có cực theo ảnh hưởng của chúng đến độ ổn định thể cấu tạo của các protein trong dung dịch. Các chất hòa tan làm ổn định được gọi là "kosmotrop." Các chất hòa tan làm mất ổn định được gọi là "chaotrop." Thông thường, các kosmotrop được sử dụng ở các nồng độ cao (ví dụ, >1 mol amoni sulfat) để làm kết tủa các protein từ dung dịch ("gây kết tủa bằng muối"). Thông thường, các chaotrop được sử dụng để phân giải và/hoặc để hòa tan các protein ("hòa tan bằng muối"). Hiệu quả tương đối của các ion đối với "sự kết tủa bằng muối" và "sự hòa tan bằng muối" xác định vị trí của chúng trong dãy Hofmeister.

Các axit amin tự do có thể được sử dụng trong các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên ST2 theo các phương án khác nhau của sáng chế làm các chất ổn định, các chất làm ổn định, và các chất chống oxy hóa, cũng như các mục đích sử dụng tiêu chuẩn khác. Lyzin, prolin, serin, và alanin có thể được sử dụng để làm ổn định các protein trong chế phẩm. Glyxin thì hữu ích trong quá trình làm khô lạnh để đảm bảo các đặc tính và cấu trúc bánh hợp lý. Acginin có thể hữu ích để ức chế sự kết tụ protein, trong cả chế phẩm dạng lỏng và chế phẩm khô lạnh. Methionin thì hữu ích dùng làm chất chống oxy hóa.

Các rượu đa chức bao gồm các đường, ví dụ, mannitol, sucroza, và sorbitol và các rượu polyhydric như, ví dụ, glyxerol và propylen glycol, và, dùng cho các mục đích thảo luận ở đây, polyetylen glycol (PEG) và các chất liên quan. Các rượu đa chức là ở dạng kosmotrop. Chúng là các chất làm ổn định hữu ích trong cả chế phẩm dạng lỏng và chế phẩm khô lạnh để bảo vệ các protein khỏi các quá trình phân hủy vật lý và hóa học. Các rượu đa chức cũng hữu ích dùng để điều chỉnh tính trương của các chế phẩm.

Trong số các rượu đa chức hữu ích theo các phương án được chọn của sáng chế thì mannitol, thông thường được sử dụng để đảm bảo độ ổn định cấu trúc của bánh trong

các chế phẩm khô lạnh. Mannitol đảm bảo sự ổn định cấu trúc của bánh. Nhìn chung, nó được sử dụng cùng với chất bảo vệ lạnh, ví dụ, sucroza. Sorbitol và sucroza nằm trong số các chất ưu tiên để điều chỉnh tính trương và là các chất làm ổn định để bảo vệ chống lại các điều kiện trở ngại đông băng - tan băng trong khi vận chuyển hoặc điều chế các lượng lớn trong quá trình sản xuất. Các đường khử (chứa các nhóm andehit hoặc keton tự do), như glucoza và lactoza, có thể glycosyl hóa các gốc lyzin và acginin trên bề mặt. Do đó, nhìn chung chúng không nằm trong số các rượu đa chức được ưu tiên để sử dụng theo sáng chế. Ngoài ra, các loại đường tạo thành các loại phản ứng như vậy, như sucroza, được thủy phân thành fructoza và glucoza trong các điều kiện có tính axit, và sau đó dẫn đến sự glycosyl hóa không enzym, cũng không nằm trong số các rượu đa chức được ưu tiên của sáng chế trong vấn đề này. PEG thì hữu ích để làm ổn định các protein và là chất bảo quản đông lạnh và có thể được sử dụng trong sáng chế trong vấn đề này.

Các phương án về các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên ST2 còn bao gồm các hoạt chất bề mặt. Các phân tử protein có thể dễ bị hấp phụ trên các bề mặt và dễ bị biến tính và kết tụ sau đó tại các bề mặt phân chia khí-lỏng, rắn-lỏng, và lỏng-lỏng. Nhìn chung, những ảnh hưởng này tỷ lệ nghịch với nồng độ protein. Những tương tác có hại này nhìn chung tỷ lệ nghịch với nồng độ protein và thông thường gia tăng do sự rung động vật lý, như sự rung động được tạo ra trong quá trình vận chuyển và xử lý sản phẩm.

Các hoạt chất bề mặt thông thường được sử dụng để ngăn ngừa, giảm thiểu, hoặc làm giảm mức hấp phụ bề mặt. Các hoạt chất bề mặt hữu ích trong sáng chế trong vấn đề này bao gồm polysorbat 20, polysorbat 80, các este của axit béo khác của sorbitan polyetoxylat, và poloxame 188.

Các hoạt chất bề mặt thông thường cũng được sử dụng để kiểm soát độ ổn định thể cấu hình protein. Việc sử dụng các hoạt chất bề mặt trong vấn đề này là đặc hiệu với protein bởi vì, thông thường một hoạt chất bề mặt xác định bất kỳ sẽ làm ổn định một số protein và làm mất ổn định các protein khác.

Các polysorbat dễ bị phân hủy oxy hóa và thường, như được cung cấp, chứa đủ lượng peroxit để gây ra sự oxy hóa các chuỗi bên của gốc protein, đặc biệt là methionin. Do đó, các polysorbat cần được sử dụng một cách cẩn thận, và khi được sử dụng, nên

được dùng ở nồng độ hiệu quả thấp nhất của chúng. Trong vấn đề này, các polysorbat là ví dụ minh họa cho quy tắc chung là nên dùng tá dược ở nồng độ hiệu quả thấp nhất của chúng.

Các phương án về các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên ST2 còn bao gồm một hoặc nhiều chất chống oxy hóa. Ở một mức độ nhất định, sự oxy hóa có hại của các protein có thể được ngăn chặn trong các dược phẩm bằng cách duy trì mức thích hợp oxy và nhiệt độ môi trường xung quanh và bằng cách tránh tiếp xúc với ánh sáng. Tá dược chống oxy hóa cũng có thể được sử dụng để ngăn chặn sự phân hủy oxy hóa của các protein. Nằm trong số các chất chống oxy hóa hữu ích trong vấn đề này là các chất khử, các chất quét gốc oxy/tự do, và các chất tạo chelat. Tốt hơn, nếu các chất chống oxy hóa để sử dụng trong các chế phẩm protein trị liệu theo sáng chế hòa tan trong nước và duy trì hoạt tính của chúng trong suốt thời gian sử dụng sản phẩm. EDTA là chất chống oxy hóa được ưu tiên theo sáng chế trong vấn đề này.

Các chất chống oxy hóa có thể làm hỏng các protein. Ví dụ, các chất khử, như glutathion đặc biệt là, có thể phá hủy các mối liên kết disulfua nội phân tử. Vì vậy, không kể những chất khác, các chất chống oxy hóa để sử dụng trong sáng chế được chọn để loại bỏ hoặc làm giảm đủ khả năng tự làm hỏng các protein trong chế phẩm.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm các ion kim loại là các đồng yếu tố protein và cần thiết để tạo thành các phức hợp protein, như kẽm cần thiết để tạo thành một số dạng huyền phù insulin nhất định. Các ion kim loại cũng có thể ức chế một số quá trình làm thoái hóa các protein. Tuy nhiên, các ion kim loại cũng xúc tác các quá trình vật lý và hóa học làm thoái hóa các protein.

Các ion magie (10-120mM) có thể được sử dụng để ức chế sự đồng phân hóa của axit aspartic thành axit isoaspartic. Các ion Ca^{+2} (tối đa 100mM) có thể làm tăng tính ổn định của deoxyribonucleaza ở người. Tuy nhiên, Mg^{+2} , Mn^{+2} , và Zn^{+2} , có thể làm mất ổn định rhDNaza. Tương tự, Ca^{+2} và Sr^{+2} có thể làm ổn định Yếu tố VIII, nó có thể bị làm mất ổn định bởi Mg^{+2} , Mn^{+2} và Zn^{+2} , Cu^{+2} và Fe^{+2} , và sự kết tụ của nó có thể được gia tăng nhờ các ion Al^{+3} .

Các phương án về các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên ST2 còn bao gồm một hoặc nhiều chất bảo quản. Chất bảo quản là cần thiết khi phát triển các chế phẩm

dùng ngoài tiêu hóa đa liều bao gồm trên một lần lấy thuốc từ cùng một vật chứa. Chức năng chính của chúng là để ức chế sự sinh trưởng của vi sinh vật và đảm bảo tính vô trùng sản phẩm trong suốt thời gian sử dụng hoặc hạn sử dụng của sản phẩm thuốc. Thông thường, chất bảo quản được sử dụng bao gồm rượu benzyl, phenol và m-cresol. Mặc dù chất bảo quản có lịch sử sử dụng lâu dài với các dạng dùng ngoài đường tiêu hóa phân tử nhỏ, nhưng việc phát triển các chế phẩm protein bao gồm chất bảo quản có thể là thách thức. Các chất bảo quản hầu như luôn luôn có tác dụng làm mất ổn định (sự kết tụ) trên các protein, và điều này đã trở thành một yếu tố quan trọng trong việc hạn chế sử dụng chúng trong các chế phẩm protein đa liều. Đến nay, hầu hết các thuốc chứa protein đã được bào chế để sử dụng liều đơn duy nhất. Tuy nhiên, khi các chế phẩm đa liều là có thể, thì chúng có lợi thế nhất về khả năng tạo điều kiện thuận tiện cho bệnh nhân, và tăng tính tiêu thụ. Một ví dụ tích cực là về hormone sinh trưởng ở người (hGH) trong đó việc phát triển các chế phẩm có chất bảo quản đã dẫn đến thương mại hóa thuận tiện hơn, các chế phẩm bút tiêm sử dụng đa liều. Ít nhất bốn dụng cụ bút tiêm như vậy chứa các chế phẩm có chất bảo quản là hGH hiện đang được bán trên thị trường. Norditropin (dạng lỏng, Novo Nordisk), Nutropin AQ (dạng lỏng, Genentech) & Genotropin (dạng khô lạnh--hộp hai buồng, Pharmacia & Upjohn) chứa phenol trong khi Somatropin (Eli Lilly) được bào chế với m-cresol.

Một số khía cạnh cần phải được xem xét trong quá trình tạo chế phẩm và phát triển các dạng bào chế có bảo quản. Nồng độ chất bảo quản hiệu quả trong sản phẩm thuốc phải được tối ưu hóa. Điều này đòi hỏi phải thử nghiệm chất bảo quản xác định trong dạng bào chế với các khoảng nồng độ mang lại hiệu quả chống vi sinh vật mà không ảnh hưởng đến tính ổn định protein.

Đúng như dự đoán, việc phát triển các chế phẩm dạng lỏng chứa chất bảo quản có nhiều thách thức hơn so với các chế phẩm khô lạnh. Sản phẩm đông khô có thể được làm khô lạnh mà không cần chất bảo quản và được hoàn nguyên bằng một chất pha loãng chứa chất bảo quản tại thời điểm sử dụng. Điều này sẽ rút ngắn thời gian mà chất bảo quản tiếp xúc với protein, điều này làm giảm thiểu đáng kể những rủi ro liên quan đến tính ổn định. Với các chế phẩm dạng lỏng, tính hiệu quả và tính ổn định của chất bảo quản cần được duy trì trong toàn bộ thời gian sử dụng sản phẩm (khoảng 18 đến 24

giờ). Một điểm quan trọng cần lưu ý là tính hiệu quả của chất bảo quản cần được chứng minh trong chế phẩm cuối cùng chứa thuốc hoạt tính và tất cả các thành phần tá dược.

Nhìn chung, các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên ST2 sẽ được thiết kế cho các đường dùng cụ thể và các phương pháp sử dụng, cho các liều dùng cụ thể và tần suất sử dụng, cho các cách điều trị cụ thể với các bệnh cụ thể, cùng với các khoảng sinh khả dụng và tính dai dẳng, không kể những yếu tố khác. Vì vậy, các chế phẩm có thể được thiết kế theo sáng chế để cấp theo một đường dùng thích hợp bất kỳ, bao gồm nhưng không giới hạn ở đường miệng, đường tai, đường mắt, đường ruột thẳng và đường âm đạo, và theo các đường dùng ngoài tiêu hóa, trong đó có tiêm tĩnh mạch và tiêm động mạch, tiêm tĩnh mạch và tiêm động mạch, tiêm bắp, tiêm dưới da.

Khi được phẩm được bào chế xong, nó có thể được bảo quản trong các lọ vô trùng dưới dạng dung dịch, huyền phù, gel, nhũ tương, thể rắn, tinh thể, hoặc dưới dạng bột khử nước hoặc bột khô lạnh. Các chế phẩm này có thể được bảo quản hoặc dưới dạng sẵn sử dụng hoặc dưới dạng (ví dụ, khô lạnh) được hoàn nguyên trước khi sử dụng. Sáng chế cũng đề xuất các bộ kit để tạo ra đơn vị dùng đơn liều. Các bộ kit theo sáng chế mỗi bộ có thể chứa cả vật chứa thứ nhất có protein khô và vật chứa thứ hai có chế phẩm chứa nước. Theo một số phương án nhất định của sáng chế này, các bộ kit chứa ống tiêm duy nhất có chứa sẵn thuốc và ống tiêm nhiều buồng riêng có chứa sẵn thuốc (ví dụ, các ống tiêm có sẵn thuốc dạng lỏng và các ống tiêm có sẵn thuốc dạng đông khô) được đề xuất.

Lượng hữu hiệu trị liệu của dược phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên ST2 cần được sử dụng sẽ tùy thuộc, ví dụ, vào hoàn cảnh điều trị và các mục đích điều trị. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận ra rằng mức liều lượng thích hợp để điều trị sẽ thay đổi tùy thuộc, một phần, vào phân tử được cấp, dấu hiệu mà protein liên kết kháng nguyên ST2 đang được sử dụng, đường dùng, và kích cỡ (trọng lượng cơ thể, bề mặt cơ thể hoặc kích cỡ cơ quan) và/hoặc tình trạng (tuổi và sức khỏe tổng quát) của bệnh nhân. Theo một số phương án nhất định, bác sĩ lâm sàng có thể chuẩn độ liều lượng và thay đổi đường dùng để có được hiệu quả điều trị tối ưu. Liều lượng thông thường có thể nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 µg/kg đến tối đa khoảng 30 mg/kg hoặc hơn, tùy thuộc vào các yếu tố nêu trên. Theo các phương án cụ thể, liều lượng có thể nằm trong khoảng từ 1, 0 µg/kg đến tối đa khoảng 20 mg/kg, tùy ý từ 10 µg/kg đến tối đa khoảng 10 mg/kg hoặc từ 100 µg/kg đến tối đa khoảng 5 mg/kg.

Tốt hơn, nếu lượng hữu hiệu điều trị của protein liên kết kháng nguyên ST2 dẫn đến làm giảm mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng bệnh, làm tăng tần suất hoặc thời gian của các giai đoạn không có triệu chứng bệnh, hoặc ngăn ngừa sự hư hại hoặc suy yếu do tình trạng bệnh gây ra.

Các dược phẩm có thể được cấp sử dụng dụng cụ y tế. Các ví dụ về các dụng cụ y tế để cấp các dược phẩm được mô tả trong US 4,475,196; US 4,439,196; US 4,447,224; US 4,447,233; US 4,486,194; US 4,487,603; US 4,596,556; US 4,790,824; US 4,941,880; US 5,064,413; US 5,312,335; US 5,312,335; US 5,383,851; và US 5,399,163, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Phương pháp chẩn đoán hoặc điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến ST2

Các protein liên kết kháng nguyên ST2 theo sáng chế thì đặc biệt hữu ích để phát hiện ra ST2 trong mẫu sinh học. Theo một số phương án nhất định, mẫu sinh học được lấy từ bệnh nhân được cho tiếp xúc với protein liên kết kháng nguyên ST2. Sau đó, sự liên kết của protein liên kết kháng nguyên ST2 với ST2 được phát hiện để xác định sự có mặt hoặc lượng ST2 tương đối trong mẫu. Các phương pháp như vậy có thể là hữu ích trong việc chẩn đoán hoặc xác định các bệnh nhân phải tuân theo việc điều trị bằng protein liên kết kháng nguyên ST2.

Theo một số phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên ST2 của sáng chế được sử dụng để chẩn đoán, phát hiện, hoặc điều trị rối loạn viêm hoặc rối loạn tự miễn. Trong điều trị các rối loạn viêm hoặc rối loạn tự miễn, protein liên kết kháng nguyên ST2 có thể nhắm đích đến các tế bào biểu hiện ST2 của hệ miễn dịch để phá hoại và/hoặc có thể ngăn cản sự tương tác của ST2 với IL-33.

Cụ thể, các rối loạn có liên quan đến tín hiệu do IL-33 gây ra phải tuân theo việc điều trị bằng một hoặc nhiều protein liên kết kháng nguyên ST2 được bộc lộ trong tài liệu này. Các rối loạn này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bệnh viêm, bệnh tự miễn dịch, các bệnh tự miễn cận ung thư, bệnh viêm sụn, bệnh xơ hóa và/hoặc bệnh thoái hóa xương, bệnh viêm khớp, viêm khớp dạng thấp, bệnh viêm khớp ở thanh thiếu niên, bệnh viêm khớp dạng thấp ở thanh thiếu niên, bệnh viêm khớp dạng thấp ở thanh thiếu niên thể viêm ít khớp, bệnh viêm khớp dạng thấp ở thanh thiếu niên thể viêm đa khớp, bệnh viêm khớp dạng thấp ở thanh thiếu niên thể hệ thống, bệnh viêm cột sống

dính khớp ở thanh thiếu niên, bệnh viêm khớp đường ruột ở thanh thiếu niên, bệnh viêm khớp phản ứng ở thanh thiếu niên, hội chứng Reter ở thanh thiếu niên, hội chứng SEA (hội chứng huyết thanh âm tính, dính khớp, viêm khớp), bệnh viêm da cơ vị thành niên, bệnh viêm khớp vảy nến vị thành niên, bệnh xơ cứng bì ở thanh thiếu niên, Lupus ban đỏ hệ thống ở thanh thiếu niên, bệnh viêm mạch ở thanh thiếu niên, bệnh viêm khớp dạng thấp thể viêm ít khớp, bệnh viêm khớp dạng thấp thể viêm đa khớp, bệnh viêm khớp dạng thấp thể hệ thống, bệnh viêm cột sống dính khớp, bệnh viêm khớp đường ruột, bệnh viêm khớp phản ứng, hội chứng Reter, hội chứng SEA (Hội chứng huyết thanh âm tính, dính khớp, viêm khớp), bệnh viêm da cơ, bệnh viêm khớp vảy nến, bệnh xơ cứng bì, Lupus ban đỏ hệ thống, bệnh viêm mạch, bệnh suy thoái cơ, bệnh viêm đa cơ, bệnh viêm bì cơ, bệnh viêm đa động mạch nút, bệnh u hạt Wegener, bệnh viêm động mạch, bệnh đau nhiều cơ dạng thấp, bệnh sarcoid, bệnh xơ cứng bì, bệnh xơ cứng, bệnh xơ cứng mật nguyên phát, bệnh viêm xơ chai đường mật, hội chứng Sjogren, bệnh vảy nến, bệnh vảy nến mảng bám, bệnh vảy nến lốm đốm, bệnh vảy nến đảo nghịch, bệnh vảy nến mủ, bệnh vảy nến toàn thân kích ứng, bệnh viêm da, bệnh viêm da dị ứng, bệnh xơ vữa động mạch, lupus, bệnh Still, Lupus ban đỏ hệ thống (SLE), chứng nhược cơ năng, bệnh viêm ruột (IBD), bệnh Crohn, bệnh viêm loét đại tràng, bệnh Celiac, bệnh đa xơ cứng (MS), bệnh hen, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính (COPD), viêm mũi xoang, viêm mũi xoang cùng với polyp, viêm thực quản tăng bạch cầu eosin, bệnh viêm phế quản tăng bạch cầu ái toan, bệnh Guillain-Barre, bệnh đái tháo đường Typ I, bệnh viêm tuyến giáp (ví dụ, bệnh Graves), bệnh Addison, hiện tượng Raynaud, bệnh viêm gan tự miễn, bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ (GVHD), từ chối cấy ghép, tổn thương thận, và các bệnh tương tự.

Theo các phương án được ưu tiên, rối loạn tự miễn hoặc rối loạn viêm là bệnh hen, bệnh viêm da dị ứng, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính, bệnh xơ hóa phổi, bệnh nhiễm trùng máu và chấn thương, bệnh nhiễm HIV, Lupus ban đỏ hệ thống, bệnh viêm đường ruột, viêm khớp dạng thấp, bệnh xơ cứng, bệnh u hạt Wegener, bệnh Behchet, bệnh tim mạch, viêm mũi xoang, bệnh polip mũi, và bệnh viêm phế quản tăng bạch cầu ái toan.

Theo một số phương án nhất định, protein liên kết kháng nguyên ST2 theo sáng chế được sử dụng để chẩn đoán, phát hiện, hoặc điều trị bệnh ung thư hoặc rối loạn gây ung thư. Trong điều trị bệnh ung thư hoặc rối loạn gây ung thư, protein liên kết kháng

nguyên ST2 có thể nhắm đích đến các tế bào biểu hiện ST2 để phá hoại và/hoặc có thể ngăn cản sự tương tác của ST2 với IL-33, do đó làm giảm tín hiệu do IL-33 gây ra. Ví dụ, sự biểu hiện cao của ST2 dạng có thể hòa tan thì liên quan đến khả năng sống sót được cải thiện ở các bệnh nhân mắc ung thư vú. (Prechtel et al, *Lab Invest* (2001) 81:159-165). Do ST2 dạng có thể hòa tan liên kết và ngăn cản tín hiệu do IL-33 gây ra, nên sáng chế dự tính rằng các protein liên kết kháng nguyên ST2 mà ngăn cản tín hiệu do IL-33 gây ra sẽ hữu ích trong việc thúc đẩy khả năng sống sót được cải thiện ở các bệnh nhân mắc ung thư vú. Bệnh ung thư hoặc các rối loạn gây khối u mà có thể được chẩn đoán, được phát hiện hoặc được điều trị bằng protein liên kết kháng nguyên ST2 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhìn chung là các khối u thể rắn, ung thư phổi, ung thư buồng trứng, ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư nội mạc tử cung, ung thư thận, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, ung thư biểu mô tế bào vảy, khối u ác tính uveal, ung thư cổ tử cung, ung thư đại trực tràng, bàng quang, não, tụy, đầu, cổ, gan, bệnh bạch cầu, u lympho và bệnh Hodgkin, bệnh đa u tủy, bệnh u melanin, ung thư dạ dày, ung thư tế bào hình sao, bệnh dạ dày, và ung thư tuyến phổi.

Các protein liên kết kháng nguyên có thể được sử dụng để ức chế sự tăng trưởng, tiến triển, và/hoặc di căn khối u. Sự ức chế này có thể được giám sát bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau. Ví dụ, sự ức chế có thể dẫn đến làm giảm kích thước khối u và/hoặc làm giảm hoạt động trao đổi chất trong khối u. Cả hai thông số này có thể được đo bằng các phương pháp quét MRI hoặc PET, ví dụ, sự ức chế cũng có thể được theo dõi bằng sinh thiết để xác định mức hoại tử, mức chết tế bào khối u, và mức độ tưới máu bên trong khối u. Mức độ di căn có thể được theo dõi sử dụng các phương pháp đã biết.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây, cả thực tế và dự đoán, được đề xuất nhằm mục đích minh họa các phương án cụ thể hoặc các đặc trưng kỹ thuật của sáng chế này và không nhằm mục đích hạn chế phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Kháng thể ST2 có hiệu lực trong mẫu vật bị hen

Ví dụ này chứng minh rằng việc cấp các kháng thể liên kết ST2 và ức chế tín hiệu do IL-33 gây ra có hiệu lực trong mẫu động vật bị viêm, tức là, bệnh hen. mAb ST2

(mAb thay thế ST2) chuột làm trung hòa ức chế hoạt tính của IL-33 được cấp ngoại sinh *in vivo*. Cấp cho các con chuột 200ng của IL-33 chuột tái tổ hợp theo đường trong mũi hai giờ sau khi tiêm tĩnh mạch 100ug của mAb kháng ST2. Ngày hôm sau, đo các nồng độ IL-5 trong dịch rửa phế quản (BALF) theo phương pháp ELISA. Các nồng độ IL-5 đường cơ sở được lấy từ BALF của chuột được xử lý bằng nước muối trước khi thử nghiệm trong nước muối. Các nồng độ BALF IL-5 tối đa được lấy từ chuột được điều trị bằng mẫu đối chứng isotop Ig được thử nghiệm khả năng bởi IL-33. So với phương pháp điều trị bằng mẫu đối chứng isotyp Ig, thì phương pháp điều trị bằng mAb ST2 ức chế đáng kể IL-5 do IL-33 gây ra trong BALF của cả hai chủng chuột BALB/c và C57BL/6 (FIG. 1).

mAb thay thế ST2 thì có hiệu lực trong mô hình do chất gây dị ứng cho loài gián (CRA) gây ra của bệnh hen, với chuột được điều trị bằng kháng thể ST2 có các tế bào ưa eozin trong BALF ít hơn đáng kể so với chuột được điều trị bằng mẫu đối chứng isotyp Ig. Chuột BALB/c được thử nghiệm khả năng bởi 100 µg CRA vào các ngày 1, 3, 6, 8, 10, và 13. Tiêm vào những con chuột 250µg hoặc là mAb kháng ST2 hoặc mẫu đối chứng isotop Ig vào các ngày 0,7, và 13, với ngày 13 việc tiêm kháng thể diễn ra trước khi thử nghiệm khả năng CRA trong mũi cuối cùng. Vào ngày 14, gây mê cho những con chuột và cho chúng trải qua bước rửa phổi. Đếm các quần thể tế bào trong BALF và việc điều trị bằng mAb kháng ST2 dẫn đến tổng số tế bào trong BALF có mặt ít hơn đáng kể, cùng với các tế bào ưa eozin bao gồm quần thể tế bào bị ảnh hưởng đáng kể (FIG. 2).

Ví dụ 2. Sản xuất các kháng thể kháng ST2 sử dụng Xenomouse® Platform

Việc tạo các kháng thể ở người đầy đủ kháng lại ST2 ở người được thực hiện sử dụng kỹ thuật XENOMOUSE® (US 6,114,598; US 6,162,963; US 6,833,268; US 7,049,426; US 7,064,244, toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn; Green *et al.*, 1994, *Nature Genetics* 7:13-21; Mendez *et al.*, 1997, *Nature Genetics* 15:146-156; Green và Jakobovitis, 1998, *J. Ex. Med.* 188:483-495, Kellermann và Green, 2002, *Current Opinion in Biotechnology*, 13:593–597

Tiến hành tạo miễn dịch cho các con vật XMG2K, XMG4K và XMG4KL XENOMOUSE® bằng hoặc polypeptit bao gồm miền ngoại bào của ST2 ở người được

dung hợp với miễn Fc trên kháng thể người hoặc bằng protein dung hợp Fc-ST2 ở người được tạo phức với IL-33 ở người. Lượng thích hợp của chất kháng nguyên (tức là, mười $\mu\text{g}/\text{con}$ của ST2 dạng có thể hòa tan) được sử dụng để tạo miễn dịch ban đầu cho các con vật XENOMOUSE® theo các phương pháp được bộc lộ trong US 08/759,620, được nộp ngày 03/12/1996 và WO 98/24893, được công bố ngày 11/06/1998 và WO 00/76310, được công bố ngày 21/12/2000, bản mô tả của các đơn này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Sau khi tạo miễn dịch ban đầu, các bước tạo miễn dịch tăng cường tiếp theo bằng chất kháng nguyên (năm $\mu\text{g}/\text{con}$ của hoặc ST2 dạng có thể hòa tan hoặc hợp phức ST2/IL33) được cấp theo một thời gian biểu và trong thời gian cần thiết để tạo ra hiệu giá thích hợp của kháng thể kháng ST2 ở những con chuột. Xác định các hiệu giá kháng thể theo phương pháp thích hợp, ví dụ, ELISA hoặc bằng phương pháp tách tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACs).

Nhận diện các con vật biểu hiện các hiệu giá thích hợp, và thu được các tế bào lympho từ các hạch bạch huyết nhỏ giọt và, khi cần thiết, gộp các tế bào lại cho từng nhóm. Các tế bào lympho được tách ra từ mô lympho bằng cách nghiền trong một môi trường thích hợp (ví dụ, Môi trường của Eagle được Dulbecco cải biến; DMEM; có thể lấy được từ hãng Invitrogen, Carlsbad, CA) để phóng thích các tế bào ra khỏi các mô này, và được tạo huyền phù trong DMEM. Các tế bào B được lựa chọn và/hoặc phát triển sử dụng phương pháp thích hợp, và được dung hợp với một đối tác dung hợp thích hợp, ví dụ, các tế bào P3X63Ag8. 653 u tùy thể không tiết (American Type Culture Collection CRL 1580; Kearney et al, *J. Immunol.* 123, 1979, 1548-1550), sử dụng các phương pháp kỹ thuật được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một phương pháp dung hợp, các tế bào lympho được trộn với các tế bào đối tác dung hợp theo tỷ lệ 1:4. Hỗn hợp tế bào nhẹ nhàng được vờ viên nhỏ bằng cách ly tâm ở 400 x g trong 4 phút, gạn lọc dịch nổi, và trộn nhẹ hỗn hợp tế bào (ví dụ, bằng cách sử dụng pipet loại 1 ml). Sự dung hợp được gây ra bởi PEG/DMSO (polyetylen glycol/dimetyl sulfoxit; có thể thu được từ Sigma-Aldrich, St. Louis MO; 1 mL trên một triệu tế bào lympho). Thêm từ từ PEG/DMSO trong điều kiện khuấy nhẹ trong một phút tiếp theo, vào khoảng một phút trộn. Sau đó thêm IDMEM (DMEM không có glutamin; 2mL trên một triệu tế bào B) trong khoảng 2 phút trong điều kiện khuấy nhẹ, tiếp theo cho thêm tiếp IDMEM vào nữa (8 mL trên một triệu tế bào B) trong khoảng 3 phút.

Các tế bào dung hợp nhẹ nhàng được vớt viên nhỏ (400 x g 6 phút) và được tạo huyền phù lại trong 20 mL Môi trường chọn lọc (DMEM chứa Azaserin và Hypoxantin [HA] và các vật liệu bổ sung khác khi cần thiết) trên một triệu tế bào B. Ủ các tế bào trong 20-30 phút ở 37°C và sau đó tạo huyền phù lại trong 200 mL Môi trường chọn lọc và nuôi cấy trong ba đến bốn ngày trong các bình thót cổ T175 trước khi đưa vào đĩa 96 giếng.

Phân phối các tế bào vào các đĩa 96 giếng bằng cách sử dụng các phương pháp kỹ thuật tiêu chuẩn để tối đa hóa khả năng nhân dòng của các cụm thu được. Sau vài ngày nuôi cấy, thu gom các dịch nổi lại và cho chúng trải qua bước sàng lọc các thử nghiệm. Các dịch nổi tế bào lai được tạo ra từ những con chuột được gây miễn dịch bởi hợp phức ST2-Fc/IL33 được sàng lọc bằng thử nghiệm trên cơ sở ELISA được thực hiện bằng cách sử dụng các đĩa ELISA bằng polystyren loại 96 giếng được phủ thụ động qua đêm ở 4°C bằng 0,5ug/ mL ST2-Flag/his được tạo phức với IL-33 ở người. Để xác định liên kết đặc hiệu ST-2, thực hiện bước sàng lọc ELISA thứ hai sử dụng các đĩa polystyren loại 96 giếng được phủ thụ động qua đêm ở 4°C bằng 10ug/ mL neutravidin. Sau đó rửa sạch các đĩa và nạp vào 0,5ug/ mL IL33 người đã được biotinyl hóa. Phép sàng lọc ELISA này đã nhận diện trên 1200 chất gắn kết đặc hiệu kháng ST2.

Các dịch nổi tế bào lai được tạo ra từ những con chuột được gây miễn dịch bởi ST2-Fc dạng hòa tan được sàng lọc để được các kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên ST2 bằng FMAT (Fluorometric Microvolume Assay Technology: FMAT) bằng cách sàng lọc dựa vào các tế bào HEK293T tái tổ hợp được chuyển nhiễm nhất thời bởi ST2 ở người có chiều dài đầy đủ và sàng lọc ngược dựa vào các tế bào HEK293T được chuyển nhiễm mô phỏng. Tóm lại, các tế bào được cấy vào các đĩa FMAT 384 giếng với thể tích 40ul/giếng với mật độ 6.000 tế bào dương tính ST2/giếng và 14.000 tế bào âm tính ST2 được chuyển nhiễm mô phỏng/giếng. Sau đó bổ sung dịch nổi tế bào lai và để cho chúng liên kết trong khoảng 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng tiếp theo là rửa sạch và phát hiện thứ cấp sử dụng kháng thể thứ cấp Fc-Cy5 kháng người. Phép sàng lọc FMAT này đã nhận diện trên 2200 chất gắn kết đặc hiệu kháng ST2 từ các tế bào lai được tạo ra từ những con chuột được gây miễn dịch bởi miễn ngoại bào của ST2.

Sau đó, nhóm kết hợp gồm 3400 dịch nổi tế bào lai đặc hiệu kháng ST2 này tiếp tục được xác định đặc điểm về khả năng đối kháng chức năng tín hiệu ST2 sử dụng thử

nghiệm phóng thích Interferon- γ cytokin. Tóm lại, hoặc các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMNC) ở người đã qua tình chế hoặc các tế bào NK ở người đã qua tình chế được cấy vào các đĩa nuôi cấy mô loại 96 giếng và được kích thích bởi IL-33 và IL-12 ở người, dẫn đến phóng thích interferon-gama vào trong dịch nổi. Mức Interferon-gama trong dịch nổi được đo và có tương quan trực tiếp với tín hiệu phụ thuộc IL-33/ST2. Bằng cách sử dụng thử nghiệm sinh học này, các mẫu tế bào lai được thử nghiệm về khả năng ngăn cản sự phóng thích interferon-gama thông qua sự phong tỏa con đường tín hiệu ST2. Phép sàng lọc này đã nhận diện 578 dịch nổi tế bào lai được tạo ra do gây miễn dịch ST2-Fc mà sự gây miễn dịch này đã ức chế sự phóng thích interferon-gama vào khoảng lớn hơn 80%. Ngoài ra, 505 dịch nổi tế bào lai được tạo ra do việc gây miễn dịch phức hợp bằng ST2Fc/IL-33 được nhận diện đã ức chế sự phóng thích interferon-gama vào khoảng lớn hơn 70%.

Sau đó, nhóm gồm 1083 dịch nổi tế bào lai này tiếp tục được xác định đặc điểm về sự liên kết phản ứng chéo với ST2 ở chuột và ở khỉ đuôi dài, về sự xếp loại ái lực tương đối bằng phương pháp ELISA kháng nguyên giới hạn, về sự phong bế thụ thể/phối tử sinh hóa theo phương pháp ELISA và về sự liên kết nội sinh bằng phương pháp FACs sử dụng các dòng tế bào. Dữ liệu được tạo ra trong các thử nghiệm thứ cấp này được sử dụng để làm đa dạng nhóm lớn thành 2 bộ gồm 40 dòng tế bào lai đã được cải tiến để tạo dòng phụ, nhân rộng và tinh chế.

Ví dụ 3: Cách xác định K_D

Trong Ví dụ này, ái lực của các kháng thể liên kết ST2 được xác định. Các bước đánh giá cộng hưởng plasmon bề mặt được thực hiện sử dụng cảm biến sinh học quang học Proteon XPR-36 được lắp chip cảm biến GLC (Bio-Rad). Phép phân tích cảm biến sinh học được tiến hành tại 25°C trong hệ chất đệm HBS-EP+ (1X) (HEPES 10mM độ pH 7,4, NaCl 150mM, EDTA 3,0mM, hoạt chất bề mặt P20 0,05%, GE Healthcare). Tất cả các thuốc thử được giữ tại 8°C trước khi tiêm.

IgG kháng người ở dê (Fc fragment specific, Jackson ImmunoResearch) được cố định vào bề mặt cảm biến theo hướng thẳng đứng thông qua amin tiêu chuẩn ghép cặp với các đường nhỏ 1-6 (~4000 RU) và sau đó được phong bế bởi etanolamin. Các kháng thể được bắt giữ (~40–100 RU) theo hướng thẳng đứng tới các đường nhỏ 1-5. Đường

thẳng đứng 6 được để trống và được sử dụng cho các mục đích tham khảo. Dữ liệu được thu gom lại trong các nhóm gồm 15 kháng thể (ba bộ 5 kháng thể).

Các thuốc thử ST2 (người hoặc khỉ đuôi dài) được điều chế trong dung dịch đệm chạy tới nồng độ 25nM và sau đó được pha loãng 3 lần để đạt 309pM. Một liều tiêm duy nhất theo hướng ngang cung cấp đầy nồng độ đầy đủ của từng phân tử ST2, sử dụng chất đệm để hoàn thiện một hàng gồm 6 mẫu và tạo ra khoảng trống theo hàng để tham chiếu kép dữ liệu đáp ứng. Tốc độ liên kết (3 phút) và tốc độ phân ly (30 phút) được theo dõi ở tốc độ dòng 100ul/phút.

Bề mặt được tái tạo ở tốc độ dòng 100ul/phút bằng glyxin 10mM (độ pH 1,5, 30ul).

Dữ liệu là đường cơ sở được hiệu chỉnh, cắt bớt, được sắp hàng, trừ quy chiếu (giữa các điểm), và sau đó làm cho phù hợp với mô hình liên kết 1:1 sử dụng phần mềm ProteOn Manager (phiên bản 2.1.2.05). Kết quả được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4

Kháng thể	Mẫu được phân tích	ka	kd	KD (pM)
Ab12	cy ST2	2,50E+06	5,60E-05	22,5
Ab13	cy ST2	1,40E+06	1,80E-04	128,0
Ab14	cy ST2	3,57E+06	1,59E-03	445,0
Ab15	cy ST2	2,67E+06	6,23E-05	23,4
Ab16	cy ST2	2,61E+06	2,18E-04	83,7
Ab17	cy ST2	3,38E+06	1,43E-04	42,2
Ab18	cy ST2	3,16E+06	1,44E-04	45,7
Ab19	cy ST2	3,07E+06	1,59E-04	51,8
Ab20	cy ST2	2,61E+06	6,64E-05	25,5
Ab21	cy ST2	3,21E+06	4,92E-05	15,3
Ab22	cy ST2	2,87E+06	5,33E-05	18,6
Ab23	cy ST2	3,29E+06	3,23E-04	98,2
Ab24	cy ST2	2,03E+06	1,54E-04	75,9
Ab25	cy ST2	6,42E+06	5,75E-04	89,6
Ab26	cy ST2	5,65E+06	3,08E-04	54,5
Ab27	cy ST2	1,63E+06	3,75E-04	230,0
Ab28	cy ST2	2,97E+06	1,35E-05	4,5
Ab29	cy ST2	3,97E+05	9,45E-05	238,0
Ab30	cy ST2	3,09E+06	3,17E-05	10,2
Ab31	cy ST2	1,07E+06	2,08E-04	194,0

Kháng thể	Mẫu được phân tích	ka	kd	KD (pM)
Ab32	cy ST2	4,81E+06	2,69E-04	55,8
Ab33	cy ST2	4,26E+06	3,31E-04	77,6
Ab34	cy ST2	2,78E+06	4,60E-05	16,5
Ab35	cy ST2	9,76E+05	1,00E-04	103,0
Ab36	cy ST2	4140000	0,000278	67,1
Ab12	hu ST2	2,35E+06	3,41E-05	14,5
Ab13	hu ST2	1,30E+06	9,12E-05	70,3
Ab14	hu ST2	4,22E+06	2,57E-05	6,1
Ab15	hu ST2	1,83E+06	5,38E-05	29,3
Ab16	hu ST2	1,28E+06	1,47E-04	115,0
Ab17	hu ST2	2,86E+06	1,04E-04	36,4
Ab18	hu ST2	2,67E+06	1,19E-04	44,5
Ab19	hu ST2	2,81E+06	1,25E-04	44,5
Ab20	hu ST2	2,41E+06	5,68E-05	23,5
Ab21	hu ST2	2,83E+06	3,07E-05	10,8
Ab22	hu ST2	2,50E+06	4,05E-05	16,2
Ab23	hu ST2	2,70E+06	2,24E-04	83,1
Ab24	hu ST2	2,89E+06	1,50E-04	51,7
Ab25	hu ST2	4,00E+06	5,44E-04	136,0
Ab26	hu ST2	5,22E+06	2,97E-04	56,9
Ab27	hu ST2	1,35E+06	3,12E-04	230,0
Ab28	hu ST2	2,37E+06	1,98E-05	8,4
Ab29	hu ST2	3,76E+05	8,96E-05	238,0
Ab30	hu ST2	2,79E+06	2,71E-05	9,7
Ab31	hu ST2	8,78E+05	2,43E-04	277,0
Ab32	hu ST2	4,37E+06	2,63E-04	60,2
Ab33	hu ST2	4,04E+06	3,41E-04	84,4
Ab34	hu ST2	2,61E+06	3,19E-05	12,3
Ab35	hu ST2	8,17E+05	1,15E-04	141,0
Ab36	hu ST2	4,12E+06	2,80E-04	68,1

Ái lực của các kháng thể bổ sung được xác định sử dụng quy trình cộng hưởng Plasmon được biến đổi mức độ nhỏ. Các bước đánh giá cộng hưởng plasmon bề mặt đối với các kháng thể Ab1, Ab2, Ab3, và Ab4 được tiến hành tại 25°C sử dụng thiết bị Biacore 3000 (Biacore International AB, Uppsala, Thụy Điển) được lắp chip cảm biến CM5. Các kháng thể bắt giữ đặc hiệu kháng Fcy được cố định kiểu đồng hóa trị vào hai

tế bào đo dòng trên chip CM4 sử dụng phương pháp hóa học ghép cặp amin tiêu chuẩn với HBS-EP ((HEPES 10mM độ pH 7,4, NaCl 150mM, EDTA 3mM, hoạt chất bề mặt P20 là 0,005%, GE Heathcare) làm dung dịch đệm chạy. Tóm lại, mỗi tế bào đo dòng được hoạt hóa bởi hỗn hợp 1:1 (thể tích/thể tích) của NHS 0,1 M và EDC 0,4 M. IgG kháng người ở dê AffiniPure, kháng thể đặc hiệu đoạn Fc γ (Jackson ImmunoResearch Inc. West Grove, PA) ở 30ug/ml trong natri axetat 10mM, độ pH 5,0 được cố định với mức đích là 3.000 RUs trên hai tế bào đo dòng. Các bề mặt phản ứng còn lại được khử hoạt tính bằng cách tiêm etanolamin 1M. Sau đó, dung dịch đệm chạy được chuyển sang HBS-EP + BSA 0,1 mg/ml cho tất cả các bước còn lại.

Tất cả các kháng thể được điều chế trong dung dịch đệm chạy trong 3 lần và được pha loãng 3 lần, và được tiêm để liều tiêm trong 3 phút với tốc độ 10 μ l/phút trên khắp tế bào đo dòng thử nghiệm dẫn đến khoảng chừng 75 - 90 đơn vị đáp ứng của kháng thể được bắt giữ trên bề mặt tế bào đo dòng thử nghiệm. Không có kháng thể nào được bắt giữ trên bề mặt tế bào đo dòng đối chứng. Sau đó, ST2 ở người hoặc khi đuôi dài ở các nồng độ khác nhau (200nM - 0,0914nM), cùng với các mẫu trắng đệm được cho chạy trên hai tế bào đo dòng. Tốc độ dòng 50ul/phút được sử dụng và pha liên kết hai phút đi theo sau là pha phân ly bốn phút. Sau mỗi chu kỳ các bề mặt được tái tạo bằng một liều tiêm 50ul của glyxin 10mM, độ pH 1,5. Sau đó, kháng thể mới được bắt giữ trên tế bào đo dòng thử nghiệm để điều chế cho chu kỳ tiếp theo. Một thí nghiệm phân ly kéo dài riêng biệt (60 phút) được thực hiện trong 3 lần ở nồng độ 200nM.

Dữ liệu được tham chiếu kép bằng cách trừ đi các đáp ứng bề mặt đối chứng để loại bỏ những thay đổi chỉ số khúc xạ số lượng lớn, và sau đó trừ đi đáp ứng của mẫu trắng đệm lấy trung bình để loại bỏ các thành phần lạ của hệ thống ra khỏi hai tế bào đo dòng thực nghiệm. Dữ liệu của ST2 được xử lý và toàn bộ phù hợp với mô hình tương tác 1:1 với Rmax cục bộ theo Phần mềm đánh giá BIA phiên bản 4.1. (Biacore International AB, Uppsala, Thụy Điển). Hằng số tốc độ liên kết (k_a) và hằng số tốc độ phân ly (k_d) được xác định và được sử dụng để tính hằng số cân bằng phân ly (K_D). Các hằng số tốc độ phân ly và hằng số cân bằng phân ly đối với Ab1, Ab2, Ab3, và Ab4 được tóm tắt trong Bảng 5.

Bảng 5

Kháng thể	ST2	k_a (1/Ms)	k_a (1/s)	K_D (pM)
Ab1	Người	1,43E+06	1,11E-04	77,7
Ab1	khỉ đuôi dài	1,69E+06	1,97E-04	117
Ab2	Người	3,33E+05	1,13E-05	33,9
Ab2	khỉ đuôi dài	3,60E+05	1,16E-05	32,2
Ab3	Người	4,00E+05	9,50E-05	238
Ab3	khỉ đuôi dài	6,74E+05	8,55E-05	127
Ab4	Người	2,35E+06	7,06E-04	301
Ab4	khỉ đuôi dài	2,50E+06	1,29E-03	516

Ví dụ 4. Sự liên kết nhạy cảm với pH của các kháng thể

Các kháng thể điều trị liên kết bởi ái lực giảm ở độ pH thấp với các đích của chúng có thể tăng cường các đặc tính PK mà các đặc tính này sẽ cho phép cấp các kháng thể ít thường xuyên hơn hoặc với các liều thấp hơn. (Nat Biotechnol. 2010 28 (11):1203-7 T. Igawa et al Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization). Điều này là do sự phóng thích đích bởi kháng thể ở độ pH thấp của lysosom, tiếp theo là sự thoái biến đích xảy ra sau và phục hồi kháng thể.

Phép phân tích cảm biến sinh học về sự liên kết nhạy cảm với pH của các kháng thể Ab1, Ab2, Ab3, và Ab4 được thực hiện trên thiết bị Biacore 4000. Các thiết lập tương tự như ví dụ 3, trong đó các phép đo K_D của các kháng thể này được tiến hành, ngoại trừ dữ liệu được làm cho phù hợp với liều tiêm gấp đôi có nồng độ duy nhất là 2, 46nM của kháng thể α -ST2. Các tốc độ liên kết (5 phút) ở độ pH 7,4 và tốc độ phân ly (10 phút) ở độ pH 5,5 và 7,4 được theo dõi ở tốc độ dòng 30ul/phút. Các số liệu đã được trừ quy chiếu được làm cho phù hợp với mô hình 1:1 theo chương trình Scrubber. Một số kháng thể thể hiện tốc độ phân tách nhanh hơn đột ngột ở độ pH thấp hơn, như được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6

Kháng thể	Độ pH	k_d được ước tính (1/s)*	Số lần thay đổi k_d ở pH 7,4/pH 5,5
-----------	-------	----------------------------	---------------------------------------

Ab1	7,4	0,000134	88,1
Ab1	5,5	0,0118	
Ab2	7,4	0,0000298	8,0
Ab2	5,5	0,000238	
Ab3	7,4	0,0000273	2,9
Ab3	5,5	0,0000791	
Ab4	7,4	0,000632	16,9
Ab4	5,5	0,0107	

Ví dụ 5. Tính cạnh tranh chéo của kháng thể

Một cách phổ biến để xác định đặc điểm các epitop là thông qua các thí nghiệm tính cạnh tranh. Các kháng thể cạnh tranh với nhau có thể được coi như liên kết cùng một vị trí trên đích. Ví dụ này mô tả phương pháp xác định tính cạnh tranh để liên kết với ST2 và các kết quả của phương pháp khi được áp dụng cho một số kháng thể được mô tả ở đây.

Các thí nghiệm theo phương pháp chia giỏ có thể được tiến hành theo một số cách, và phương pháp được sử dụng có thể có tác dụng với các kết quả thử nghiệm. Phổ biến đối với các phương pháp này chính là ST2 thông thường được liên kết bởi một kháng thể mẫu và được dò bởi một kháng thể khác. Nếu kháng thể mẫu ngăn cản sự liên kết của kháng thể dò thì các kháng thể được cho là trong cùng một giỏ. Thứ tự mà trong đó các kháng thể được sử dụng là quan trọng. Nếu kháng thể A được sử dụng làm kháng thể mẫu và ngăn cản sự liên kết của kháng thể B thì phần đảo không phải luôn luôn đúng: kháng thể B được sử dụng làm kháng thể mẫu sẽ không nhất thiết phải ngăn cản kháng thể A. Có một số nhân tố đang sử dụng ở đây: sự liên kết của kháng thể có thể gây ra những thay đổi về hình dạng nơi đích ngăn cản sự liên kết của kháng thể thứ hai, hoặc các epitop mà chồng lên nhau nhưng không hoàn toàn dính vào nhau có thể cho phép kháng thể thứ hai vẫn có đủ sự tương tác ái lực cao với đích để cho phép liên kết. Nhìn chung, nếu quan sát sự cạnh tranh theo hoặc thứ tự các kháng thể được cho là cùng giỏ với nhau, và nếu cả hai kháng thể có thể ngăn chặn nhau thì có khả năng là các epitop chồng lấn lên nhau đầy đủ hơn.

Đối với ví dụ này, việc biến đổi theo phương pháp chia giỏ đa hợp được mô tả bởi Jia, et al (J. Immunological Methods, 288 (2004) 91-98) được sử dụng. ST2-FLAG His dạng có thể hòa tan được sử dụng. Mỗi Mã hạt trong số các hạt Luminex được bọc streptavidin (Luminex, #L100-L1XX-01, XX quy định cụ thể mã hạt) được ủ trong 100ul của 6pg/hạt kháng thể bắt giữ IgG chuột-kháng-người đơn trị đã qua biotinyl hóa (BD Pharmingen, #555785) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối, sau đó được rửa sạch 3 lần bằng PBSA, nước muối đệm phosphat (PBS) cộng với albumin huyết thanh bò (BSA) 1%. Mỗi mã hạt được ủ riêng biệt với 100ul kháng thể kháng ST2 pha loãng 1:10 (Kháng thể Cố định) trong 1 giờ sau đó chúng được rửa sạch. Gộp các hạt này lại sau đó phân phối vào đĩa lọc loại 96 giếng (Millipore, #MSBVN1250). Cho 100ul ST2 2ug/ml vào một nửa các giếng và cho chất đệm vào một nửa còn lại và ủ hỗn hợp trong 1 giờ sau đó rửa sạch. Cho 100ul kháng thể kháng ST2 pha loãng 1:10 (Ab phát hiện) vào một giếng có ST2 và một giếng không có ST2, ủ trong 1 giờ sau đó rửa sạch. Một IgG ở người không liên quan (Jackson, #009-000-003) cũng như một điều kiện không có kháng thể (mẫu trắng) được chạy với vai trò là các mẫu đối chứng âm tính. Cho IgG chuột kháng người đơn trị được liên hợp với 20ul PE (BD Pharmingen, #555787) vào từng giếng và ủ trong 1 giờ sau đó rửa sạch. Tạo huyền phù lại cho các hạt trong 75ul PBSA và thu thập ít nhất 100 biến cố/mã hạt trên thiết bị BioPlex (BioRad).

Cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) của cặp kháng thể không có ST2 được trừ khỏi tín hiệu của phản ứng tương ứng chứa ST2. Đối với cặp kháng thể được xem xét là được liên kết đồng thời, và do đó nằm trong các giỏ khác nhau, giá trị của phản ứng phải đáp ứng hai tiêu chí: 1) các giá trị phải lớn hơn 2 lần so với kháng thể cố định được ghép cặp với chính nó, mẫu không liên quan hoặc mẫu trắng, bất kể mẫu nào là cao nhất, và 2) các giá trị phải lớn hơn so với tín hiệu của kháng thể phát hiện có mặt cùng với mẫu không liên quan hoặc hạt được bọc bởi mẫu trắng. Tối thiểu ba giỏ được tìm thấy như được trình bày trong Bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

Giỏ	Kháng thể
Giỏ 1	Ab23, Ab17, Ab24, Ab25, Ab12, Ab36, Ab14, Ab18, Ab19, Ab20, Ab33, Ab34, Ab1, Ab7, Ab3, Ab15, Ab16, Ab27, Ab5, Ab2, Ab8, Ab13, Ab30, Ab35, Ab28
Giỏ 2	Ab9, Ab10, Ab11
Giỏ 3	Ab29

Ví dụ 6. Các thử nghiệm ngăn chặn IL-33

Cơ chế hoạt động của các kháng thể ST2 được khảo sát tỉ mỉ sử dụng hai phép AlphaScreen. Cùng một lúc, các thử nghiệm được sử dụng để xác định xem các kháng thể có thể ức chế sự liên kết của IL-33 với ST2 hoặc ngược lại xem các kháng thể có thể ngăn cản đặc hiệu sự liên kết của các đồng thụ thể ST2 và AcP trong khi vẫn cho phép IL-33 liên kết với ST2. AlphaScreen là một từ viết tắt cho Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay screen (phép sàng lọc thử nghiệm đồng nhất lân cận phát quang khuếch đại).

Trong lần sàng lọc thứ nhất, các kháng thể được đánh giá về khả năng ngăn cản sự liên kết giữa IL-33 và ST2. Thử nghiệm này đã đo khả năng của các kháng thể kháng ST2 khi ngăn cản sự liên kết của IL-33 ở người đã được biotinyl hóa (được ghép cặp với hạt cho Streptavidin) với ST2 ở người có đuôi 6xhistidin (được ghép cặp với hạt nhận chất tạo chelat Ni). AlphaScreen IL-33/ST2 được tiến hành bằng cách sử dụng các phản ứng 40ul trong đĩa nửa bề mặt loại 96 giếng (Perkin Elmer). Chất đệm thử nghiệm được sử dụng cho cả hai AlphaScreen chứa HEPES 40mM (pH=7,4), CaCl₂ 1mM, BSA 0,1%, Tween-20 0,05% và NaCl 100mM. Mỗi giếng thử nghiệm chứa IL-33 ở người đã được biotinyl hóa 0,3nM, ST2-FH ở người 0,3nM (các vị trí FH cho các đuôi FLAG và 6xhistidin), các hạt cho được bọc Streptavidin 10ug/ml (Perkin Elmer, Waltham, MA), các hạt nhận được bọc chất tạo chelat Ni 10ug/ml (Perkin Elmer) và Ab kháng ST2 12,5ug/mL. Sau khi cho tất cả các thành phần của thử nghiệm vào, các đĩa được ủ qua đêm trong bóng tối ở nhiệt độ trong phòng. Ngày hôm sau đọc kết quả các đĩa trên máy đọc đa nhãn Envision 2103 (Perkin Elmer). Sự kích thích laze của các hạt cho ở 680nm được sử dụng để tạo ra nguyên tử oxy phản ứng mà có thể bắt đầu một tầng phát quang/huỳnh quang trong các hạt nhận mà các hạt này nằm lân cận nhau do sự tương

tác của các protein được ghép cặp với hạt dẫn đến sự phát xạ ánh sáng được phát hiện ở 570nm.

Trong thử nghiệm thứ hai, các kháng thể được đánh giá về khả năng ức chế sự liên kết do IL-33 gây ra của ST2 với đồng thụ thể AcP. Thử nghiệm này đã đo khả năng của các kháng thể kháng ST2 khi ngăn cản sự liên kết do IL-33 gây ra của ST2-Fc ở người đã được biotinyl hóa (được ghép cặp với hạt cho Streptavidin) với AcP người có đuôi 6xhistidin (được ghép cặp với hạt nhận chất tạo chelat Ni). AlphaScreen ST2/AcP được tiến hành trong các phản ứng 8ul trong đĩa 384 giếng (Perkin Elmer). Mỗi giếng thử nghiệm chứa IL-33 ở người 5nM, ST2-Fc ở người đã được biotinyl hóa 5nM, AcP-FH ở người 5nM, các hạt cho được bọc Streptavidin 10ug/ml, các hạt nhận được bọc chất tạo chelat Ni 10ug/ml và 12,5ug/mL Ab kháng ST2. Sau khi cho tất cả các thành phần của thử nghiệm vào, ủ các đĩa qua đêm trong bóng tối ở nhiệt độ trong phòng. Ngày hôm sau đọc kết quả các đĩa trên máy đọc đa nhãn Envision 2103 (Perkin Elmer) sử dụng các thông số tương tự như trên đối với thử nghiệm thứ nhất.

Các kết quả của hai AlphaScreen được trình bày trong Bảng 8 dưới đây. Khả năng ức chế của từng kháng thể được trình bày dưới dạng tỷ lệ phần trăm ức chế của tín hiệu trong AlphaScreen sử dụng kháng thể xác định ở nồng độ 12,5ug/ml tùy theo tín hiệu trong thử nghiệm khi không có kháng thể nào có trong giếng thử nghiệm. Một số kháng thể ức chế sự tương tác của ST2 và IL-33 đầy đủ hơn so với chúng ức chế sự tương tác của ST2/IL-33/AcP và một số kháng thể ức chế sự tương tác của ST2/IL-33/AcP đầy đủ hơn so với sự tương tác của ST2 và IL-33. Tất cả các kháng thể đã ức chế sự tương tác của IL-33 với ST2 vào khoảng ít nhất 50%.

Bảng 8

Tên	% ức chế ST2-IL33 ở 12,5ug/ml	% ức chế ST2-AcP ở 12,5ug/ml
Ab6	98,5	71,2
Ab4	98,4	77,8
Ab9	75,9	93,1
Ab10	51,8	73,2
Ab1	98,1	86,9
Ab7	98,9	75,7

Ab3	98,8	68,7
Ab11	75,8	93,6
Ab5	96,3	33,8
Ab2	99,2	96,4

Ví dụ 7. Thử nghiệm sinh học IL-33 ở người *in vitro*

mAbs người ST2 dùng làm ví dụ minh họa được thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học ở người bằng cách sử dụng các tế bào CD4⁺ T đã qua tinh chế được lấy từ các vật cho khác nhau được kích thích bởi IL-33 ở người và IL-2 ở người. Quy trình thử nghiệm như sau. Cấy các tế bào với mật độ 250.000 tế bào mỗi giếng với thể tích 60ul trong đĩa có đáy hình tròn loại 96 giếng. Sau khi ủ trước, thêm 30ul 4 lần hỗn hợp huIL-2 + huIL-33 vào từng tế bào. Thể tích tổng trong đĩa đáy tròn loại 96 giếng là 120ul. Bắt đầu các kháng thể ở 20ug/ml và thực hiện pha loãng 1:3 để tạo ra đường cong 10 điểm. Thực hiện 4 lần với thể tích 30ul. Sau khi ủ trước Abs với các tế bào, thêm 30ul 4 lần hỗn hợp huIL-2 + huIL-33 vào từng tế bào. 37°C, CO₂ 5% trong 48 giờ. Thu gom các dịch nổi. Phân tích khả năng ức chế của IL-5 theo phương pháp ELISA huIL-5.

Fig. 3 cho thấy các mAb ST2 trong việc ức chế sự sản xuất IL-5 do IL-33 ở người gây ra từ các tế bào CD4⁺ T của các vật cho khác nhau. Đường (—) minh họa giá trị của đối chứng dương của IL-33 ở người kết hợp với IL-2 ở người mà không có sự ức chế. Đường (····) minh họa giá trị của đối chứng dương của IL-2 ở người. Đường (---) minh họa giá trị của đối chứng môi trường. Các tế bào CD4⁺ T ở người được ủ trước trong khoảng 30 phút với mAbs kháng ST2 và sau đó được kích thích trong 48 giờ bởi IL-33 ở người (4ng/ml) và IL-2 ở người (10ng/ml). FIG 3 cho thấy các kháng thể ST2 có thể ức chế sự hoạt hóa ST2 gây bởi IL-33 ở người, được xác định bằng sự sản xuất IL-5 từ các tế bào CD4⁺ T. Các kháng thể ST2 là có thể đối kháng sự sản xuất IL-5 do IL-33 gây ra từ các tế bào CD4⁺ T với các giá trị IC₅₀ khoảng chừng <100nM. Bảng 9 cho thấy các giá trị IC₅₀ đại diện.

Bảng 9

Ab	IC ₅₀ (nM)
2	5,25
8	6,90
10	6,90

1	10,68
9	62,01
5	64,54
11	479,86

Ví dụ 8. Thử nghiệm phóng thích IFN γ tế bào CD4 + T ở khi đuôi dài

Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) ở khi đuôi dài được làm giàu từ máu ngoại vi của vật cho thông thường được xử lý bằng axit xitrat dextroza (ACD) bằng cách ly tâm gradien ISOLYMPH (Gallard-Schlesinger Industries, Plainview, NY). Quá trình tách ly sau đó của các tế bào CD4+ T ở khi đuôi dài được thực hiện sử dụng bộ Kit tách ly tế bào CD4 + T ở khi đuôi dài của hãng Miltenyi Biotec. Các tế bào CD4+ T ở khi đuôi dài đã qua tách ly (2×10^5 tế bào/giếng trong các đĩa 96 giếng) được ủ với các kháng thể đơn dòng đã qua tinh chế ở các nồng độ khác nhau trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó được kích thích bởi IL-33 (10ng/mL), IL-2 (10ng/mL), và IL-12p70 (50ng/mL) trong 84 giờ. Sau đó, các dịch nổi nuôi cấy tế bào CD4 + T ngoài tế bào khi đuôi dài thu được được phân tích về sự có mặt của IFN γ ở khi đuôi dài theo phương pháp ELISA (số liệu của ví dụ được cung cấp trong Bảng 10). Hiệu lực của các kháng thể đơn dòng đã qua tinh chế được xác định trong thử nghiệm phóng thích IFN γ tế bào CD4 + T ở khi đuôi dài từ ba vật cho riêng biệt.

Bảng 10

Các giá trị IC-50	pM
Ab1	15,82
Ab2	79,5
Ab3	15,15
Ab4	4,03
Ab5	12,9
Ab6	47,1
Ab7	40,01
Ab8	158,07

Ví dụ 9. Thử nghiệm phóng thích IL-8 wa eozin ở người

Các hồng cầu và các bạch cầu ở người hạt được làm giàu từ máu ngoại vi của vật cho thông thường, đã heparin hóa bằng cách ly tâm gradien ISOLYMPH (Gallard-

Schlesinger Industries, Plainview, NY). Các hồng cầu được loại bỏ bằng cách sử dụng chất đệm làm dung giải ACK (Gibco, Carlsbad, CA). Quá trình tách ly sau đó của các tế bào ưa eozin được thực hiện sử dụng Bộ Kit Tách ly tế bào ưa eozin của hãng Miltenyi Biotec. Các tế bào ưa eozin được tách ly (2×10^5 tế bào/giếng trong các đĩa 96 giếng) được ủ với các dịch nổi không tạo dòng hoặc tạo dòng với một số độ pha loãng, hoặc các kháng thể đơn dòng đã qua tinh chế ở các nồng độ khác nhau trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng và sau đó được kích thích bởi IL-33 (2ng/mL) và IL-3 (100ng/mL) trong 3 ngày. Sau đó, các dịch nổi nuôi cấy ưa eozin ngoài tế bào thu được được phân tích về sự có mặt của IL-8 theo phương pháp ELISA. Số liệu của ví dụ được trình bày trong Bảng 11. Hiệu lực của các kháng thể đơn dòng đã qua tinh chế được xác định trong thử nghiệm phóng thích IL-8 ưa eozin từ ba vật cho riêng biệt.

Bảng 11

Các giá trị IC-50	pM
Ab1	51,45
Ab2	52,75
Ab3	50,38
Ab4	14,12
Ab5	73,27
Ab6	63,02
Ab7	40,68
Ab8	3120

Ví dụ 10. Hiệu lực của kháng thể kháng ST2 so với các kháng thể thương mại

Đáp ứng liều của IL-33 ở người trong thử nghiệm tế bào NK ở người

Các tế bào NK ở người dương tính với CD56 nguyên phát (5×10^4 tế bào) được điều trị bằng IL-12 ở người (1ng/mL) cộng với các lượng tăng thêm của IL-33 ở người, như được thể hiện trong FIG. 4. Hai mươi hai giờ sau đó, các dịch nổi ngoài tế bào được thu gom lại và được đo nồng độ IFN- γ sử dụng thử nghiệm thương mại (R&D Systems). Sử dụng IL-33 10ng/mL làm liều kích thích để ức chế kháng thể ST2.

Sự ức chế hoạt tính IL-33 của kháng thể

Các tế bào NK ở người được kích thích như trên. Ba mươi phút trước khi bổ sung IL-33 và IL-12, bổ sung các kháng thể ST2 vào các tế bào với các nồng độ như được chỉ

ra trong FIG. 5. Hai mươi hai giờ sau khi điều trị bằng IL -33, các dịch nổi ngoài tế bào được thu gom lại và được đo nồng độ IFN- γ sử dụng thử nghiệm thương mại (R&D Systems). Tên của dòng được chỉ định cho các kháng thể sẵn có trên thị trường. Chỉ có Ab2 ức chế hoàn toàn đáp ứng IFN- γ phụ thuộc IL-33 và nó có ý nghĩa mạnh hơn đáng kể so với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể huST2 có sẵn trên thị trường. Giá trị IC50 tương ứng với từng kháng thể được thể hiện trong Bảng 12.

Bảng 12

Kháng thể	IC50 (ug/ml)
2A5	~608
HB12	7,700
B4E6	~43,54
FB9	~498,4
97203	0,3851
Ab2	0,04123

Ví dụ 11: Sự gây đột biến của ST2 bằng cách quét alanin/acginin

Ví dụ này mô tả đặc điểm các kháng thể ST2 dựa trên tác dụng gây đột biến của ST2 đến khả năng liên kết của chúng với đích. Các dữ liệu liên kết trước đã chỉ ra rằng các miền 1 và 2 của ST2 thì chủ yếu chịu trách nhiệm về liên kết kháng thể đối với nhóm gồm các kháng thể được phân tích bằng sự gây đột biến quét ST2 trong Ví dụ này. Như vậy, chỉ các miền 1 và 2 (D1D2) của ST2 được xem xét về mặt cấu trúc trong ngữ cảnh chiều dài đầy đủ ST2 trong trong các thiết kế về vị trí đột biến.

Các chỉ số phối trí mô hình hợp phức ST2 và IL-33 được lấy từ tài liệu của Lingel et al., *Structure (London, England: 1993)*. Elsevier Ltd 17, 1398–410. Độ tiếp cận dung môi của ST2 trên chuỗi bên của gốc được tính toán theo phương pháp Môi trường Hoạt động Phân tử (*Molecular Operating Environment (MOE)*, 2011. 10; *Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2011.*). Sau đó, các giá trị độ tiếp cận dung môi này được sử dụng trong việc lựa chọn các gốc bề mặt của D1D2 để gây đột biến bằng cách lựa chọn đầu tiên tất cả các gốc của D1D2 với các mặt tiếp xúc chuỗi bên là ít nhất 10 Å² hoặc các gốc glyxin với tổng diện tích tiếp xúc là ít nhất 10 Å². Các gốc glyxin với một góc Phi dương được

loại bỏ, như là các gốc prolin, bởi vì các đột biến ở các vị trí này có xác suất thay đổi cao hơn cấu trúc proteincục bộ. Các gốc xystein cũng được loại bỏ khỏi bước lựa chọn để duy trì các mối liên kết disulfua. Gốc A82 được loại bỏ sau khi xem xét bằng mắt. Phương pháp này đã tạo ra một danh sách gồm 140 gốc để gây đột biến. Tất cả các gốc được đột biến thành acginin ngoại trừ các gốc acginin và lyzin, các gốc này được đột biến thành alanin.

Tất cả các cấu trúc đột biến của miền ngoại bào (ECD) của ST2 có đuôi His-Avi khởi đầu, trong vector pTT5, được biểu hiện trong các tế bào trong huyền phù 293-6E được chuyển nhiễm nhất thời (NRCC) trong các đĩa 24 giếng. Sự biotiny hóa đạt được bằng cách truyền nhiễm đồng thời BiR A trong vector pTT5. Các dịch nổi được thẩm tách bằng PBS để loại bỏ biotin dư.

Thử nghiệm liên kết BioPlex được sử dụng để đo sự liên kết của các kháng thể kháng ST2 để chỉ ra các đột biến của ST2. Các đột biến được biotiny hóa được gắn kết vào 80 mã hạt trong số các hạt được bọc streptavidin (Luminex, #L100-L1XX-01, XX quy định cụ thể mã hạt). Tám mươi mã hạt này cho phép ghép hai bộ gồm 70 đột biến để được tổng số 140. Mỗi bộ bao gồm 6 mẫu đối chứng gốc, 3 mẫu đối chứng protein không liên quan và 1 mẫu trắng. Kháng thể liên kết với protein đột biến được so sánh với kháng thể liên kết với protein gốc.

Dem rửa 5 lần 100ul dịch pha loãng 1:7 của các đột biến ST2, các mẫu đối chứng gốc hoặc mẫu đối chứng không có protein được gắn kết trước với các hạt bằng PBS +BSA 1%, gộp lại và phân ước vào đĩa lọc loại 96 giếng (Millipore) sau đó rửa sạch lần nữa. Cho 100ul các kháng thể kháng ST2 trong các dịch pha loãng 3 lần vào các giếng bộ ba, ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng và rửa sạch. Cho 100ul dịch pha loãng 1:500 của IgG Fc kháng người được liên hợp với PE (Jackson, #109-116-170) vào từng giếng, ủ trong khoảng 0,5 giờ và rửa sạch. Tạo huyền phù lại cho các hạt trong thể tích 75ul, lắc ít nhất trong 3 phút, và đọc kết quả trên máy BioPlex.

Trước khi chạy thử nghiệm liên kết, tiến hành một thí nghiệm xác nhận để đánh giá độ biến thiên từ "vùng hạt" đến "vùng hạt" (B-B). Trong thí nghiệm xác nhận, tất cả các hạt được liên hợp với cùng một protein đối chứng kiểu đại. Do đó, độ chênh lệch giữa các vùng hạt chỉ là do phương sai B-B và không bị làm lẫn do độ chênh lệch giữa

các protein kiểu đại và protein đột biến. Xác định hiệu giá kháng thể được chạy với 12 lần lặp lại trong các giếng khác nhau.

Mục tiêu của phép phân tích thống kê này là để ước tính độ biến thiên B-B của giá trị EC50 ước tính của các đường cong liên kết. Sau đó, độ lệch chuẩn (SD) B-B được ước tính được sử dụng để xây dựng các khoảng tin cậy EC50 của các protein kiểu đại và protein đột biến trong các thực nghiệm so sánh đường cong.

Mô hình logistic bốn tham số được điều chỉnh cho phù hợp với dữ liệu liên kết cho từng vùng hạt. Tập tin có tên "sumout. xls" thu được, chứa các kết quả kiểm soát chất lượng (QC) đường cong và các giá trị ước tính tham số cho đỉnh (lớn nhất), đáy (nhỏ nhất), Hillslope (vị trí mà tạo thành bề mặt nghiêng trên cùng nhất gần phía trên cùng của độ dốc) (dốc), và log tự nhiên của EC50 (xmid) của các đường cong, được sử dụng làm các số liệu thô cho phép phân tích. Sau đó, độ biến thiên B-B cho từng tham số được ước tính bằng cách cố định mô hình ảnh hưởng của các nhân tố kết hợp sử dụng quy trình SAS PROC MIXED. Chỉ các đường cong có tình trạng QC "tốt" là được bao gồm trong phép phân tích này. Mô hình ảnh hưởng của các nhân tố kết hợp cuối cùng bao gồm chỉ có một số dư (tức là các vùng hạt riêng lẻ) với vai trò là tác dụng ngẫu nhiên. Các giá trị trung bình bình phương tối thiểu (trung bình LS) cho từng tham số cũng được ước tính theo mô hình ảnh hưởng của các nhân tố kết hợp. SD B-B được tính toán bằng cách lấy căn bậc hai của phương sai B-B. Số lần thay đổi giữa trung bình LS + 2SD và trung bình LS - 2SD, đại diện cho khoảng chừng trên và dưới 97,5 phần trăm quần thể, cũng được tính toán.

Để xác định các đột biến không tạo ra nhiều đáp ứng tùy theo đối chứng WT, cho từng kháng thể, các đột biến trong đó (MFI) cực đại là nhỏ hơn 30% (MFI) cực đại đối với đối chứng WT được nhận diện và gắn nhãn là Hitmax.

Các giá trị EC50 thuộc các đường cong liên kết đột biến và các đường cong liên kết kiểu đại được so sánh. Sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê được xác định là các va chạm để xem xét thêm. Các đường cong có gắn các nhãn "không phù hợp" hoặc "ít phù hợp" bị loại khỏi phép phân tích này.

Hai nguồn biến thiên được xem xét trong việc so sánh các giá trị ước tính EC50, độ biến thiên từ đường cong phù hợp và độ biến thiên hạt-hạt. Các kiểu đại và các đột

biến được liên kết với các hạt khác nhau, do đó độ chênh lệch của chúng bị lẫn lộn với độ chênh lệch hạt-hạt. Độ biến thiên phù hợp đường cong được ước tính theo sai số chuẩn của các giá trị ước tính log EC50. Độ biến thiên hạt-hạt được xác định bằng thực nghiệm sử dụng một thực nghiệm trong đó các mẫu đối chứng kiểu đại được liên kết với từng hạt một. Độ biến thiên hạt trong các giá trị ước tính EC50 của đường cong liên kết kiểu đại từ thực nghiệm này được sử dụng để ước tính độ biến thiên hạt-hạt trong thực nghiệm lập bản đồ thực tế.

Các bước so sánh giữa hai giá trị EC50 (theo lý lệ log) được tiến hành sử dụng phép kiểm định T Student. Thống kê T được tính bằng tỷ lệ giữa delta (độ chênh lệch tuyệt đối giữa các giá trị ước tính EC50) và độ lệch chuẩn delta. Phương sai delta được ước tính bằng tổng của ba thành phần, ước tính phương sai của EC50 cho các đường cong đột biến và đường cong kiểu đại trong hồi quy phi tuyến và hai lần phương sai hạt-hạt được ước tính từ một thực nghiệm riêng biệt. Bội số của hai đối với phương sai hạt-hạt là do giả định rằng cả hạt đột biến và hạt kiểu đại có cùng phương sai.

Mức độ tự do của độ lệch chuẩn delta được tính toán sử dụng phép xấp xỉ của Satterthwaite (1946).

Các giá trị p riêng lẻ và các khoảng tin cậy (95% và 99%) được suy ra dựa trên phép phân phối T Student cho mỗi so sánh.

Trong trường hợp nhiều mẫu đối chứng kiểu đại, một cách tiếp cận thận trọng đã được thực hiện bằng cách chọn lựa mẫu đối chứng kiểu đại mà gần như tương tự đột biến, tức là, chọn ra những mẫu có các giá trị p lớn nhất.

Việc điều chỉnh bội số là quan trọng để kiểm soát lỗi khẳng định sai trong khi tiến hành một số lượng lớn các thử nghiệm một cách đồng thời. Hai hình thức điều chỉnh bội số được thực hiện đầy đủ đối với phép phân tích này: kiểm soát mức sai số chung nhỏ nhất (FWE) và kiểm soát tốc độ phát hiện lỗi (FDR). Phương pháp FWE kiểm soát xác suất mà một hoặc nhiều va chạm là không có thực; phương pháp FDR kiểm soát tỷ lệ dự kiến của lỗi khẳng định sai trong số các va chạm được chọn. Phương pháp FWE thì có tính bảo thủ hơn và ít hiệu lực hơn so với phương pháp FDR. Có rất nhiều phương pháp có sẵn cho cả hai cách tiếp cận, đối với phép phân tích này, chúng tôi chọn phương pháp của Hochberg (1988) cho phép phân tích FWE và phương pháp FDR của

Benjamini-Hochberg (1995) cho phép phân tích FDR. Các giá trị p được điều chỉnh cho cả hai cách tiếp cận được tính toán cho hoặc là từng kháng thể hoặc toàn bộ thử nghiệm.

Một đột biến được lựa chọn là có hiệu quả theo các tiêu chí sau nếu: 1) các kết quả phù hợp rất ít hoặc không phù hợp được trả lại cho đột biến đó, 2) đột biến được chọn cho tiêu chí va chạm lớn nhất, 3) Giá trị p có mức sai số chung nhỏ nhất là nhỏ hơn 0,01, hoặc 4) giá trị Bmax là lớn hơn 200% gốc. Một va chạm được chỉ định là đột biến ức chế nếu ảnh hưởng làm giảm Bmax hoặc làm tăng giá trị EC50, một va chạm được chỉ định là đột biến hoạt hóa nếu ảnh hưởng làm tăng Bmax hoặc làm giảm giá trị EC50. Tám đột biến bị loại khỏi danh sách các va chạm do ảnh hưởng của chúng đến >90% các kháng thể được thử nghiệm, các đột biến đó là: K37A, R46A, D63R, V71R, G106R, K112A, N132R, Q137R, và Y141R.

Các kết quả của phép phân tích được cho biết trong các Bảng 13 và 14.

Bảng 13

Ab	Giỏ	Các đột biến ức chế	Các đột biến hoạt hóa
Ab2	1	L14R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, D97R, V104R, G138R, N152R, V176R	L53R, R72A, S73R
Ab3	1	S3R, E10R, I15R, S33R, E43R, V47R, A62R, G65R, F76R, T79R, D92R, D97R, V104R, T124R, K131A, Q134R, G138R, F147R, V176R, V184R	D29R, L53R, V61R, R72A, T162R
Ab32	1	S3R, I15R, Y32R, S33R, E43R, V47R, S50R, K55A, A62R, G65R, T79R, D92R, V95R, D97R, V104R, E128R, Q134R, G138R, S146R, F147R, V176R	D29R, R72A
Ab33	1	S3R, I15R, Y32R, S33R, T35R, E43R, V47R, S50R, K55A, A62R, G65R, T79R, D92R, V95R, D97R, V104R, E128R, Q134R, G138R, S146R, F147R, N152R, V176R	D29R, R72A
Ab30	1	S3R, L14R, Y26R, S33R, T35R, E43R, V47R, A62R, G65R, T79R, D92R, V104R, , G138R, , A143R, F147R, N152R, V176R, V184R	R72A

Ab	Giỏ	Các đột biến ức chế	Các đột biến hoạt hóa
Ab11	2	S50R, S175R	W7R, E10R, L14R, Q21R, E43R, T79R, N110R, T177R, V184R, K185A
Ab10	2	A49R, S50R, I70R, S175R, S181R	K4A, Q5R, W7R, E10R, L14R, I15R, Q21R, Y26R, E43R, T79R, M100R, K109A, N110R, T124R, K145A, T177R, V184R, K185A
Ab29	3	N11R, V47R, S50R, Y67R, N83R, V104R, L120R, G138R, S139R, S146R, F147R, A172R	

Bảng 14

Ab	Các đột biến không có hiệu lực
Ab2	K1A, F2R, S3R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, N11R, E12R, A13R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, S50R, G51R, Q52R, K55A, L57R, E60R, V61R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, V95R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, E128R, F130R, K131A, Q134R, A135R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, S146R, F147R, V149R, D151R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, V184R, K185A, D186R, E187R
Ab3	K1A, F2R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, N11R, E12R, A13R, L14R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, Y31R, Y32R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, S50R, G51R, Q52R, K55A, L57R, E60R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, S73R, T75R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, V95R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, E128R, F130R, A135R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, S146R, V149R, D151R, N152R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, K185A, D186R, E187R

Ab	Các đột biến không có hiệu lực
Ab32	K1A, F2R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, N11R, E12R, A13R, L14R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, Y31R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, G51R, Q52R, L53R, L57R, E60R, V61R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, F130R, K131A, A135R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, V149R, D151R, N152R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, V184R, K185A, D186R, E187R
Ab33	K1A, F2R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, N11R, E12R, A13R, L14R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, Y31R, Q34R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, G51R, Q52R, L53R, L57R, E60R, V61R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, F130R, K131A, A135R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, V149R, D151R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, V184R, K185A, D186R, E187R
Ab30	K1A, F2R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, N11R, E12R, A13R, I15R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, Q34R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, A49R, S50R, G51R, Q52R, L53R, K55A, L57R, E60R, V61R, S64R, I66R, Y67R, T68R, I70R, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, N94R, V95R, D97R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, E128R, F130R, K131A, Q134R, A135R, S139R, R140A, R142A, H144R, K145A, S146R, V149R, D151R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, S175R, T177R, R180A, S181R, T183R, K185A, D186R, E187R

Ab	Các đột biến không có hiệu lực
Ab11	K1A, F2R, S3R, K4A, Q5R, S6R, L9R, N11R, E12R, A13R, I15R, V16R, R17A, R20A, K23A, S25R, Y26R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, S33R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, V47R, A49R, G51R, Q52R, L53R, K55A, L57R, E60R, V61R, A62R, S64R, G65R, I66R, Y67R, T68R, I70R, R72A, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, D92R, N94R, V95R, D97R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, V104R, S107R, E108R, K109A, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, T124R, E128R, F130R, K131A, Q134R, A135R, G138R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, S146R, F147R, V149R, D151R, N152R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, A172R, N173R, Y174R, V176R, R180A, S181R, T183R, D186R, E187R
Ab10	K1A, F2R, S3R, S6R, L9R, N11R, E12R, A13R, V16R, R17A, R20A, K23A, S25R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, S33R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, R44A, N45R, V47R, G51R, Q52R, L53R, K55A, L57R, E60R, V61R, A62R, S64R, G65R, I66R, Y67R, T68R, I70R, R72A, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, G80R, Y81R, N83R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, D92R, N94R, V95R, D97R, Y98R, Y101R, S102R, T103R, V104R, S107R, E108R, Y114R, T117R, D119R, L120R, Y121R, N122R, W123R, E128R, F130R, K131A, Q134R, A135R, G138R, S139R, R140A, R142A, A143R, H144R, S146R, F147R, V149R, D151R, N152R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, A172R, N173R, Y174R, V176R, R180A, T183R, D186R, E187R
Ab29	K1A, F2R, S3R, K4A, Q5R, S6R, W7R, L9R, E10R, E12R, A13R, L14R, I15R, V16R, R17A, R20A, Q21R, K23A, S25R, Y26R, V28R, D29R, Y31R, Y32R, S33R, Q34R, T35R, N36R, S38R, T41R, Q42R, E43R, R44A, N45R, A49R, G51R, Q52R, L53R, K55A, L57R, E60R, V61R, A62R, S64R, G65R, I66R, T68R, I70R, R72A, S73R, T75R, F76R, N77R, R78A, T79R, G80R, Y81R, T85R, Y87R, K88A, K89A, Q90R, S91R, D92R, N94R, V95R, D97R, Y98R, M100R, Y101R, S102R, T103R, S107R, E108R, K109A, N110R, Y114R, T117R, D119R, Y121R, N122R, W123R, T124R, E128R, F130R, K131A, Q134R, A135R, R140A, R142A, A143R, H144R, K145A, V149R, D151R, N152R, M154R, T155R, E156R, A158R, D160R, T162R, K164A, I166R, H167R, N168R, N170R, N173R, Y174R, S175R, V176R, T177R, R180A, S181R, T183R, V184R, K185A, D186R, E187R

Ví dụ 12: Phân tích Trao đổi hydro/đoteri (HDX)

Trong Ví dụ này, Ab2 được liên kết với ST2 và ảnh hưởng của sự liên kết đến HDX được xác định.

Protein ST2 dạng có thể hòa tan (các miền 1-3 chứa các axit amin 19-322 thuộc SEQ ID NO:1) có cả hai đuôi FLAG và đuôi His trên đầu C được biểu hiện nhất thời

trong các tế bào 293-6E ở động vật có vú và được tinh chế bằng IMAC (phương pháp sắc ký ái lực cố định ion kim loại) và được tinh chế thêm bằng phương pháp SEC điều chế (sắc ký rây phân tử). Sau đó, protein được cô đặc đến nồng độ 3,5 mg/mL sử dụng phương pháp siêu lọc. ST2 kháng thể Ab2 được biểu hiện trong các tế bào CHO-CS9 đã qua biến đổi và được tinh chế bằng phương pháp sắc ký ái lực protein A tiếp theo là phương pháp SEC điều chế. SEC phân tích được sử dụng để xác định rằng tỷ lệ mol 0,75:1,00 của kháng thể:kháng nguyên là tối ưu để đảm bảo rằng protein ST2 được liên kết hoàn toàn với kháng thể. Cả protein ST2 tự do và hợp phức kháng nguyên-kháng thể được bảo quản trong dung dịch đệm PBS, độ pH 7,2.

Thí nghiệm HDX được thực hiện trên hệ thống HDX tự động (Zhang, Zhang et al. 2012). Tóm lại, quá trình trao đổi H/D bắt đầu bằng bước pha loãng 5 μ L của hoặc dung dịch protein ST2 tự do (3,5 mg/mL) hoặc hợp phức ST2-kháng thể (với nồng độ jST2 là 3,5 mg/mL, tỷ lệ kháng nguyên:kháng thể là 1:0,75) vào 25 μ L đệm D₂O trong PBS 100mM, độ pH 7,2, mà được điều chế bằng cách hòa tan viên PBS trong nước D₂O, ở 25°C. Cho phép ủ phản ứng trao đổi trong khoảng thời gian ghi nhãn khác nhau (30 giây, 2, 8, 30 phút, và 2,8 giờ) cho mỗi thí nghiệm HDX, và dập tắt phản ứng ghi nhãn bằng cách trộn 20 μ L dung dịch ghi nhãn với 80 μ L dung dịch đệm dập tắt/biến tính/khử (urê 7,25M và tris (2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) 625mM, glyxin 0,45M, độ pH 2,7) ở 1°C.

Chuyển phân ước 40 μ L của dung dịch dập tắt vào 120 μ L dung dịch pepsin lộn 0,4 mg/mL (Sigma, St. Louis, MO). Dung dịch thủy phân ngay lập tức được tiêm vào vòng mẫu ở 1°C và để yên 6 phút để thủy phân hoàn toàn. Ngoài ra, dịch thủy phân được tách bởi các cột C18 (3 cột liên tiếp, BEH C18,2, 1mmx5mm, Waters Corp., Milford, MA). Quá trình tách HPLC được thực hiện ở 1°C với gradien ACN 5 phút là 1-40%. Chất rửa giải LC được phân tích bằng khối phổ kế Orbitrap Elite (Thermo Scientific, San Jose, CA) trong thử nghiệm LC-MS/MS phụ thuộc dữ liệu.

Quá trình thủy phân ghi nhãn đơteri, dập tắt, phân giải protein và tiêm được thực hiện trên hệ thống LEAP HD-X PAL được kiểm soát bởi thiết bị LEAP Shells (LEAP Technologies, Carrboro, NC).

Các thí nghiệm được lặp lại ba lần và trong mỗi thí nghiệm, mỗi thời điểm được lặp lại hai lần. Hỗn hợp peptit tiêu chuẩn được thêm vào các mẫu để theo dõi và hiệu

chỉnh độ biến thiên trao đổi ngược. Hỗn hợp chứa ba peptit này: bradykinin, angiotensin I, và leuxin enkephalin. Tetrapeptit PPPI được thiết kế đặc hiệu (được tổng hợp bởi AnaSpec, Fremont, CA) được sử dụng làm nội chuẩn thứ hai để làm giảm thiểu độ biến thiên của từng bước xử lý. Dịch thủy phân chứa protein ST2 mà không có trao đổi H/D cũng được phân tích với vai trò là mẫu đối chứng.

Các tệp dữ liệu thu được được xử lý bằng chương trình MassAnalyzer (Zhang, Zhang et al. 2012). Phần mềm này nhận diện các peptit từ dịch thủy phân kháng nguyên, tính tốc độ trao đổi của từng peptit, hiệu chỉnh cho các thông tin trao đổi ngược thu được từ các nội chuẩn, và cố định dữ liệu vào một mô hình mang lại các yếu tố bảo vệ đối với từng gốc.

Việc so sánh các mẫu trao đổi giữa protein ST2 tự do và protein ST2 liên kết với kháng thể đã bộc lộ hai vùng quan tâm và có thể là epitop tiềm năng. Hai vùng trong trình tự của ST2 được tinh chế thành IVRCPRQGKPSY (các axit amin 33-44 thuộc SEQ ID NO:1 tương ứng với các axit amin 15-26 của ST2 thành thực) và IVRSPTF (các axit amin 88-94 thuộc SEQ ID NO:1 tương ứng với các axit amin 70-76 của ST2 thành thực) cạnh nhiều peptit xếp chồng lên nhau. Các vùng này được bảo vệ ít hơn khi ST2 là ở trạng thái tự do, trong khi tốc độ trao đổi giảm đáng kể trong lúc liên kết ST2 và kháng thể. Ngoài ra, dựa trên mô hình cấu trúc tương đồng của ST2 được thể hiện trong Fig. 6, sự mở rộng của hai trình tự này chiếm các vị trí không gian tương tự trên bề mặt ngoài của protein. Các kết quả này dẫn đến kết luận rằng hai peptit được tham gia vào sự liên kết giữa Ab2 và protein ST2.

Ví dụ 13: Phương pháp ghi hình tinh thể bằng tia X

Trong ví dụ này, cấu trúc tinh thể của hợp phức gồm đoạn sc-dsFv của Ab2 và ST2 mang lại các gốc axit amin đặc hiệu trong bề mặt tương tác.

Ab2 sc-dsFv được biểu hiện trong các tế bào BL21 (DE3) Star. Tóm lại, Ab2 sc-dsFv chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng được nối với vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bằng một mối liên kết (G₄S)₃. Để làm ổn định hơn nữa cho phân tử, liên kết disulfua được biến đổi thành phân tử bằng cách làm đột biến thành xystein vị trí 44 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nặng và vị trí 101 thuộc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Protein được biểu hiện dưới dạng thể vùi. Thể vùi được hòa tan và gấp nếp lại lần nữa. Protein được tinh

chế thêm trên cột rây phân tử (SEC) và cột MonoQ trao đổi ion, và sau đó được chà xát trên SEC.

ST2 được biểu hiện trong các tế bào 293S. Protein được tinh chế bằng cột ái lực Ni và khử glycosyl hóa bằng EndoH. Protein được tinh chế thêm trên SEC.

Hợp phức gồm Ab2 sc-dsFv và ST2 được tạo thành bằng cách trộn Ab2 sc-dsFv và lượng dư ST2. Tinh chế hợp phức này trên SEC và cô đặc đến nồng độ 12 mg/ml để kết tinh. Hợp phức protein được kết tinh trong PEG400 32-36% và Hepes 0,1M, độ pH 7,5-8,5, ở 16°C sử dụng phương pháp khuếch tán hơi lỏng giọt.

Bộ dữ liệu về độ phân giải 1,9 Å được thu gom lại tại máy Advanced Light Source, Lawrence Berkeley National Lab (Berkeley, CA). Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm MOSFLM (Leslie, 1992) và được so với nhau bằng SCALA trong bộ chương trình CCP4 (Collaborative Computational Project, No 4. (1994)). Giải cấu trúc bằng phương pháp thay thế phân tử với chương trình PHASER (McCoy et al., 2007) sử dụng miền D1D2 thuộc cấu trúc đã được công bố là IL-1RII (mã pdb: 3O4O) và miền biến đổi thuộc cấu trúc Fab của Ab2 như các mô hình tìm kiếm. Việc lọc cấu trúc lặp lại và xây dựng mô hình được thực hiện với chương trình REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) và COOT (Emsley và Cowtan, 2004).

Thực hiện phân tích bề mặt phân chia với chương trình PISA, AREAMOL và NCONTACT trong gói CCP4. Các Fig. được xây dựng bằng chương trình Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System. Schrödinger).

Cấu trúc tinh thể của phức hợp ST2/Ab2 sc-dsFv được giải tới độ phân giải là 1,9 Å. Có hai cặp phức hợp độc lập ST2/Ab2 sc-dsFves trong đơn vị không đối xứng (FIG. 7). Mỗi hợp phức bao gồm một phân tử ST2 và một đoạn Ab2 sc-dsFv. Phân tử ST2 được tạo từ hai miền giống IgG (miền D1 và D2). Miền Ab2 Fv sử dụng tất cả sáu vòng CDR của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ để tương tác với phân tử ST2 (FIG. 8). Đối với ST2, hai vòng (vòng BC và vòng FG) và đầu N của ST2 gây ra sự tương tác trực tiếp với kháng thể. Tổng diện tích bề mặt tiếp cận dung môi được che giữa ST2 và Ab2 sc-dsFv là 1803 Å².

Bề mặt phân chia giữa ST2 và Ab2 được tích điện cao. ST2 có chứa một cụm gồm các gốc bazơ (Lys và Arg) trong miền D1. Mảnh bề mặt tích điện dương này bù cho

mảnh bề mặt tích điện âm trên Ab2 được tạo thành bởi các cụm gồm các gốc axit (Asp và Glu) trong các vùng CDR (FIG. 9).

Hai phương pháp khác nhau được sử dụng để xác định các gốc ở bề mặt phân chia. Theo phương pháp thứ nhất, các gốc ở bề mặt phân chia được xác định sử dụng độ chênh lệch tiếp xúc dung môi. Diện tích bề mặt tiếp cận dung môi của mỗi gốc trong ST2 (hoặc Ab2 sc-dsFv) trong hợp phức được tính toán và so sánh với diện tích bề mặt tiếp cận dung môi của các gốc tương ứng trong ST2 (hoặc Ab2 sc-dsFv) tách ra từ hợp phức. Tất cả các axit amin có độ chênh lệch lớn hơn 10% được liệt kê trong Bảng 15 và Bảng 16 đối với ST2 và Ab2, theo tương ứng. Độ chênh lệch tiếp xúc bề mặt của Arg72 và Tyr81 của ST2 là nhỏ hơn 10%. Tuy nhiên, việc xem xét kỹ cấu trúc phức đã bộc lộ rằng cả hai gốc tạo thành các liên kết hydro do nước gây ra với các gốc trên chuỗi nặng của Ab2 và do đó chúng được bao gồm trong danh sách này.

Bảng 15. Các gốc epitop như được xác định bởi độ chênh lệch tiếp xúc dung môi: ST2. Số gốc tương ứng với vị trí của axit amin trong ST2 thành thực, tức là, axit amin 1 tương ứng với axit amin 19 thuộc SEQ ID NO:1.

Gốc	Số gốc	ASA trong hợp phức	ASA trong apo	Tỷ lệ	Tỷ lệ chênh lệch (%)
LYS	1	68,5	196,9	0,348	65,2
PHE	2	48,4	106,2	0,456	54,4
PRO	19	7,9	10,8	0,731	26,9
ARG	20	0	79,6	0,000	100,0
GLN	21	81,7	98,1	0,833	16,7
GLY	22	17,8	59,3	0,300	70,0
LYS	23	51,5	130,6	0,394	60,6
TYR	26	32,4	56,6	0,572	42,8
ILE	70	16,6	30,9	0,537	46,3
VAL	71	1,7	5,3	0,321	67,9
ARG	72	52,2	56,9	0,917	8,3
SER	73	18	22,2	0,811	18,9
PRO	74	70,9	106,8	0,664	33,6
THR	75	3,8	84,6	0,045	95,5
PHE	76	0	134,3	0,000	100,0
ASN	77	2,8	47,6	0,059	94,1

ARG	78	1, 1	83, 6	0,013	98,7
THR	79	7	37	0,189	81,1
TYR	81	78,3	80,8	0,969	3,1
ASN77-NAG	502	148,2	249	0,595	40,5

Bảng 16. Các gốc paratop như được xác định bằng các độ chênh lệch tiếp xúc dung môi: Ab2

Gốc HC	Số gốc	ASA trong hợp phức	ASA trong apo	Tỷ lệ	Tỷ lệ chênh lệch (%)
TRP	33	1,9	32,2	0,059	94,1
ILE	50	0	8,3	0,000	100,0
ASP	57	52,8	59,6	0,886	11,4
ARG	59	60,4	89,5	0,675	32,5
HIS	99	2	6,6	0,303	69,7
GLY	100	3,6	5,5	0,655	34,5
THR	101	27,5	35,9	0,766	23,4
SER	102	48,8	97,6	0,500	50,0
SER	103	45,3	111,8	0,405	59,5
ASP	104	23,1	93	0,248	75,2
TYR	105	1,9	75,4	0,025	97,5
TYR	106	36,8	64,6	0,570	43,0
Gốc LC	Số gốc	ASA trong hợp phức	ASA trong apo	Tỷ lệ	Tỷ lệ chênh lệch (%)
ASP	28	85,1	105,2	0,809	19,1
SER	30	11,9	50,9	0,234	76,6
ASN	31	12,5	47,1	0,265	73,5
TYR	32	1,1	109,9	0,010	99,0
TYR	49	8,4	58,1	0,145	85,5
ASP	50	8,1	51,5	0,157	84,3
ASN	53	20,2	59,5	0,339	66,1
GLU	55	27,5	38,4	0,716	28,4
THR	56	116,9	127,4	0,918	8,2
ASP	91	2	27,4	0,073	92,7

ASP	92	2,5	54,1	0,046	95,4
ASN	93	50,5	69,5	0,727	27,3
PHE	94	54,9	110,9	0,495	50,5
LEU	96	2,9	7,8	0,372	62,8

Theo phương pháp thứ hai, các gốc ở bề mặt phân chia được chọn có độ tương đồng ít nhất một nguyên tử nằm trong khoảng cách được xác định trước với protein đối tác của nó. Hai vỏ được xác định dựa trên khoảng cách cắt bỏ khác nhau.

Vỏ lõi bao gồm tất cả các gốc có khoảng cách lên đến 5,0 Å.

Vỏ biên bao gồm tất cả các gốc có khoảng cách dài hơn 5,0 Å nhưng ngắn hơn 8,0 Å.

Danh sách đầy đủ các gốc axit amin trong mỗi vỏ đối với ST2, chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của Ab2 được thể hiện trong các Bảng 17, 18 và 19, lần lượt tương ứng. Đối với các gốc tạo liên kết hydro hoặc các cầu muối với protein đối tác của nó, kiểu tương tác đặc hiệu được biểu thị trong ngoặc đơn sau gốc (HB với liên kết hydro và SB với cầu muối).

Bảng 17. Các gốc epitop được xác định bằng khoảng cách được cắt bỏ: ST2. Số gốc tương ứng với vị trí của axit amin trong ST2 thành thực, tức là, axit amin 1 tương ứng với axit amin 19 thuộc SEQ ID NO:1.

Lõi (0- 5 Å)	Biên (5 -8 Å)
1 (LYS) (HB/SB)	3 (SER)
2 (PHE)	4 (LYS)
19 (PRO)	18 (CYS)
20 (ARG) (HB/SB)	24 (PRO)
21 (GLN)	27 (THR)
22 (GLY)	28 (VAL)
23 (LYS) (HB/SB)	31 (TYR)
26 (TYR) (HB)	68 (THR)
70 (ILE)	69 (CYS)
71 (VAL)	80 (GLY)
72 (ARG)	81 (TYR)
73 (SER)	
74 (PRO)	
75 (THR) (HB)	

76 (PHE)	
77 (ASN) (HB)	
78 (ARG) (HB/SB)	
79 (THR) (HB)	
502 (NAG)-77 (ASN)	

Bảng 18. Các gốc paratop được xác định bằng khoảng cách được cắt bỏ: chuỗi nặng của Ab2.

Lõi (0 - 5 Å)	Biên (5 - 8 Å)
33 (TRP)	31 (ASN)
50 (ILE)	32 (TYR)
57 (ASP)	34 (ILE)
59 (ARG)	47 (TRP)
99 (HIS)	52 (TYR)
100 (GLY)	55 (ASN)
101 (THR)	58 (THR)
102 (SER) (HB)	98 (ARG)
103 (SER) (HB)	107 (GLY)
104 (ASP) (HB/SB)	108 (LEU)
105 (TYR) (HB)	109 (ASP)
106 (TYR)	

Bảng 19. Các gốc paratop được xác định bằng khoảng cách được cắt bỏ: chuỗi nhẹ của Ab2.

Lõi (0 - 5 Å)	Biên (5 - 8 Å)
28 (ASP) (HB)	2 (ILE)
29 (ILE)	27 (GLN)
30 (SER)	33 (LEU)
31 (ASN) (HB)	34 (ASN)
32 (TYR)	46 (LEU)
49 (TYR)	52 (SER)
50 (ASP) (HB/SB)	54 (LEU)
53 (ASN)	67 (SER)
55 (GLU) (HB/SB)	68 (GLY)
56 (THR)	89 (GLN)
91 (ASP) (HB/SB)	90 (GLN)

92 (ASP) (HB/SB)	95 (PRO)
93 (ASN)	96 (LEU)
94 (PHE)	
96 (LEU)	

Các gốc epitop mà được xác định bởi các độ chênh lệch tiếp xúc dung môi phù hợp các gốc của các nhóm tương tác lỗi được xác định bằng khoảng cách được cắt bỏ. Bảng 20 liệt kê tất cả các cặp liên kết hydro và cầu muối nằm trong bề mặt phân chia.

Bảng 20 - Các cặp tương tác trong bề mặt phân chia

Chuỗi nhẹ của Ab2 – ST2				Chuỗi nặng của Ab2 – ST2			
Các liên kết hydro				Các liên kết hydro			
##	Cấu trúc 1	Khoảng cách	Cấu trúc 2	##	Cấu trúc 1	Khoảng cách	Cấu trúc 2
1	L:ASN 31 [ND2]	3,4	A:ARG 20 [O]	1	H:TYR 105 [N]	3,3	A:ASN 77 [O]
2	L:GLU 55 [OE1]	2,7	A:LYS 1 [NZ]	2	H:SER 102 [O]	2,6	A:ASN 77 [ND2]
3	L:ASP 50 [OD2]	2,8	A:ARG 20 [NE]	3	H:SER 103 [O]	2,7	A:THR 79 [OG1]
4	L:ASP 50 [OD1]	3,0	A:ARG 20 [NH2]	4	H:ASP 104 [OD1]	2,7	A:LYS 1 [N]
5	L:ASP 28 [O]	2,9	A:LYS 23 [NZ]	5	H:ASP 104 [OD2]	2,8	A:THR 79 [N]
6	L:ASP 92 [OD1]	2,9	A:LYS 23 [NZ]	6	H:ASP 104 [OD2]	2,9	A:ARG 20 [NH1]
7	L:ASP 92 [OD1]	3,3	A:TYR 26 [OH]	7	H:TYR 105 [O]	2,8	A:ARG 20 [NH2]
8	L:ASP 91 [O]	2,7	A:THR 75 [OG1]	các cầu muối			
9	L:ASP 91 [O]	3,0	A:ARG 78 [NH2]	##	Cấu trúc 1	Khoảng cách	Cấu trúc 2
10	L:ASP 91 [OD2]	3,0	A:ARG 78 [NH2]		H:ASP 104 [OD1]	2,7	A:LYS 1 [N]
các cầu muối					H:ASP 104 [OD2]	3,2	A:LYS 1 [N]
##	Cấu trúc 1	Khoảng cách	Cấu trúc 2		H:ASP 104 [OD2]	2,9	A:ARG 20 [NH1]
1	L:GLU 55 [OE1]	2,7	A:LYS 1 [NZ]				
2	L:GLU 55 [OE2]	3,6	A:LYS 1 [NZ]				
3	L:ASP 50 [OD1]	3,9	A:ARG 20 [NE]				
4	L:ASP 50 [OD2]	2,8	A:ARG 20 [NE]				
5	L:ASP 50 [OD1]	3,0	A:ARG 20 [NH2]				
6	L:ASP 50 [OD2]	3,4	A:ARG 20 [NH2]				
7	L:ASP 92 [OD2]	3,4	A:LYS 23 [NZ]				
8	L:ASP 92 [OD1]	2,9	A:LYS 23 [NZ]				
9	L:ASP 91 [OD2]	3,0	A:ARG 78 [NH2]				

Các vùng epitop của ST2 thu được từ phép phân tích HDX-MS trong Ví dụ 12 được xác nhận nhờ dữ liệu tính thể học. Hai epitop (15-26 và 70-76) từ HDX được xác

định là các epitop trong dữ liệu tinh thể học có độ phân giải cao. Cụ thể là, Arg20, Gly22, Lys23 và Tyr26, cũng như Thr75 được xác định là gần với kháng thể có khoảng cách nhỏ hơn 3, 4 Å. Các gốc khác mà được xác định là có khoảng cách với kháng thể nằm trong khoảng 3, 4 đến 5 Å (Pro19, Gln21, Ile70, Val71, Arg72, Ser73 Pro74 và Phe76) cũng được bao gồm trong các epitop HDX.

Nhìn chung, các kết quả đã chứng minh rằng các vùng epitop của ST2 thu được từ cả phương pháp HDX-MS và phương pháp tinh thể học là phù hợp. Vòng BC và vòng FG trong Miền 1 (Xem dữ liệu tinh thể học) là các vị trí tương tác chính.

Tài liệu tham khảo

Ali, M., G. Zhang, et al. (2009). "Investigations into the role of ST2 in acute asthma in children. " *Tissue Antigens* 73 (3): 206-212.

Beltran, C. J., L. E. Nunez, et al. (2010). "Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease. " *Inflamm Bowel Dis* 16 (7): 1097-1107.

Brunner, M., C. Krenn, et al. (2004). "Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma. " *Intensive Care Med* 30 (7): 1468-1473.

Buysschaert, I. D., V. Grulois, et al. (2010). "Genetic evidence for a role of IL33 in nasal polyposis. " *Allergy* 65 (5): 616-622.

Castano R, B. Y., Mfuno Endam L, Desrosiers M (2009). "Evidence of association of Interleukin 1 receptor-like 1 gene polymorphisms with surgery unresponsive Chronic Rhinosinusitis. " *American Journal of Rhinology* in press (NA): NA.

Gudbjartsson, D. F., U. S. Bjornsdottir, et al. (2009). "Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. " *Nat Genet* 41 (3): 342-347.

Hacker, S., C. Lambers, et al. (2009). "Increased soluble serum markers: caspase-cleaved cytokeratin-18, histones, and ST2 indicate apoptotic turnover and chronic immune response in COPD. " *J Clin Lab Anal* 23 (6): 372-379.

Kuroiwa, K., T. Arai, et al. (2001). "Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases. " *Biochem Biophys Res Commun* 284 (5): 1104-1108.

Manetti, M., L. Ibba-Manneschi, et al. (2009). "The IL-1-like cytokine IL-33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis. " *Ann Rheum Dis*.

Marvie, P., M. Lisbonne, et al. (2009). "Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. " *J Cell Mol Med*.

Matsuyama, Y., H. Okazaki, et al. (2010). "Increased levels of interleukin 33 in sera and synovial fluid from patients with active rheumatoid arthritis. " *J Rheumatol* 37 (1): 18-25.

Miyagaki, T., M. Sugaya, et al. (2011). "High Levels of Soluble ST2 and Low Levels of IL-33 in Sera of Patients with HIV Infection. " *J Invest Dermatol* 131 (3): 794-796.

Moffatt, M. F., I. G. Gut, et al. (2010). "A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. " *N Engl J Med* 363 (13): 1211-1221.

Mok, M. Y., F. P. Huang, et al. (2010). "Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus. " *Rheumatology (Oxford)* 49 (3): 520-527.

Neill, D. R., S. H. Wong, et al. (2010). "Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity." *Nature* 464 (7293): 1367-1370.

Oshikawa, K., K. Kuroiwa, et al. (2001). "Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. " *Am J Respir Crit Care Med* 164 (2): 277-281.

Oshikawa, K., K. Kuroiwa, et al. (2001). "Acute eosinophilic pneumonia with increased soluble ST2 in serum and bronchoalveolar lavage fluid. " *Respir Med* 95 (6): 532-533.

Palmer, G., D. Talabot-Ayer, et al. (2009). "Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. " *Arthritis Rheum* 60 (3): 738-749.

Pastorelli, L., R. R. Garg, et al. (2010). "Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. " *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (17): 8017-8022.

Plager, D. A., J. C. Kahl, et al. (2010). "Gene transcription changes in asthmatic chronic rhinosinusitis with nasal polyps and comparison to those in atopic dermatitis. " *PLoS ONE* 5 (7): e11450,

Prefontaine, D., S. Lajoie-Kadoch, et al. (2009). "Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. " *J Immunol* 183 (8): 5094-5103.

Prefontaine, D., J. Nadigel, et al. (2010). "Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. " *J Allergy Clin Immunol* 125 (3): 752-754.

Pushparaj, P. N., H. K. Tay, et al. (2009). "The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. " *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (24): 9773-9778.

Reijmerink, N. E., D. S. Postma, et al. (2008). "Association of IL1RL1, IL18R1, and IL18RAP gene cluster polymorphisms with asthma and atopy. " *J Allergy Clin Immunol* 122 (3): 651-654 e658.

Sakashita, M., T. Yoshimoto, et al. (2008). "Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. " *Clin Exp Allergy* 38 (12): 1875-1881.

Shah, R. V. và J. L. Januzzi, Jr. (2010). "ST2: a novel remodeling biomarker in acute và chronic heart failure. " *Curr Heart Fail Rep* 7 (1): 9-14.

Shimizu, M., A. Matsuda, et al. (2005). "Functional SNPs in the distal promoter of the ST2 gene are associated with atopic dermatitis. " *Hum Mol Genet* 14 (19): 2919-2927.

Sponheim, J., J. Pollheimer, et al. (2010). "Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is preferentially expressed in ulceration-associated myofibroblasts. " *Am J Pathol* 177 (6): 2804-2815.

Tajima, S., K. Oshikawa, et al. (2003). "The increase in serum soluble ST2 protein upon acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. " *Chest* 124 (4): 1206-1214.

Theoharides, T. C., B. Zhang, et al. (2010). "IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. " *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (9): 4448-4453.

Verri, W. A., Jr., A. T. Guerrero, et al. (2008). "IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. " *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (7): 2723-2728.

Wu, H., I. Romieu, et al. (2010). "Evaluation of candidate genes in a genome-wide association study of childhood asthma in Mexicans. " *J Allergy Clin Immunol* 125 (2): 321-327 e313.

Xu, D., H. R. Jiang, et al. (2008). "IL-33 exacerbates kháng nguyên-induced arthritis by activating mast cells. " *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (31): 10913-10918.

Yanaba, K., A. Yoshizaki, et al. (2011). "Serum IL-33 levels are raised in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. " *Clin Rheumatol*.

Zhang, Z.; Zhang, A. và Xiao, G.; "Improved Protein Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry Platform with Fully Automated Data Processing", *Analytical Chemistry*, 2012, 84 (11), 4942-9

Zhang Z, Smith DL. *Protein Sci.* 1993; 2: 522.

Engen JR, Smith DL. *Anal. Chem.* 2001; 73: 256A.

Codreanu SG, Ladner JE, Xiao G, Stourman NV, Hachey DL, Gilliland GL, Armstrong RN. *Biochemistry* 2002; 41: 15161.

Hamuro Y, Coales SJ, Morrow JA, Molnar KS, Tuske SJ, Southern MR, Griffin PR. *Protein Sci.* 2006; 15: 1.

Baerga-Ortiz A, Hughes CA, Mandell JG, Komives EA. *Protein Sci.* 2002; 11: 1300, Coales, SJ. et al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009; 23: 639–647.

CCP4 (Collaborative Computational Project, No 4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50, 760-763.

Emsley, P., và Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.

Leslie, A. G. W. (1992). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography* 26.

McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., và Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography* 40, 658-674.

Murshudov, G. N., Vagin, A. A., và Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53, 240-255.

The PyMOL Molecular Graphics System. Schrödinger, L.

Baerga-Ortiz, A., C. A. Hughes, J. G. Mandell và E. A. Komives (2002). "Epitope mapping of a monoclonal antibody against human thrombin by H/D-exchange mass spectrometry reveals selection of a diverse sequence in a highly conserved protein. " *Protein Sci.* 11 (6): 1300-1308.

Coales, S. J., S. J. Tuske, J. C. Tomasso và Y. Hamuro (2009). "Epitope mapping by amide hydrogen/deuterium exchange coupled with immobilization of antibody, on-line proteolysis, liquid chromatography and mass spectrometry. " *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (5): 639-647.

Codreanu, S. G., J. E. Ladner, G. Xiao, N. V. Stourman, D. L. Hachey, G. L. Gilliland và R. N. Armstrong (2002). "Local Protein Dynamics and Catalysis: Detection of Segmental Motion Associated with Rate-Limiting Product Release by a Glutathione Transferase. " *Biochemistry* 41 (51): 15161-15172.

Engen, J. R. và D. L. Smith (2001). "Investigating protein structure and dynamics by hydrogen exchange MS. " *Anal. Chem.* 73 (9): 256A-265A.

Hamuro, Y., S. J. Coales, J. A. Morrow, K. S. Molnar, S. J. Tuske, M. R. Southern và P. R. Griffin (2006). "Hydrogen/deuterium-exchange (H/D-Ex) of PPAR γ LBD in the presence of various modulators. " *Protein Sci.* 15 (8): 1883-1892.

Zhang, Z. và D. L. Smith (1993). "Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: A new tool for protein structure elucidation. " Protein Sci. 2 (4): 522-531.

Zhang, Z., A. Zhang và G. Xiao (2012). "Improved Protein Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry Platform with Fully Automated Data Processing. " Analytical Chemistry 84 (11): 4942-4949.

Chỉ dẫn đến các đơn có liên quan

Đơn sáng chế yêu cầu hưởng quyền ưu tiên từ đơn xin cấp bằng sáng chế tạm thời ở Hoa Kỳ số 61/792,619, nộp ngày 15/3/2013, và đơn xin cấp bằng sáng chế tạm thời ở Hoa Kỳ số 61/649,147, nộp ngày 18/5/012, toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Chỉ dẫn đến danh mục trình tự

Sáng chế sẽ được nộp kèm theo Danh sách trình tự dưới định dạng điện tử qua EFS-Web. Danh mục trình tự này được cung cấp dưới dạng tập tin có tiêu đề A1712WOPCT_ST25. txt, được tạo vào ngày 17/05/2013, có kích cỡ 189,804 base. Thông tin dưới dạng điện tử của danh sách trình tự toàn bộ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể ST2 được phân lập bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm LCDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:107; LCDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:118; và LCDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:129; và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm HCDR1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:41; HCDR2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:52; và HCDR3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:63.
2. Kháng thể ST2 được phân lập theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm:
 - a) miền biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 90% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:96;
 - b) miền biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 90% tính tương đồng với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30; hoặc
 - c) miền biến đổi chuỗi nhẹ của a) và miền biến đổi chuỗi nặng của b).
3. Kháng thể ST2 theo điểm 2, trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:96.
4. Kháng thể ST2 theo điểm 2 hoặc 3, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30.
5. Kháng thể ST2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4, trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:96.
6. Kháng thể ST2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5, trong đó miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30.
7. Kháng thể ST2 theo điểm 1, trong đó miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:96 và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30.
8. Kháng thể ST2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng thể này gắn kết đặc hiệu với ST2 ở người và có ái lực nhỏ hơn hoặc bằng 1×10^{-10} M.
9. Kháng thể ST2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó kháng thể này ức chế liên kết của ST2 ở người với IL-33 ở người.
10. Kháng thể ST2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó kháng thể này làm giảm tín hiệu ST2 do IL-33 ở người gây ra trong các tế bào biểu hiện ST2 ở người.

11. Kháng thể ST2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó kháng thể này ức chế liên kết ST2 ở khi đuôi dài với IL-33 ở khi đuôi dài.
12. Kháng thể ST2 theo điểm 11, trong đó kháng thể này làm giảm tín hiệu ST2 ở khi đuôi dài do IL-33 gây ra trong các tế bào biểu hiện ST2 ở khi đuôi dài.
13. Kháng thể ST2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó kháng thể này là kháng thể người.
14. Kháng thể ST2 theo điểm 13 bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó chuỗi nhẹ này bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID:85 và chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:19.
15. Axit nucleic được phân lập mã hóa miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14.
16. Axit nucleic được phân lập mã hóa miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14.
17. Axit nucleic được phân lập mã hóa miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14.
18. Axit nucleic được phân lập theo điểm 15, trong đó axit nucleic này mã hóa chuỗi nhẹ của kháng thể.
19. Axit nucleic được phân lập theo điểm 18, trong đó chuỗi nhẹ này được mã hóa bởi axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng ít nhất 80% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:74.
20. Axit nucleic được phân lập theo điểm 18, trong đó chuỗi nhẹ này được mã hóa bởi axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng ít nhất 90% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:74.
21. Axit nucleic được phân lập theo điểm 18, trong đó chuỗi nhẹ này được mã hóa bởi axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng ít nhất 95% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:74.
22. Axit nucleic được phân lập theo điểm 18, trong đó chuỗi nhẹ được mã hóa bởi axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:74.
23. Axit nucleic được phân lập theo điểm 16, trong đó axit nucleic này mã hóa chuỗi nặng của kháng thể.

24. Axit nucleic được phân lập theo điểm 23, trong đó chuỗi nặng được mã hóa bởi axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng ít nhất 80% s với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:8.
25. Axit nucleic được phân lập theo điểm 23, trong đó chuỗi nặng được mã hóa bởi axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng ít nhất 90% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:8.
26. Axit nucleic được phân lập theo điểm 23, trong đó chuỗi nặng được mã hóa bởi axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng ít nhất 95% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:8.
27. Axit nucleic được phân lập theo điểm 23, trong đó chuỗi nặng được mã hóa bởi axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:8.
28. Vector biểu hiện bao gồm axit nucleic được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 27.
29. Tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm axit nucleic được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 27 một cách có kiểm soát với trình tự khởi đầu.
30. Tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm vector biểu hiện theo điểm 28.
31. Tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm 29 hoặc 30, trong đó tế bào chủ này tiết ra kháng thể liên kết với ST2.
32. Tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 29 đến 31, trong đó tế bào này có nguồn gốc từ động vật có vú.
33. Tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm 32, trong đó tế bào này là dòng tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO).
34. Phương pháp sản xuất kháng thể ST2, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:
- nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 29 đến 33; và
 - phân lập kháng thể ST2 từ môi trường nuôi cấy này.

DANH SÁCH TRÌNH TỰ

<110> AMGEN INC.
 SMITH, Dirk E
 FOLTZ, Ian
 KING, Chadwick T
 LIM, Ai Ching
 CLARK, Rutilio
 COMEAU, Michael R
 KETCHEM, Randal R
 MIN, Xiaoshan
 SHI, Donghui
 WANG, Zhulun

<120> Kháng thể ST2 được phân lập, axit nucleic mã hóa kháng thể này và phương pháp sản xuất kháng thể ST2

<130> A-1712-WO-PCT

<140> -được ấn định-
 <141> 2013-05-17

<150> US 61/792,619
 <151> 2013-03-15

<150> US 61/649,147
 <151> 2012-05-18

<160> 175

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
 <211> 556
 <212> PRT
 <213> Người

<220>
 <221> misc_đặc trưng
 <222> (78)..(78)
 <223> Xaa ở vị trí 78 là Glu hoặc Ala

<400> 1

Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr
 1 5 10 15

Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu
 20 25 30

Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp
 35 40 45

Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg
 50 55 60

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

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

<210> 2
 <211> 570
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 2

Met Thr Leu Leu Trp Cys Val Val Ser Leu Tyr Phe Tyr Gly Ile Leu
 1 5 10 15

Gln Ser Asp Ala Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met
 20 25 30

Arg Gln Ile Gln Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro
 35 40 45

Leu Phe Glu His Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ala
 50 55 60

Gly Leu Thr Leu Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu
 65 70 75 80

Glu Pro Ile Asn Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys
 85 90 95

Asp Val Leu Trp Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr
 100 105 110

Thr Cys Met Leu Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro
 115 120 125

Leu Glu Val Val Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Pro Met Lys Leu
 130 135 140

Pro Val His Lys Leu Tyr Ile Glu Tyr Gly Ile Gln Arg Ile Thr Cys
 145 150 155 160

Pro Asn Val Asp Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Thr Ile Thr
 165 170 175

Trp Tyr Met Gly Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val Ile Pro
 180 185 190

Glu Gly Met Asn Leu Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ile Ser Asn Asn Gly
 195 200 205

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

450 455 460
 Leu Val Val Leu Ser Pro Asn Tyr Val Leu Gln Gly Thr Gln Ala Leu
 465 470 475 480
 Leu Glu Leu Lys Ala Gly Leu Glu Asn Met Ala Ser Arg Gly Asn Ile
 485 490 495
 Asn Val Ile Leu Val Gln Tyr Lys Ala Val Lys Glu Thr Lys Val Lys
 500 505 510
 Glu Leu Lys Arg Ala Lys Thr Val Leu Thr Val Ile Lys Trp Lys Gly
 515 520 525
 Glu Lys Ser Lys Tyr Pro Gln Gly Arg Phe Trp Lys Gln Leu Gln Val
 530 535 540
 Ala Met Pro Val Lys Lys Ser Pro Arg Arg Ser Ser Ser Asp Glu Gln
 545 550 555 560
 Gly Leu Ser Tyr Ser Ser Leu Lys Asn Val
 565 570
 <210> 3
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 3
 Met Lys Pro Lys Met Lys Tyr Ser Thr Asn Lys Ile Ser Thr Ala Lys
 1 5 10 15
 Trp Lys Asn Thr Ala Ser Lys Ala Leu Cys Phe Lys Leu Gly Lys Ser
 20 25 30
 Gln Gln Lys Ala Lys Glu Val Cys Pro Met Tyr Phe Met Lys Leu Arg
 35 40 45
 Ser Gly Leu Met Ile Lys Lys Glu Ala Cys Tyr Phe Arg Arg Glu Thr
 50 55 60
 Thr Lys Arg Pro Ser Leu Lys Thr Gly Arg Lys His Lys Arg His Leu
 65 70 75 80
 Val Leu Ala Ala Cys Gln Gln Gln Ser Thr Val Glu Cys Phe Ala Phe
 85 90 95

Gly Ile Ser Gly Val Gln Lys Tyr Thr Arg Ala Leu His Asp Ser Ser
100 105 110

Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Thr
115 120 125

Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr Glu
130 135 140

Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val Leu
145 150 155 160

Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly Asp Gly
165 170 175

Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp Phe
180 185 190

Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys Cys
195 200 205

Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Met His
210 215 220

Ser Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe Ile
225 230 235 240

Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser Ser Glu
245 250 255

Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr
260 265 270

<210> 4
<211> 556
<212> PRT
<213> Khi đuôi dài

<400> 4

Met Gly Leu Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Val Tyr Ser Thr
1 5 10 15

Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu
20 25 30

Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Ser Ser Tyr Ile Val Asp Trp

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

Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Arg Tyr Asp Cys Leu
 290 295 300

Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Ile Arg Leu Ser Arg
 305 310 315 320

Lys Asn Pro Ile Asp His Gln Ser Thr Tyr Cys Ile Ile Ala Val Cys
 325 330 335

Ser Val Leu Leu Met Leu Ile Asn Ile Leu Val Ile Ile Leu Lys Thr
 340 345 350

Phe Trp Ile Glu Ala Thr Leu Leu Trp Arg Asp Ile Ala Lys Pro Tyr
 355 360 365

Lys Thr Arg Asn Asp Gly Lys Leu Tyr Asp Ala Tyr Val Ile Tyr Pro
 370 375 380

Arg Asn Tyr Thr Ser Ser Ala Asp Gly Ala Ser Arg Val Glu Tyr Phe
 385 390 395 400

Val His Gln Ile Leu Pro Asp Val Leu Glu Asn Lys Cys Gly Tyr Thr
 405 410 415

Leu Cys Ile Tyr Gly Arg Asp Met Leu Pro Gly Glu Asp Val Val Thr
 420 425 430

Ala Val Glu Thr Asn Ile Arg Lys Ser Arg Arg His Ile Phe Ile Leu
 435 440 445

Thr Pro Gln Ile Thr His Ser Glu Glu Phe Ala Tyr Glu Gln Glu Val
 450 455 460

Ala Leu His Ser Ala Leu Ile Gln Asn Asp Ser Lys Val Ile Leu Ile
 465 470 475 480

Glu Met Glu Ala Leu Ser Glu Leu Asp Met Leu Gln Ala Glu Ala Leu
 485 490 495

Gln Asp Ser Leu Arg His Leu Met Glu Val Gln Gly Thr Ile Lys Trp
 500 505 510

Arg Glu Asp His Val Ala Asn Lys Arg Ser Leu Asn Ser Lys Phe Trp
 515 520 525

Lys His Val Arg Tyr Gln Met Pro Val Pro Ser Lys Met Pro Arg Lys
 530 535 540

Ala Ser Ser Leu Thr Ser Leu Ala Ala Gln Lys Gln
 545 550 555

<210> 5
 <211> 570
 <212> PRT
 <213> Khi đuôi dài

<400> 5

Met Thr Leu Leu Trp Cys Val Val Ser Leu Tyr Phe Tyr Gly Ile Leu
 1 5 10 15

Gln Ser Asp Ala Ser Glu Arg Cys Asp Asp Trp Gly Leu Asp Thr Met
 20 25 30

Arg Gln Ile Gln Val Phe Glu Asp Glu Pro Ala Arg Ile Lys Cys Pro
 35 40 45

Leu Phe Glu His Phe Leu Lys Phe Asn Tyr Ser Thr Ala His Ser Ala
 50 55 60

Gly Leu Thr Leu Ile Trp Tyr Trp Thr Arg Gln Asp Arg Asp Leu Glu
 65 70 75 80

Glu Pro Ile Asn Phe Arg Leu Pro Glu Asn Arg Ile Ser Lys Glu Lys
 85 90 95

Asp Val Leu Trp Phe Arg Pro Thr Leu Leu Asn Asp Thr Gly Asn Tyr
 100 105 110

Thr Cys Met Leu Arg Asn Thr Thr Tyr Cys Ser Lys Val Ala Phe Pro
 115 120 125

Leu Glu Val Val Gln Lys Asp Ser Cys Phe Asn Ser Pro Met Lys Leu
 130 135 140

Pro Val His Lys Leu Tyr Ile Glu Tyr Gly Ile Gln Arg Ile Thr Cys
 145 150 155 160

Pro Asn Val Asp Gly Tyr Phe Pro Ser Ser Val Lys Pro Thr Ile Thr
 165 170 175

Trp Tyr Met Gly Cys Tyr Lys Ile Gln Asn Phe Asn Asn Val Ile Pro

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

Phe Gly Tyr Lys Leu Cys Ile Phe Asp Arg Asp Ser Leu Pro Gly Gly
 435 440 445

Ile Val Thr Asp Glu Thr Leu Ser Phe Ile Gln Lys Ser Arg Arg Leu
 450 455 460

Leu Val Val Leu Ser Pro Asn Tyr Val Leu Gln Gly Thr Gln Ala Leu
 465 470 475 480

Leu Glu Leu Lys Ala Gly Leu Glu Asn Met Ala Ser Gln Gly Asn Ile
 485 490 495

Asn Val Ile Leu Val Gln Tyr Lys Ala Val Lys Glu Thr Lys Val Lys
 500 505 510

Glu Leu Lys Arg Ala Lys Thr Val Leu Thr Val Ile Lys Trp Lys Gly
 515 520 525

Glu Lys Ser Lys Tyr Pro Gln Gly Arg Phe Trp Lys Gln Leu Gln Val
 530 535 540

Ala Met Pro Val Lys Lys Ser Pro Arg Arg Ser Ser Ser Asp Glu Gln
 545 550 555 560

Gly Leu Ser Tyr Ser Ser Leu Lys Asn Val
 565 570

<210> 6
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Khi đuôi dài

<400> 6

Met Lys Pro Lys Met Lys Tyr Ser Thr Asn Lys Ile Ser Thr Ala Lys
 1 5 10 15

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

Gln Gln Lys Ala Lys Glu Val Cys His Val Tyr Phe Met Lys Leu Arg
 35 40 45

Ser Gly Leu Met Ile Lys Lys Glu Ala Cys Tyr Phe Arg Arg Glu Thr
 50 55 60

Thr Lys Arg Pro Ser Leu Lys Thr Gly Gly Lys His Lys Gly His Leu
65 70 75 80

Val Leu Ala Ala Cys Gln Gln Gln Ser Thr Val Glu Cys Phe Ala Phe
85 90 95

Gly Ile Ser Gly Val Pro Lys Tyr Thr Arg Ala Leu His Asp Ser Ser
100 105 110

Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Ser Leu Ala Ser Leu Ser Thr
115 120 125

Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr Glu
130 135 140

Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Lys Lys Lys Asp Lys Val Leu
145 150 155 160

Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Ser Glu Ser Gly Asp Gly
165 170 175

Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp Phe
180 185 190

Trp Leu Gln Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys Cys
195 200 205

Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Arg Ser
210 215 220

Phe Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe Ile
225 230 235 240

Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp His Ser Glu
245 250 255

Asn Leu Gly Ser Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Ile
260 265 270

<210> 7
<211> 1332
<212> ADN
<213> Người

<400> 7
cagggtccaac tggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg tttccggata caccctcact gaattatcca tacactgggt gcgacaggct 120

cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttggtcctg aagatgggtga aacaatctac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtac aacagaggat 300
 agcagtggcc tctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagctagc 360
 accaagggcc catcgggtctt cccctggcg cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
 tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccagctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agacagttga gcgcaaagt 660
 tgtgtcgagt gcccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt cttcctcttc 720
 ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggaccc ctgaggtcac gtgctgtggtg 780
 gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
 gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc 900
 agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960
 tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc 1020
 cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1080
 agcctgacct gcctggtcaa aggtttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acacctccca tgctggactc cgacggctcc 1200
 ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1260
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1320
 tctccgggta aa 1332

<210> 8
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Nguði

<400> 8
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggata cagctttacc aactactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtaactctga taccagattc 180
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcac caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacatggt 300
 acctcgtccg actactacgg tctggacgtc tggggccaag ggaccaggt caccgtctcc 360

tcagctagca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc	420
gagagcacag cggccctggg ctgcctgggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg	480
tcgtggaact caggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctacagtcc	540
tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct ccagcaactt cggcacccag	600
acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gacagttgag	660
cgcaaatgtt gtgtcgagtg cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc	720
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg	780
tgctgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac	840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc	900
cgtgtgggtca gcgtcctcac cgttgtgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag	960
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaa	1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag	1080
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag	1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctcccat gctggactcc	1200
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg	1260
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	1320
ctctccctgt ctccgggtaa a	1341

<210> 9
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Nguòì

<400> 9	
gaggtgcagc tgggtggagtgc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctacgaca tgcactggat ccgccaagct	120
ccaggaaaaa atctggagtg ggtctcagct attgatcttg ctggtgacac atactatcca	180
ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaagatg ccaagaactc cttgtatctt	240
caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag aggggggagat	300
ggctacaatt acgactacta cggtatagac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc	360
tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc	420
tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg	480
gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccagc tgtcctacag	540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc	600

cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt	660
gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca	720
gtcttcctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc	780
acgtgctgtg tggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg	840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg	900
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac	960
aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc	1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc	1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg	1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga ccacacctcc catgctggac	1200
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1260
gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacgcagaag	1320
agcctctccc tgtctccggg taaa	1344

<210> 10
 <211> 1329
 <212> ADN
 <213> Nguòì

<400> 10	
caggtccagc tgggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcctgcgagg tttccggatt catcctcact gaattatccg tgaactgggt gcgacaggct	120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctg aagatggtaa aacaatctac	180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccttg accgaggaca catctacaga cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aacatgggtg	300
gactttcact ttgacttctg gggccaggga accctgggtc cgtctcctc agctagcacc	360
aagggcccat cggctctccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg	420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca	480
ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtctc aggactctac	540
tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc	600
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt	660
gtcgagtgcc caccgtgccc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctcttcccc	720
ccaaaacca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtgggtggtg	780
gacgtgagcc acgaagacct cgagggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg	840

cataatgcc	agacaaagcc	acgggaggag	cagttcaaca	gcacgttccg	tgtggtcagc	900
gtcctcaccg	ttgtgcacca	ggactggctg	aacggcaagg	agtacaagtg	caaggtctcc	960
aacaaaggcc	tcccagcccc	catcgagaaa	accatctcca	aaaccaaagg	gcagccccga	1020
gaaccacagg	tgtacaccct	gccccatcc	cgggaggaga	tgaccaagaa	ccaggtcagc	1080
ctgacctgcc	tgggtcaaag	cttctacccc	agcgacatcg	ccgtggagtg	ggagagcaat	1140
gggcagccgg	agaacaacta	caagaccaca	cctcccatgc	tggactccga	cggctccttc	1200
ttcctctaca	gcaagctcac	cgtggacaag	agcaggtggc	agcaggggaa	cgtctttctca	1260
tgctccgtga	tgcatgaggc	tctgcacaac	cactacacgc	agaagagcct	ctccctgtct	1320
ccgggtaaa						1329

<210> 11
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Nguòì

<400> 11						
gaggtgcagt	tgggtggagtc	tgggggaggc	tgggtacagc	ctggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	agttatgaca	tgtactgggt	ccgccaagct	120
acagggaaag	gtctggagtg	ggtctcaggt	attgatactg	ttggggacac	atattatcca	180
gactccgtga	agggccgatt	caccatctcc	agagaaaatg	ccaagaactc	cgtgtatctt	240
caaatgaaca	ccctgagagc	cggggacacg	gctgtgtatt	actgtgtaag	aggcatctac	300
ggtgactttt	attattacgg	tttggacgtc	tggggccacg	ggaccacggt	caccgtctcc	360
tcagctagca	ccaagggccc	atcggctctc	cccctggcgc	cctgctccag	gagcacctcc	420
gagagcacag	cggccctggg	ctgcctggtc	aaggactact	tccccgaacc	ggtgacggtg	480
tcgtggaact	caggcgctct	gaccagcggc	gtgcacacct	tcccagctgt	cctacagtcc	540
tcaggactct	actccctcag	cagcgtgggtg	accgtgcctt	ccagcaactt	cggcaccacg	600
acctacacct	gcaacgtaga	tcacaagccc	agcaacacca	aggtggacaa	gacagttgag	660
cgcaaagtgt	gtgtcgagtg	cccaccgtgc	ccagcaccac	ctgtggcagg	accgtcagtc	720
ttcctcttcc	ccccaaaacc	caaggacacc	ctcatgatct	cccggacccc	tgaggtcacg	780
tgctgtgggtg	tggacgtgag	ccacgaagac	cccaggtcc	agttcaactg	gtacgtggac	840
ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	ccacgggagg	agcagttcaa	cagcacgttc	900
cgtgtgggtca	gcgtcctcac	cgttgtgcac	caggactggc	tgaacggcaa	ggagtacaag	960
tgcaaggtct	ccaacaaagg	cctcccagcc	cccatcgaga	aaaccatctc	caaaacccaa	1020
gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	cccgggagga	gatgaccaag	1080

aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag	1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctcccat gctggactcc	1200
gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg	1260
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	1320
ctctccctgt ctccgggtaa a	1341

<210> 12
 <211> 1344
 <212> ADN
 <213> Nguòì

<400> 12	
gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctacgaca tgcaactgggt ccgccaaact	120
acaggaaaag gtctggagtg ggtctcagct attgatcttg ctggtgacac atactatcca	180
ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaagatg ccaagaactc cttgtatctt	240
caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag agggggagat	300
ggctacaatt acgactacta cggtatagac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc	360
tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc tccccctgg cgccctgctc caggagcacc	420
tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg	480
gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc ggctgtcaca ccttcccagc tgtcctacag	540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc	600
cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaagggtga caagacagtt	660
gagcgcaaatt gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca	720
gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc	780
acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg	840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg	900
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac	960
aagtgcaagg tctccaacaa aggctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaaacc	1020
aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc	1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg	1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacacctcc catgctggac	1200
tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag	1320

agcctctccc tgtctccggg taaa

1344

<210> 13
<211> 1344
<212> ADN
<213> Nguòì

<400> 13
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctacgaca tgcactgggt ccgccaaact 120
acaggaaaag gtctggagtg ggtctcagct attgatcttg ctgggtgacac atactatcca 180
ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaagatg ccaagaactc cttgtatctt 240
caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag agggggagat 300
ggctacaatt acgactacta cggtatagac gtctggggcc aaggggaccac ggtcacgctc 360
tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc 420
tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccagc tgtcctacag 540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc 600
cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaagggtga caagacagtt 660
gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca 720
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg 900
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttggtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga ccacacctcc catgctggac 1200
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320
agcctctccc tgtctccggg taaa 1344

<210> 14
<211> 1341
<212> ADN
<213> Nguòì

<400> 14
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggct cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctacgaca tgtactgggt ccgccaagct 120
acaggaaaag gtctggagtg ggtctcagct attgatactg ttggtgacac atactatcca 180
ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaagaactc cttgtatctt 240
caaatgaaca gcctgagagt cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag aggcggtgac 300
tacgactact cttattacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tcagctagca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 420
gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
tcgtggaact caggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctacagtcc 540
tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct ccagcaactt cggcaccag 600
acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gacagttgag 660
cgcaaagtgt gtgtcgagtg cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc 720
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 780
tgctgtggtg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc 900
cgtgtggtca gcgtcctcac cgttgtgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaa 1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 1080
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctcccat gctggactcc 1200
gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
ctctccctgt ctccgggtaa a 1341

<210> 15
<211> 1326
<212> ADN
<213> Nguòì

<400> 15
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcaactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggatat gtggaagtca taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaattga acagcctgag agccgaagac acggctgtct attactgtgc gagagacaag 300
ggcgagtttg actactgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag 360
ggcccatcgg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 420
ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc 480
gctctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc aacttcggca cccagaccta cacctgcaac 600
gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc 660
gagtgccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttcct cttccccca 720
aaaccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 780
gtgagccacg aagaccccg ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 840
aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 900
ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac 960
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaa ccaaaggga gccccagaa 1020
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg gaggatga ccaagaacca ggtcagcctg 1080
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1140
cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcttcttc 1200
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1320
ggtaaa 1326

<210> 16
<211> 1326
<212> ADN
<213> Người

<400> 16
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtata ctggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgttgcac 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagataaa 300
gggtactttg actactgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag 360
ggcccatcgg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 420

ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc	480
gctctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	540
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc aacttcggca cccagaccta cacctgcaac	600
gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc	660
gagtgtccac cgtgtcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttcct cttcccccca	720
aaaccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac	780
gtgagccacg aagaccccg ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat	840
aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc	900
ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac	960
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaa ccaaagggca gccccagaa	1020
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg	1080
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg	1140
cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcttcttc	1200
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc	1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg	1320
ggtaaa	1326

<210> 17
 <211> 1326
 <212> ADN
 <213> Người

<400> 17	
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct	120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggatat gtggaagtca taaatactat	180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaattga acagcctgag agccgaagac acggctgtct attactgtgc gagagacaag	300
ggcgagtttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag	360
ggcccatcgg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc	420
ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc	480
gctctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	540
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc aacttcggca cccagaccta cacctgcaac	600
gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc	660

```

gagtgtccac cgtgtcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttcct cttcccccca 720
aaaccaagg acaccctcat gatctcccg gacctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 780
gtgagccacg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 840
aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 900
ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 960
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa 1020
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1080
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1140
cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctctttcttc 1200
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1320
ggtaaa 1326

```

```

<210> 18
<211> 444
<212> PRT
<213> Người

```

```

<400> 18

```

```

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 Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
20          25          30

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Thr Thr Glu Asp Ser Ser Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100          105          110

```

```

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

```

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 19
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 19

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

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

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

370	375	380
Gly 385	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser 400	390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg 415	405 410 415	
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu 430	420 425 430	
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 445	435 440 445	
<210> 20		
<211> 448		
<212> PRT		
<213> Người		
<400> 20		
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		
Asp Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asn Leu Glu Trp Val 35 40 45		
Ser Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys 50 55 60		
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu 65 70 75 80		
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala 85 90 95		
Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp 100 105 110		
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 115 120 125		
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr 130 135 140		

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

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

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

Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205

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

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 21

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 Glu Val Ser Gly Phe Ile Leu Thr Glu Leu
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Thr Trp Trp Asp Phe His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

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

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

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

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

Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro
 210 215 220

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

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 22
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 22

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp 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

Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Asp Thr Val Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Val Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val
 85 90 95

Arg Gly Ile Tyr Gly Asp Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 23

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Thr Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
 50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp
 100 105 110

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

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

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

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

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

Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

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

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

		420						425							430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
		435					440					445					
<210> 24 <211> 448 <212> PRT <213> Người <400> 24																	
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				
Asp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Thr	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
Ser	Ala	Ile	Asp	Leu	Ala	Gly	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Ser	Val	Lys		
	50					55					60						
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Glu	Asp	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu		
65					70					75					80		
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Gly	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala		
				85					90					95			
Arg	Gly	Gly	Asp	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Asp	Val	Trp		
			100					105					110				
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro		
		115					120					125					
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr		
		130				135					140						
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr		
145					150					155					160		
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro		
				165					170					175			
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr		
		180						185					190				

Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 195 200 205

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

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 25

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

Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Asp Thr Val Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
 50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Gly Asp Tyr Asp Tyr Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 26
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 26

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

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

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

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

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

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

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

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

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro

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

<210> 27
 <211> 442

<212> PRT
 <213> Người

<400> 27

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

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

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

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

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

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 28
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 28

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

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

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

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

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

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

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

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

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 29
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 29

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 Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
20 25 30

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

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

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

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

Thr Thr Glu Asp Ser Ser Gly Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 121
<212> PRT
<213> Người

<400> 30

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

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

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 31
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 31

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

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

Ser Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
 50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 32
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 32

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 Glu Val Ser Gly Phe Ile Leu Thr Glu Leu
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Thr Trp Trp Asp Phe His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 33
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 33

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp 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

Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Asp Thr Val Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Val Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val
 85 90 95

Arg Gly Ile Tyr Gly Asp Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly
 100 105 110

His Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 34
<211> 122
<212> PRT
<213> Người

<400> 34

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Thr Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 122
<212> PRT
<213> Người

<400> 35

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Thr Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Asp Leu Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 121
<212> PRT
<213> Người

<400> 36

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

Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Asp Thr Val Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gly Asp Tyr Asp Tyr Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 37

<211> 116
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 37

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 38
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 38

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 39
<211> 116
<212> PRT
<213> Người

<400> 39

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> Người

<400> 40

Glu Leu Ser Ile His
1 5

<210> 41
<211> 5
<212> PRT
<213> Người

<400> 41

Asn Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> Người

<400> 42

Thr Tyr Asp Met His
1 5

<210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> Người

<400> 43

Glu Leu Ser Val Asn
1 5

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> Người

<400> 44

Ser Tyr Asp Met Tyr
1 5

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> Người

<400> 45

Thr Tyr Asp Met His
1 5

<210> 46

<211> 5
<212> PRT
<213> Người

<400> 46

Thr Tyr Asp Met His
1 5

<210> 47
<211> 5
<212> PRT
<213> Người

<400> 47

Ser Tyr Asp Met Tyr
1 5

<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> Người

<400> 48

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 49
<211> 5
<212> PRT
<213> Người

<400> 49

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> Người

<400> 50

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> Người

<400> 51

Gly Phe Gly Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 52
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 52

Ile Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Arg Phe Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 53
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 53

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

<210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 54

Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Lys Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 55
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 55

Gly Ile Asp Thr Val Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 56

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 56

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

<210> 57
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 57

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

<210> 58
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 58

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

<210> 59
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 59

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

Gly

<210> 60
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 60

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

Gly

<210> 61
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 61

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

Gly

<210> 62
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 62

Glu Asp Ser Ser Gly Leu Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 63
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 63

His Gly Thr Ser Ser Asp Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10

<210> 64
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 64

Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val
 1 5 10

<210> 65
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 65

Trp Trp Asp Phe His Phe Asp Phe
 1 5

<210> 66

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 66

Gly Ile Tyr Gly Asp Phe Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10

<210> 67
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 67

Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val
 1 5 10

<210> 68
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 68

Gly Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ile Asp Val
 1 5 10

<210> 69
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 69

Gly Gly Asp Tyr Asp Tyr Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 70

Asp Lys Gly Glu Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 71
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 71

Asp Lys Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> Người

<400> 72

Asp Lys Gly Glu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 73
<211> 660
<212> ADN
<213> Người

<400> 73

gacctcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctccgggcga gagggccact	60
atcaactgca agtccagcca gagtctttta tacagctcca acaataagga ctacttagct	120
tggtaccagc agaagccggg acagcctcct aaactgctca tttactgggc atctaccggg	180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagatct cactctcacc	240
atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcaccaata ttataatact	300
ccgtggacgt tcggccaagg gaccaagggtg gaaatcaaac gtacgggtggc tgcaccatct	360
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc	420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgccctc	480
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc	540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc	600
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt	660

<210> 74
<211> 642
<212> ADN
<213> Người

<400> 74

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc aggcgagtca ggacattagt aactatttaa attggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctacgat gcatccaatt tggaaacagg ggtcccatca	180
aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactttca ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagatattg caacatatta ctgtcaacag gatgataatt tccctctcac tttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa acgtacgggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca	360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 75
<211> 654
<212> ADN
<213> Nguòì

<400> 75
gatattgtaa tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtgatg gataccacta tttggattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcggggc 180
tccgggggtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tggtgggggt tattactgca tgcaagctct acaaattctc 300
actttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 76
<211> 657
<212> ADN
<213> Nguòì

<400> 76
gattttgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
atctcctgta agtctagtca gagcctcctg catagtaatg gaaagaccta tttgtattgg 120
ttcctgcaga agccaggcca gcctccacaa ctctgatct atgaagtttc caaccgggtc 180
tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agccgggtgg aggctgagga tggtgggggt tattactgca tgcaaagtat acagcttcct 300
ctcactttcg gcggagggac caaggtggag atcaaacgta cgggtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
 gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 77
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> Nguòì

<400> 77
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg tatagtgatg gaaacaacta tttggattgg 120
 tacctgcaga agccagggca gtctccacac ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
 tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgacga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaactctc 300
 actttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
 agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 78
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> Nguòì

<400> 78
 gatattgtaa tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtgatg gatatacta tttggattgg 120
 tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
 tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaacatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaactctc 300
 actttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540

agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 79
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> Nguòì

<400> 79
 gatattgtaa tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca ggtctagtca ggcctcctg catagtgatg gatataccta tttggattgg 120
 tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcggggc 180
 tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaacatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaactctc 300
 actttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 80
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> Nguòì

<400> 80
 gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgta ggtctgggtca ggcctcctg catagtgatg gatacaacta tttggattgg 120
 tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atttgggttc taatcggggc 180
 tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaagctct acaaactatc 300
 accttcggcc aagggacacg actggagatt aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600

acccatcagg gacctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt

654

<210> 81
<211> 645
<212> ADN
<213> Nguòì

<400> 81
gaaattgtga tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagccact taggctggta tcagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca acagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag caaactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccgtg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cggccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 82
<211> 645
<212> ADN
<213> Nguòì

<400> 82
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagt agcagccact tagcctggta tcagcagaaa 120
cctggccaga ctcccagggt cctcatctat gctgcatcca gcagggccac cggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaggatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatggta gctcaccgtg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cggccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 83
 <211> 645
 <212> ADN
 <213> Nguòì

<400> 83
 gaaattgtga tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagccact taggctggta tcagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag caaactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccgtg gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600
 ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 84
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Nguòì

<400> 84

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

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

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

Pro Pro Lys 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 His Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Asn Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

30818

100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220
 <210> 85
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 85
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Asp Asn Phe Pro Leu
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 86
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 86

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

85

90

95

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 87
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 87

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

Ile Gln Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

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

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

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

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

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

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

<210> 88
<211> 218
<212> PRT
<213> Người

<400> 88

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro His Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

<210> 89
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Người
 <400> 89

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 90
<211> 218
<212> PRT
<213> Người

<400> 90

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50		55		60											
Asp 65	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp 75	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile 80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ala
			85						90					95	
Leu	Gln	Thr	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
			100					105					110		
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln
		115					120					125			
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
130						135					140				
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser
145					150					155					160
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
				165					170					175	
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
			180					185					190		
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
		195					200					205			
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
210						215									
<210>	91														
<211>	218														
<212>	PRT														
<213>	Người														
<400>	91														
Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Gly	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser
			20					25					30		
Asp	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
	35						40					45			

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Leu Gln Thr Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 92
<211> 215
<212> PRT
<213> Người

<400> 92

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

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

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

35

40

45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 93
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 93

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 94
<211> 215
<212> PRT
<213> Người

<400> 94

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20										25					30															
His	Leu	Gly	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu															
		35					40					45																		
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser															
	50					55					60																			
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Leu	Glu															
65					70					75					80															
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro															
				85					90					95																
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala															
			100					105						110																
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser															
		115					120					125																		
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu															
	130					135					140																			
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser															
145					150					155					160															
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu															
				165					170					175																
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val															
			180					185					190																	
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys															
		195					200					205																		
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys																								
	210					215																								
<210>	95																													
<211>	114																													
<212>	PRT																													
<213>	Người																													
<400>	95																													
Asp	Leu	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Pro	Gly															
1				5					10					15																

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

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

Pro Pro Lys 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 His Gln
85 90 95

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

Lys Arg

<210> 96
<211> 108
<212> PRT
<213> Người

<400> 96

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Asp Asn Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 97
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 97

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

<210> 98
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 98

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

Ile Gln Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 99
<211> 112
<212> PRT
<213> Người

<400> 99

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro His Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 100
<211> 112
<212> PRT
<213> Người

<400> 100

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 101
<211> 112
<212> PRT
<213> Người

<400> 101

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 102

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 102

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Gly Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asp Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

Leu Gln Thr Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 103
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 103

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

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

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

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

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

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

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

<210> 104
<211> 109
<212> PRT
<213> Người

<400> 104

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

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

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

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

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

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

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

<210> 105
<211> 109
<212> PRT
<213> Người

<400> 105

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

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

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

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

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

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

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

<210> 106
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 106

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asp Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 107
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 107

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 108
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 108

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 109
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 109

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

<210> 110
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 110

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asp Gly Asn Asn Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 111
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 111

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 112
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 112

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Tyr His Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 113
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 113

Arg Ser Gly Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 114
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 114

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser His Leu Gly
 1 5 10

<210> 115
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Người

<400> 115

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser His Leu Ala
 1 5 10

<210> 116
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 116

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser His Leu Gly
 1 5 10

<210> 117
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 117

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 118
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 118

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5

<210> 119
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 119

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 120
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 120

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser

1

5

<210> 121
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 121

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 122
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 122

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 123
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 123

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 124
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 124

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 125
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 125

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 126
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Người

<400> 126

Ala Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 127

<211> 7

<212> PRT

<213> Người

<400> 127

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> Người

<400> 128

His Gln Tyr Tyr Asn Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> Người

<400> 129

Gln Gln Asp Asp Asn Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 130

<211> 8

<212> PRT

<213> Người

<400> 130

Met Gln Ala Leu Gln Ile Leu Thr
1 5

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Người

<400> 131

Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 132
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 132

Met Gln Ala Leu Gln Thr Leu Thr
 1 5

<210> 133
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 133

Met Gln Ala Leu Gln Thr Leu Thr
 1 5

<210> 134
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 134

Met Gln Ala Leu Gln Thr Leu Thr
 1 5

<210> 135
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 135

Met Gln Ala Leu Gln Thr Ile Thr
 1 5

<210> 136
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 136

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 137
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 137

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> Người

<400> 138

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 139

<211> 1335

<212> ADN

<213> Người

<400> 139

cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
tcctgtacag cgtctggatt caccttcagt agccatggca tgcactgggt ccgccaggct	120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgacaatt atatggtttg atggaaataa taaatactat	180
gcagactccg tggaggggccg cttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt	240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtct attactgtgc gagagagggg	300
gcggaacagg ggttcacatga tctctggggc cgtggcaccc tggtcactgt ctcctcagct	360
agcaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc	420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga	540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac	600
acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaagggtg acaagacagt tgagcgcaaa	660
tgttggtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcctc	720
ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg	780
gtggtggacg tgagccacga agaccccag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg	840
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg	900
gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag	960
gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag	1020
ccccgagaac cacagggtga caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag	1080
gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctccgg gtaaa 1335

<210> 140
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Nguòì

<400> 140
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacaac ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt accttcgaca tgcactgggt ccgccaagct 120
 acaggaaaag gtctggagtg ggtctcaagt attgatactg aaggagacac atactattca 180
 ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaggaaactc cttgtatctt 240
 caaatgaaca gcctgagagc cggggacacg gctgtgtatt actgtacaag aggcgaggac 300
 tggagcgacg acgactacta ctacggtttg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
 gtctcctcag ctagcaccaa gggcccatcg gtcttcccc ttggcgccctg ctccaggagc 420
 acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 480
 acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta 540
 cagtccctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc 600
 acccagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca 660
 gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg 720
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 780
 gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 840
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 900
 acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 960
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
 accaaagggc agccccgaga accacagggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 1080
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1140
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg 1200
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1347

<210> 141
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Nguòì

<400> 141
 gaggtgcaac tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt accttcgaca tgcactgggt ccgccaagtt 120
 ccaggaaaag gtctggagtg gatctcaagt attgatactg aaggagacac atactatcca 180
 ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccaggaaactc cttgtatctt 240
 caaatgaaca gcctgagagc cgggggacacg gctgtgtatt actgtacaag aggcgaggac 300
 tggagcgacg acgactacta ctacggtttg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
 gtctcctcag ctagcaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcgccctg ctccaggagc 420
 acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 480
 acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta 540
 cagtctcag gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgccctccag caacttcggc 600
 acccagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca 660
 gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgccag caccacctgt ggcaggaccg 720
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctccc gaccctgag 780
 gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 840
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccac gggaggagca gttcaacagc 900
 acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 960
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
 accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg ggaggagatg 1080
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1140
 gtggagtggt agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccacacc tcccatgctg 1200
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1347

<210> 142
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Nguòì

<400> 142

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 143
<211> 449
<212> PRT
<213> Người

<400> 143

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 144

<211> 449

<212> PRT

<213> Người

<400> 144

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 Phe
 20 25 30

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

Ser Ser Ile Asp Thr Glu Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Arg Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 85 90 95

Arg Gly Glu Asp Trp Ser Asp Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 100 105 110

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

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

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

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

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

Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 145
<211> 119
<212> PRT
<213> Người

<400> 145

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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
20 25 30

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

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

Glu 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 Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Ala Glu Gln Gly Phe Ile Asp Leu Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 146
<211> 123
<212> PRT
<213> Người

<400> 146

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 Phe
20 25 30

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

Ser Ser Ile Asp Thr Glu Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Gly Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Arg Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Arg Gly Glu Asp Trp Ser Asp Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 100 105 110

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

<210> 147
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 147

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 Phe
 20 25 30

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

Ser Ser Ile Asp Thr Glu Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Arg Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 85 90 95

Arg Gly Glu Asp Trp Ser Asp Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 100 105 110

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

<210> 148
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 148

Ser His Gly Met His
 1 5

<210> 149
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Người

<400> 149

Thr Phe Asp Met His
1 5

<210> 150

<211> 5

<212> PRT

<213> Người

<400> 150

Thr Phe Asp Met His
1 5

<210> 151

<211> 17

<212> PRT

<213> Người

<400> 151

Ile Ile Trp Phe Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 152

<211> 16

<212> PRT

<213> Người

<400> 152

Ser Ile Asp Thr Glu Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Gly Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 153

<211> 16

<212> PRT

<213> Người

<400> 153

Ser Ile Asp Thr Glu Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 154

<211> 10

<212> PRT

<213> Người

<400> 154

Glu Gly Ala Glu Gln Gly Phe Ile Asp Leu
 1 5 10

<210> 155

<211> 15

<212> PRT

<213> Người

<400> 155

Gly Glu Asp Trp Ser Asp Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10 15

<210> 156

<211> 15

<212> PRT

<213> Người

<400> 156

Gly Glu Asp Trp Ser Asp Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10 15

<210> 157

<211> 642

<212> ADN

<213> Người

<400> 157

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc aggcgagtc ggacattagc aactatttaa attggtatca ccagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctacgat gcatccaatt tggaaacagg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactttca ccatcagcgg cctgcagcct 240
 gaagatattg caacatatta ctgtcaacag catgataatc tcccgtcac ttccggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa gcgaacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 158

<211> 654

<212> ADN

<213> Người

<400> 158

```

aatattgtga tgacctagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc      60
atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta tttatttttg      120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atggagtttc caaccggttc      180
tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc      240
agccgggtgg aggctgaaga tggtgggggt tattactgca tgcaaagttt acagctattc      300
actttcggcc ctgggaccaa agtggagatc aagcgaacgg tggtgcacc atctgtcttc      360
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg      420
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg      480
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc      540
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc      600
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt          654

```

<210> 159

<211> 657

<212> ADN

<213> Nguòì

<400> 159

```

aatattgtga tgacctagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc      60
atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta tttatttttg      120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atggagtttc caaccggttc      180
tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc      240
agccgggtgg aggctgaaga tggtgggggt tattcctgca tgcaaagttt acagctattc      300
actttcggcc ctgggaccaa agtggatatc aaacgacgta cggtggctgc accatctgtc      360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg      420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa      480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc      540
agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa      600
gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt          657

```

<210> 160

<211> 214

<212> PRT

<213> Nguòì

<400> 160

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

<210> 161
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 161

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 162

<211> 219

<212> PRT

<213> Người

<400> 162

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Leu Gln Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

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

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

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

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

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

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

<210> 163

<211> 108
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 163

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Asn Leu Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 164
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 164

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Asn Leu Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 165
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 165

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Phe Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

Leu Gln Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
 100 105 110

Arg

<210> 166
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 166

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 167
 <211> 16
 <212> PRT

<213> Người

<400> 167

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Phe
1				5					10					15	

<210> 168

<211> 16

<212> PRT

<213> Người

<400> 168

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Phe
1				5					10					15	

<210> 169

<211> 7

<212> PRT

<213> Người

<400> 169

Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Thr
1			5			

<210> 170

<211> 7

<212> PRT

<213> Người

<400> 170

Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
1			5			

<210> 171

<211> 7

<212> PRT

<213> Người

<400> 171

Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
1			5			

<210> 172

<211> 9

<212> PRT

<213> Người

<400> 172

Gln	Gln	His	Asp	Asn	Leu	Pro	Leu	Thr
1				5				

<210> 173
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 173

Met Gln Ser Leu Gln Leu Phe Thr
 1 5

<210> 174
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 174

Met Gln Ser Leu Gln Leu Phe Thr
 1 5

<210> 175
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 175

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 Glu 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

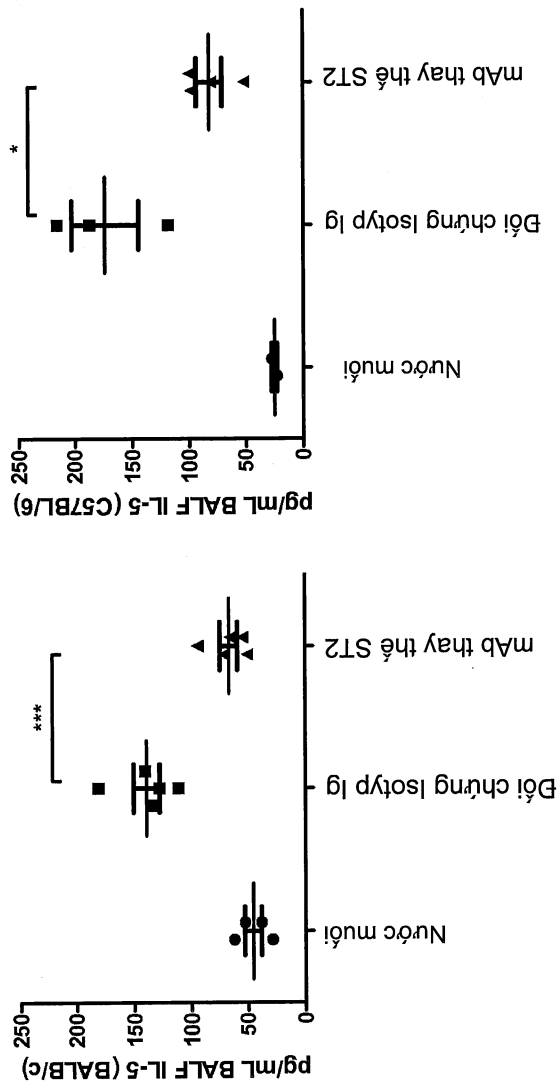
Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Leu Glu
 115 120 125

Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg Ala His
 130 135 140

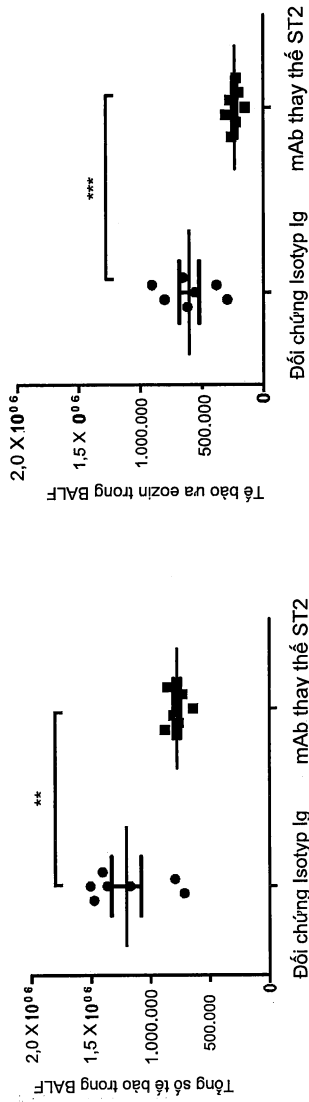
Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala Gly Asp
 145 150 155 160

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
 180 185

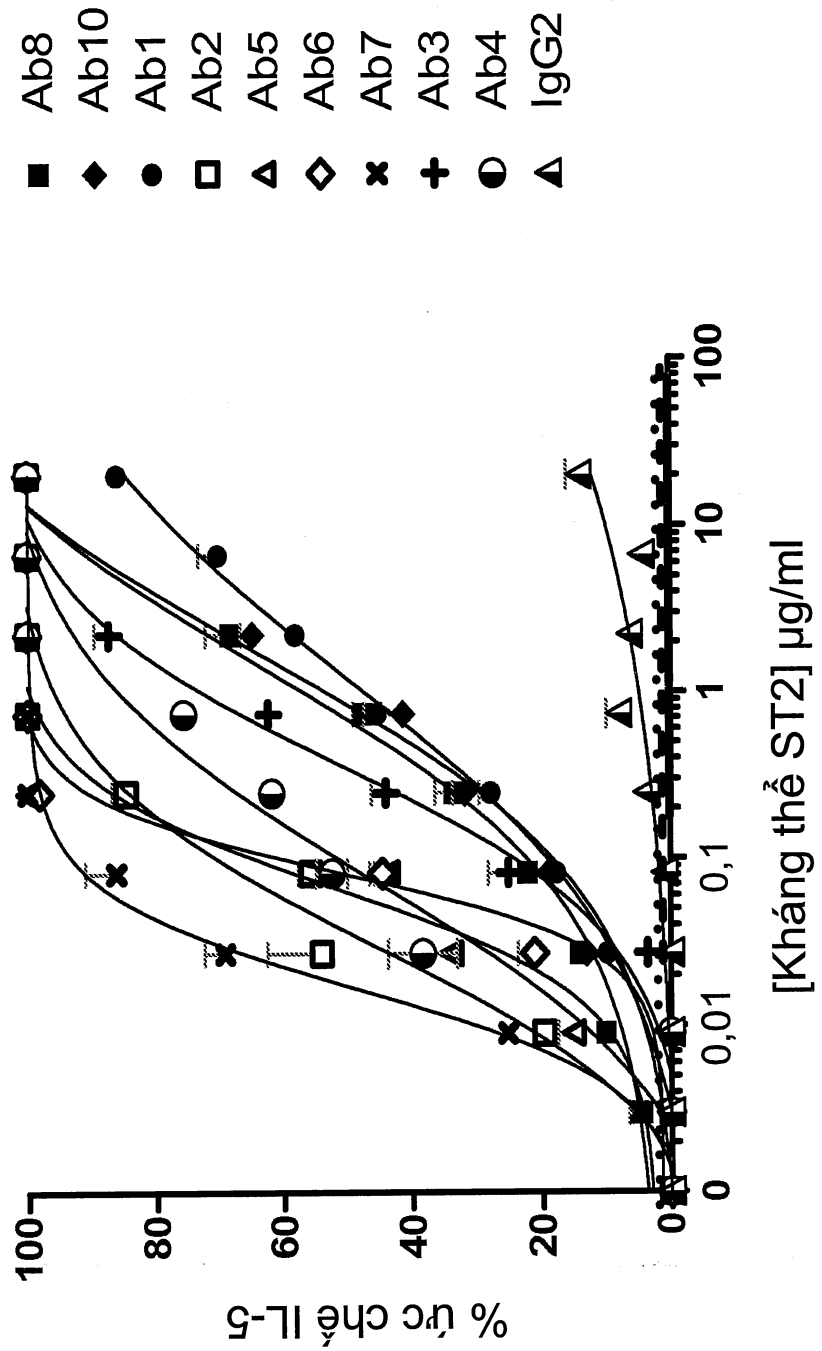


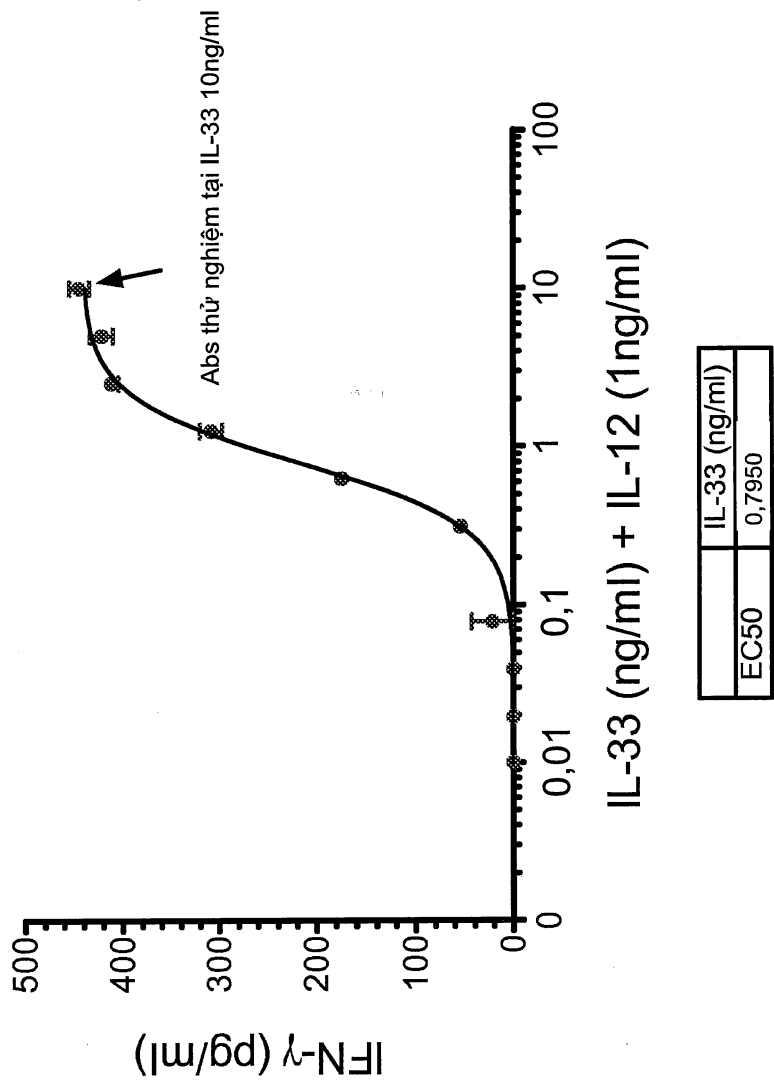
Hình 1



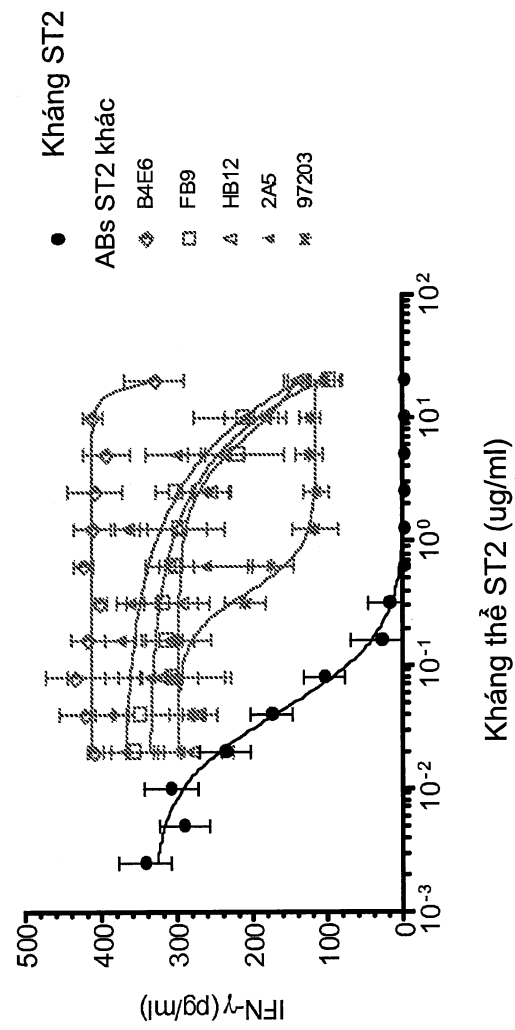
Hình 2

Hình 3

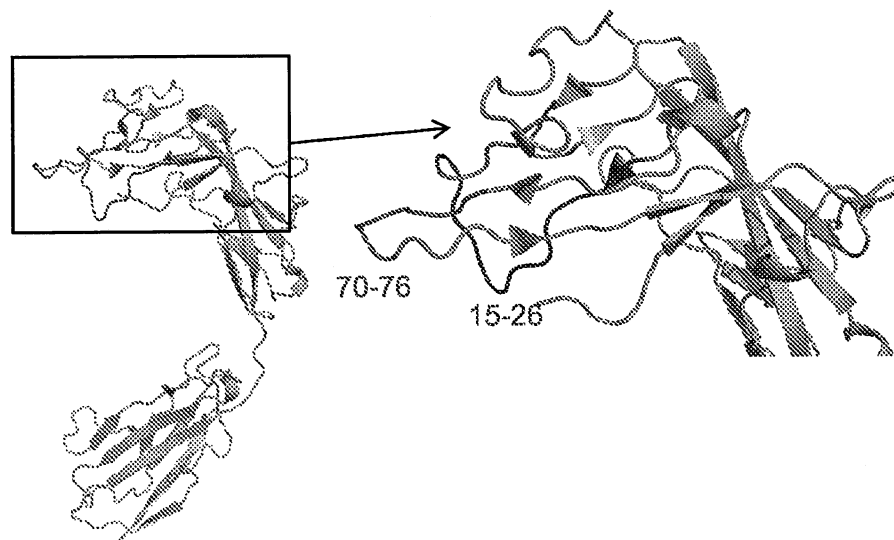




Hình 4

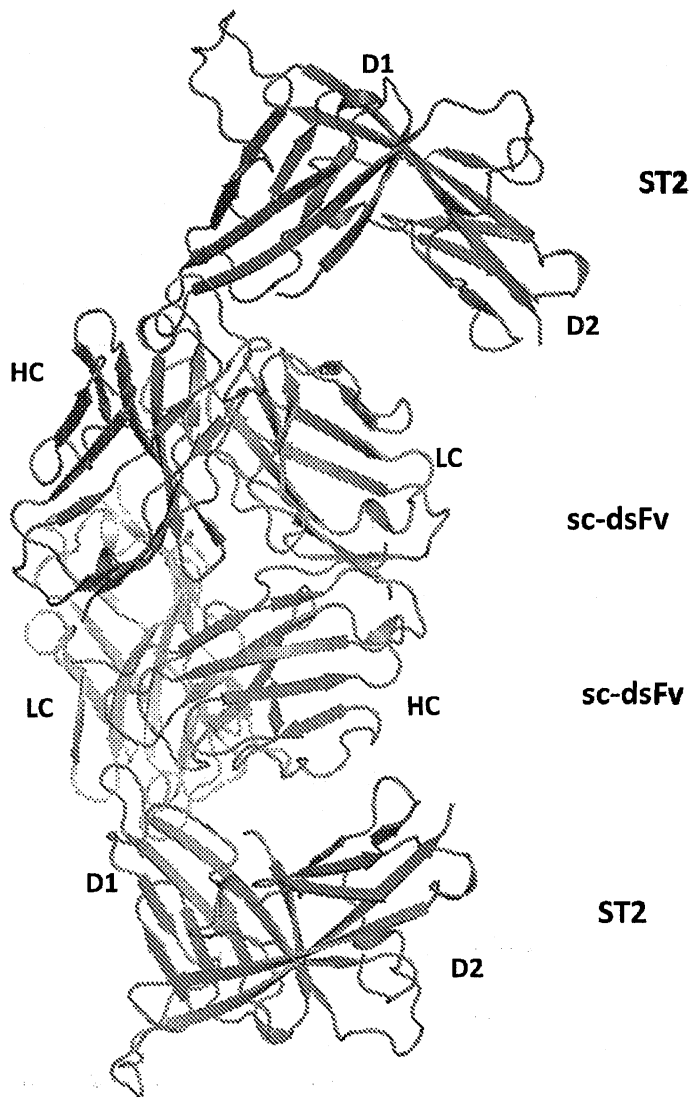


Hình 5

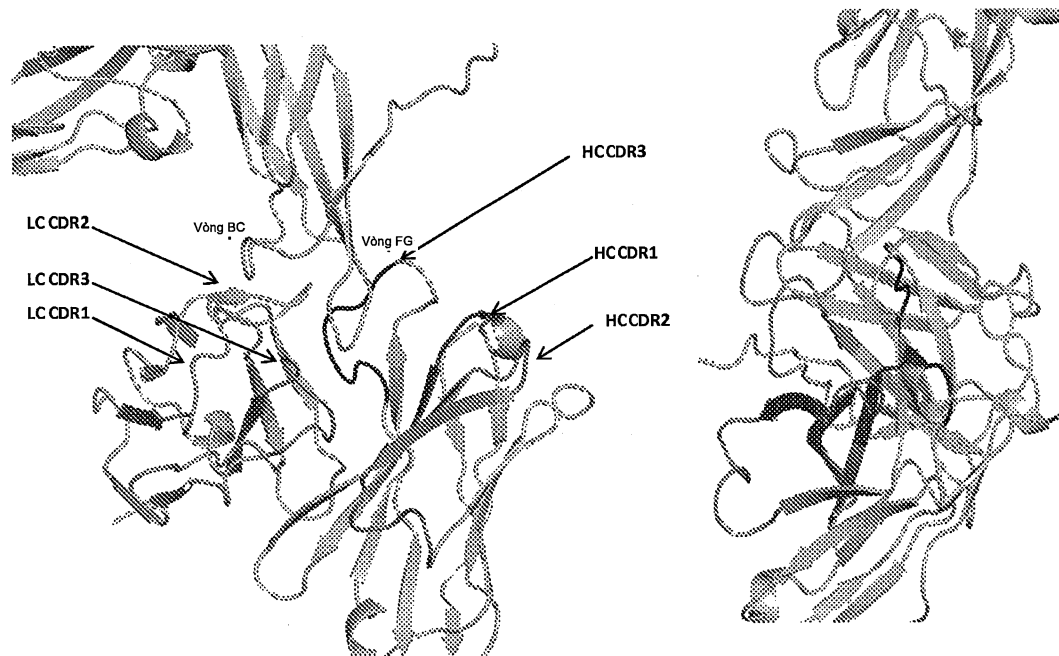


Hình 6

7/11

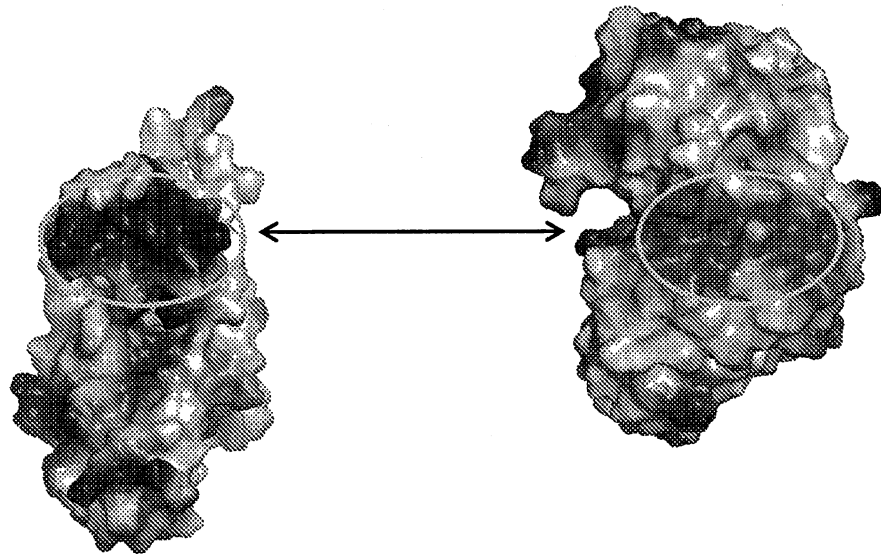


Hình 7



Hình 8

9/11

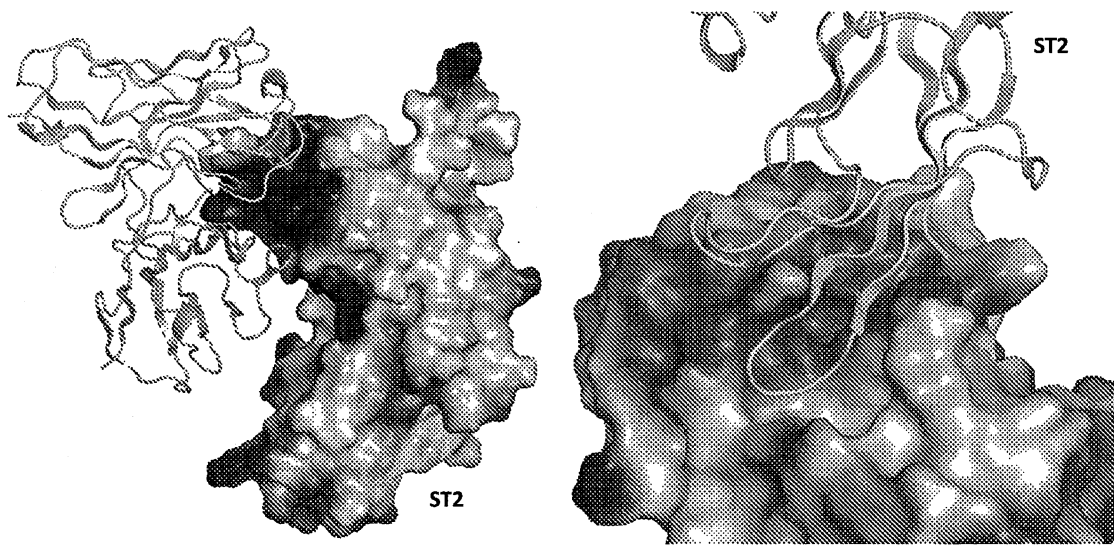


ST2

Ab2

Hình 9A

10/11



Hình 9B

Vùng biến đổi HC Ab2 (SEQ IQ NO:30)

EVQLVQSGAE VKKPGESLKI SCKGSGYSFT NYWICWVRQM PGKGLEWMCII IYPGNSDTRF SPSFQCGVTTI SADKSITTAY
 LQWSSLKASD TAMYYCARHG TSSDYIGLDV WGOQTIVTVS S

Vùng biến đổi LC Ab2 (SEQ IQ NO:96)

DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCCQASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYD ASNLEIGVPS RFSGSGSGTD FTFITISLQP
 EDIATYYCQQ DDNFPLTFGG GTKVEIKR

Hình 10