



(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)



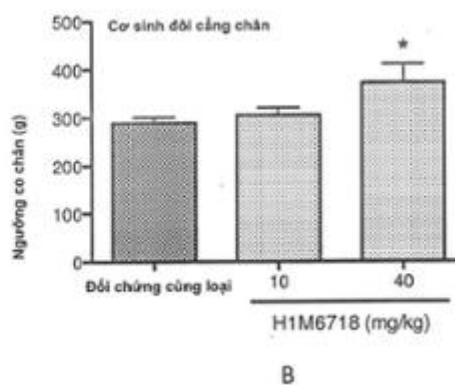
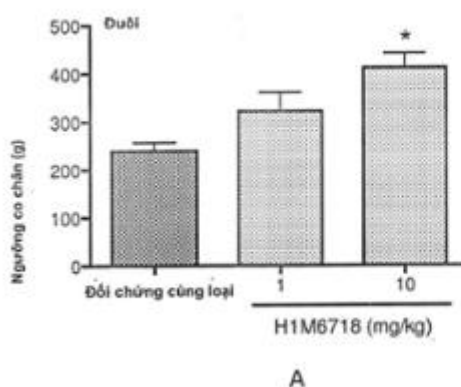
1-0032446

(51)⁷ C07K 16/18; A61K 39/395; A61P 29/00 (13) B

- (21) 1-2014-02919 (22) 30/01/2013
(86) PCT/US2013/023784 30/01/2013 (87) WO/2013/116296 08/08/2013
(30) 61/592,837 31/01/2012 US; 61/644,038 08/05/2012 US; 61/692,925 24/08/2012 US
(45) 25/07/2022 412 (43) 25/12/2014 321A
(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, USA
(72) MACDONALD, Lynn (US); GAO, Min (US); MORRA, Marc., R. (US);
ALESSANDRI-HABER, Nicole, M. (US); LaCROIX-FRALISH, Michael, L. (US).
(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK
CO., LTD.)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG ASIC1 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với tế bào biểu hiện ASIC1. Theo các phương án nhất định theo sáng chế, kháng thể ức chế dòng ion qua trung gian ASIC1 do axit tạo ra ở tế bào biểu hiện ASIC1 người. Kháng thể theo sáng chế hữu ích để điều trị chứng đau, bao gồm chứng đau đi kèm với biện pháp can thiệp phẫu thuật và các rối loạn và bệnh khác nhau.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể, và mảnh liên kết kháng nguyên của nó, đặc hiệu với ASIC1 người, và phương pháp sử dụng nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kênh ion nhận biết axit (Acid sensing ion channel - ASIC) là kênh cation được che chắn và biểu hiện trong hệ thần kinh trung ương và hệ thần kinh ngoại biên. Họ ASIC ở người bao gồm các tiểu loại ASIC1, ASIC2, ASIC3 và ASIC4, chúng được sắp xếp thành kênh ion đồng hoặc dị multimer trong màng tế bào thần kinh. ASIC1, ASIC2 và ASIC3 được biểu hiện với mức cao ở các tế bào thần kinh cảm thụ đau có kích thước nhỏ và trung bình, những tế bào này có khả năng phát hiện ra các hóa chất không độc, nhiệt, các kích thích cơ học có ngưỡng đau cao. ASIC2 và ASIC3 cũng được biểu hiện ở các tế bào thần kinh lớn tương ứng với các thụ cảm cơ học có ngưỡng đau thấp.

Các ASIC có khả năng thấm ion Na^+ và Ca^{2+} được hoạt hóa bằng sự thay đổi độ pH bên ngoài và từ 6,8 đến 4,0. Các ASIC này được tin là có vai trò quan trọng trong việc nhận biết chứng nhiễm axit cục bộ. Chứng nhiễm axit mô cục bộ là chỉ báo rõ ràng cho chứng đau và viêm, và các mô bị viêm thường biểu hiện mức pH thấp (dưới ~4,7). Việc ức chế các ASIC được coi là liệu pháp điều trị rất nhiều rối loạn và các tình trạng bệnh. Đặc biệt, việc ức chế ASIC1 được coi là liệu pháp điều trị các tình trạng bệnh như đau, các bệnh thoái hóa thần kinh và các bệnh tâm thần.

Các chất ức chế được lý của ASIC1 bao gồm peptit Psalmotoxin-1 (PcTx1) từ nhện đen lớn ở Nam Âu, peptit này ức chế đặc hiệu ASIC1 homomere, và các chất ức chế không chọn lọc ASIC phân tử nhỏ, amilorit và A-317567. Độc tố peptit gồm 40 axit amin APETx2, thu được từ hải quỳ, được biết là ức chế ASIC3 homomere và ASIC3/1 và ASIC3/2 heteromere.

Trong số kháng thể đã biết hiện nay, chưa phát hiện thấy kháng thể bất kỳ có tác dụng ức chế đặc hiệu ASIC. Do đó, trong lĩnh vực kỹ thuật này, có nhu cầu về các chất ức chế ASIC, như kháng thể kháng ASIC1, có thể dùng được trong điều trị bệnh và các tình trạng bệnh qua trung gian bởi sự truyền tín hiệu ASIC.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể liên kết đặc hiệu với ASIC1 người, bao gồm, ví dụ kháng thể liên kết đặc hiệu với ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào. Kháng thể theo sáng chế, theo các phương án nhất định, ức chế các dòng ion do axit tạo ra, và qua trung gian ASIC1 ở tế bào biểu hiện ASIC1 người. Kháng thể theo sáng chế có tác dụng, *không kể những tác dụng khác*, ức chế sự truyền tín hiệu qua trung gian ASIC1 và được dùng để điều trị các bệnh và các rối loạn do hoạt động của ASIC1 gây ra hoặc liên quan đến hoạt tính và/hoặc quá trình truyền tín hiệu ASIC1. ví dụ kháng thể theo sáng chế có thể được dùng cho bệnh nhân để điều trị hoặc làm giảm chứng đau và các tình trạng bệnh liên quan.

Kháng thể theo sáng chế có thể có chiều dài đầy đủ (ví dụ, kháng thể IgG1 hoặc IgG4) hoặc có thể chỉ bao gồm phần liên kết với kháng nguyên (ví dụ, mảnh Fab, F(ab')₂ hoặc scFv), và có thể được cải biến để tác động đến chức năng, ví dụ loại bỏ các chức năng tác động không cần thiết (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 370, và 386, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ giống về mặt trình tự ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 98% hoặc ít nhất bằng 99%.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 378, và 394, hoặc trình tự gần giống của chúng có ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 98% hoặc ít nhất bằng 99% mức độ giống về mặt trình tự.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa cặp trình tự HCVR và LCVR (HCVR/LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, và 386/394.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể

chứa miền CDR3 của chuỗi nặng (HCDR3) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 376, và 392, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ giống về mặt trình tự ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 98% hoặc ít nhất bằng 99%; và miền CDR3 của chuỗi nhẹ (LCDR3) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 384, và 400, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ giống về mặt trình tự ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 98% hoặc ít nhất bằng 99%.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của kháng thể chứa cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8/16, 24/32, 40/48, 56/64, 72/80, 88/96, 104/112, 120/128, 136/144, 152/160, 168/176, 184/192, 200/208, 216/224, 232/240, 248/256, 264/272, 280/288, 296/304, 312/320, 328/336, 344/352, 360/368, 376/384, và 392/400.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh của nó còn chứa miền CDR1 của chuỗi nặng (HCDR1) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 372, và 388, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ giống về mặt trình tự ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 98% hoặc ít nhất bằng 99%; miền CDR2 của chuỗi nặng (HCDR2) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 374, và 390, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ giống về mặt trình tự ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 98% hoặc ít nhất bằng 99%; miền CDR1 của chuỗi nhẹ (LCDR1) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 380, và 396, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ giống về mặt trình tự ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 98% hoặc ít nhất bằng 99%; và miền CDR2 của chuỗi nhẹ (LCDR2) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 382, và 398, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ giống về mặt trình tự ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 98% hoặc ít nhất bằng 99%.

Ví dụ không giới hạn phạm vi sáng chế về kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế chứa các miền HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, tương ứng có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm: SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16 (ví dụ, H1M6712N); 20-22-24-28-30-32 (ví dụ, H1M6716N); 36-38-40-44-46-48 (ví dụ, H1M6718N); 52-54-56-60-62-64 (ví dụ, H1M7101N); 68-70-72-76-78-80 (ví dụ, H2M7103N); 84-86-88-92-94-96 (ví dụ, H3M6713N); 100-102-104-108-110-112 (ví dụ, H3M6715N); 116-118-120-124-126-128 (ví dụ, H3M6720N); 132-134-136-140-142-144 (ví dụ, H3M6721N); 148-150-152-156-158-160 (ví dụ, H3M6721N2); 164-166-168-172-174-176 (ví dụ, H3M6726N); 180-182-184-188-190-192 (ví dụ, H3M6760N); 196-198-200-204-206-208 (ví dụ, H3M7102N); 212-214-216-220-222-224 (ví dụ, H3M7118N); 228-230-232-236-238-240 (ví dụ, H4H6362P); 244-246-248-252-254-256 (ví dụ, H4H6363P); 260-262-264-268-270-272 (ví dụ, H4H6364P); 276-278-280-284-286-288 (ví dụ, H4H6366P); 292-294-296-300-302-304 (ví dụ, H4H6372P); 308-310-312-316-318-320 (ví dụ, H4H6374P); 324-326-328-332-334-336 (ví dụ, H4H6375P); 340-342-344-348-350-352 (ví dụ, H4H6379P); 356-358-360-364-366-368 (ví dụ, H4H6380P); 372-374-376-380-382-384 (ví dụ, H4H6381P); và 388-390-392-396-398-400 (ví dụ, H4H6383P).

Theo phương án liên quan, sáng chế bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết đặc hiệu với ASIC1 (ví dụ, ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào), trong đó kháng thể hoặc mảnh chứa các miền CDR của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nằm trong trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (HCVR/LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 370/378, và 386/394.

Phương pháp và kỹ thuật để xác định các CDR nằm trong các trình tự axit amin HCVR và LCVR là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được dùng để xác định các CDR nằm trong các trình tự axit amin HCVR và/hoặc LCVR cụ thể được mô tả ở đây. ví dụ về quy ước có thể được dùng để xác định ranh giới giữa các CDR bao gồm, ví dụ định nghĩa của Kabat, định nghĩa của Chothia, và định nghĩa của AbM. Nói chung, định nghĩa Kabat dựa trên tính thay đổi trình tự, định nghĩa Chothia dựa trên sự định vị vùng cấu trúc dạng vòng, và định nghĩa AbM là sự kết hợp giữa định nghĩa Kabat và định nghĩa Chothia. Xem, ví dụ Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest,"

National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); và Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Cơ sở dữ liệu chung cũng có sẵn để xác định CDR các trình tự nằm trong một kháng thể.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng ASIC1 hoặc mảnh của nó. Vector biểu hiện tái tổ hợp mang các axit nucleic theo sáng chế, và vật chủ được đưa vector này vào, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế, cũng như phương pháp sản xuất kháng thể bằng cách nuôi cấy vật chủ trong điều kiện cho phép sản xuất kháng thể, và thu hồi kháng thể được tạo ra cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh của nó chứa HCVR được mã hóa bởi trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289, 305, 321, 337, 353, 369, và 385, hoặc trình tự gần giống có mức độ tương đồng ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 98%, hoặc ít nhất bằng 99%.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc mảnh của nó chứa LCVR được mã hóa bởi trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281, 297, 313, 329, 345, 361, 377, và 393, hoặc trình tự gần giống có mức độ tương đồng ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 98%, hoặc ít nhất bằng 99%.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể chứa miền HCDR3 được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 7, 23, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 151, 167, 183, 199, 215, 231, 247, 263, 279, 295, 311, 327, 343, 359, 375, và 391, hoặc trình tự gần giống có mức độ tương đồng ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 98%, hoặc ít nhất bằng 99%; và miền LCDR3 được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 15, 31, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 159, 175, 191, 207, 223, 239, 255, 271, 287, 303, 319, 335, 351, 367, 383, và 399, hoặc trình tự gần giống có mức độ tương đồng ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 98%, hoặc ít nhất bằng 99%.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc mảnh của nó còn chứa miền HCDR1 được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 3, 19, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147, 163, 179, 195, 211, 227, 243, 259, 275, 291, 307, 323, 339, 355, 371, và 387, hoặc trình tự gần giống có mức độ tương đồng ít nhất bằng 90%, ít nhất

bằng 95%, ít nhất bằng 98%, hoặc ít nhất bằng 99%; miền HCDR2 được mã hóa bởi trình tự nulceotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 5, 21, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 149, 165, 181, 197, 213, 229, 245, 261, 277, 293, 309, 325, 341, 357, 373, và 389, hoặc trình tự gần giống có mức độ tương đồng ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 98%, hoặc ít nhất bằng 99%; miền LCDR1 được mã hóa bởi trình tự nulceotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 11, 27, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155, 171, 187, 203, 219, 235, 251, 267, 283, 299, 315, 331, 347, 363, 379, và 395, hoặc trình tự gần giống có mức độ tương đồng ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 98%, hoặc ít nhất bằng 99%; và miền LCDR2 được mã hóa bởi trình tự nulceotit được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 13, 29, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 157, 173, 189, 205, 221, 237, 253, 269, 285, 301, 317, 333, 349, 365, 381, và 397, hoặc trình tự gần giống có mức độ tương đồng ít nhất bằng 90%, ít nhất bằng 95%, ít nhất bằng 98%, hoặc ít nhất bằng 99%.

Theo các phương án nhất định, kháng thể hoặc mảnh của nó chứa của các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ CDR được mã hóa bởi các trình tự axit nucleic SEQ ID NO: 1 và 9 (ví dụ, H1M6712N), 17 và 25 (ví dụ, H1M6716N), 33 và 41 (ví dụ, H1M6718N), 49 và 57 (ví dụ, H1M7101N), 65 và 73 (ví dụ, H2M7103N), 81 và 89 (ví dụ, H3M6713N), 97 và 105 (ví dụ, H3M6715N), 113 và 121 (ví dụ, H3M6720N), 129 và 137 (ví dụ, H3M6721N), 145 và 153 (ví dụ, H3M6721N2), 161 và 169 (ví dụ, H3M6726N), 177 và 185 (ví dụ, H3M6760N), 193 và 201 (ví dụ, H3M7102N), 209 và 217 (ví dụ, H3M7118N), 225 và 233 (ví dụ, H4H6362P), 241 và 249 (ví dụ, H4H6363P), 257 và 265 (ví dụ, H4H6364P), 273 và 281 (ví dụ, H4H6366P), 289 và 297 (ví dụ, H4H6372P), 305 và 313 (ví dụ, H4H6374P), 321 và 329 (ví dụ, H4H6375P), 337 và 345 (ví dụ, H4H6379P), 353 và 361 (ví dụ, H4H6380P), 369 và 377 (ví dụ, H4H6381P), 385 và 393 (ví dụ, H4H6383P).

Sáng chế bao gồm kháng thể kháng ASIC1 có mẫu glycosyl hóa được cải biến. Trong một số ứng dụng, việc cải biến để loại bỏ các vị trí glycosyl hóa không mong muốn có thể đem lại lợi ích, hoặc kháng thể thiếu nhóm fucoza có mặt trên chuỗi oligosacarit.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể người tái tổ hợp hoặc mảnh của nó liên kết đặc hiệu với ASIC1 (ví dụ, ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào) và chất mang được dụng. Theo khía cạnh liên quan, sáng chế đề xuất được phẩm

là hỗn hợp của kháng thể kháng ASIC1 và chất điều trị thứ hai. Theo một phương án, chất điều trị thứ hai này là chất bất kỳ có thể kết hợp được một cách dễ dàng với kháng thể kháng ASIC1. Các chất có thể kết hợp dễ dàng với kháng thể kháng ASIC1 được lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất khác có tác dụng ức chế hoạt tính của ASIC1 (bao gồm kháng thể khác hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, các chất ức chế peptit, chất đối kháng phân tử nhỏ, v.v..) và/hoặc các chất không trực tiếp liên kết với ASIC1 nhưng cũng không tương tác, ức chế, hoặc làm giảm dòng ion qua trung gian ASIC1.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp để ức chế dòng ion qua trung gian ASIC1 sử dụng kháng thể kháng ASIC1 hoặc phần liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế, trong đó phương pháp điều trị bao gồm dùng lượng cho hiệu quả điều trị của dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế. Rối loạn được điều trị là bệnh hoặc tình trạng bệnh bất kỳ cải thiện được, làm giảm được, ức chế được hoặc ngăn ngừa được bằng cách loại bỏ, ức chế hoặc làm giảm dòng ion qua trung gian ASIC1. Kháng thể kháng ASIC1 hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế có thể có chức năng ức chế dòng ion qua trung gian ASIC1 do axit tạo ra, hoặc theo cách khác, ức chế hoạt tính truyền tín hiệu của ASIC1.

Sáng chế còn bao gồm việc sử dụng kháng thể kháng ASIC1 hoặc phần liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến hoặc do dòng ion qua trung gian ASIC1 gây ra ở bệnh nhân.

Các phương án khác sẽ trở lên rõ ràng từ phần mô tả chi tiết dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện các ngưỡng co chân của chuột được điều trị bằng kháng thể kháng ASIC1 (H1M6718N), hoặc kháng thể đối chứng cùng loại, khi đáp ứng với làm đau cơ học ở đuôi (đồ thị A) hoặc cơ sinh đôi cẳng chân (đồ thị B). Các kết quả được biểu hiện bằng ngưỡng co chân khi làm đau tính bằng g (giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn cho mỗi nhóm chuột).

Fig.2 thể hiện % thay đổi ngưỡng co chân so với ngưỡng cơ sở trên mô hình chuột bị tăng cảm đau cơ do nước muối có tính axit gây ra được điều trị bằng kháng thể kháng ASIC1 (H1M6718N) hoặc đối chứng cùng loại.

Fig.3 (đồ thị A và B) thể hiện % thay đổi ngưỡng co chân so với ngưỡng cơ sở trên mô hình chuột bị tăng cảm đau cơ do caragenan gây ra được điều trị bằng kháng thể

kháng ASIC1 (H1M6718N, 10 hoặc 40 mg/kg - đồ thị A; hoặc H4H6721N2 10 hoặc 30 mg/kg - đồ thị B), hoặc đối chứng cùng loại.

Fig.4 thể hiện mức tăng cảm đau theo thời gian do taxol gây ra ở chuột được nhận taxol và cũng được điều trị bằng kháng thể đối chứng cùng loại với liều 30 mg/kg (dưới da), H1M6718N với liều 30 mg/kg (dưới da), hoặc gabapentin với liều 100 mg/kg (dưới da). Các kết quả được biểu hiện bằng ngưỡng co chân (g) khi đo sử dụng các sợi Von Frey (như được mô tả trong ví dụ 10).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi sáng chế được mô tả, cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các phương pháp cụ thể và các điều kiện thử nghiệm được mô tả ở đây, vì các phương pháp và điều kiện này có thể thay đổi. Cần hiểu rằng các thuật ngữ được dùng ở đây chỉ cho mục đích mô tả các phương án cụ thể và không được dự định để giới hạn phạm vi của sáng chế mà phạm vi của sáng chế được xác định bằng các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Trừ khi được định nghĩa khác, nếu không tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được dùng ở đây có cùng nghĩa như thường được hiểu đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “khoảng” khi được dùng để đề cập đến một trị số cụ thể thì có nghĩa rằng giá trị này có thể thay đổi so với giá trị được nêu nhưng không lớn hơn 1%. ví dụ như được sử dụng ở đây, cách diễn đạt “khoảng 100” bao gồm 99 và 101 và tất cả giá trị ở giữa (ví dụ, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, v.v.).

Mặc dù phương pháp và nguyên liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với phương pháp và nguyên liệu được mô tả ở đây có thể được dùng để thực hành sáng chế nhưng các phương pháp và nguyên liệu được ưu tiên sẽ được mô tả dưới đây.

Các định nghĩa

Thuật ngữ "ASIC1" và "mảnh ASIC1" như được sử dụng ở đây chỉ protein ASIC1 người hoặc mảnh trừ khi có thông báo khác là chúng chỉ các loài không phải người (ví dụ, "ASIC1 ở chuột nhắt" "mảnh ASIC1 ở chuột nhắt" "ASIC1 ở khỉ", "mảnh ASIC1 ở khỉ" v.v.). ASIC1 người có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO:401). Thuật ngữ "ASIC1" như được sử dụng ở đây, bao gồm các mảnh tan của miền ASIC1 ngoại bào (ví dụ, các polypeptit chứa hoặc bao gồm ít nhất bằng 30 axit amin liên tiếp được phát hiện thấy trong axit amin từ 63 đến 424 của SEQ ID NO:401), cũng như ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào (như thuật ngữ này được định nghĩa dưới đây).

Như được sử dụng ở đây, "kháng thể liên kết với ASIC1" hoặc "kháng thể kháng ASIC1" bao gồm kháng thể, và mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với mảnh tan của protein ASIC1 (ví dụ, một phần của miền ngoại bào của ASIC1) và/hoặc ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào. Thuật ngữ "ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào" chỉ một hoặc nhiều protein ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào *vitro hoặc ở vivo*, sao cho ít nhất là một phần của protein ASIC1 (ví dụ, axit amin từ 63 đến 424 của SEQ ID NO:401) bị lộ ra so với phía ngoại bào của màng tế bào và có thể tiếp cận với phần liên kết với kháng nguyên của kháng thể. "ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào" bao gồm protein ASIC1 nằm trong nội dung của kênh ion ASIC1 chức năng ở màng tế bào. Trong một số trường hợp, "ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào" là protein ASIC1 được biểu hiện dưới dạng một phần của dị multimer trên bề mặt tế bào (ví dụ, ASIC1/2, ASIC1/3 hoặc ASIC1/4 dị multimer). Trong các trường hợp, "ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào" là protein ASIC1 được biểu hiện dưới dạng một phần của homomultimer trên bề mặt tế bào. Hơn thế nữa, "ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào" có thể chứa hoặc bao gồm protein ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào thường biểu hiện protein ASIC1. Theo cách khác, "ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào" có thể chứa hoặc bao gồm protein ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào mà thường không biểu hiện ASIC1 người trên bề mặt nó nhưng được con người xử lý để biểu hiện ASIC1 trên bề mặt nó.

Thuật ngữ "kháng thể", như được sử dụng ở đây, chỉ phân tử liên kết hoặc phức chất của phân tử kháng nguyên bất kỳ chứa ít nhất một vùng xác định tính bổ trợ (complementarity determining region - CDR) liên kết hoặc tương tác đặc hiệu với một kháng nguyên nhất định (ví dụ, ASIC1). Thuật ngữ "kháng thể" bao gồm phân tử globulin miễn dịch chứa bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (heavy - H) và hai chuỗi nhẹ (light - L) liên kết với nhau bằng liên kết disulfua, cũng như các multimer của chúng (ví dụ, IgM). Mỗi chuỗi nặng chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (ở đây viết tắt là HCVR hoặc V_H) và vùng cố định của chuỗi nặng. Vùng cố định của chuỗi nặng chứa ba vùng, C_{H1} , C_{H2} và C_{H3} . Mỗi chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (ở đây viết tắt là LCVR hoặc V_L) và vùng cố định của chuỗi nhẹ. Vùng cố định của chuỗi nhẹ chứa một miền (CL1). Vùng V_H và V_L có thể còn được chia tiếp thành các vùng siêu biến, được gọi bằng thuật ngữ vùng xác định tính bổ trợ (complementary determining region - CDR), xen giữa bằng các vùng được bảo toàn ở mức độ lớn hơn, được gọi bằng thuật ngữ vùng

khung làm việc (framework region - FR). Mỗi V_H và V_L được cấu thành từ ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo các phương án khác của sáng chế, các FR của kháng thể kháng ASIC1 (hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng) có thể giống với trình tự dòng mầm ở người, hoặc có thể được cải biến tự nhiên hoặc nhân tạo. Trình tự liên ứng axit amin có thể được xác định dựa trên phân tích liên tiếp hai hoặc nhiều CDR.

Thuật ngữ "kháng thể," như được sử dụng ở đây, cũng bao gồm các mảnh liên kết kháng nguyên của phân tử kháng thể đầy đủ. Thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể, "mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể, và các phần tương tự, như được sử dụng ở đây, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein bất kỳ xuất hiện trong tự nhiên, thu được bằng cách sử dụng enzym, tổng hợp hoặc bằng kỹ thuật gen và liên kết đặc hiệu với kháng nguyên tạo thành phức chất. Các mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể thu được, ví dụ từ phân tử kháng thể đầy đủ sử dụng kỹ thuật tiêu chuẩn bất kỳ thích hợp như phân giải protein hoặc kỹ thuật xử lý gen tái tổ hợp liên quan đến việc thao tác và biểu hiện ADN mã hóa vùng biến đổi và tùy ý vùng cố định của kháng thể. ADN này là đã biết và/hoặc dễ dàng thu được từ, *ví dụ* các nguồn thương mại, các thư viện ADN (bao gồm, *ví dụ* thử nghiệm thực khuẩn-kháng thể), hoặc có thể được tổng hợp. ADN có thể được đọc trình tự và xử lý hóa học hoặc bằng cách sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử, ví dụ để sắp xếp một hoặc nhiều vùng biến đổi và/hoặc vùng cố định vào cấu hình thích hợp, hoặc đưa vào các codon, tạo ra các gốc xystein, cải biến hoặc bổ sung hoặc loại bỏ các axit amin, v.v..

Các ví dụ không giới hạn về các mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm: (i) các mảnh Fab; (ii) các mảnh $F(ab')_2$; (iii) các mảnh Fd; (iv) các mảnh Fv; (v) các phân tử Fv mạch đơn (scFv); (vi) các mảnh dAb; và (vii) các đơn vị nhận diện nhỏ chứa các gốc axit amin mà mô phỏng vùng siêu biến của kháng thể (ví dụ, vùng xác định tính bổ trợ được phân tách (complementarity determining region - CDR) như CDR3 peptit), hoặc peptit ghép FR3-CDR3-FR4. Các phân tử được xử lý kỹ thuật khác, như kháng thể đặc hiệu miễn, các kháng thể miễn đơn, các kháng thể bị xóa bỏ miễn, các kháng thể khảm, các kháng thể được ghép CDR, các kháng thể hai, các kháng thể ba, các kháng thể bốn, tiểu kháng thể, kháng thể nano (ví dụ, kháng thể nano đơn hóa trị, kháng thể nano hai hóa trị, v.v..), các dược chất miễn dịch phân tử nhỏ (small modular immunopharmaceutical - SMIP), và các vùng IgNAR biến đổi của cá mập, cũng nằm trong phạm vi của thuật ngữ

“mảnh liên kết kháng nguyên” như được sử dụng ở đây.

Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể sẽ thường chứa ít nhất một miền biến đổi. Miền biến đổi này có thể có kích thước bất kỳ và thành phần axit amin bất kỳ và sẽ thường chứa ít nhất một CDR mà liên kết hoặc nằm trong khung với một hoặc nhiều trình tự khung làm việc. Trong các mảnh liên kết kháng nguyên có miền V_H đi kèm với miền V_L , miền V_H và V_L có thể được đặt ở vị trí liên quan với miền khác với sự sắp xếp bất kỳ thích hợp. ví dụ vùng biến đổi có thể là dime và chứa V_H - V_H , V_H - V_L hoặc V_L - V_L . Theo cách khác, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa miền V_H hoặc V_L ở dạng monome.

Theo các phương án nhất định, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất một miền biến đổi liên kết đồng hóa trị với ít nhất một vùng cố định. Cấu hình ví dụ nhưng sáng chế không bị giới hạn ở cấu hình này, của vùng biến đổi và vùng cố định có thể được tìm thấy trong mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bao gồm: (i) V_H - C_{H1} ; (ii) V_H - C_{H2} ; (iii) V_H - C_{H3} ; (iv) V_H - C_{H1} - C_{H2} ; (v) V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} ; (vi) V_H - C_{H2} - C_{H3} ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_{H1} ; (ix) V_L - C_{H2} ; (x) V_L - C_{H3} ; (xi) V_L - C_{H1} - C_{H2} ; (xii) V_L - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} ; (xiii) V_L - C_{H2} - C_{H3} ; và (xiv) V_L - C_L . Trong cấu hình bất kỳ của vùng biến đổi và vùng cố định, kể cả cấu hình ví dụ bất kỳ đã liệt kê ở trên, vùng biến đổi và vùng cố định đều có thể liên kết trực tiếp với một vùng khác nữa và có thể liên kết bởi vùng khớp đầy đủ hoặc một phần hoặc vùng liên kết. Vùng khớp có thể chứa ít nhất 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 axit amin hoặc nhiều hơn) mà tạo ra liên kết linh động hoặc bán linh động giữa vùng biến đổi và/hoặc vùng cố định liên kết nhau trong phân tử polypeptit đơn. Hơn thế nữa, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể chứa đồng dime hoặc dị dime (hoặc multime khác) của cấu hình vùng biến đổi và vùng cố định bất kỳ được liệt kê ở trên kết hợp với một vùng khác và/hoặc với một hoặc nhiều miền V_H hoặc V_L ở dạng monome (ví dụ, bằng (các) liên kết disulfua).

Đối với các phân tử kháng thể có chiều dài đầy đủ, các mảnh liên kết kháng nguyên có thể là đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu đôi). Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể sẽ thường chứa ít nhất hai miền biến đổi khác nhau, trong đó mỗi miền biến đổi có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên riêng biệt hoặc với epitop khác nhau trên cùng một kháng nguyên. Dạng kháng thể đa đặc hiệu, kể cả dạng kháng thể đặc hiệu ví dụ được mô tả ở đây, có thể được điều chỉnh để sử dụng trong nội

dung của mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế sử dụng các kỹ thuật có sẵn trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thuật ngữ "kháng thể ở người" như được sử dụng ở đây bao gồm các kháng thể có vùng cố định và biến đổi thu được từ các trình tự globulin miễn dịch của tế bào dòng mầm ở người. Các kháng thể ở người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm ở người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu điểm *in vitro* hoặc bằng đột biến soma *in vivo*), ví dụ trong các CDR và cụ thể là CDR3. Tuy nhiên, thuật ngữ "kháng thể ở người", như được sử dụng ở đây, không bao gồm các kháng thể trong đó các trình tự CDR thu được từ tế bào dòng mầm của các loại động vật có vú khác như chuột, đã được ghép lên trên trình tự vùng khung làm việc ở người.

Thuật ngữ "kháng thể tái tổ hợp ở người" như được sử dụng ở đây bao gồm tất cả các kháng thể ở người được chuẩn bị, biểu hiện, tạo ra hoặc được tách bằng phương pháp tái tổ hợp như các kháng thể được biểu hiện sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào tế bào chủ, các kháng thể được tách ra từ thư viện kháng thể người tổ hợp, tái tổ hợp (Hoogenboom, *Trends Biotechnol*, 15:62-70 (1997); Azzazy and Highsmith, *Clin. Biochem.* 35:425-445 (2002); Gavilondo and Larrick, *BioTechniques* 29:128-145 (2000); Hoogenboom and Chames, *Immunol Today* 21:371-378 (2000)), các kháng thể được tách ra từ động vật (ví dụ, chuột nhắt) được chuyển vào các gen globulin miễn dịch ở người (xem tài liệu: Taylor, et al. *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295 (1992); Kellermann and Green L.L., *Current Opinion in Biotechnol* 13:593-597 (2002); Little et al., *Immunol Today* 21:364-370 (2000)) hoặc các kháng thể ở người được chuẩn bị, biểu hiện, tạo ra hoặc được tách ra bằng phương pháp bất kỳ khác bao gồm bước phân cắt trình tự gen globulin miễn dịch ở người thành trình tự ADN khác. Các kháng thể tái tổ hợp ở người có vùng cố định và biến đổi thu được từ các trình tự globulin miễn dịch của tế bào dòng mầm ở người. Theo một số phương án nhất định, tuy nhiên, các kháng thể tái tổ hợp ở người được gây đột biến *in vitro* (hoặc khi sử dụng động vật được chuyển gen là trình tự Ig ở người thì gây đột biến soma *in vivo*) và do đó, trình tự axit amin của vùng VH và VL của kháng thể tái tổ hợp là trình tự đồng thời thu được từ và liên quan đến trình tự VH và VL của tế bào dòng mầm ở người, nhưng có thể không tồn tại một cách tự nhiên trong kho kháng thể của tế bào dòng mầm ở người *in vivo*.

Các kháng thể người có thể tồn tại ở hai dạng mà kết hợp với tính dị sinh vùng khớp. Ở một dạng, phân tử globulin miễn dịch chứa cấu trúc chuỗi bốn ổn định có khối lượng phân tử khoảng 150-160 kDa, trong đó các dime này được giữ cùng nhau bằng liên kết disulfua chuỗi nặng liên chuỗi. Ở dạng thứ hai, các dime này không liên kết qua các liên kết disulfua liên chuỗi và phân tử khoảng 75-80 kDa được tạo thành từ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cặp với nhau bằng liên kết đồng hóa trị (nửa-kháng thể). Các dạng này cực kỳ khó tách, ngay cả sau khi tinh chế theo ái lực.

Sự xuất hiện thường xuyên của dạng thứ hai trong các isotyp IgG nguyên vẹn khác nhau là do, nhưng không chỉ hạn chế ở, sự khác biệt cấu trúc của isotyp vùng khớp của kháng thể. Việc thay thế axit amin đơn trong vùng khớp của vùng khớp IgG4 ở người có thể làm giảm sự xuất hiện của dạng thứ hai (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) đến mức thường quan sát thấy khi sử dụng vùng khớp IgG1 ở người. Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể có một hoặc nhiều đột biến trong vùng khớp, vùng C_H2 hoặc C_H3 có thể là mong muốn, ví dụ trong sản xuất, để cải thiện hiệu suất thu dạng kháng thể mong muốn.

"Kháng thể đã phân lập" như được sử dụng ở đây, chỉ kháng thể đã xác định được và đã tách được và/hoặc thu hồi từ ít nhất một thành phần của môi trường tự nhiên của nó. ví dụ kháng thể đã tách được hoặc loại bỏ khỏi ít nhất một thành phần của sinh vật, hoặc từ mô hoặc tế bào trong đó kháng thể tồn tại trong tự nhiên hoặc được tạo ra một cách tự nhiên, là "kháng thể đã phân lập" cho các mục đích của sáng chế. Kháng thể đã phân lập cũng bao gồm kháng thể được sản xuất luôn trong tế bào tái tổ hợp. Các kháng thể đã tách là các kháng thể đã trải qua ít nhất một bước tinh chế hoặc tách. Theo các phương án nhất định, kháng thể đã tách có thể hầu như không chứa nguyên liệu tế bào và/hoặc các hóa chất khác.

Kháng thể "trung hòa" hoặc "ức chế" như được sử dụng ở đây, được dùng để chỉ kháng thể có khả năng với ASIC1 làm giảm hoặc ức chế ở mức có thể phát hiện thấy dòng ion qua trung gian ASIC1 do axit tạo ra. Việc ức chế do kháng thể trung hòa hoặc ức chế ASIC1 gây ra không cần phải hoàn toàn miễn là nó có thể phát hiện được sử dụng thử nghiệm thích hợp. Thử nghiệm ví dụ dùng để phát hiện sự ức chế ASIC1 được mô tả ở đây.

Các kháng thể kháng ASIC1 được mô tả trong sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều thay thế, đoạn xen và/hoặc loại bỏ axit amin trong khung làm việc và/hoặc trong

các vùng CDR thuộc các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ so với các trình tự dòng mầm tương ứng mà các kháng thể thu được từ đó. Các đột biến này có thể dễ dàng thấy được bằng cách so sánh trình tự axit amin được mô tả ở đây với các trình tự có sẵn từ, ví dụ các dữ liệu thụ thể kháng thể đã được công bố rộng rãi. Sáng chế bao gồm các phương pháp liên quan đến việc sử dụng các kháng thể, và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà thu được từ trình tự axit amin bất kỳ được mô tả ở đây, trong đó một hoặc nhiều axit amin nằm trong một hoặc nhiều vùng khung làm việc và/hoặc vùng CDR được đột biến so với (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm mà tạo ra kháng thể, hoặc với (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác, hoặc với thay thế axit amin bảo toàn của (các) gốc dòng mầm tương ứng (các thay đổi trình tự này ở đây gọi chung là ‘đột biến dòng mầm’). Người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này, nếu bắt đầu từ các trình tự của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nhẹ được mô tả ở đây, có thể dễ dàng tạo ra rất nhiều kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên mà chứa một hoặc nhiều các đột biến dòng mầm riêng rẽ hoặc hỗn hợp của nó. Theo các phương án nhất định, tất cả các gốc của khung làm việc và/hoặc các gốc trong vùng CDR trong miền V_H và/hoặc V_L được đột biến ngược so với các gốc được phát hiện thấy trong trình tự dòng mầm ban đầu mà từ đó thu được kháng thể. Theo các phương án khác, chỉ các gốc nhất định bị đột biến ngược so với trình tự dòng mầm ban đầu, ví dụ chỉ các gốc bị đột biến được phát hiện trong 8 axit amin đầu tiên của FR1 hoặc trong 8 axit amin cuối cùng của FR4, hoặc chỉ các gốc bị đột biến được phát hiện trong CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều gốc trong khung làm việc và/hoặc trong CDR bị đột biến tương ứng so với các gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác nhau (nghĩa là, trình tự dòng mầm khác với trình tự dòng mầm tạo ra kháng thể ban đầu). Hơn thế nữa, các kháng thể theo sáng chế có thể chứa hỗn hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều đột biến dòng mầm trong vùng khung làm việc và/hoặc vùng CDR, ví dụ trong đó các gốc riêng rẽ nhất định bị đột biến so với các gốc tương ứng của một trình tự dòng mầm cụ thể trong khi đó các gốc khác nhất định mà khác với trình tự dòng mầm ban đầu được giữ lại hoặc bị đột biến so với các gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác nhau. Ngay sau khi thu được, các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên mà chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm có thể dễ dàng được kiểm tra một hoặc nhiều đặc tính mong muốn như, tính đặc hiệu liên kết tăng, ái lực liên kết tăng, đặc tính sinh học đối kháng hoặc chủ vận tăng (vì trường hợp này có thể), tính sinh miễn dịch giảm, v.v.. Các kháng thể và các mảnh liên

kết kháng nguyên thu được theo cách tổng hợp này cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng ASIC1 chứa các biến thể của các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được mô tả ở đây có một hoặc một số thay thế được bảo toàn. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng ASIC1 có các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR có, ví dụ, 10 thay thế axit amin bảo toàn hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, v.v.. của các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được mô tả ở đây.

Thuật ngữ “epitop” chỉ thành phần quyết định tính kháng nguyên mà tương tác với vị trí liên kết kháng nguyên đặc hiệu ở vùng biến đổi của phân tử kháng thể gọi là paratop. Một kháng nguyên có thể có nhiều hơn một epitop. Do đó, kháng thể có thể liên kết với các khu vực khác nhau trên kháng nguyên và có thể có tác dụng sinh lý khác nhau. Các epitop có thể có cấu dạng hoặc thẳng. Epitop cấu dạng được tạo ra bởi các axit amin nằm cạnh nhau trong không gian thu được từ các mảnh khác nhau của chuỗi polypeptit thẳng. Epitop thẳng là epitop được tạo ra bởi các gốc axit amin liên kề nhau trong mạch polypeptit. Trong một số trường hợp nhất định, epitop này có thể bao gồm các nhóm sacarit, các nhóm phosphoryl, hoặc các nhóm sulfonyl trên kháng nguyên này.

Thuật ngữ "gần như giống" khi đề cập axit nucleic hoặc mảnh của nó, thể hiện rằng, khi được làm thẳng tối ưu với đoạn xen nucleotit hoặc loại bỏ nucleotit thích hợp với axit nucleic khác (hoặc mạch bổ trợ của nó), thì có sự giống nhau về trình tự nucleotit ít nhất bằng khoảng 95%, và tốt hơn nếu ít bằng khoảng 96%, 97%, 98% hoặc 99% bazơ nucleotit, như được xác định bằng thuật toán bất kỳ đã biết dùng để xác định mức giống nhau của trình tự như FASTA, BLAST hoặc GAP, như được thảo luận dưới đây. Phân tử axit nucleic gần như giống với phân tử axit nucleic tham chiếu, có thể, trong một số trường hợp, mã hóa polypeptit có trình tự axit amin giống hoặc gần như tương tự với polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic tham chiếu.

Khi được áp dụng cho polypeptit, thuật ngữ "gần như giống" có nghĩa hai trình tự peptit, khi được làm thẳng tối ưu, như bằng chương trình GAP hoặc BESTFIT sử dụng trọng lượng khoảng trống mặc định, có mức giống trình tự ít nhất bằng 95%, tốt hơn nữa nếu mức giống trình tự ít nhất bằng 98% hoặc 99%. Tốt hơn, nếu các vị trí gốc không giống nhau khác nhau bởi các thay thế axit amin bảo toàn.

"Sự thay thế axit amin bảo toàn" là sự thay thế trong đó gốc axit amin được thay thế bằng gốc axit amin khác có mạch nhánh (nhóm R) có đặc tính hóa học tương tự (ví dụ, mang điện hoặc tính kỵ nước). Thông thường, sự thay thế axit amin bảo toàn gần như không làm thay đổi tính năng của protein. Trong các trường hợp trong đó hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau ở các thay thế bảo toàn thì % hoặc mức tương tự về mặt trình tự có thể được điều chỉnh để hiệu chỉnh bản chất bảo toàn của việc thay thế. Các phương pháp điều chỉnh là đã biết đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307- 331. ví dụ về các nhóm axit amin có mạch nhánh có tính chất hóa học tương tự bao gồm: 1) mạch nhánh béo: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; 2) mạch nhánh hydroxyl béo: serin và threonin; 3) mạch nhánh chứa amit: asparagin và glutamin; 4) mạch nhánh thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; 5) mạch nhánh bazơ: lysin, arginin, và histidin; 6) mạch nhánh axit: aspartat và glutamat, và 7) mạch nhánh chứa lưu huỳnh: xystein và methionin. Các nhóm thế axit amin bảo toàn được ưu tiên là: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat, và asparagin-glutamin. Theo cách khác, việc thay thế bảo toàn là sự thay đổi bất kỳ có giá trị dương trong ma trận log-xác suất PAM250 được mô tả trong tài liệu: Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45. Sự thay thế "bảo toàn với mức độ trung bình" là sự thay đổi bất kỳ có giá trị không âm trong ma trận log-xác suất PAM250.

Tính tương tự về mặt trình tự của polypeptit, mà cũng thường được gọi là mức giống nhau về mặt trình tự, thường được xác định sử dụng phần mềm phân tích trình tự. Phần mềm phân tích protein ghép cặp tương ứng các trình tự tương tự nhau sử dụng các phép đo tính tương tự được gán cho các thay thế, loại bỏ khác nhau và các cải biến khác, kể cả các thay thế axit amin bảo toàn. Ví dụ, phần mềm GCG có các chương trình như GAP và BESTFIT mà có thể được sử dụng cùng với các thông số mặc định để xác định mức tương đồng về trình tự hoặc mức giống nhau về trình tự giữa các polypeptit có liên quan chặt chẽ với nhau, như các polypeptit tương đồng từ các loài sinh vật khác nhau hoặc giữa protein kiểu dại và đột biến của nó. Xem, ví dụ, GCG, phiên bản 6.1. Các trình tự polypeptit cũng có thể được so sánh sử dụng FASTA với các thông số mặc định hoặc được khuyến cáo; chương trình trong GCG phiên bản 6.1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) cung cấp kết quả làm thẳng và mức độ giống về trình tự (%) của các vùng có mức chồng lấn lớn nhất giữa trình tự cần xác định và trình tự tìm kiếm (Pearson (2000) *supra*). Một thuật toán được ưu tiên khác khi so sánh trình tự của sáng chế với cơ sở dữ

liệu gồm một số lượng lớn trình tự từ các sinh vật khác nhau là chương trình máy tính BLAST, cụ thể là BLASTP hoặc TBLASTN, sử dụng các thông số mặc định. Xem, ví dụ, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 và (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402.

Đặc tính sinh học của kháng thể

Sáng chế bao gồm kháng thể liên kết đặc hiệu với ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào. Như được sử dụng ở đây, kháng thể liên kết đặc hiệu với ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào nếu kháng thể thể hiện liên kết ở mức phát hiện được với tế bào biểu hiện ASIC1 tự nhiên hoặc nhân tạo nhưng không có liên kết ở mức phát hiện được với tế bào tương đương không biểu hiện ASIC1. Một dạng thử nghiệm ví dụ có thể được dùng để xác định kháng thể liên kết đặc hiệu với ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào là thử nghiệm phân loại tế bào được hoạt hóa bằng ánh sáng huỳnh quang (fluorescence activated cell sorting - FACS), như được minh họa ở ví dụ 3 ở đây. Thử nghiệm định lượng-liên kết FACS dương tính của kháng thể với các tế bào biểu hiện ASIC1, như được thể hiện trong Bảng 2, có thể được dùng để xác định kháng thể liên kết đặc hiệu với ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào. FACS cũng có thể được dùng để đánh giá về mặt định lượng liên kết của kháng thể với tế bào biểu hiện ASIC1 bằng giá trị EC_{50} , như được thể hiện trong ví dụ 3, Bảng 3. Do đó, theo các phương án nhất định theo sáng chế, kháng thể "liên kết đặc hiệu với ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào" nếu kháng thể, khi được thử nghiệm trong dạng thử nghiệm FACS trong ví dụ 3 hoặc dạng thử nghiệm gần giống, biểu hiện giá trị EC_{50} khoảng 5 nM hoặc nhỏ hơn (ví dụ, khoảng 5,0 nM, 4,5 nM, 4,0 nM, 3,5 nM, 3,0 nM, 2,5 nM, 2,0 nM, 1,5 nM, 1,4 nM, 1,3 nM, 1,2 nM, 1,1 nM, 1,0 nM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 600 pM, 500 pM, 400 pM, 300 pM, 200 pM, 100 pM, 90 pM, 85 pM, 80 pM, 75 pM, 70 pM, hoặc nhỏ hơn).

Kháng thể theo sáng chế, theo các phương án nhất định, cũng có thể (hoặc theo cách khác) thực hiện chức năng ức chế dòng ion qua trung gian ASIC1 do axit tạo ra ở tế bào biểu hiện ASIC1 người. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "dòng ion qua trung gian ASIC1 ức chế do axit tạo ra" có nghĩa là, trong thử nghiệm trong đó dòng ion nội bào do axit tạo ra có thể phát hiện được và/hoặc định lượng được, việc bổ sung kháng thể theo sáng chế làm giảm hoặc ức chế dòng ion do axit tạo ra so với dòng ion không quan sát được khi không có mặt kháng thể (ví dụ, khi có mặt kháng thể đối chứng âm tính không đặc hiệu). ví dụ không giới hạn phạm vi sáng chế về thử nghiệm có thể được dùng để xác

định việc kháng thể "ức chế dòng ion qua trung gian ASIC1 do axit tạo ra" được minh họa trong ví dụ 4 ở đây. Trong ví dụ này, dòng canxi do pH thấp hoạt hóa được đo ở các tế bào biểu hiện ASIC1 khi có mặt kháng thể kháng ASIC1 ("thử nghiệm FLIPR"). Bằng cách thay đổi lượng kháng thể được dùng trong dạng thử nghiệm này, lượng kháng thể cần để ức chế 50% dòng ion do pH thấp tạo ra có thể được tính toán và biểu hiện bằng giá trị IC_{50} (xem, ví dụ, ví dụ 4, Bảng 5). Sáng chế bao gồm kháng thể kháng ASIC1 ức chế dòng ion qua trung gian ASIC1 do axit tạo ra với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 10 nM khi được thử nghiệm trong thử nghiệm FLIPR ở độ pH khoảng 5,0 đến khoảng 6,0 (ví dụ, ở pH=5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, hoặc 6,0) như được mô tả ở trên, hoặc trong thử nghiệm gần giống. ví dụ sáng chế bao gồm kháng thể kháng ASIC1 có IC_{50} nhỏ hơn khoảng 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, 0,1 nM, hoặc nhỏ hơn, khi được thử nghiệm trong thử nghiệm FLIPR ở độ pH=5,5 như được mô tả như được mô tả ở trên, hoặc trong thử nghiệm gần giống.

Một dạng thử nghiệm khác được lấy làm ví dụ và có thể được dùng để xác định việc kháng thể "ức chế dòng ion qua trung gian ASIC1 do axit tạo ra" được minh họa trong ví dụ 5 và 6 ở đây. Trong các ví dụ này, thử nghiệm automated kẹp điện thế, patch-clamp được dùng để đo và/hoặc đánh giá mức độ ức chế dòng ASIC ở tế bào biểu hiện ASIC1 ở độ pH axit khi có mặt kháng thể kháng ASIC1, so với dòng ASIC quan sát được trong điều kiện tương tự nhưng không có mặt kháng thể (ví dụ, khi có mặt có mặt kháng thể đối chứng âm tính không đặc hiệu). Kháng thể được coi là "ức chế dòng ion qua trung gian ASIC1 do axit tạo ra" nếu kháng thể, khi được thử nghiệm trong thử nghiệm kẹp điện thế ráp nối ở nồng độ kháng thể khoảng 1 nM đến khoảng 100 nM, ở độ pH từ khoảng 5,0 đến khoảng 6,0 (ví dụ, ở pH 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, hoặc 6,0), tạo ra mức độ ức chế thấp nhất 10% dòng ASIC (ví dụ, ít nhất bằng khoảng 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc mức độ ức chế dòng ASIC lớn hơn; xem, ví dụ, ví dụ 5, Bảng 6). Trong một số trường hợp, kháng thể theo sáng chế ức chế hoàn toàn dòng ASIC (mức độ ức chế 100%) ở 10 nM hoặc cao hơn (ví dụ, 100 nM), khi được thử nghiệm trong dạng thử nghiệm kẹp ráp nối như được mô tả ở trên, hoặc thử nghiệm gần giống.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể ức chế hoặc làm giảm (các) đáp ứng đau ở nhiều mô hình đau khác nhau trên động vật. ví dụ về mô hình đau trên động vật được dùng để

phân tích đặc tính của kháng thể kháng ASIC1 theo sáng chế được minh họa trong các ví dụ 7-9, ở đây. ví dụ sáng chế bao gồm kháng thể kháng ASIC1 làm giảm hoặc ức chế đáp ứng đau đối với chứng đau nội tạng trên mô hình chuột nhắt. (xem, ví dụ ví dụ 7). Cụ thể, sáng chế bao gồm kháng thể kháng ASIC1 có mức ức chế thấp nhất 20% đáp ứng đau nội tạng (ví dụ, các co bóp bất thường khi đáp ứng với việc tiêm trong màng bụng axit axetic 0,6%) khi được dùng ở liều khoảng 1 hoặc 10 mg/kg cho mô hình chuột như được thể hiện trong ví dụ 7, hoặc mô hình gần giống. Trong một số trường hợp nhất định, % ức chế đáp ứng đau do việc dùng kháng thể theo sáng chế gây ra có thể cao lên mức khoảng 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, hoặc cao hơn khi được thử nghiệm trên mô hình đau ở chuột của ví dụ 7, hoặc mô hình gần giống. Các mô hình đau khác trên động vật có thể được dùng để phân tích đặc tính của kháng thể kháng ASIC theo sáng chế bao gồm, ví dụ, mô hình đáp ứng đau thụ cảm đau cơ học của ví dụ 8, mô hình đau cơ của ví dụ 9, và các mô hình tương tự khác có sẵn trong lĩnh vực kỹ thuật này. Do đó, sáng chế bao gồm kháng thể kháng ASIC1 có khả năng làm giảm hoặc ức chế đáp ứng đau đối với các kích thích cơ học không độc (xem, ví dụ, ví dụ 8); và/hoặc tăng cảm đau cơ do axit-nước muối hoặc caragenan gây ra (xem, ví dụ, ví dụ 9), như được thể hiện trên mô hình động vật thích hợp được lấy làm ví dụ ở đây.

Lập bản đồ epitop và các công nghệ liên quan

Sáng chế bao gồm kháng thể kháng ASIC1 tương tác với một hoặc nhiều axit amin được phát hiện thấy trong miền ngoại bào của ASIC1 người (axit amin từ 63 đến 424 của SEQ ID NO:401). Epitop liên kết với kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm một trình tự liên tiếp chứa 3 axit amin hoặc nhiều hơn (ví dụ, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều hơn) nằm tại miền ngoại bào của ASIC1. Theo cách khác, epitop này có thể bao gồm rất nhiều axit amin không nằm cạnh nhau (hoặc các trình tự axit amin) nằm trong miền ngoại bào của ASIC1.

Rất nhiều kỹ thuật đã biết đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được dùng để xác định việc kháng thể "tương tác với một hoặc nhiều axit amin" nằm trong polypeptit hoặc protein. ví dụ về các kỹ thuật này bao gồm, ví dụ, thử nghiệm ức chế chéo thông thường như thử nghiệm được mô tả trong Antibody, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), phân tích đột biến quét alanin, phân tích thâm tách peptit (Reineke, 2004, Method Mol Biol 248:443-463), và phân tích phân cắt peptit. Ngoài ra, các phương pháp như cắt epitop, chiết epitop và cải biến hóa học

kháng nguyên có thể được sử dụng (Tomer, 2000, Protein Science 9:487-496). Phương pháp khác có thể được dùng để xác định việc axit amin nằm trong polypeptit tương tác với kháng thể là trao đổi hydro/đoteri được phát hiện nhờ phổ khối. Nói chung, phương pháp trao đổi hydro/đoteri liên quan đến việc đánh dấu protein quan tâm bằng ddowterri, sau đó cho kháng thể liên kết với protein được đánh dấu đoteri này. Tiếp theo, phức chất protein.kt được chueyern vào nước để hiện tượng trao đổi hydro/đoteri xuất hiện ở tất cả các gốc ngoại trừ các gốc được bảo vệ bằng kháng thể (phần còn lại được đánh dấu đoteri). Sau khi phân ly kháng thể, protein đích được phân cắt bằng proteaza và phân tích phổ khối, nhờ đó để lộ ra các gốc được đánh dấu đoteri mà tương ứng với các axit amin đặc hiệu tương tác với kháng thể. Xem, ví dụ, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng ASIC1 liên kết với cùng epitop với kháng thể bất kỳ được lấy ví dụ cụ thể ở đây (ví dụ, H1M6712N, H1M6716N, H1M6718N, H1M7101N, H2M7103N, H3M6713N, H3M6715N, H3M6720N, H3M6721N, H3M6721N2, H3M6726N, H3M6760N, H3M7102N, H3M7118N, H4H6362P, H4H6363P, H4H6364P, H4H6366P, H4H6372P, H4H6374P, H4H6375P, H4H6379P, H4H6380P, H4H6381P, H4H6383P v.v.). Tương tự, sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng ASIC1 cạnh tranh liên kết với ASIC1 hoặc ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào với kháng thể bất kỳ được lấy ví dụ cụ thể ở đây (ví dụ, H1M6712N, H1M6716N, H1M6718N, H1M7101N, H2M7103N, H3M6713N, H3M6715N, H3M6720N, H3M6721N, H3M6721N2, H3M6726N, H3M6760N, H3M7102N, H3M7118N, H4H6362P, H4H6363P, H4H6364P, H4H6366P, H4H6372P, H4H6374P, H4H6375P, H4H6379P, H4H6380P, H4H6381P, H4H6383P v.v.).

Người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này dễ dàng xác định được rằng kháng thể có liên kết với cùng epitop, hoặc cạnh tranh liên kết với kháng thể kháng ASIC1 tham chiếu hay không bằng cách sử dụng phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. ví dụ để xác định kháng thể thử nghiệm có liên kết với cùng epitop với kháng thể kháng ASIC1 tham chiếu theo sáng chế hay không, kháng thể tham chiếu được cho liên kết với protein ASIC1 (ví dụ, ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào). Sau đó, đánh giá khả năng liên kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử ASIC1. Nếu kháng thể thử nghiệm có khả năng liên kết đặc hiệu với ASIC1 sau khi làm bão hòa liên kết bằng kháng thể kháng ASIC1 tham chiếu, có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm liên kết

với epitop khác với kháng thể ASIC1. Mặt khác, nếu kháng thể thử nghiệm không có kháng nguyên liên kết phân tử ASIC1 sau khi làm bão hòa liên kết bằng kháng thể ASIC1 tham chiếu, thì kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với cùng epitop liên kết với kháng thể ASIC1 tham chiếu theo sáng chế.

Thử nghiệm thông thường khác (ví dụ, đột biến peptit và phân tích liên kết) sau đó có thể được tiến hành để xác nhận việc thiếu liên kết quan sát được của kháng thể thử nghiệm thực tế là do liên kết với cùng epitop với kháng thể tham chiếu hoặc nếu việc cản trở không gian (hoặc hiện tượng khác) làm cho việc thiếu liên kết quan sát được này. Các thử nghiệm loại này có thể được tiến hành sử dụng ELISA, RIA, Biacore, đo dòng tế bào hoặc thử nghiệm liên kết kháng thể định lượng hoặc định tính sẵn có trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Hai kháng thể liên kết với cùng một epitop hoặc các epitop chồng lấn nếu mỗi kháng thể ức chế hoàn toàn (ức chế) liên kết của kháng thể khác với kháng nguyên. Một kháng thể lớn hơn 1-, 5-, 10-, 20- hoặc 100 lần kháng thể còn lại sẽ ức chế liên kết của kháng thể còn lại ít nhất là 50% nhưng tốt hơn là 75%, 90% hoặc thậm chí là 99% như được xác định trong thử nghiệm liên kết cạnh tranh (xem, ví dụ, Junghans et al., Cancer Res. 1990 50:1495-1502). Theo cách khác, hai kháng thể có cùng epitop nếu gần như tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên mà làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của một kháng thể sẽ làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của kháng thể còn lại. Hai kháng thể có các epitop chồng lấn nếu một số đột biến axit amin mà làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của một kháng thể sẽ làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của kháng thể còn lại.

Để xác định xem kháng thể có cạnh tranh liên kết với kháng thể ASIC1 tham chiếu, phương pháp liên kết đã mô tả ở trên được tiến hành theo hai hướng: hướng thứ nhất, kháng thể tham chiếu được cho liên kết với phân tử ASIC1 trong điều kiện bão hòa liên kết, sau đó đánh giá liên kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử ASIC1. Theo hướng thứ hai, kháng thể thử nghiệm được cho liên kết với phân tử ASIC1 trong điều kiện bão hòa liên kết, sau đó đánh giá liên kết của kháng thể tham chiếu với phân tử ASIC1. Nếu theo cả hai hướng thì, chỉ có khía cạnh đầu tiên (bão hòa liên kết), đó là kháng thể có khả năng liên kết với phân tử ASIC1, thì kết luận rằng kháng thể thử nghiệm và kháng thể tham chiếu có sự cạnh tranh liên kết đặc hiệu với ASIC1. Người có kỹ năng bình thường trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng, một kháng thể cạnh tranh liên kết với kháng thể tham chiếu có thể không nhất thiết phải liên kết với cùng epitop

với kháng thể tham chiếu, nhưng có thể cản trở không gian liên kết của kháng thể tham chiếu bằng cách liên kết với epitop chồng lấp hoặc liền kề.

Sản xuất kháng thể người

Phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể đơn dòng ở người có chiều dài đầy đủ là đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phương pháp bất kỳ đã biết này có thể được dùng trong nội dung của sáng chế để tạo ra kháng thể người liên kết đặc hiệu với người ASIC1.

Sử dụng công nghệ VELOCIMMUNE™ hoặc phương pháp bất kỳ đã biết khác để tạo ra kháng thể đơn dòng, kháng thể khảm có ái lực cao với ASIC1 ban đầu được phân lập có vùng biến đổi ở người và vùng cố định ở chuột. Như trong phần thử nghiệm dưới đây, kháng thể được phân tích đặc tính và chọn theo đặc tính mong muốn, bao gồm ái lực, độ chọn lọc, epitop, v.v.. Vùng cố định ở chuột nhất được thay thế bằng vùng cố định mong muốn ở người để tạo ra kháng thể người có chiều dài đầy đủ theo sáng chế, ví dụ, IgG1 hoặc IgG4 kiểu đại hoặc được cải biến. Khi vùng cố định được chọn có thể thay đổi theo mục đích sử dụng cụ thể thì đặc tính liên kết với kháng thể với ái lực cao và tính đặc hiệu đích nằm trong vùng biến đổi.

Các tương đương sinh học

Kháng thể kháng ASIC1 và mảnh của kháng thể theo sáng chế bao gồm các protein có trình tự axit amin thay đổi theo từng kháng thể được mô tả nhưng chúng vẫn giữ lại được khả năng liên kết đặc hiệu với ASIC1 người. Các biến thể này của kháng thể và mảnh của kháng thể này chứa một hoặc nhiều đoạn bổ sung, đoạn loại bỏ, hoặc thay thế axit amin so với trình tự gốc, nhưng chúng vẫn biểu hiện hoạt tính sinh học gần như tương đương với hoạt tính sinh học của các kháng thể đã mô tả. Ngược lại, trình tự ADN mã hóa kháng thể ASIC1 theo sáng chế bao gồm trình tự chứa một hoặc nhiều một hoặc nhiều đoạn bổ sung, đoạn loại bỏ, hoặc thay thế nucleotit so với trình tự gốc, nhưng chúng vẫn mã hóa kháng thể ASIC1 hoặc mảnh của kháng thể này mà gần như tương đương sinh học với kháng thể ASIC1 hoặc mảnh của kháng thể này theo sáng chế. ví dụ về các trình tự axit amin và ADN cải biến đã được thảo luận ở trên.

Hai protein hoặc kháng thể liên kết kháng nguyên được coi là tương đương sinh học với nhau nếu, ví dụ, chúng là các tương đương dược học hoặc là các thay thế dược học có tốc độ và mức độ hấp thu không có nhiều khác biệt khi được dùng với liều ở cùng số mol trong các điều kiện thử nghiệm tương tự nhau, ở dạng liều đơn hoặc đa liều. Một

số kháng thể sẽ được coi là các tương đương sinh học hoặc các thay thế được học nếu chúng tương đương về mức độ hấp thụ nhưng không tương đương về tốc độ hấp thụ chúng và ngoài ra, chúng còn được coi là tương đương sinh học vì sự khác nhau trong tốc độ hấp thụ nằm ngoài mong muốn và nó được phản ánh trong nhãn sản phẩm, không nhất thiết phải thu được nồng độ được chất hiệu quả trong cơ thể, khi, ví dụ, sử dụng thường xuyên, và được coi là không có ý nghĩa trong y học đối với một sản phẩm thuốc cụ thể được nghiên cứu. Theo một phương án, hai protein liên kết với kháng nguyên được coi là tương đương sinh học khi không có sự khác biệt có ý nghĩa lâm sàng về độ an toàn, độ tinh khiết và hoạt lực giữa chúng.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên được coi là tương đương sinh học khi một bệnh nhân có thể chuyển qua dùng một hoặc nhiều giữa sản phẩm tham chiếu và sản phẩm sinh học mà không làm tăng nguy cơ xuất hiện các tác dụng phụ, kể cả sự thay đổi có ý nghĩa lâm sàng về tính sinh miễn dịch hoặc hiệu quả bị giảm đi so với việc tiếp tục sử dụng sản phẩm cũ mà không chuyển sang sản phẩm mới.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên được coi là tương đương sinh học nếu chúng đều tác động bằng cơ chế hoặc các cơ chế tác động thông thường trong điều kiện hoặc các điều kiện sử dụng ở mức các cơ chế này đã biết.

Tính tương đương sinh học có thể chứng minh được bằng phương pháp *in vivo* và *in vitro*. Các phương pháp xác định tính tương đương sinh học bao gồm, ví dụ, (a) thử nghiệm *in vivo* ở người và động vật có vú khác, trong đó nồng độ kháng thể hoặc chất chuyển hóa của nó được đo trong máu, huyết tương, huyết thanh hoặc dịch sinh học khác, dưới dạng hàm của thời gian; (b) thử nghiệm *in vitro* liên hệ với và là dự báo thích hợp cho số liệu về độ sinh khả dụng *in vivo* ở người; (c) thử nghiệm *in vivo* ở người và động vật có vú khác, trong đó tác dụng dược lý tức thời thích hợp của kháng thể (hoặc đích của nó) được xác định dưới dạng hàm của thời gian; và (d) trong thử nghiệm lâm sàng được kiểm soát chặt chẽ để xác định được độ an toàn, hiệu lực hoặc độ sinh khả dụng hoặc tương đương sinh học của kháng thể.

Các biến thể tương đương sinh học của kháng thể kháng ASIC1 theo sáng chế có thể được tạo cấu trúc, ví dụ, bằng cách tạo ra các thay thế khác nhau trên các gốc hoặc trình tự hoặc loại bỏ các gốc hoặc trình tự ở đầu tận cùng hoặc bên trong phân tử không tạo ra hoạt tính sinh học. ví dụ các gốc xystein không tạo ra hoạt tính sinh học có thể bị loại bỏ hoặc thay thế bằng axit amin khác để ngăn cản sự tạo ra cầu disulfua nội phân tử

không cần thiết hoặc không đúng khi hồi tính. Trong một nội dung khác, các kháng thể tương đương sinh học có thể bao gồm các biến thể của kháng thể kháng ASIC1 có các thay đổi axit amin mà làm cải biến đặc tính glycosyl hóa của kháng thể, ví dụ, các đột biến mà loại bỏ sự glycosyl hóa.

Tính chọn lọc theo loài và tính phản ứng chéo theo loài

Theo các phương án nhất định theo sáng chế, kháng thể kháng ASIC1 liên kết với ASIC1 người nhưng không liên kết với ASIC1 ở các loài khác. Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng ASIC1 liên kết với ASIC1 người và với ASIC1 từ một hoặc nhiều loài không phải là người. ví dụ kháng thể kháng ASIC1 theo sáng chế có thể liên kết với ASIC1 người và có thể liên kết hoặc không liên kết, vì trong trường hợp có thể, với ASIC1 ở một hoặc nhiều loài được chọn từ chuột nhắt, chuột đồng, chuột lang, động vật gặm nhấm, chuột nhảy, lợn, mèo, chó, thỏ, cừu, dê, ngựa, lạc đà, khỉ đầu chó, khỉ đuôi sóc, khỉ nâu hoặc tinh tinh. Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng ASIC1 ức chế có chọn lọc dòng ion do axit tạo ra đi qua kênh ASIC1 ở người (nhưng không đi qua kênh ASIC1 không ở người). Theo cách khác, theo các phương án nhất định, kháng thể kháng ASIC1 được đề xuất có khả năng ức chế dòng ion do axit tạo ra đi qua kênh ASIC1 ở người cũng như các kênh ASIC1 không phải ở người (ví dụ, chuột nhắt, chuột đồng, v.v..) (xem, *ví dụ, ví dụ 5*, ở đây).

Các thể tiếp hợp miễn dịch

Sáng chế bao gồm kháng thể đơn dòng kháng ASIC1 người được tiếp hợp với nhóm có tác dụng điều trị (“thể tiếp hợp miễn dịch”), như chất gây độc tế bào, dược chất dùng trong hóa trị liệu, chất ức chế miễn dịch hoặc đồng vị phóng xạ. Các chất gây độc tế bào bao gồm chất bất kỳ gây hại cho tế bào. ví dụ về các chất gây độc tế bào và dược chất dùng trong hóa trị liệu thích hợp để tạo ra các thể tiếp hợp miễn dịch là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, xem ví dụ WO 05/103081.

Đa đặc hiệu

Kháng thể theo sáng chế có thể có tính đặc hiệu đơn, đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu. Các kháng thể đa đặc hiệu có thể đặc hiệu với nhiều epitop khác nhau của một polypeptit đích hoặc có thể chứa các vùng liên kết kháng nguyên đặc hiệu với nhiều hơn một polypeptit. Xem, ví dụ, Tutt et al. (1991) J. Immunol. 147:60-69. Các kháng thể kháng ASIC1 người có thể được cho liên kết hoặc đồng biểu hiện với phân tử chức năng khác, ví dụ, peptit hoặc protein khác. ví dụ kháng thể hoặc mảnh của nó có thể được cho

liên kết chức năng (ví dụ, bằng cách kết hợp hóa học, dung hợp gen, kết hợp không đồng hóa trị hoặc theo cách khác) với một hoặc nhiều thực thể phân tử khác, như kháng thể khác hoặc mảnh của kháng thể, để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu có tính đặc hiệu liên kết hai.

Ví dụ về dạng kháng thể đặc hiệu kép có thể được sử dụng trong nội dung sáng chế liên quan đến việc sử dụng vùng CH3 thứ nhất của globulin miễn dịch (immunoglobulin - (Ig) và vùng CH3 thứ hai của globulin miễn dịch, trong đó vùng CH3 thứ nhất và thứ hai của Ig khác nhau ít nhất một axit amin, và trong đó việc khác nhau ít nhất một axit amin làm giảm khả năng liên kết của kháng thể đặc hiệu kép với protein A so với kháng thể đặc hiệu kéo không có sự khác nhau về axit amin. Theo một phương án, vùng CH3 thứ nhất của globulin miễn dịch liên kết với protein A và vùng CH3 thứ hai của globulin miễn dịch chứa đột biến mà làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của protein A như cải biến H95R (bằng cách đánh số exon theo hệ thống IMGT; H435R bằng cách đánh số theo hệ thống EU). Vùng CH3 có thể còn chứa cải biến Y96F (theo IMGT; Y436F theo EU). Các cải biến khác có thể phát hiện được trong vùng CH3 thứ hai bao gồm: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, và V82I (theo IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, và V422I theo EU) trong trường hợp kháng thể IgG1; N44S, K52N, và V82I (IMGT; N384S, K392N, và V422I by EU) trong trường hợp kháng thể IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, và V82I (theo IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, và V422I theo EU) trong trường hợp kháng thể IgG4. Các cải biến trên dạng kháng thể đặc hiệu kép được mô tả ở trên cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Chế phẩm dùng để điều trị và cách dùng

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể kháng-ASIC1 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Dược phẩm theo sáng chế được bào chế cùng với chất mang, tá dược thích hợp, và các chất khác để tạo ra sự cải thiện trong vận chuyển, phân phối, dung nhận và trong các quy trình khác. Rất nhiều công thức thích hợp có thể tìm thấy trong các công thức đã biết đối với tất cả các chuyên gia hóa dược: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Các chế phẩm này bao gồm, ví dụ, bột, dạng bột nhão, thuốc mỡ, mực, sáp, dầu, chất lỏng, lipid, các chất dẫn chứa lipid (cation hoặc anion) (như LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), thể dung hợp ADN, bột nhão hấp thu nước, nhũ tương dầu trong nước và nước trong dầu,

sáp cacbon dạng nhũ tương (polyetylen glycol có phân tử lượng khác nhau), gel bán rắn, và hỗn hợp bán rắn chứa sáp cacbon. ví dụ cũng xem: Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral compositions" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Liều kháng thể được dùng cho bệnh nhân có thể thay đổi phụ thuộc vào độ tuổi và thể trọng của bệnh nhân, bệnh cần điều trị, tình trạng sức khỏe, đường dùng, và v.v..Liều được ưu tiên thường được tính theo thể trọng hoặc diện tích bề mặt cơ thể. Khi kháng thể theo sáng chế được sử dụng để điều trị các tình trạng bệnh và bệnh đi kèm hoạt động của ASIC1 ở đối tượng là người lớn, thuận lợi hơn nếu dùng kháng thể theo sáng chế trong tĩnh mạch, thường ở liều đơn nằm trong khoảng từ 0,01 đến 20 mg/kg thể trọng, tốt hơn nữa nếu nằm trong khoảng từ 0,02 đến 7, nằm trong khoảng từ 0,03 đến 5, hoặc nằm trong khoảng từ 0,05 đến 3 mg/kg thể trọng. Tùy thuộc vào mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh, tần xuất và khoảng thời gian có thể được điều trị.

Liều hiệu quả và phác đồ dùng các kháng thể kháng ASIC có thể được xác định theo kinh nghiệm, ví dụ, sự tiến triển của bệnh nhân có thể được theo dõi bằng các đánh giá định ký, và do đó, liều được điều chỉnh. Hơn thế nữa, tỷ lệ liều giữa các loài có thể được thực hiện sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

Các hệ thống phân phối khác nhau là đã biết và có thể được sử dụng để phân phối dược phẩm theo sáng chế, ví dụ, bao nang trong lidương tnhom, vi hạt, vi viên nang, tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện virus đột biến, nhập bào qua trung gian thụ thể (xem, ví dụ, Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Phương pháp phân phối bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trong da, trong cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch, dưới da, trong mũi, ngoài màng cứng, và qua đường miệng. Chế phẩm có thể được dùng bằng đường bất kỳ thuận lợi, ví dụ, bằng cách truyền, hoặc tiêm liều lớn, bằng cách hấp thu qua lớp biểu mô hoặc lớp niêm mạc (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc âm đạo và niêm mạc ruột, v.v..) và có thể được dùng cùng với các chất khác có hoạt tính sinh học. Có thể dùng toàn thân hoặc khu trú.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được phân phối dưới da hoặc trong tĩnh mạch bằng xylanh và kim tiêm tiêu chuẩn. Ngoài ra, nếu phân phối dưới da, thì thiết bị phân phối dạng bút sẽ dễ dàng phân phối dược phẩm theo sáng chế. Thiết bị phân phối dạng bút này có thể dùng nhiều lần hoặc bỏ đi. Thiết bị phân phối dạng bút dùng nhiều lần thường sử dụng một loại hộp có thể thay thế, hộp này chứa dược phẩm. Ngay khi toàn bộ

được phẩm trong hộp được dùng và hộp sẽ rỗng, hộp rỗng này có thể dễ dàng lấy ra và thay bằng hộp khác chứa được phẩm. Thiết bị phân phối dạng bút sau đó có thể sử dụng được nhiều lần. Trong thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần, không có hộp thay thế. Nói cách khác, thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần được điền đầy trước bằng được phẩm và được giữ trong khoang chứa bên trong thiết bị. Khi khoang chứa không còn được phẩm, toàn bộ thiết bị sẽ được bỏ đi.

Rất nhiều bút tái sử dụng và thiết bị phân phối tự tiêm có thể được sử dụng để phân phối chế phẩm theo sáng chế dưới da. Các ví dụ về bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bút AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), bút DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), bút HUMALOG MIX 75/25™, bút HUMALOG™, bút HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), bút BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, và OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), trong số rất nhiều sản phẩm khác. Các ví dụ về bút dùng một lần có các ứng dụng trong phân phối được phẩm sáng chế dưới da bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bút SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), và KWIKPEN™ (Eli Lilly), thiết bị tự tiêm SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.), và bút HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), trong số rất nhiều sản phẩm khác.

Trong một số trường hợp, được phẩm có thể được phân phối trong hệ giải phóng có kiểm soát. Theo một phương án, bơm có thể được dùng đến (xem Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). Theo phương án khác, các nguyên liệu polyme có thể được dùng đến, xem Medical Applications of Controlled Release, Langer và Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Theo phương án khác nữa, hệ giải phóng kéo dài có kiểm soát có thể được đặt ở vị trí mong muốn, do đó chỉ cần dùng một phần liều toàn thân (xem, ví dụ, Goodson, 1984, ở Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138). Các hệ giải phóng có kiểm soát khác được thảo luận trong tài liệu: Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Chế phẩm để tiêm có thể bao gồm các dạng liều để tiêm trong tĩnh mạch, dưới da, trong da, và trong cơ, truyền nhỏ giọt, v.v... Các chế phẩm để tiêm này có thể được bảo

chế theo phương pháp đã được biết đến một cách rộng rãi. ví dụ các chế phẩm để tiêm có thể được bào chế, ví dụ, bằng cách hòa tan, tạo hỗn dịch hoặc nhũ hóa kháng thể hoặc muối của nó được mô tả ở trên, trong môi trường nước vô trùng hoặc môi trường dầu thường dùng để tiêm. Đối với môi trường nước để tiêm, ví dụ, nước muối sinh lý, dung dịch đẳng trương chứa glucoza và các chất phụ trợ khác, v.v., có thể được sử dụng kết hợp với chất làm tan thích hợp như rượu (ví dụ, etanol), rượu đa chức (ví dụ, propylen glycol, polyetylen glycol), chất hoạt động bề mặt không ion hóa [Ví dụ polysorbate 80, HCO-50 (sản phẩm cộng hợp của polyoxyetylen (50 mol) với dầu thầu dầu đã được hydro hóa)], v.v.. Đối với môi trường dầu, ví dụ, dầu vừng, dầu đậu nành, v.v., có thể được sử dụng kết hợp với chất làm tan như benzyl benzoat, rượu benzylic, v.v.. Do đó, tốt hơn nếu chế phẩm để tiêm đã bào chế được điền đầy vào ống tiêm thích hợp.

Thuận lợi hơn nếu được phẩm để dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa được mô tả ở đây được bào chế thành các dạng liều ở liều đơn vị được làm phù hợp với liều của thành phần có hoạt tính. Các dạng liều này trong liều đơn vị bao gồm, ví dụ, viên nén, viên tròn, viên nang, dạng tiêm (ống tiêm lớn), viên đạn, v.v.. Lượng kháng thể nêu trên có mặt thường nằm trong khoảng từ 5 đến 500 mg trong dạng liều trong liều đơn vị; đặc biệt là ở dạng để tiêm, được ưu tiên hơn nếu kháng thể nêu trên có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 100 mg và nằm trong khoảng từ 10 đến 250 mg đối với các dạng liều khác.

Sử dụng kháng thể trong điều trị bệnh

Kháng thể theo sáng chế có tác dụng, không kể những tác dụng khác, điều trị, ngăn ngừa và/hoặc làm giảm bệnh hoặc rối loạn đi kèm với hoặc qua trung gian hoạt tính của ASIC1 hoặc có thể điều trị được bằng cách ức chế hoặc làm giảm dòng ion qua trung gian ASIC1 do axit tạo ra ở các tế bào thần kinh của cá thể. ví dụ về các bệnh hoặc rối loạn có thể điều trị được bằng kháng thể kháng ASIC1 theo sáng chế bao gồm chứng đau các tình trạng bệnh như chứng đau thụ cảm đau và chứng đau nội tạng (ví dụ, chứng đau do bệnh viêm ruột/hội chứng ruột bị kích thích, viêm bàng quang kẽ, viêm tuyến tụy, viêm màng dạ con, hội chứng đau xương chậu mạn tính, v.v.), cũng như chứng đau đi kèm với viêm (ví dụ, đau cơ do viêm), viêm đa cơ, đau vết rạch sau khi mổ (ví dụ, chứng đau sau phẫu thuật), bệnh lý thần kinh (ví dụ, bệnh lý thần kinh do đái tháo đường), đau thần kinh tọa, đau dây thần kinh sau khi mắc bệnh zona, hội chứng đau cơ mặt mạn tính (ví dụ, chứng đau cơ mặt mạn tính), viêm khớp, tế bào hình lưỡi liềm, thiếu máu cục bộ

thần kinh ruột, chứng đau do bị què, gãy xương, bong, gãy xương do loãng xương, bệnh gút, đau nửa đầu, rối loạn gây đau cơ và khớp, hội chứng đau vùng phức hợp, chứng đau do bệnh zona cấp tính, v.v.. Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được dùng để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc làm giảm các tình trạng bệnh như, ví dụ, các bệnh thoái hóa thần kinh (ví dụ, các bệnh mất myelin như đa xơ cứng, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, v.v.), tổn thương não (ví dụ, đột quy, tổn thương não do chấn thương, axit hóa não), các rối loạn thần kinh (ví dụ, cơn tai biến ngập máu, các rối loạn liên quan đến cơn tai biến ngập máu), và các bệnh tâm thần (ví dụ, trầm cảm, rối loạn lo lắng, rối loạn căng thẳng sau chấn thương, rối loạn hoảng sợ, v.v..).

Kháng thể kháng ASIC1 theo sáng chế cũng hữu ích để điều trị hoặc ngăn ngừa chứng đau đi kèm với bệnh ung thư. "Chứng đau đi kèm bệnh ung thư" bao gồm, ví dụ, chứng đau do ung thư xương, bao gồm chứng đau do ung thư di căn vào xương (ví dụ, ung thư vú, ung thư tuyến tụy, ung thư phổi, sarcoma, ung thư thận, đa u tủy, v.v..). "Chứng đau đi kèm bệnh ung thư" cũng bao gồm chứng đau thường đi kèm với các tình trạng bệnh ung thư như, ví dụ, carcinom tế bào thận, carcinom tuyến tụy, ung thư vú, ung thư đầu và cổ, ung thư tuyến tiền liệt, u thần kinh đệm ác tính, sarcoma xương, ung thư ruột trực tràng, ung thư dạ dày, u trung biểu mô ác tính, đa u tủy, ung thư buồng trứng, ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư tuyến giáp, sarcoma hoạt dịch, hoặc u hắc sắc tố. Kháng thể kháng ASIC1 theo sáng chế cũng hữu ích để điều trị hoặc ngăn ngừa chứng đau do hoặc đi kèm với liệu pháp trị ung thư hoặc các phương pháp y tế điều trị ung thư, ví dụ, chứng đau thần kinh do hóa trị như chứng đau do hoặc đi kèm với việc điều trị bằng paclitaxel (Taxol™), docetaxel (Taxotere®); nitrosourea, cyclophosphamid, doxorubicin, epirubicin, 5-fluorouracil, topotecan, irinotecan, carmustin, estramustin, và các hóa chất dựa trên platin, như cisplatin, carboplatin, và iproplatin.

Điều trị phối hợp

Sáng chế bao gồm các chế độ dùng trong điều trị bao gồm việc dùng kháng thể kháng ASIC1 theo sáng chế kết hợp với ít nhất một thành phần có tác dụng điều trị khác. ví dụ không giới hạn phạm vi sáng chế về các thành phần này bao gồm các chất ức chế ASIC như, ví dụ, kháng thể kháng ASIC1 thứ hai, kháng thể định hướng vào thành phần ASIC khác (ví dụ, kháng thể kháng-ASIC2, kháng thể kháng-ASIC3, kháng thể kháng-ASIC4, v.v.), chất ức chế peptid ASIC (ví dụ, psalmotoxin-1 [PcTx1], APETx2, v.v..),

và/hoặc chất ức chế ASIC phân tử nhỏ (ví dụ, amilorit, A-317567, v.v.).

Các thành phần khác này có thể được dùng và cho lợi ích khi kết hợp với kháng thể kháng ASIC1 theo sáng chế bao gồm các chất ức chế xytokin (bao gồm các chất ức chế xytokin phân tử nhỏ và kháng thể liên kết với các xytokin như IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, hoặc các thụ thể tương ứng của nó), thuốc kháng khuẩn, thuốc kháng sinh, thuốc gây mê, corticosteroid và/hoặc NSAID.

(các) thành phần có tác dụng điều trị khác có thể được dùng trước, đồng thời hoặc sau khi dùng kháng thể kháng ASIC1 theo sáng chế; (để mô tả, các chế độ dùng này được coi là dùng kháng thể kháng ASIC1 "kết hợp với" thành phần khác có tác dụng điều trị).

Sử dụng kháng thể trong chẩn đoán bệnh

Kháng thể kháng ASIC1 theo sáng chế cũng có thể được dùng để phát hiện và/hoặc đo ASIC1, hoặc các tế bào biểu hiện ASIC1 ở mẫu, ví dụ, cho mục đích chẩn đoán. ví dụ kháng thể kháng ASIC1, hoặc mảnh của nó, có thể được dùng để chẩn đoán tình trạng bệnh hoặc bệnh đặc trưng bởi sự biểu hiện bất thường (ví dụ, biểu hiện quá mức, biểu hiện dưới mức bình thường, không biểu hiện, v.v.) ASIC1. ví dụ về các thử nghiệm chẩn đoán cho ASIC1 có thể bao gồm, ví dụ, cho mẫu, thu được từ bệnh nhân, tiếp xúc với kháng thể kháng ASIC1 theo sáng chế, trong đó kháng thể kháng ASIC1 được đánh dấu bằng phân tử đánh dấu có thể phát hiện được hoặc phân tử thông báo. Theo cách khác, kháng thể kháng ASIC1 không được đánh dấu có thể được dùng trong các ứng dụng chẩn đoán kết hợp với kháng thể thứ hai, chính kháng thể thứ hai này được đánh dấu để phát hiện được. Phân tử đánh dấu có thể phát hiện được hoặc phân tử thông báo có thể là đồng vị phóng xạ, như ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , hoặc ^{125}I ; nhóm phát huỳnh quang hoặc nhóm phát quang hóa học như isothioxyanat, hoặc rhodamin phát huỳnh quang; hoặc enzym như alkaline phosphatase, beta-galactosidase, peroxidase cải ngựa, hoặc luciferase. ví dụ cụ thể về các thử nghiệm có thể được dùng để phát hiện hoặc đo mức ASIC1 trong mẫu bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay - RIA), và thử nghiệm phân loại thử nghiệm được hoạt hóa bằng ánh sáng huỳnh quang (fluorescence-activated cell sorting - FACS).

Các mẫu có thể được dùng trong thử nghiệm chẩn đoán ASIC1 theo sáng chế bao gồm mẫu mô hoặc dịch bất kỳ có thể thu được từ bệnh nhân mà chứa lượng có thể phát hiện được của protein ASIC1, hoặc mảnh của nó, trong điều kiện sinh lý bình thường

hoặc điều kiện bệnh lý. Thông thường, các mức ASIC1 ở mẫu cụ thể thu được bệnh nhân khỏe mạnh (ví dụ, bệnh nhân không bị mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh đi kèm với mức hoặc hoạt tính của ASIC1 bất thường) sẽ được đo để bước đầu xác định mức cơ sở ASIC1 hoặc mức ASIC1 chuẩn. Mức ASIC1 cơ sở này sau đó có thể được so sánh với mức ASIC1 đo được ở mẫu thu được từ các cá thể bị nghi ngờ mắc bệnh hoặc tình trạng bệnh đến ASIC1.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được nêu ra chỉ để cung cấp cho người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này phần mô tả hoàn chỉnh và cách thức tiến hành và sử dụng phương pháp và các điều kiện theo sáng chế, và chúng không được dự định để giới hạn phạm vi của sáng chế cũng như phạm vi của đối tượng nêu trong sáng chế. Các tác giả sáng chế cũng đã cố gắng để đảm bảo tính chính xác cho các trị số được dùng (ví dụ, lượng, nhiệt độ, v.v..) nhưng một số sai sót thử nghiệm và độ lệch cũng nên được tính đến. Trừ khi có thông báo khác, nếu không các phần sẽ tính bằng phần trọng lượng, phân tử lượng là phân tử lượng trung bình, nhiệt độ đo bằng °C, và áp suất bằng hoặc gần bằng áp suất khí quyển.

Ví dụ 1. Tạo ra kháng thể người liên kết với ASIC1 người

Để tạo ra kháng thể kháng-ASIC1, quy trình gây miễn dịch ADN được sử dụng trong đó ADN plasmit mã hóa ASIC1 người có chiều dài đầy đủ, cùng với plasmit riêng biệt mã hóa chất điều chỉnh, được tiêm vào da chuột VELOCIMMUNE® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY). Vị trí tiêm sau đó được mở lỗ bằng điện để chuyển nhiễm các plasmit này vào vật chủ. Chuột VELOCIMMUNE® được sử dụng để gây miễn dịch chứa ADN mã hóa các vùng biến đổi của chuỗi nặng kappa và chuỗi nặng của globulin miễn dịch và thiếu gen *asic1a* nội sinh ở chuột. Đáp ứng miễn dịch với kháng thể được theo dõi bằng thử nghiệm liên kết tế bào sử dụng các tế bào được xử lý di truyền để biểu hiện ASIC1 người. Khi thu được đáp ứng miễn dịch mong muốn, thu hoạch các tế bào lá lách và dung hợp với các tế bào u tủy ở chuột để bảo toàn khả năng sống sót của chúng và tạo ra dòng tế bào lai. Các dòng tế bào lai được sàng lọc và chọn lọc để xác định các dòng tế bào mà tạo ra các kháng thể đặc hiệu ASIC1. Sử dụng kỹ thuật này để tạo ra một vài kháng thể kháng ASIC1 (nghĩa là, các kháng thể có miền biến đổi ở người và miền cố định ở chuột); ví dụ về kháng thể được tạo ra theo cách

này được ký hiệu như sau: H1M6712N, H1M6716N, H1M6718N, H1M7101N, H2M7103N, H3M6713N, H3M6715N, H3M6720N, H3M6721N, H3M6721N2, H3M6726N, H3M6760N, H3M7102N, và H3M7118N.

Kháng thể kháng ASIC1 được phân lập trực tiếp từ các tế bào B dương tính với kháng thể mà không cần dung hợp với các tế bào u tủy, như được mô tả ở US 2007/0280945A1. Bằng cách sử dụng phương pháp có thể tạo ra một vài kháng thể kháng ASIC1 ở người có chiều dài đầy đủ (*nghĩa là*, kháng thể có miền biến đổi ở người và miền biến đổi cố định ở người); ví dụ về kháng thể được tạo ra theo cách này được ký hiệu như sau: H4H6362P, H4H6363P, H4H6364P, H4H6366P, H4H6372P, H4H6374P, H4H6375P, H4H6379P, H4H6380P, H4H6381P, và H4H6383P.

Các đặc điểm sinh học nhất định của kháng thể kháng ASIC1 được tạo ra theo phương pháp của ví dụ này và được lấy làm ví dụ được mô tả chi tiết trong các ví dụ được nêu dưới đây.

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

Bảng 1 dưới đây thể hiện cặp trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể kháng ASIC1 được chọn và các chất xác định kháng thể tương ứng.

Bảng 1

Ký hiệu của kháng thể	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
6712N	2	4	6	8	10	12	14	16
6716N	18	20	22	24	26	28	30	32
6718N	34	36	38	40	42	44	46	48
7101N	50	52	54	56	58	60	62	64
7103N	66	68	70	72	74	76	78	80
6713N	82	84	86	88	90	92	94	96
6715N	98	100	102	104	106	108	110	112
6720N	114	116	118	120	122	124	126	128
6721N	130	132	134	136	138	140	142	144
6721N2	146	148	150	152	154	156	158	160
6726N	162	164	166	168	170	172	174	176
6760N	178	180	182	184	186	188	190	192
7102N	194	196	198	200	202	204	206	208
7118N	210	212	214	216	218	220	222	224
6362P	226	228	230	232	234	236	238	240
6363P	242	244	246	248	250	252	254	256
6364P	258	260	262	264	266	268	270	272
6366P	274	276	278	280	282	284	286	288
6372P	290	292	294	296	298	300	302	304

6374P	306	308	310	312	314	316	318	320
6375P	322	324	326	328	330	332	334	336
6379P	338	340	342	344	346	348	350	352
6380P	354	356	358	360	362	364	366	368
6381P	370	372	374	376	378	380	382	384
6383P	386	388	390	392	394	396	398	400

Kháng thể thường được gọi ở đây theo danh pháp sau: tiền tố Fc (ví dụ, "H4H", "H1M", "H2M"), sau đó là số xác định (ví dụ, "6712" hoặc "6362" như được thể hiện trong Bảng 1), sau đó là hậu tố "P" hoặc "N". Do đó, theo danh pháp này, kháng thể ở đây có thể gọi là, ví dụ, "H1M6712N" hoặc "H4H6362P". Tiền tố H4H, H1M, và H3M trong ký hiệu của kháng thể được sử dụng ở đây chỉ phân Fc cụ thể của kháng thể. ví dụ kháng thể "H1M" có IgG1 Fc ở chuột, trong khi đó kháng thể "H4H" có IgG4 Fc ở đây. Người có kỹ năng bình thường trong lĩnh vực kỹ thuật này kháng thể H1M hoặc H3M có thể cũng được chuyển hóa thành H4H kháng thể, và ngược lại, nhưng trong trường hợp bất kỳ, các miền biến đổi (bao gồm các CDR) – được thể hiện bằng chất đánh dấu có số được thể hiện trong Bảng 1 – sẽ giữ nguyên.

Ví dụ 3. Liên kết của kháng thể với tế bào biểu hiện ASIC1 ở người hoặc chuột có chiều dài đầy đủ

Để phân tích thêm kháng thể kháng ASIC1, khả năng liên kết với (a) dòng tế bào 3TC ở chuột nguyên bào sợi được chuyển nhiễm ổn định để biểu hiện ASIC1 người có chiều dài đầy đủ (3T3/hASIC1; axit amin 1-528 của trình tự có mã số truy cập NCBI NP_001086.2 [SEQ ID NO:401]), (b) dòng tế bào 3T3 được chuyển nhiễm ổn định để biểu hiện quá mức ASIC1a ở chuột có chiều dài đầy đủ (3T3/mASIC1a; axit amin 1-526 có mã số truy cập NCBI NP_033727), hoặc (c) dòng tế bào ND7 (ECACC, # 92090903) là dòng tế bào dung hợp của u nguyên bào thần kinh ở chuột nhắt và tế bào hạch rễ lưng tủy sống ở chuột đồng biểu hiện nội sinh ASIC1 ở chuột đồng, được xác định sử dụng phương pháp đo dòng tế bào (flow cytometry - FACS). Các tế bào ND7 được khu biệt bằng cách thay thế môi trường nuôi cấy bằng môi trường nuôi cấy có nồng độ huyết thanh thấp (0,5% FBS) chứa dibutyryl-cAMP 1mM (Cat. No. sc-201567A, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Liên kết FACS được thử nghiệm đối với một số kháng thể trên cả các tế bào ND7 chưa biệt hóa và các tế bào ND7 đã biệt hóa.

Để thực hiện các thử nghiệm liên kết FACS, các tế bào kết dính được thu sử dụng EDTA 1 mM ở PBS, sau đó rửa, và tái tạo huyền phù trong PBS lạnh chứa FBS 5%. Đối

với mỗi thử nghiệm liên kết, mỗi kháng thể kháng ASIC1 (ở nồng độ cuối cùng của kháng thể đã tinh chế bằng 10 nM hoặc bằng 3,3 nM đối với dịch nổi chứa kháng thể liên kết với các tế bào 3T3/hASIC1 và 5nM đối với liên kết với tế bào 3T3/mASIC1a hoặc ND7) được bổ sung vào các tế bào với mật độ 250,000 trong 500 μ L PBS bằng FBS 5%. Sau khi ủ trong 20 phút ở nhiệt độ phòng, kháng thể thứ hai nhận biết Fc người (Cat. No. 109-136-098, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) hoặc Fc ở chuột (Cat. No. 550826, BD Biosciences, San Jose, CA) và được dung hợp với allophycoxyanin, sau được bổ sung vào hỗn hợp tế bào ở nồng độ cuối cùng bằng 13,3 nM. Sau khi ủ trong 20 phút trên đá, các tế bào này được rửa và tái tạo huyền phù trong PBS chứa FBS 5%, sau đó phân loại và phân tích bằng dụng cụ đo dòng tế bào (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA) để xác định liên kết tương đối của kháng thể thử nghiệm với dòng tế bào được thử nghiệm. Biểu đồ hóa mô của các tế bào được nhuộm bằng kháng thể kháng ASIC1 được so sánh với biểu đồ hóa mô của các tế bào chỉ được nhuộm bằng kháng thể thứ hai. % tín hiệu ASIC1 khi sử dụng một mình kháng thể thứ hai được tính sử dụng phần mềm FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). Các mẫu được nhuộm bằng kháng thể kháng ASIC1 được ghi dưới dạng dương tính với FACS khi được tập hợp lại lớn hơn 10%. Các mẫu được nhuộm bằng kháng thể kháng ASIC1 được ghi là âm tính với FACS khi được tập hợp lại lớn hơn 1%. Các mẫu được nhuộm bằng kháng thể kháng ASIC1 được ghi là yếu khi được tập hợp lại nằm trong khoảng từ 1% đến 10%. Đặc tính liên kết của kháng thể kháng ASIC1 với các tế bào 3T3/hASIC1, tế bào 3T3/mASIC1a và tế bào ND7 được tóm tắt trong Bảng 2 (ND = không xác định được).

Bảng 2: Liên kết đặc hiệu của kháng thể kháng ASIC1 được xác định bằng FACS

Kháng thể	Liên kết FACS với 3T3/hASIC1	Liên kết FACS với 3T3/mASIC1a	Liên kết FACS với các tế bào ND7 chưa biệt hóa	Liên kết FACS với các tế bào ND7 đã biệt hóa
H1M6712N	Dương tính	ND	ND	ND
H3M6721N	Dương tính	Dương tính	Âm tính	ND
H1M6718N	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính
H4H6372P	Âm tính	ND	ND	ND
H4H6374P	Âm tính	ND	ND	ND
H4H6375P	Âm tính	ND	ND	ND
H4H6379P	Âm tính	ND	ND	ND
H4H6380P	Âm tính	ND	ND	ND
H4H6381P	Âm tính	ND	ND	ND
H4H6383P	Âm tính	ND	ND	ND
H4H6362P	Âm tính	ND	ND	ND
H4H6363P	Dương tính	ND	ND	ND
H4H6364P	Dương tính	ND	ND	ND

H1M7101N	Dương tính	Dương tính	Dương tính	ND
H1M6716N	Dương tính	ND	ND	ND
H3M6726N	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính
H3M6720N	Dương tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính
H3M6713N	Dương tính	ND	ND	ND
H3M7102N	Dương tính	Dương tính	Dương tính	ND
H3M6760N	Dương tính	ND	ND	ND
H2M7103N	Dương tính	Dương tính	Âm tính	Âm tính
H3M6715N	Dương tính	ND	ND	ND
H3M7118N	Dương tính	Yếu	Yếu	Dương tính
H4H6366P	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính
H4H6721N2	Dương tính	Dương tính	Dương tính	Dương tính

Ái lực liên kết của kháng thể đã chọn với các tế bào 3T3/hASIC1 còn được xác định bằng FACS sử dụng nhiều nồng độ kháng thể (67 nM, 6,7 nM, 0,67 nM, 67 pM, và 6,7 pM) từ đó tính được giá trị EC_{50} gần đúng. Tín hiệu cường độ ánh sáng huỳnh quang trung bình (mean fluorescence intensity - MFI) được quan sát thấy cho kháng thể kháng ASIC1 được trừ cho tín hiệu nền (sử dụng một mình kháng thể thứ hai) và được xây dựng trên đồ thị điểm dưới dạng hàm của nồng độ kháng thể để xác định các giá trị EC_{50} sử dụng GraphPad Prism (Bảng 3).

Bảng 3: Giá trị EC_{50} cho các kháng thể kháng ASIC1 đã chọn liên kết với các tế bào 3T3/hASIC1

Kháng thể	EC_{50}
H1M6712N	< 100 pM
H3M6721N	85 pM
H1M6718N	550 pM
H4H6363P	836 pM
H3M6713N	215 pM
H3M6715N	72 pM
H1M6716N	23 pM
H3M6720N	1,1 nM
H3M6726N	2,6 nM
H3M6760N	853 pM
H1M7101N	720 pM
H3M7102N	5,4 nM
H3M7118N	>67 nM
H2M7103N	1,7 nM
H4H6364P	1,5 nM
H4H6366P	1,0 nM
H4H6721N2	1,7 nM

Như được thể hiện trong Bảng 2, 17 trong số 25 kháng thể được thử nghiệm thể hiện liên kết đặc hiệu với dòng tế bào 3T3/hASIC1; 8 trong số 10 kháng thể được thử nghiệm thể hiện dương tính liên kết với các tế bào 3T3/mASIC1a; 6 trong số 10 kháng thể được thử nghiệm thể hiện dương tính liên kết với dòng tế bào ND7 chưa được biệt hóa; và 5 trong số 7 kháng thể được thử nghiệm thể hiện dương tính liên kết với dòng tế

bào ND7 đã biệt hóa. Đáng chú ý là một kháng thể (H3M7118N) thể hiện liên kết yếu với cả 3T3/mASIC1a lẫn dòng tế bào ND7 chưa được biệt hóa nhưng cho kết quả liên kết dương tính với các tế bào 3T3/hASIC1. Như được thể hiện trong Bảng 3, kháng thể kháng ASIC1 được thử nghiệm ở nhiều nồng độ kháng thể thể hiện ái lực liên kết FACS cao với giá trị EC_{50} gần đúng thấp và bằng 23 pM khi liên kết với các tế bào 3T3/hASIC1.

Ví dụ 4. Kháng thể kháng ASIC1 ức chế việc truyền tín hiệu tế bào qua trung gian axit trong thử nghiệm dòng canxi tế bào

Để phân tích chức năng ức chế việc truyền tín hiệu tế bào qua trung gian axit của kháng thể kháng ASIC1, thử nghiệm đo dòng canxi tế bào được thực hiện sử dụng dòng tế bào, HEK293 CL:1F10 (1F10), được chuyển nhiễm tạm thời để biểu hiện ASIC1 người (các axit amin 1-528 có mã số truy cập NCBI NP_0010862.2 [SEQ ID NO:401]). Dòng tế bào này được tạo ra từ dòng tế bào gốc HEK293/D9 đã được chuyển nhiễm ổn định để biểu hiện Par2 người. Các tế bào đã chuyển nhiễm được ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 2 ngày trước khi đặt lại vào đĩa thử nghiệm đáy màu đen, trong suốt, 96 lỗ ở nồng độ 100,000 tế bào/lỗ. Các tế bào này được phép kết dính vào đĩa ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút, sau đó ủ qua đêm ở 37°C, 5% CO₂.

Kit thử nghiệm canxi Fluo-4 NW (Invitrogen, # F36206) được sử dụng để đo mức dòng canxi nội bào trong các tế bào được hoạt hóa bằng đệm có độ pH thấp. Đệm thử nghiệm được chuẩn bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 50 µL probenecid (77 µg/µL) được bổ sung vào 5 mL đệm C (2xHBSS), sau được bổ sung vào thành phần A (thuốc nhuộm Fluo-4). Kháng thể kháng ASIC1 được pha loãng trong thuốc nhuộm Fluo-4 đến nồng độ 250 nM đối với thử nghiệm ức chế đơn điểm. Kháng thể ức chế dòng canxi được kích thích bằng đệm có độ pH thấp còn được phân tích thêm trong thử nghiệm này sử dụng nhiều nồng độ kháng thể. Kháng thể kháng ASIC1 được pha loãng đến nồng độ 250 nM trong thuốc nhuộm và 8 pha loãng pha loãng theo tỷ lệ 1:3 (nằm trong khoảng từ 250 đến 0,1 nM) được dùng để xác định giá trị IC_{50} ức chế của mỗi kháng thể. Môi trường nuôi cấy tế bào được loại bỏ khỏi đĩa thử chứa các tế bào và 50 µL thuốc nhuộm Fluo-4 chứa kháng thể kháng ASIC1 sau đó được bổ sung vào. Đĩa này được ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong 1 giờ trước khi đọc bằng FLIPR Tetra (Molecular Devices).

Độ pH của đệm C được điều chỉnh đến độ pH=5,0 hoặc pH=5,5 và được bổ sung vào đĩa bảo quản trước khi bổ sung vào các tế bào. Sau đó FLIPR Tetra được bổ sung 50

μL đệm có độ pH thấp từ đĩa bảo quản vào các tế bào trong đĩa thử nghiệm ở tốc độ 50 $\mu\text{L}/\text{giây}$. Tín hiệu canxi được tạo ra trong mỗi lỗ trong 10 giây trước khi bổ sung đệm (trước khi đọc) và trong 100 giây sau khi bổ sung đệm được đo bằng FLIPR Tetra sử dụng cài đặt bước sóng kích thích ở 470-490 nm và cài đặt bước sóng phát xạ 515-575 nm. Sự khác nhau giữa giá trị lớn nhất quan sát được sau khi bổ sung đệm và giá trị nhỏ nhất trong toàn bộ thử nghiệm bao gồm cả trường hợp trước khi đọc và sau khi bổ sung đệm được tính toán và thể hiện bằng đồ thị sử dụng GraphPad Prism. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 4 và 5.

Bảng 4: Ức chế dòng canxi tế bào qua trung gian axit bằng 250 nM kháng thể kháng ASIC1 ở pH=5,5 và 5,0

FLIPR		
	Thử nghiệm đơn điểm 250 nM	
Kháng thể	Độ pH=5,5	Độ pH=5,0
H1M6712N	Yếu	Âm tính
H3M6721N	Dương tính	Dương tính
H1M6718N	Dương tính	Dương tính
H1M7101N	Âm tính	Âm tính
H1M6716N	Yếu	Yếu
H3M6726N	Âm tính	Âm tính
H3M6720N	Âm tính	Âm tính
H3M6713N	Yếu	Yếu
H3M7102N	Âm tính	Âm tính
H3M6760N	Dương tính	Yếu
H2M7103N	Âm tính	Âm tính
H3M6715N	Yếu	Yếu
H3M7118N	Âm tính	Âm tính
H4H6372P	Yếu	Âm tính
H4H6374P	Yếu	Âm tính
H4H6375P	Yếu	Yếu
H4H6379P	Âm tính	Âm tính
H4H6380P	Yếu	Âm tính
H4H6381P	Yếu	Âm tính
H4H6383P	Âm tính	Âm tính
H4H6362P	Âm tính	Âm tính
H4H6363P	Âm tính	Âm tính
H4H6364P	Âm tính	Âm tính
H4H6366P	Âm tính	Âm tính

Bảng 5: Tác dụng ức chế dòng canxi tế bào qua trung gian axit phụ thuộc liều của kháng thể kháng ASIC1 ở pH=5,5 và 5,0

Kháng thể	Đường cong liều FLIPR			
	% ức chế ở độ pH=5,5	IC ₅₀ nM ở độ pH=5,5	% ức chế ở độ pH=5,0	IC ₅₀ nM ở độ pH=5,0
H1M6712N	64%	6 nM	10%, Không phụ thuộc liều	Không phụ thuộc liều
H3M6721N	44%	0,3 nM	25%	IC*
H1M6718N	78%	0,6 nM	48%	IC*
H3M6713N	63%	0,2 nM	23%, Không phụ thuộc liều	Không phụ thuộc liều
H3M6715N	39%	0,1 nM	10%, Không phụ thuộc liều	Không phụ thuộc liều
H1M6716N	37%	1,1 nM	25%, Không phụ thuộc liều	Không phụ thuộc liều
H3M6760N	71%	0,9 nM	56%	1 nM
H4H6375P	27%	0,1 nM	10%, Không phụ thuộc liều	Không phụ thuộc liều
H4H6380P	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính
H4H6381P	Âm tính	Âm tính	Âm tính	Âm tính

Như được thể hiện trong Bảng 4, hai trong số 24 kháng thể, H3M6721N và H1M6718N, thể hiện mức ức chế dòng canxi (dương tính) lớn hơn 30% ở một nồng độ 250 nM ở cả độ pH=5,5 lẫn độ pH=5,0, và một kháng thể (H3M6760N) thể hiện mức ức chế lớn hơn 30% chỉ ở độ pH=5,5. Hai mươi trong số 24 kháng thể ở pH=5,5 và 17 trong số 24 kháng thể ở pH=5,0 được thử nghiệm ở một nồng độ 250 nM không thể hiện mức ức chế đo được (âm tính). 9 trong số 24 kháng thể ở pH=5,5, và 5 trong số 24 kháng thể ở pH=5,0, được thử nghiệm ở một nồng độ 250 nM thể hiện ảnh hưởng làm giảm dòng canxi ở mức nằm trong khoảng từ 10 đến 30% (yếu).

Như được thể hiện trong Bảng 5, tám trong số 10 kháng thể được thử nghiệm tác dụng ức chế phụ thuộc liều ở pH=5,5 thể hiện mức ức chế (%) dòng canxi nằm trong khoảng từ 27% đến 78% và giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng từ 0,1 nM đến 6 nM. Hai kháng thể được thử nghiệm tác dụng ức chế dòng canxi phụ thuộc liều ở pH=5,5, H4H6380P và H4H6381P, thể hiện mức ức chế không đo được. Hai trong số 10 kháng thể được thử nghiệm tác dụng ức chế phụ thuộc liều pH=5,0, H3M6721N và H1M6718N, thể hiện mức ức chế dòng canxi lần lượt là 25% và 48%, nhưng giá trị IC₅₀ không thể xác định được (IC*) mặc dù có thể hiện sự phụ thuộc liều. Một trong số 10 kháng thể được thử nghiệm tác dụng ức chế phụ thuộc liều ở pH=5,0, H3M6760N, thể hiện mức ức chế 56% dòng canxi và giá trị IC₅₀ bằng 1 nM. 5 trong số 10 kháng thể được thử nghiệm tác

dụng tác dụng ức chế dòng canxi phụ thuộc liều ở pH=5,0 thể hiện sự ức chế không phụ thuộc liều nhưng ức chế từ 10% đến 25% dòng canxi ở mỗi nồng độ kháng thể được thử nghiệm. Hai trong số 10 kháng thể được thử nghiệm tác dụng ức chế phụ thuộc liều ở pH=5,0, H4H6380P và H4H6381P thể hiện mức ức chế không đo được.

Ví dụ 5. Kháng thể kháng ASIC1 ức chế dòng ion ASIC1 do axit tạo ra trong thử nghiệm kẹp ráp nối kẹp điện thế tự động [Q-Patch]

Q-Patch (Sophion Bioscience, Inc., Ballerup, Denmark), một hệ thống kẹp ráp nối dựa trên vi chip, được sử dụng để xác định khả năng ức chế dòng ion ASIC1 ở người của kháng thể kháng ASIC1 ở dòng tế bào HEK293 được chuyển nhiễm ổn định biểu hiện kênh ASIC1 có chiều dài đầy đủ ở người (HEK/hASIC1; các axit amin 1-528 có mã số truy cập NCBI NP_001086.2) hoặc dòng ASIC1a ở chuột ở dòng tế bào 3T3 được chuyển nhiễm ổn định biểu hiện kênh ASIC1a có chiều dài đầy đủ ở người (3T3/mASIC1a; các axit amin 1-526 có mã số truy cập NCBI NP_033727).

Các tế bào HEK/hASIC1 được nuôi cấy trong môi trường có nồng độ glucoza cao DMEM, 10% huyết thanh bào thai bê (fetal bovine serum - FBS), 1% axit amin không thiết yếu và 500 µg/mL Geneticin® (Invitrogen, # 10131). Các tế bào 3T3/mASIC1a được nuôi cấy trong môi trường có nồng độ glucoza cao DMEM, 10% FBS, 1% penixilin/streptomycin/glutamin (Invitrogen, #10378-016), và 400ug/mL Geneticin®. Vào ngày ghi kết quả, các tế bào được thu hoạch bằng dung dịch liên kết tế bào Detachin (Genlantis, San Diego, CA, # T100100), được ly tâm và tái tạo huyền phù trong 1,4 mL dung dịch không chứa huyết thanh [môi trường CHO-SFM-II (Invitrogen, # 31033), HEPES 25 mM và penixilin/streptomycin 100 đơn vị/mL]. Huyền phù chứa tế bào sau đó được ủ trong máy lắc trong 40 phút ở nhiệt độ phòng (RT). Hai hoặc ba kháng thể kháng ASIC1 và kháng thể đối chứng được chạy song song trong một thử nghiệm. Do đó, vào thời điểm cuối của quá trình ủ, huyền phù chứa tế bào trong 4 ống (khoảng 5×10^5 tế bào trong 300 µL/ống) và kháng thể được pha loãng đến nồng độ cuối cùng bằng 100 nM trực tiếp trong các ống cho thử nghiệm một điểm, hoặc ở khoảng nồng độ cho các thử nghiệm đáp ứng liều và sau đó ủ trong máy lắc trong 20 phút ở RT. vào thời điểm cuối của quá trình ủ, các tế bào được nạp lên Q-Patch.

Các tế bào đầu tiên phủ bằng đệm ở độ pH=7,4 (NaCl 140 mM, KCl 4 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, glucoza 5 mM và HEPES 10 mM) chứa 0,2% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh bò (đệm ngoại bào) và kháng thể quân tam ở nồng

độ cuối cùng 100 nM cho các thử nghiệm đơn điểm, hoặc ở khoảng nồng độ cho các thử nghiệm đáp ứng liều, được bổ sung vào và được phép ủ trong khoảng 3 phút. Sau đó, dòng ASIC1 ở người được tạo ra trong 1 giây bằng cách bổ sung đệm ngoại bào để điều chỉnh độ pH=6,0 đồng thời giữ các tế bào ở điện thế giữ -80 mV. 30 μ M amilorit được bổ sung vào sau mỗi lần ghi trên Q-Patch để chứng minh rằng các tế bào này có đáp ứng trong toàn bộ thử nghiệm. Thành phần của dung dịch nội bào dùng để ghi là CsCl 140 mM, MgCl₂ 4 mM, EGTA 10 mM và HEPES 10 mM; được điều chỉnh về pH=7,3 bằng CsOH.

Tất cả các kháng thể kháng ASIC1 được thử nghiệm với bốn bản sao song song với kháng thể đối chứng không liên quan. Việc ức chế kênh được xác định dưới dạng % ức chế dòng ASIC khi có mặt kháng thể kháng ASIC1 so với dòng ASIC khi có mặt kháng thể đối chứng không liên quan, được tính trung bình từ nhiều thử nghiệm ức chế. Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 6.

Bảng 6: % Ức chế dòng ASIC1 do axit tạo ra ở người bằng kháng thể kháng ASIC1 ở 100 nM

Kháng thể	Số lỗ được thử nghiệm	Nồng độ kháng thể (nM)	Mức độ ức chế dòng ASIC1 (%)
H1M6712N	10	100	0
H3M6715N	7	100	30
H3M6720N	7	100	82
H3M6726N	3	100	85
H3M6721N	14	100	100
H1M6718N	8	100	100
H4H6372P	4	100	0
H4H6374P	8	100	0
H4H6375P	5	100	0
H4H6379P	4	100	30
H4H6380P	5	100	0
H4H6381P	6	100	25
H4H6383P	4	100	15
H4H6362P	4	100	29
H4H6363P	4	100	0
H4H6364P	2	100	0

H4H6366P	8	100	72
H3M7099N	4	100	25
H1M7101N	4	100	97
H3M7102N	3	100	100
H2bM7103N	7	100	92
H3M7104N	7	100	35
H1M7117N	4	100	30

Như được thể hiện trong Bảng 6, 17 trong số 23 kháng thể được thử nghiệm ở 100 nM trên Q-Patch thể hiện chức năng ức chế dòng ASIC1 ở người với 9 trong số 17 kháng thể có mức ức chế lớn hơn 70%. 11 kháng thể (H1M6718N, H3M6720N, H3M6721N, H3M6726N, H4H6366P, H1M7101N, H3M7102N, H2bM7103N, H3M7118N, H4H6718N, và H4H6721N2) còn được thử nghiệm về khả năng ức chế dòng ASIC1 ở người ở các nồng độ khác nhau trên Q-Patch, và 9 kháng thể (H4H6718N, H3M6720N, H3M6721N, H1M7101N, H3M7102N, H2bM7103N, H3M6726N, H4H6366P, và H3M7118N) được thử nghiệm khả năng ức chế dòng ASIC1 ở chuột. % ức chế được quan sát thấy đối với các kháng thể được tóm tắt ở Bảng 7 (ASIC1 người) và Bảng 8 (ASIC1 chuột).

Bảng 7: % Ức chế dòng ASIC1 người do axit tạo ra của kháng thể kháng ASIC1 ở các nồng độ kháng thể khác nhau

Kháng thể	Số lỗ được thử nghiệm	Nồng độ kháng thể (nM)	Mức độ ức chế dòng ASIC1 (%) + SEM
H1M6718N	4	100	100 ± 0
	18	10	99 ± 1
	13	1	63 ± 13
	8	0,1	0 ± 0
H3M6720N	13	100	83 ± 9
	8	50	88 ± 6
	3	10	70
	4	1	0
H3M6721N	14	100	100
	8	50	100
	11	10	75 ± 10
	6	1	30
H3M6726N	14	100	77 ± 3
	12	10	30 ± 11

	7	1	15 ± 15
H4H6366P	7	100	76 ± 6
	6	10	53 ± 8
	7	1	38 ± 15
H1M7101N	4	100	97
	10	10	$99 \pm 0,7$
	4	5	96
	10	1	57 ± 18
	4	0,1	7
H3M7102N	4	100	99
	8	10	96 ± 1
	3	5	35
	10	1	0 ± 0
H2bM7103N	7	100	96 ± 3
	3	50	96
	5	10	61 ± 15
	4	1	0
H3M7118N	2	100	99
	2	10	89
	2	1	30
H4H6718N	7	10	100
	6	5	98 ± 2
	3	1	97
	8	0,6	66 ± 6
	4	0,3	54
	4	0,1	12
H4H6721N2	7	10	95 ± 2
	13	5	93 ± 1
	7	1	59 ± 10
	8	0,6	$32,7 \pm 0,1$
	3	0,3	40
	4	0,1	1

Bảng 8: % Ức chế dòng ASIC1 chuột do axit tạo ra của kháng thể kháng ASIC1 ở các nồng độ kháng thể khác nhau

Kháng thể	Số lỗ được thử nghiệm	Nồng độ kháng thể (nM)	Mức độ ức chế dòng ASIC1 (%) + SEM
H4H6718N	10	10	90
	4	5	98
	3	2	96
	3	1	71
	9	0,3	36 ± 3
	2	0,1	20
H3M6720N	4	100	83
	4	50	83
	3	10	46
	4	5	19
	10	1	12 ± 3
	6	0,1	21 ± 8
H3M6721N	4	100	91
	3	10	57
	4	1	0
H4H6721N2	8	25	99 ± 1
	7	10	62
H1M7101N	4	100	90
H3M7102N	4	100	100
H2bM7103N	8	100	67 ± 2
	3	50	77
	3	10	30
	2	5	32
	10	1	33 ± 5
	7	0,1	3 ± 1
H3M6726N	4	100	51
	3	50	38
	3	5	23
	4	1	3
H4H6366P	1	100	46
	4	10	30
	3	5	28
	4	1	10
H3M7118N	7	100	92 ± 3

	3	50	87
	8	10	36 ± 23
	4	5	12
	6	1	6 ± 6

Như được thể hiện trong Bảng 7, một kháng thể, H3M6726N, ức chế dòng ASIC1 người với IC_{50} biểu kiến lớn hơn 10 nM, trong khi đó 6 kháng thể (H3M6720N, H3M6721N, H4H6366P, H3M7102N, H2bM7103N và H3M7118N) ức chế dòng ASIC1 người với IC_{50} biểu kiến bằng 10 nM hoặc nhỏ hơn. Bốn kháng thể, H1M6718N, H1M7101N, H4H6718N, và H4H6721N2, ức chế dòng ASIC1 người với IC_{50} biểu kiến nhỏ hơn 1nM.

Như được thể hiện trong Bảng 8, 6 trong số 10 kháng thể kháng ASIC1 (H4H6718N, H3M6721N, H4H6721N2, H1M7101N, H3M7102N và H3M7118N) được thử nghiệm trên các tế bào biểu hiện ở chuột ASIC1 ức chế 90 đến 100% dòng ASIC1 ở chuột ở nồng độ kháng thể cao nhất được thử nghiệm, trong khi đó bốn kháng thể (H3M6720N, H3M6726N, H4H6366P, và H2bM7103N) chỉ ức chế dòng này khoảng 80% hoặc nhỏ hơn. H3M7118N, H2bM7103N, H3M6720N và H3M6721N ức chế dòng ASIC1 ở chuột với IC_{50} biểu kiến nhỏ hơn 25 nM. H4H6718N ức chế dòng ASIC1 người IC_{50} biểu kiến nhỏ hơn 1nM.

Q-Patch cũng được sử dụng để xác định khả năng ức chế dòng ASIC1 của kháng thể kháng ASIC1 H4H6718N ở dòng tế bào ND7/23 (ECACC, # 92090903), mà là dòng tế bào dung hợp của u nguyên bào thần kinh ở chuột và tế bào hạch rễ lưng tủy sống ở chuột đồng biểu hiện nội sinh ASIC1 ở chuột đồng.

Các tế bào ND7/23 được nuôi cấy trong môi trường có nồng độ glucoza cao DMEM chứa 10% FBS, 2mM glutamin, 1% penixilin-streptomycin (Invitrogen, # 10378-016). Một ngày sau khi gieo mầm, các tế bào ND7/23 được biệt hóa bằng cách thay thế môi trường nuôi cấy bằng môi trường có nồng độ huyết thanh thấp (0,5% FBS) chứa 1 mM dibutyryl-AMP vòng (Santa Cruz, # sc-201567A). Vào ngày ghi kết quả, các tế bào được thu hoạch sử dụng chất thử làm tan tế bào StemPro Accutase (Invitrogen, # A11105-01), được ly tâm, và tái tạo huyền phù trong 1 mL dung dịch đệm ngoại bào. Huyền phù chứa tế bào này sau đó được nạp lên Q-Patch.

Các tế bào đầu tiên được phủ bằng dung dịch đệm ngoại bào ở pH=7,4 (NaCl 140 mM, KCl 4 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, glucoza 5 mM và HEPES 10 mM, được điều chỉnh đến pH=7,4 bằng NaOH) chứa 0,2% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết

thanh bỏ trong 6 phút để làm ổn định miêng kẹp. Dòng ASIC1 ở chuột đồng sau đó được tạo ra trong 1 giây bằng cách bổ sung đệm ngoại bào, mà được điều chỉnh đến pH=6,0, trong khi đó các tế bào này được giữ ở điện thế giữ bằng -80 mV. Dòng ASIC1 ở chuột đồng được tạo ra 2 lần trong đệm ngoại bào ở pH=6 và sau đó, 2 lần nữa ở cùng đệm ngoại bào chứa 10 nM kháng thể đối chứng cùng loại hoặc 10 nM kháng thể kháng ASIC1 (H4H6718N, H3M6720N, H2bM7103N, H3M6726N, H4H6366P và H3M7118N). Sau khi ghi đối với kháng thể kháng ASIC1, 10 nM chất đối kháng ASIC1 chọn lọc, PcTx1 (Alomone Labs, # STP-200) được bổ sung vào các tế bào để đánh giá vai trò của dòng đặc hiệu ASIC1 đối với dòng được tạo ra bởi đệm ngoại bào ở pH=6. Thành phần của dung dịch đệm nội bào dùng để ghi là CsF 120 mM, NaCl 15 mM, EGTA 10 mM và HEPES 10 mM; được điều chỉnh đến pH=7,3 bằng CsOH.

Mức ức chế kênh được xác định dưới dạng % ức chế dòng ASIC khi có mặt kháng thể kháng ASIC1 so với dòng ASIC đo được trước khi dùng kháng thể và được so với % ức chế dòng ASIC khi có mặt PcTx1, mà được sử dụng để xác định mức ức chế dòng đặc hiệu ASIC1 lớn nhất. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 9.

Bảng 9: % Ức chế dòng ASIC1a do axit tạo ra ở chuột đồng ở các tế bào ND7 của kháng thể kháng ASIC1

Kháng thể	Số lỗ được thử nghiệm	Nồng độ kháng thể (nM)	Mức độ ức chế dòng ASIC1 (%) + SEM
H4H6718N	9	10	100
H3M6720N	4	10	43 ± 15
H2bM7103N	5	10	26 ± 14
H3M6726N	5	10	7 ± 6
H4H6366P	3	10	36 ± 20
H3M7118N	10	10	65 ± 11
Đối chứng cùng loại	21	10	15 3

Như được thể hiện trong Bảng 9, H4H6718N thể hiện mức ức chế 100% dòng ASIC1 ở chuột đồng ở các tế bào ND7/23 đã biệt hóa ở nồng độ 10 nM (n= 9) trong khi đó H3M6720N và H3M7118N ức chế dòng này với mức gần 43% và 65% tương ứng. Ba kháng thể (H2bM7103N, H3M6726N và H4H6366P) không thể hiện mức ức chế đáng kể dòng ASIC1 ở chuột đồng ở 10 nM trong các thử nghiệm này.

Ví dụ 6. Kháng thể kháng ASIC1 ức chế dòng ion ASIC1 do axit tạo ra trong thử nghiệm kẹp ráp nối kẹp điện thế tự động [Port-A-Patch]

Port-A-Patch (Nanion Technologies Inc., North Brunswick, NJ), một hệ thống kẹp ráp nối dựa trên vi chip, được sử dụng để xác định giá trị IC_{50} của kháng thể kháng ASIC1 H1M6718N cần để ức chế dòng ion ASIC1 ở người của kháng thể kháng ASIC1 ở dòng tế bào HEK293 được chuyển nhiễm ổn định biểu hiện kênh ASIC1 có chiều dài đầy đủ ở người (HEK/hASIC1; các axit amin 1-528 có mã số truy cập NCBI NP_001086.2).

Các tế bào HEK/hASIC1 được nuôi cấy trong môi trường có nồng độ glucoza cao DMEM, 10% huyết thanh bào thai bê (fetal bovine serum - FBS), 1% axit amin không thiết yếu và 500 $\mu\text{g/mL}$ Geneticin® (Invitrogen, # 10131).. Vào ngày ghi kết quả, các tế bào được thu hoạch bằng dung dịch liên kết tế bào Detachin (Genlantis, San Diego, CA, # T100100), được ly tâm và tái tạo huyền phù trong 500 μL dung dịch đệm ngoại bào (NaCl 140 mM, KCl 4 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 2 mM, glucoza 5 mM và HEPES 10 mM, độ pH=7,4 bằng NaOH). Huyền phù chứa tế bào này sau đó được nạp lên Port-a-Patch.

Các tế bào đầu tiên phủ bằng đệm ở độ pH=7,4 chứa 0,1% (trọng lượng/thể tích) albumin huyết thanh bò trong khoảng 5 phút để làm ổn định kẹp. Sau đó, dòng ASIC1 ở người được tạo ra trong 3 giây bằng cách bổ sung đệm ngoại bào để điều chỉnh độ pH=6,0 đồng thời giữ các tế bào ở điện thế giữ -80 mV. Dòng ASIC1 người được tạo ra 3 lần (mỗi lần 2 phút) ở trong đệm ngoại bào có độ pH=6,0 và 3 lần trong đệm ngoại bào độ pH=6,0 100nM kháng thể đối chứng cùng loại hoặc 10, 3, 1, 0,8 hoặc 0,6 nM kháng thể kháng ASIC1 H1M6718N. 30 μM amilorit trong đệm ngoại bào có độ pH=6,0 được bổ sung vào sau khi hoàn thành các phép đo được kích thích bằng pH để chứng minh rằng các tế bào này có đáp ứng trong toàn bộ thử nghiệm. Thành phần của dung dịch nội bào dùng để ghi là: CsF 120 mM, NaCl_2 15 mM, EGTA 10 mM và HEPES 10 mM; được điều chỉnh về pH=7,3 bằng CsOH.

Mức ức chế kênh được xác định dưới dạng % ức chế dòng ASIC khi có mặt kháng thể kháng ASIC1 so với dòng ASIC trước khi dùng kháng thể. Kết quả được tính trung bình từ nhiều thử nghiệm ức chế. % ức chế dòng ASIC1 người ở nồng độ kháng thể H1M6718N là 10, 3, 1, 0,8 và 0,6 nM được tóm tắt trong Bảng 10.

Bảng 10: % Ức chế dòng ASIC1 người của kháng thể kháng ASIC1 ở các nồng độ khác nhau

Kháng thể	Số lỗ được thử nghiệm	Nồng độ kháng thể (nM)	Mức độ ức chế dòng ASIC1 (%) + SEM
H1M6718N	3	10	94 ± 1
	3	3	86 ± 7
	4	1	76 ± 6
	3	0,8	33 ± 6
	4	0,6	17 ± 9
Đối chứng cùng loại	3	100	0

H1M6718N thể hiện sự ức chế phụ thuộc liều đối với dòng ASIC1 người với IC₅₀ tính được bằng 860 pM, trong khi đó kháng thể đối chứng cùng loại không thể hiện tác dụng ức chế dòng này ở nồng độ bằng 100 nM.

Ví dụ 7. Kháng thể kháng ASIC1 làm giảm đáp ứng đau nội tạng ở mô hình chuột

Trong ví dụ này, khả năng làm giảm chứng đau nội tạng chứng đau của kháng thể kháng ASIC1 H1M6718N ở mô hình co thắt bất thường do axit axetic tạo ra được đánh giá. Chuột C57BL/6 kiểu đại từ phòng thí nghiệm Jackson (Bar Harbor, ME) được sử dụng ở trong thử nghiệm này. 5 nhóm chuột khác nhau (n=10) nhận 10 mg/kg (dưới da) kháng thể đối chứng cùng loại hoặc 1 hoặc 10 mg/kg (dưới da) H1M6718N. 20 giờ sau khi kháng thể dùng tất cả 5 nhóm chuột này được tiêm trong màng bụng axetic 0,6%, việc này sẽ được tạo ra hành vi co duỗi chân bất thường như phỏng đoán (ví dụ, co lại) mà được đếm bằng người quan sát không biết nhóm chuột nào được dùng kháng thể (thử nghiệm mù) trong thời gian lên đến 30 phút sau khi tiêm. Các kết quả của thử nghiệm này, được thể hiện bằng % thay đổi tổng số lần co chân bất thường, được thể hiện trong Bảng 11 (tất cả số liệu được thể hiện bằng giá trị trung bình + độ lệch chuẩn (SEM)).

Bảng 11: Ảnh hưởng của kháng thể kháng ASIC1 đến sự co duỗi bất thường được tạo ra bằng cách tiêm axit axetic

Liều H1M6718N	% thay đổi số lần co duỗi bất thường so với đối chứng
1	-32,06 ± 15,8
10	-46,57 ± 19,3

Ví dụ này cho thấy kháng thể kháng ASIC1 (H1M6718N), được biết là có khả năng ức chế dòng ASIC1 do axit tạo ra (xem ví dụ 4 đến 6) làm giảm hiệu quả đáp ứng đau nội tạng do axit tạo ra trên mô hình chuột. .

Ví dụ 8. Kháng thể kháng ASIC1 tạo ra tác dụng giảm đau khi kích thích cơ học không

gây hại trên mô hình chuột

Trong ví dụ này,, khả năng tạo ra tác dụng giảm đau của kháng thể kháng ASIC1 (H1M6718N) khi đáp ứng với kích thích áp lực/kẹp không gây hại được đánh giá.

Chuột C57BL/6 từ phòng thí nghiệm Jackson (Bar Harbor, ME) được sử dụng trong thử nghiệm này. Các nhóm chuột khác nhau được nhận H1M6718N với liều 1, 10, hoặc 40 mg/kg (dưới da), hoặc kháng thể đối chứng cùng loại với liều 10 mg/kg (dưới da). 20 giờ sau khi dùng kháng thể, các nhóm khác nhau này (n=10) được thử nghiệm ngưỡng cảm nhận đau do kích thích cơ học, mà được xác định bằng ngưỡng co chân khi kẹp cơ sinh đôi cẳng chân hoặc đuôi (Model #2455, IITC Life Science, Woodland Hills, CA). Cảm nhận đau do kích thích cơ học ở đuôi được xác định ở chuột được điều trị bằng H1M6718N với liều 1 mg/kg và 10 mg/kg ngoài việc chúng được điều trị bằng đối chứng cùng loại. Cảm nhận đau do kích thích cơ học ở cơ sinh đôi cẳng chân hoặc đuôi được xác định ở chuột được điều trị bằng H1M6718N với liều 10 mg/kg và 40 mg/kg ngoài việc chúng được điều trị bằng đối chứng cùng loại. Các kết quả của thử nghiệm được thể hiện bằng ngưỡng co chân khi bị kẹp tính theo đơn vị gam (trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn đối với mỗi nhóm chuột), được thể hiện trên Fig.1, đồ thị A và B.

Trong cả hai thử nghiệm này, việc điều trị bằng H1M6718N làm tăng đáng kể ngưỡng co chân ở liều kháng thể cao nhất được thử nghiệm (10 mg/kg ở thử nghiệm ở đuôi [Fig.1, đồ thị A] và 40 mg/kg ở thử nghiệm ở cơ sinh đôi cẳng chân [Fig.1, đồ thị B]) so với đối chứng cùng loại như được xác định bằng ANOVA ($p=0,0015$ cho thử nghiệm ở đuôi và $0,0228$ cho thử nghiệm ở cơ sinh đôi cẳng chân) và bằng kiểm định Bonferonni post-hoc ($* = p<0,05$).

Ví dụ 9. Kháng thể kháng ASIC1 làm giảm đau cơ ở mô hình chuột

Trong ví dụ này, khả năng làm giảm đau do tiêm nước muối có tính axit (pH=5,5) hoặc 3% caragenan của kháng thể kháng ASIC1 H1M6718N và H4H6721N2 được đánh giá.

Chuột C57BL/6 từ phòng thí nghiệm Jackson (Bar Harbor, ME) được sử dụng trong thử nghiệm này. Trong thử nghiệm đầu tiên, các nhóm chuột khác nhau được nhận kháng thể đối chứng cùng loại với liều 10 mg/kg (dưới da) hoặc H1M6718N với liều 10 mg/kg (dưới da), hoặc. 20 giờ sau khi dùng kháng thể, tất cả số chuột này được tiêm bắp nước muối có tính axit (pH=5,5) vào trong cơ sinh đôi cẳng chân, mà tạo ra sự tăng cảm đau mạnh do kích thích cơ học ban đầu trong vài ngày như được xác định bằng ngưỡng

co chân khi kẹp cơ (Model #2455, IITC Life Science, Woodland Hills, CA). Các kết quả được thể hiện trên Fig.2.

Trong thử nghiệm thứ hai, các nhóm chuột khác nhau được nhận kháng thể đối chứng cùng loại với liều 10 mg/kg (dưới da); H1M6718N với liều 10, hoặc 40 mg/kg (dưới da); hoặc H4H6721N2 10 hoặc 30 mg/kg (dưới da). 20 giờ sau khi dùng kháng thể, tất cả số chuột này được tiêm bắp nước muối có tính axit (pH=5,5) vào trong cơ sinh đôi cẳng chân, mà tạo ra sự tăng cảm đau mạnh do kích thích cơ học ban đầu trong vài ngày như được xác định bằng ngưỡng co chân khi kẹp cơ (Model #2455, IITC Life Science, Woodland Hills, CA). Các kết quả được thể hiện trên Fig.3A (10 và 40 mg/kg H1M6718N) và 3B (10 và 30 mg/kg H4H6721N2).

Các kết quả thử nghiệm, như được thể hiện trong Fig.2 và 3, được thể hiện bằng % thay đổi ngưỡng co chân so với ban đầu (tất cả số liệu được thể hiện bằng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn). Đối với cả hai thử nghiệm, quan sát được tác dụng chính đáng chú ý khi điều trị bằng H1M6718N sử dụng các phép đo ANOVA lặp lại ($p=0,0363$ đối với nước muối có tính axit và $0,0193$ đối với caragenan). Đối với thử nghiệm thứ hai, quan sát được tác dụng chính đáng chú ý khi điều trị bằng H1M6721N2 sử dụng các phép đo ANOVA lặp lại ($p=0,0018$). * = $p<0,05$ và ** = $p<0,01$ trong kiểm định Bonferonni post-hoc tại 1 thời điểm nhất định. Do đó, cả hai kháng thể đều thể hiện tác dụng giảm đau cơ đáng kể trong hệ thống thử nghiệm được sử dụng ở đây.

Ví dụ 10. Hiệu lực của kháng thể kháng ASIC1 ở mô hình đau giống bệnh thần kinh do hóa trị liệu gây ra

Ví dụ này đánh giá khả năng làm giảm đau giống bệnh thần kinh của kháng thể kháng ASIC1 H4M6718N khi toàn thân tiếp xúc với hóa trị liệu taxol. Chuột C57BL/6 từ phòng thí nghiệm Jackson (Bar Harbor, ME) được sử dụng trong thử nghiệm này. Sau khi đánh giá hành vi ban đầu, tất cả số chuột này được nhận chế độ điều trị bằng taxol (4 mg/kg, cách ngày, tổng 4 liều) trước khi bắt đầu dùng kháng thể theo sáng chế. Các nhóm chuột khác nhau nhận kháng thể đối chứng cùng loại với liều 30 mg/kg (dưới da), H1M6718N với liều 30 mg/kg (dưới da), hoặc gabapentin với liều 100 mg/kg (dưới da). Kháng thể được dùng 24 giờ trước khi quan sát hành vi mỗi tuần và gabapentin được dùng 2 giờ trước khi quan sát hành vi mỗi tuần. Mức tăng cảm đau do kích thích cơ học được đo ở tất cả các nhóm sử dụng sợi von Frey (#58011, Stoelting Co., Wood Dale, IL) theo phương pháp lên xuống của Dixon (Chaplan et al., *J Neurosci Methods*. 53(1):55-

63). Các kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trên Fig.4 (tất cả số liệu được thể hiện bằng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn).

Như được minh họa trên Fig.4, khi điều trị bằng H1M6718N và điều trị bằng gabapentin đều quan sát thấy tác dụng chính đáng kể so với nhóm được điều trị bằng đối chứng cùng loại bằng các phép đo ANOVA lặp lại ($p=0,0003$ đối với H4H6718N, $p<0,00001$ đối với gabapentin). Do đó, ví dụ này gợi ý rằng kháng thể kháng ASIC1 theo sáng chế có hiệu quả cao trong việc làm giảm đáp ứng đau do hóa trị liệu gây ra.

Tóm lại, các kết quả của các ví dụ nêu trên đều cho thấy kháng thể kháng ASIC1 có thể được dùng để ức chế rất nhiều tình trạng đau khác nhau.

Sáng chế không bị giới hạn phạm vi bởi các phương án cụ thể được mô tả ở đây. Các cải biến khác nhau của sáng chế đối với các phương án được mô tả ở đây có thể được người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này tạo ra dựa vào phần mô tả ở trên và các hình vẽ đi kèm. Các cải biến này cũng nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào (SEQ ID NO: 401), trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm vùng xác định tính bổ trợ của chuỗi nặng (Heavy chain complementarity determining region - HCDR) 1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 36, HCDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 38, HCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 40, vùng xác định tính bổ trợ của chuỗi nhẹ (Light chain complementarity determining region – LCDR) 1 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 44, LCDR2 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 46 và LCDR3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48.
2. Kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (Heavy chain variable region – HCVR) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 34 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (Light chain variable region – LCVR) có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 42.
3. Kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cạnh tranh liên kết với ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào với kháng thể tham chiếu bao gồm HCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 34 và LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 42.
4. Kháng thể phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với ASIC1 được biểu hiện trên bề mặt tế bào (SEQ ID NO: 401), trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này bao gồm CDR chuỗi nặng và CDR chuỗi nhẹ của cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 34 và 42.
5. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.

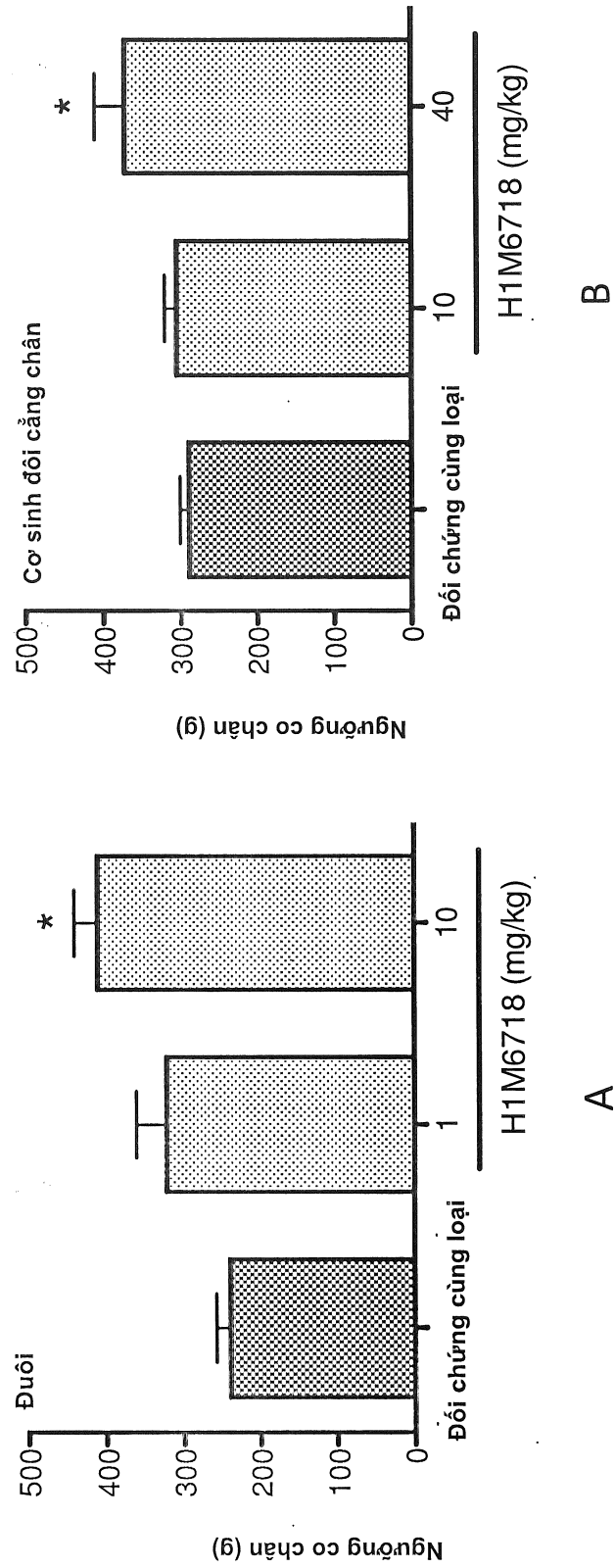


Fig.1

Tăng cảm đau cơ do nước muối có tính axit gây ra (độ pH = 5,5)

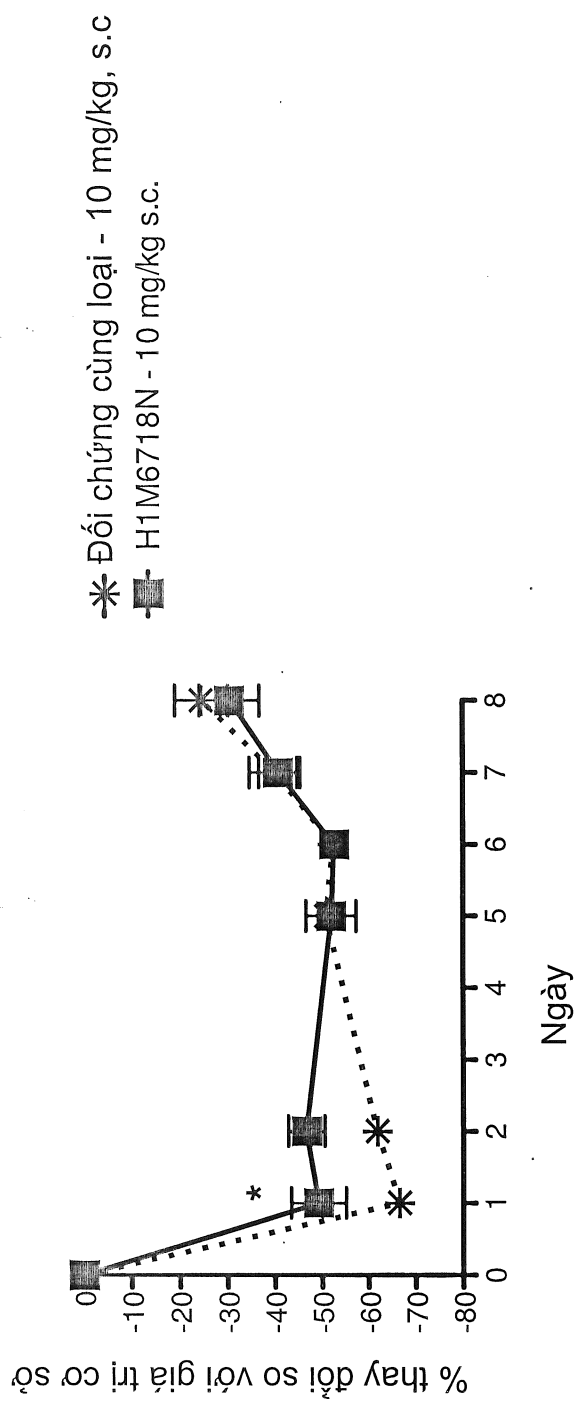
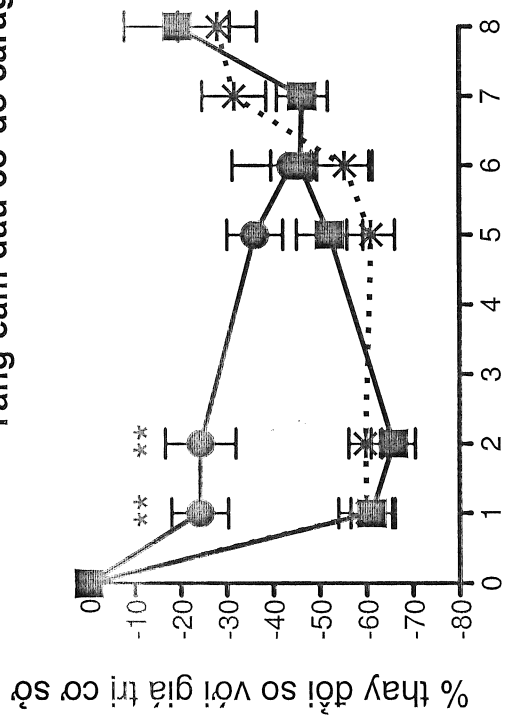


Fig.2

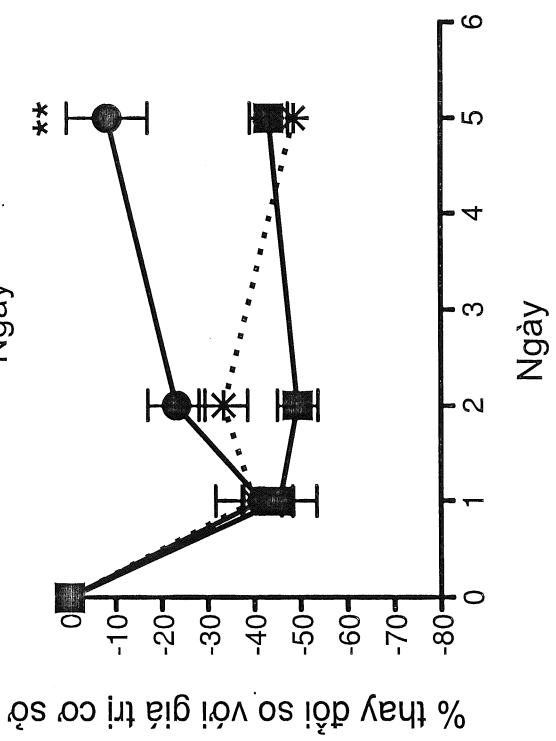
Tăng cảm đau cơ do caragenan gây ra

- * Đối chứng cùng loại - 10 mg/kg s.c
- H1M6718N - 10 mg/kg s.c.
- H1M6718N - 40 mg/kg s.c.



A

- * Đối chứng cùng loại - 30 mg/kg s.c
- H4H6721N2 - 10 mg/kg s.c.
- H4H6721N2 - 30 mg/kg s.c.



B

Fig.3

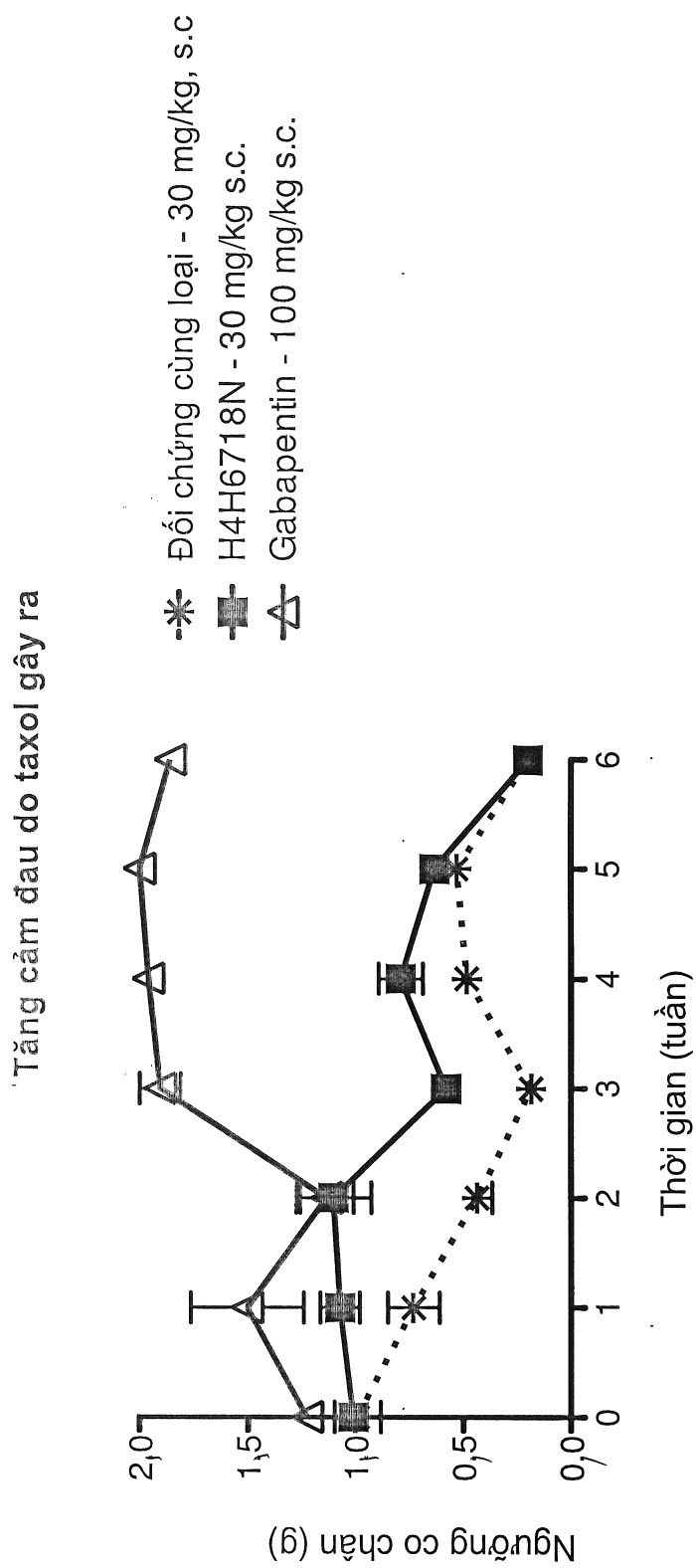


Fig.4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG ASIC1 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 7250A-WO

<140> được ký hiệu

<141> và nộp kèm theo

<150> 61/592,837

<151> 2012-01-31

<150> 61/644,038

<151> 2012-05-08

<150> 61/692,925

<151> 2012-08-24

<160> 401

<170> FastSEQ cho Windows phiên bản 4.0

<210> 1

<211> 348

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 1

```
caggtgcagc tgggtgcagtc tgggggctgaa gtgaagaagc ctgggggcctc aatgaagggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc atttatgata tcaactgggt gcgccaggcc 120
actggacaag ggcttgagt gatgggggtg atgaacccta ggagtggtag cacaggctat 180
tcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accaggaaca cctccataaa cacagccttc 240
atggaactga gtagcctcag gtctgatgac acggccgtgt attactgtgt gagagggcaa 300
ctcgtcctgg gctactgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctcctca 348
```

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 2

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

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

<210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 3
 ggatacacct tcaccattta tgat

24

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 4
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ile Tyr Asp
 1 5

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 5
 atgaacccta ggagtggtag caca

24

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 6
 Met Asn Pro Arg Ser Gly Ser Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 7
 gtgagagggc aactcgtcct gggctac

27

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 8
 Val Arg Gly Gln Leu Val Leu Gly Tyr
 1 5

<210> 9
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 9
 gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcca gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtggtgta tacagttcca cccctaagaa ctacttagct 120
 tggtagcagc agaaaccagg acagcctcct aaactgctca tttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc cgcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggcg gtttattact gtcagcaata tttttctact 300
 ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

<210> 10
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 10
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Val Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Thr Pro Lys Asn 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	Arg	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
65					70					75					80
Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				85					90					95	
Tyr	Phe	Ser	Thr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile
			100					105					110		

Lys

<210> 11
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 11
 cagagtgttg tatacagttc caccctaag aactac

36

<210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 12
 Gln Ser Val Val Tyr Ser Ser Thr Pro Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 13
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 13
 tgggcatct

9

<210> 14
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 14
 Trp Ala Ser
 1

<210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 15
 cagcaatatt tttctactcc gtacact

27

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 16
 Gln Gln Tyr Phe Ser Thr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 17
 caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggctc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc atttatgata tcaactgggt gcgccaggcc 120
 actggacaag ggcttgagtg gatgggggtg atgaacccta ggagtggtag cacaggctat 180
 tcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accaggaaca cctccataaa cacagccttc 240
 atggagctga gtagcctcag atctgaggac acggccgtct attactgtgt gagagggcaa 300
 ctcgtcctgg gctactgggg ccaggggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 18
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<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 Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ile Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Met Asn Pro Arg Ser Gly Ser Thr Gly Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Asn Thr Ala Phe

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

<210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 19
 ggatacacct tcaccattta tgat

24

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 20
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ile Tyr Asp
 1 5

<210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 21
 atgaacccta ggagtggtag caca

24

<210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 22
 Met Asn Pro Arg Ser Gly Ser Thr
 1 5

<210> 23

<211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 23
 gtgagagggc aactcgtcct gggctac

27

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 24
 Val Arg Gly Gln Leu Val Leu Gly Tyr
 1 5

<210> 25
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 25
 gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtggtgta tacagttcca acactaagaa ctacttagct 120
 tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aacctgctca tttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc cgcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggcg gtttattact gtcagcaata tttttctact 300
 ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

<210> 26
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Phe Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 27
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 27
 cagagtgttg tatacagttc caacactaag aactac

36

<210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 28
 Gln Ser Val Val Tyr Ser Ser Asn Thr Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 29
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 29
 tgggcatct

9

<210> 30
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 30
 Trp Ala Ser
 1

<210> 31
 <211> 27

<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 31
cagcaatatt tttctactcc gtacact

27

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 32
Gln Gln Tyr Phe Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 33
<211> 348
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 33
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctttgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gactggagtg ggtctcaggt attagtggta gtggtgggtg cacacactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attcgaagaa catggtgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgcat attactgtgc gaaagaggcc 300
tataaatggc agccctgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 34
<211> 116
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 34
Glu Val Gln Leu Leu 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 Phe
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys

				85					90					95		
Ala	Lys	Glu	Ala	Tyr	Lys	Trp	Gln	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
			100					105					110			
Thr	Val	Ser	Ser													
		115														

<210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 35
 ggattcacct ttagcagctt tgcc

24

<210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 36
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala
 1 5

<210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 37
 attagtggta gtggtggtgg caca

24

<210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 38
 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr
 1 5

<210> 39
 <211> 27
 <212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 39

gcgaaagagg cctataaatg gcagccc

27

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 40

Ala Lys Glu Ala Tyr Lys Trp Gln Pro

1

5

<210> 41

<211> 321

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 41

gacatccaga tgaccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcac 60
atcacttgcc gggccagtc gaggattagt agctggttg cctggtatca acagaaacca 120
gggaaagccc ctaacctcct gatctataag gcgtctattt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgatattg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attcgtagac ttttggccag 300
gggaccaaac tggagatcaa a 321

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 42

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

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

<210> 43
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 43
 cagaggatta gtagctgg

18

<210> 44
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 44
 Gln Arg Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 45
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 45
 aaggcgtct

9

<210> 46
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 46
 Lys Ala Ser
 1

<210> 47
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 47

caacagtata atagttattc gtacact

27

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 48

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr Thr

1

5

<210> 49

<211> 348

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 49

gaggtgcagc tgttggcgtc tgggggaggc ttggtacaga ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agctttgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgcat attattgtgc gaaagaggcc 300
tataaatggc agccctgggg ccaggggaatc cgggtcaccg tctcctca 348

<210> 50

<211> 116

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 50

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

115

<210> 51
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 51
 ggattcacct ttagtagctt tgcc

24

<210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 52
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala
 1 5

<210> 53
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 53
 attagtggtgta gtggtggtag caca

24

<210> 54
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 54
 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 55
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 55

gcgaaagagg cctataaatg gcagccc

27

<210>56

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 56

Ala Lys Glu Ala Tyr Lys Trp Gln Pro

1

5

<210> 57

<211> 321

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 57

gacatccaga tgaccagtc tccttccacc ctgtctgctt ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtc gagtattagt agctggttg cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaacctcct gatctataag acgtctaatt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgatattg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attcgtacac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 58

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

<210> 59
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 59
 cagagtatta gtagctgg

18

<210> 60
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 60
 Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 61
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 61
 aagacgtct

9

<210> 62
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 62
 Lys Thr Ser
 1

<210> 63
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 63
 caacagtata atagttattc gtacact

27

<210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 64
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr Thr
 1 5

<210> 65
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 65
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agcttttgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtggccaat ataaagcaaa atggaagtga gacatactat 180
 gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acaccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctatat attactgtgc gagagggggg 300
 cggatacagc tatggtctag ctggttcgac ccctgggggc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 66
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

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

<210> 67
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 67
 ggattcacct ttagtagctt ttgg

24

<210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 68
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Trp
 1 5

<210> 69
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 69
 ataaagcaaa atggaagtga gaca

24

<210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 70
 Ile Lys Gln Asn Gly Ser Glu Thr
 1 5

<210> 71
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 71
 gcgagagggg ggcgataca gctatggtct agctgggttcg acccc

45

<210> 72
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 72
 Ala Arg Gly Gly Arg Ile Gln Leu Trp Ser Ser Trp Phe Asp Pro
 1 5 10 15

<210> 73
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 73
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtcagcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattaaa aactatttaa attggtatca gcagaaatca 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 agggtcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaccct 240
 gaagattttg cagcttacta ctgtcaacag agtttcagtg ccccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 74
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

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

<210> 75
 <211> 18
 <212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 75

cagagcatta aaaactat

18

<210> 76

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 76

Gln Ser Ile Lys Asn Tyr

1

5

<210> 77

<211> 9

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 77

gctgcatcc

9

<210> 78

<211> 3

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 78

Ala Ala Ser

1

<210> 79

<211> 27

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 79

caacagagtt tcagtgcctt gctcact

27

<210> 80

<211> 9

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 80
 Gln Gln Ser Phe Ser Ala Pro Leu Thr
 1 5

<210> 81
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 81
 gaggagctag tgttggaatc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt catgttttagc acctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcactt attagtggtc gtgacggtag cacatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca tttccaggaa cacgctctat 240
 ctacacttga acagcctgcg agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagataca 300
 gctgtggttc ctggctacgg tttggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 82
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

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

<210> 83
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 83

ggattcatgt ttagcaccta tgcc

24

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 84

Gly Phe Met Phe Ser Thr Tyr Ala
1 5

<210> 85

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 85

attagtgggtc gtagcggtac caca

24

<210> 86

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 86

Ile Ser Gly Arg Asp Gly Ser Thr
1 5

<210> 87

<211> 42

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 87

gcgaaagata cagctgtggt tcctggctac ggtttgacg tc

42

<210> 88

<211> 14

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 88
 Ala Lys Asp Thr Ala Val Val Pro Gly Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10

<210> 89
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 89
 gacatccaga tgacccagtc tcctgccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtca gactattagt aactgggttg cctggtatca gcagagacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaactgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgattttg caagttatta ctgccaacag tataatagtt attcgtggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 90
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

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

<210> 91
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 91

cagactatta gtaactgg

18

<210> 92

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 92

Gln Thr Ile Ser Asn Trp

1

5

<210> 93

<211> 9

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 93

aaggcgtct

9

<210> 94

<211> 3

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 94

Lys Ala Ser

1

<210> 95

<211> 27

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 95

caacagtata atagttattc gtggacg

27

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 96
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Trp Thr
1 5

<210> 97
<211> 363
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 97
gaggagctag tgttggaaac tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt catgttttagc acctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcactt attagtggtc gtgacggtaa cacatactat 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaggaa cagctctat 240
ctacaattga acagcctgcg agccgaggac acggccttat attactgtgc gaaagataca 300
gctgtgggttc ctggctacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 98
<211> 121
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 98
Glu Glu Leu Val Leu 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 Met Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Leu Ile Ser Gly Arg Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Thr Ala Val Val Pro Gly Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 99
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400>99

ggattcatgt ttagcaccta tgcc

24

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 100

Gly Phe Met Phe Ser Thr Tyr Ala
1 5

<210> 101

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 101

attagtggtc gtagcgtaa caca

24

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 102

Ile Ser Gly Arg Asp Gly Asn Thr
1 5

<210> 103

<211> 42

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 103

gcgaaagata cagctgtggt tcctggctac ggtatggacg tc

42

<210> 104

<211> 14

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 104

Ala Lys Asp Thr Ala Val Val Pro Gly Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 105

<211> 321

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 105

gacatccaga tgacccagtc tcctgccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtca gactattagt aactggttgg cctggtatca gcagagacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaactgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgattttg caagttatta ctgccaacag tataatagtt attcgtggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 106

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 106

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

<210> 107

<211> 18

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 107

cagactatta gtaactgg

18

<210> 108
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 108
 Gln Thr Ile Ser Asn Trp
 1 5

<210> 109
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 109
 aaggcgtct

9

<210> 110
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 110
 Lys Ala Ser
 1

<210> 111
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 111
 caacagtata atagttattc gtggacg

27

<210> 112
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 112

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Trp Thr
 1 5

<210> 113

<211> 366

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 113

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagt agcttttgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtggccaat ataaagcaaa atggaagtga gacatactat 180
 gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acaccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctatat attactgtgc gagagggggg 300
 cgatacagc tatggtctag ctggttcgac ccctgggggc agggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 114

<211> 122

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 114

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

<210> 115

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 115

ggattcacct ttagtagctt ttgg

24

<210> 116

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 116

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Trp

1

5

<210> 117

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 117

ataaagcaaa atggaagtga gaca

24

<210> 118

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 118

Ile Lys Gln Asn Gly Ser Glu Thr

1

5

<210> 119

<211> 45

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 119

gcgagagggg ggcgataca gctatggtct agctggttcg acccc

45

<210> 120

<211> 15

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 120

Ala Arg Gly Gly Arg Ile Gln Leu Trp Ser Ser Trp Phe Asp Pro
 1 5 10 15

<210> 121

<211> 321

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 121

gccatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 attacttgcc gggcaagtca gggcatttag aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctatggg gcatccagtt tacaaactgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacaa gatttcaatt acccgtagac ttttggccag 300
 gggaccaaac tggagatcaa a 321

<210> 122

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 122

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

<210> 123

<211> 18

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 123

cagggcatta gcaatgat

18

<210> 124

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 124
 Gln Gly Ile Ser Asn Asp
 1 5

<210> 125
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 125
 ggtgcatcc

9

<210> 126
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 126
 Gly Ala Ser
 1

<210> 127
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 127
 ctacaagatt tcaattaccc gtacact

27

<210> 128
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 128
 Leu Gln Asp Phe Asn Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 129
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 129
 gaggtgcagc tgttggcgtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagt agctttgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta gtgggtgtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgcat attattgtgc gaaagaggcc 300
 tataaatggc agccctgggg ccaggggaatc cgggtcaccg tctcctca 348

<210> 130
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 130
 Glu Val Gln Leu Leu Ala 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 Phe
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Glu Ala Tyr Lys Trp Gln Pro Trp Gly Gln Gly Ile Arg Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 131
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 131
 ggattcacct ttagtagctt tgcc

24

<210> 132
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

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

<210> 133
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 133
 attagtggta gtggtgtag caca

24

<210> 134
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 134
 Ile Ser Gly Ser Gly Val Ser Thr
 1 5

<210> 135
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 135
 gcgaaagagg cctataaatg gcagccc

27

<210> 136
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 136
 Ala Lys Glu Ala Tyr Lys Trp Gln Pro
 1 5

<210> 137
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 137
 gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtc gagtattagt agctggttg cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct aatctataag gcgtctaatt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attcgtacac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 138
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 138
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 139
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 139
 cagagtatta gtagctgg

18

<210> 140
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

 <400> 140
 Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 141
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 141
 aaggcgtct

9

<210> 142
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 142
 Lys Ala Ser
 1

<210> 143
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 143
 caacagtata atagttattc gtacact

27

<210> 144
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 144
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr Thr
 1 5

<210> 145
 <211> 348

<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 145
gaggtgcagc tgttggcgtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagt agctttgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta gtggtgttag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgcat attattgtgc gaaagaggcc 300
tataaatggc agccctgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctca 348

<210> 146
<211> 116
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

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

<210> 147
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 147
ggattcacct ttagtagctt tgcc

24

<210> 148
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 148

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala
1 5

<210> 149

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 149

attagtggta gtggtgtag caca

24

<210> 150

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 150

Ile Ser Gly Ser Gly Val Ser Thr
1 5

<210> 151

<211> 27

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 151

gcgaaagagg cctataaatg gcagccc

27

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 152

Ala Lys Glu Ala Tyr Lys Trp Gln Pro
1 5

<210> 153

<211> 321

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 153

```
gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtc gagtattagt agctggttg cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct aatctataag gcgtctaatt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgatattt caacttatta ctgccaacag tataatagtt attcgtacac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321
```

<210> 154

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 154

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

<210> 155

<211> 18

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 155

cagagtatta gtagctgg

18

<210> 156

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 156

Gln Ser Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 157
<211> 9
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 157
aaggcgtct

9

<210> 158
<211> 3
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 158
Lys Ala Ser
1

<210> 159
<211> 27
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 159
caacagtata atagttattc gtacact

27

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 160
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr Thr
1 5

<210> 161
<211> 363
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 161

```
gaggtgcagc tgttggagtc tggggggggtc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caattttaac aactatgaca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagtc attagtgcaa gtggtcgtaa cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagat cagtctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag acccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcac 300
ctcgtccact actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
tct 363
```

<210> 162

<211> 121

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 162

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

<210> 163

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 163

ggattcaatt ttaacaacta tgac

24

<210> 164

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 164

Gly Phe Asn Phe Asn Asn Tyr Asp
1 5

<210> 165
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 165
attagtgcac gtggctcgtaa caca

24

<210> 166
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 166
Ile Ser Ala Ser Gly Arg Asn Thr
1 5

<210> 167
<211> 42
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 167
gcgaaagatc acctcggtcca ctactactac ggtatggacg tc

42

<210> 168
<211> 14
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 168
Ala Lys Asp His Leu Val His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 169
<211> 336
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 169

```

gatattatga tgactcagtc tccactctcc ctgtccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gaggctcctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
tacctccaga agtcaggaca gtctccacac ctctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
tccgggggtcc ctgacagggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgggtggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactcct 300
cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaaa 336

```

<210> 170

<211> 112

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400>170

```

Asp Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1      5      10
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20     25     30
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ser 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 Glu Asp Gly Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85     90     95
Leu Gln Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100    105    110

```

<210> 171

<211> 33

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 171

cagagcctcc tgcatagtaa tggatacaac tat

33

<210> 172

<211> 11

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 172

```

Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr
1      5      10

```

<210> 173
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 173
 ttgggttct

9

<210> 174
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 174
 Leu Gly Ser
 1

<210> 175
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 175
 atgcaagctc tacaaactcc tcggacg

27

<210> 176
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 176
 Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 177
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 177

gaggaccgag tgttggaatc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt catgttttagc agctatgcc tgagctgggt cgcagggt 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcactt attagtgggtc gtgacggtaa cacatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaggaa cacgctctat 240
 ctacaattga acagcctgcg agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagataca 300
 gctgtgggtc ctggctacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 178
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 178
 Glu Asp Arg Val Leu 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 Met Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Leu Ile Ser Gly Arg Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg 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 Lys Asp Thr Ala Val Val Pro Gly Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 179
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 179
 ggattcatgt ttagcagcta tgcc

24

<210> 180
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 180
 Gly Phe Met Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 181
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 181
 attagtggtc gtgacggtaa caca

24

<210> 182
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

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

<210> 183
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 183
 gcgaaagata cagctgtggt tcctggctac ggtatggacg tc

42

<210> 184
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 184
 Ala Lys Asp Thr Ala Val Val Pro Gly Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 185
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 185

```

gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtc gagtattagt aactgggttg cctgggtatca gcagagacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgattttg caagttatta ctgccaacag tataatagtt attcgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

```

<210> 186
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 186

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

<210> 187
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 187
 cagagtatta gtaactgg 18

<210> 188
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 188
 Gln Ser Ile Ser Asn Trp
 1 5

<210> 189
 <211> 9

<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 189
aaggcgtct

9

<210> 190
<211> 3
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 190
Lys Ala Ser
1

<210> 191
<211> 27
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 191
caacagtata atagttattc gtggacg

27

<210> 192
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 192
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Trp Thr
1 5

<210> 193
<211> 348
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 193
gaggtgcagc tgttggcgtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctttgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggaaggg ggtctgagtg ggtctcaggt attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaaaaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgcat attactgtgc gaaagaggcc 300
 tataaatggc agccctgggg ccaggggaatc cgggtcaccg tctcctca 348

<210> 194
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 194
 Glu Val Gln Leu Leu Ala 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 Phe
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Glu Ala Tyr Lys Trp Gln Pro Trp Gly Gln Gly Ile Arg Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 195
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 195
 ggattcacct ttagcagctt tgcc

24

<210> 196
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 196
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala
 1 5

<210> 197
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 197

attagtggta gtggtggtag caca

24

<210> 198

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 198

Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 199

<211> 27

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 199

gcgaaagagg cctataaatg gcagccc

27

<210> 200

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 200

Ala Lys Glu Ala Tyr Lys Trp Gln Pro
1 5

<210> 201

<211> 321

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 201

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtctcc 60
atcacttgcc gggccagtca gagtattagt agctggttgg cctggatatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctaatt tagacagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggaac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attcgtacac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 202
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 202
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 203
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 203
 cagagtatta gtagctgg

18

<210> 204
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 204
 Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 205
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 205
aaggcgtct

9

<210> 206
<211> 3
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 206
Lys Ala Ser
1

<210> 207
<211> 27
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 207
caacagtata atagttattc gtacact

27

<210> 208
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 208
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr Thr
1 5

<210> 209
<211> 387
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 209
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc cggggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttaga aactatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggaaagg ggctggagtg ggtctcagct attaatgggt gtggtgatag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa tacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagaggag 300
ggagactgga actacgtggg atatggttac tactactact acggtatgga cgtctggggc 360
caagggacca cggtcaccgt ctctca 387

<210> 210
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 210
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Asn Gly Gly Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Glu Glu Gly Asp Trp Asn Tyr Val Gly Tyr Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110
 Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser

<210> 211
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 211
 ggattcacct ttagaaacta tgcc

24

<210> 212
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 212
 Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr Ala
 1 5

<210> 213
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 213

attaatggtg gtggtgatag caca

24

<210> 214

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 214

Ile Asn Gly Gly Gly Asp Ser Thr

1

5

<210> 215

<211> 66

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 215

gcgaaagagg agggagactg gaactacgtg ggatatggtt actactacta ctacggtatg 60
gacgtc 66

<210> 216

<211> 22

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 216

Ala Lys Glu Glu Gly Asp Trp Asn Tyr Val Gly Tyr Gly Tyr Tyr Tyr

1

5

10

15

Tyr Tyr Gly Met Asp Val

20

<210> 217

<211> 321

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 217

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc atgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgctc gggcgagtca ggggtattagc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcaggag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgtacac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 218
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

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

<210> 219
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 219
 cagggtatta gcagctgg

18

<210> 220
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

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

<210> 221
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 221
gctgcatcc

9

<210> 222
<211> 3
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 222
Ala Ala Ser
1

<210> 223
<211> 27
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 223
caacaggcta acagtttccc gtacact

27

<210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

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

<210> 225
<211> 369
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 225
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgaag cctctggttt caccttcgga agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg gatggcagtt atatcatatg atggaaatag tagatactct 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa tacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agctgaggac acggctctgt attactgtgc gaaagaaaat 300

catatagcag ctcgtcgtcc cggaggtctg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
gtctcctca 369

<210> 226
<211> 123
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

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

<210> 227
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 227
ggtttcacct tcggaagcta tggc

24

<210> 228
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

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

<210> 229
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 229

atatcatatg atggaaatag taga

24

<210> 230

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 230

Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Ser Arg

1

5

<210> 231

<211> 48

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 231

gcgaaagaaa atcatatagc agctcgtcgt cccggaggtc tggacgtc

48

<210> 232

<211> 16

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 232

Ala Lys Glu Asn His Ile Ala Ala Arg Arg Pro Gly Gly Leu Asp Val

1

5

10

15

<210> 233

<211> 321

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 233

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgagtc gggcattagc atttatttag cctggtatca acagaaacca 120
 gggaaagtgc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaatcagg ggtcccatct 180
 cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatgttg caacttattt ctgtcaaaac tataacattg ccccggtggac gctcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a

321

<210> 234
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 234
 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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ile Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Asn Tyr Asn Ile Ala Pro Trp
 85 90 95
 Thr Leu Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 235
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 235
 cagggcatta gcatttat

18

<210> 236
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 236
 Gln Gly Ile Ser Ile Tyr
 1 5

<210> 237
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 237
gctgcatcc

9

<210> 238
<211> 3
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 238
Ala Ala Ser
1

<210> 239
<211> 24
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 239
caaaactata acattgcccc gtgg

24

<210> 240
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 240
Gln Asn Tyr Asn Ile Ala Pro Trp
1 5

<210> 241
<211> 384
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 241
gaggtgcagc tggttgagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt catctttacc aattatgccg tgacctggct ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct cttagtgggt ctggtgggtac cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccacc tccagagaca attccaagaa cactctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtct attactgtgc gaaagatccc 300
cattactatg ggtcggggaa tgattacttc tactactacg gtttggacgt ctggggccga 360
gggaccacgg tcaccgtctc ctca 384

<210> 242
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 242
 Glu Val Gln Leu Leu 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 Ile Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Thr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Leu Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Thr Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Pro His Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Asp Tyr Phe Tyr Tyr
 100 105 110
 Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 243
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 243
 ggattcatct ttaccaatta tgcc

24

<210> 244
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 244
 Gly Phe Ile Phe Thr Asn Tyr Ala
 1 5

<210> 245
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 245
cttagtggtt ctggtggtac caca

24

<210> 246
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 246
Leu Ser Gly Ser Gly Thr Thr
1 5

<210> 247
<211> 63
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 247
gcgaaagatc cccattacta tgggtcgggg aatgattact tctactacta cggtttggac 60
gtc 63

<210> 248
<211> 21
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 248
Ala Lys Asp Pro His Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Asp Tyr Phe Tyr Tyr
1 5 10 15
Tyr Gly Leu Asp Val
20

<210> 249
<211> 336
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 249
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctccctgatct atttgggttc taatcggggc 180
tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaggctct acaaactccg 300

tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaa

336

<210> 250
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 250
 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 Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn 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 Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 251
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 251
 cagagcctcc tgcataagtaa tggatacaac tat

33

<210> 252
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 252
 Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr
 1 5 10

<210> 253
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 253
ttgggttct

9

<210> 254
<211> 3
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 254
Leu Gly Ser
1

<210> 255
<211> 27
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 255
atgcaggctc tacaaactcc gtacact

27

<210> 256
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 256
Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 257
<211> 357
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 257
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggt ttgggtccagt ctgggggggtc cctgagactc 60
tcttgtgcag cctctggatt cacctttagt agatattgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaaacaag atggaagtga gaaagattat 180
gtggactctg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca acaccaagag ctactgttt 240
ctgcaaattga atagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaggagaga 300
tggaactgga acttctttga ctactggggc caggggaacc tggtcactgt ctctca 357

<210> 258

<211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 258
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Asp Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Ser Ser 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 Lys Glu Arg Trp Asn Trp Asn Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 259
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 259
 ggattcacct ttagtagata ttgg

24

<210> 260
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

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

<210> 261
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

0

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 261
ataaaacaag atggaagtga gaaa

24

<210> 262
<211> 8
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 262
Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys
1 5

<210> 263
<211> 36
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 263
gcgaaggaga gatggaactg gaacttcttt gactac

36

<210> 264
<211> 12
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 264
Ala Lys Glu Arg Trp Asn Trp Asn Phe Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 265
<211> 318
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 265
gacatccaga tgaccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtc gagtattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagtcct gatctataag gcatctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccagcag tttaatagtt attccacttt tggccagggg 300
accaagctgg agatcaaa 318

<210> 266
<211> 106

<212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 266
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Ser Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 267
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 267
 cagagtatta gtagctgg

18

<210> 268
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

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

<210> 269
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 269
 aaggcatct

9

<210> 270
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 270
 Lys Ala Ser
 1

<210> 271
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 271
 cagcagttta atagttattc cact

24

<210> 272
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 272
 Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Ser Thr
 1 5

<210> 273
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 273
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggagac ttaatacagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtatag cctctggatt cacctttaga ggctatgcca tgagttgggt ccgccaggct 120
 ccaggggagg ggctggactg ggtctcaggt attagttctg gtggcgggaa cacatattac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ttgcaaatga acagtctgag agtcgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagacaga 300
 gggggtgtaa gggactttta ctacggtttg gacgtctggg gccaggggac cacggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 274
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 274

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

<210> 275

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 275

ggattcacct ttagaggcta tgcc

24

<210> 276

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 276

Gly	Phe	Thr	Phe	Arg	Gly	Tyr	Ala
1				5			

<210> 277

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 277

attagttctg gtggcgggaa caca

24

<210> 278
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

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

<210> 279
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 279
 gcgaaagaca gagggggtgt aagggaacttt tactacggtt tggacgtc 48

<210> 280
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 280
 Ala Lys Asp Arg Gly Gly Val Arg Asp Phe Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10 15

<210> 281
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 281
 gacatccaga tgaccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtca gagtatattat agttgggttg cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccgtca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgatattta caacttatta ctgccaacaa tatcttagtt attctcggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaatcaa a 321

<210> 282
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 282
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Thr Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Ser Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 283
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 283
 cagagtattt atagttgg

18

<210> 284
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 284
 Gln Ser Ile Tyr Ser Trp
 1 5

<210> 285
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 285
 aaggcgtct

9

<210> 286
 <211> 3
 <212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 286

Lys Ala Ser

1

<210> 287

<211> 27

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 287

caacaatatc ttagttattc tcggacg

27

<210> 288

<211> 9

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 288

Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Ser Arg Thr

1

5

<210> 289

<211> 378

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 289

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctttgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcc tgcactgggt ccggcaagct 120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atagtggtag cataggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaataga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagcccgt 300
ggatacagct atggttacgg ggagtactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
acggtcaccg tctcctca 378

<210> 290

<211> 126

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 290

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

<210> 291

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 291

ggattcacct ttgatgatta tgcc

24

<210> 292

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 292

Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	Ala
1				5			

<210> 293

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 293

attagttgga atagtggtag cata

24

<210> 294

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 294

Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile
1 5

<210> 295

<211> 57

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 295

gcaaaagccc gtggatacag ctatgggttac ggggagtact actacggtat ggacgtc 57

<210> 296

<211> 19

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 296

Ala Lys Ala Arg Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Gly Glu Tyr Tyr Tyr Gly
1 5 10 15
Met Asp Val

<210> 297

<211> 321

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 297

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgtagac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 298

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 298

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

<210> 299

<211> 18

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 299

cagagcatta gcagctat

18

<210> 300

<211> 6

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 300

Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
1				5	

<210> 301

<211> 9

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 301

gctgcatcc

9

<210> 302

<211> 3

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 302
Ala Ala Ser
1

<210> 303
<211> 27
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 303
caacagagtt acagtacccc gtacact

27

<210>304
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 304
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 305
<211> 351
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 305
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aactatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atattgtatg atggaagtaa taaatactat 180
acagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagataac 300
tggaaactctt ttgactactg gggccaggga accctgggtca ccgtctcctc a 351

<210> 306
<211> 117
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 306

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

<210> 307
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 307
 ggattcacct tcagtaacta tggc

24

<210> 308
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 308
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly
 1 5

<210> 309
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 309
 atattgtatg atggaagtaa taaa

24

<210> 310
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 310
Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 311
<211> 30
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 311
gcgagagata actggaactc ttttgactac 30

<210> 312
<211> 10
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 312
Ala Arg Asp Asn Trp Asn Ser Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 313
<211> 321
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 313
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatact gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacacta cccattcac ttcgggcct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 314
<211> 107
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 314
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	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Thr	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55				60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Phe
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 315
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 315
 cagagcatta gcagctat

18

<210> 316
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 316
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 317
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 317
 actgcatcc

9

<210> 318
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 318
Thr Ala Ser
1

<210> 319
<211> 27
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 319
caacagagtt acactacccc attcact

27

<210> 320
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 320
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 321
<211> 375
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 321
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagt agctattgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaatactat 180
gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagagg 300
gtagtagtac cagctgctat accccactgg tacttcgac tctggggccg tggcaccctg 360
gtcaccgtct cctca 375

<210> 322
<211> 125
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 322
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				
Trp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
Ala	Asn	Ile	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Val	Asp	Ser	Val		
	50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr		
65					70				75					80			
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
			85					90					95				
Ala	Arg	Glu	Arg	Val	Val	Val	Pro	Ala	Ala	Ile	Pro	His	Trp	Tyr	Phe		
		100					105					110					
Asp	Leu	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
	115						120					125					

<210> 323
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 323
 ggattcacct ttagtagcta ttgg

24

<210> 324
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 324
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp
 1 5

<210> 325
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 325
 ataaagcaag atggaagtga gaaa

24

<210> 326
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 326

Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys

1

5

<210> 327

<211> 54

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 327

gcgagagaga gggtagtagt accagctgct atacccact ggtacttcga tctc

54

<210> 328

<211> 18

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 328

Ala Arg Glu Arg Val Val Val Pro Ala Ala Ile Pro His Trp Tyr Phe

1

5

10

15

Asp Leu

<210> 329

<211> 339

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 329

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagggtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tggtagcagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca ttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300
 cctcggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa 339

<210> 330

<211> 113

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 330

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

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn 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 Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys

<210> 331
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 331
 cagagtgttt tatacagctc caacaataag aactac

36

<210> 332
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 332
 Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 333
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 333
 tgggcatct

9

<210> 334
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 334
Trp Ala Ser
1

<210> 335
<211> 27
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 335
cagcaatatt atagtactcc tcggacg

27

<210> 336
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 336
Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

<210> 337
<211> 375
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 337
caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggctc 60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagcgtat 300
tacgatattt tgactgggta ttactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360
gtcaccgtct cctca 375

<210> 338
<211> 125
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 338
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

<210> 339
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 339
 ggttacacct ttaccagcta tggt

24

<210> 340
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 340
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 341
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 341
 atcagcgctt acaatggtaa caca

24

<210> 342
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 342

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
 1 5

<210> 343

<211> 54

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 343

gcgagagcgt attacgatat ttgactggt tattactact acggtatgga cgtc 54

<210> 344

<211> 18

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 344

Ala Arg Ala Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
 1 5 10 15
 Asp Val

<210> 345

<211> 333

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 345

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc aggcgagtc ggacattagc aactatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctacgat gcatccaatt tggaaacagg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat ttactttca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatattg caacatatta ctgtcaacag tatgataatc tccctccggg gggttcattc 300
 actttcggcc ctgggaccaa agtggatc aaa 333

<210> 346

<211> 111

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 346

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	Tyr	Asp	Asn	Leu	Pro	Pro
				85				90					95		
Gly	Gly	Ser	Phe	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	
			100					105					110		

<210> 347
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 347
 caggacatta gcaactat

18

<210> 348
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 348
 Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 1 5

<210> 349
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 349
 gatgcatcc

9

<210> 350
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 350
Asp Ala Ser
1

<210> 351
<211> 39
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 351
caacagtatg ataatctccc tccggggggt tcattcact 39

<210> 352
<211> 13
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 352
Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Pro Gly Gly Ser Phe Thr
1 5 10

<210> 353
<211> 360
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 353
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccagggt 120
ccagggaagg ggctggaatg ggtctcaggt cttagtggta gtgggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attattgtgc gaaagagaaa 300
tataattgga aatttcactt tgactactgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca 360

<210> 354
<211> 120
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 354
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

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

<210> 355
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 355
 ggattcacct ttagcagtta tgcc

24

<210> 356
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 356
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 357
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 357
 cttagtggtgta gtggtggtag caca

24

<210> 358
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 358

Leu Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 359

<211> 39

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 359

gcgaaagaga aatataattg gaaatttcac tttgactac

39

<210> 360

<211> 13

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 360

Ala Lys Glu Lys Tyr Asn Trp Lys Phe His Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 361

<211> 321

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 361

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc aggcgagtc ggacattagc aactatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctacgat gcatccaatt tggaaacagg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactttca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatattg caacatatta ctgtcaacag tatgataatc tcccgcctac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 362

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 362

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 Tyr Asp Asn Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 363
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 363
 caggacatta gcaactat

18

<210> 364
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 364
 Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 1 5

<210> 365
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 365
 gatgcatcc

9

<210> 366
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 366
 Asp Ala Ser
 1

<210> 367
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 367
 caacagtatg ataatctccc gctcact

27

<210> 368
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 368
 Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu Thr
 1 5

<210> 369
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 369
 caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggctc 60
 tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgctt acaatggtaa cacaaactat 180
 gcacagaagc tccagggcag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagatggg 300
 agctactcct ggttcgaccc ctgggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 370
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 370
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu

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

<210> 371
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 371
 ggttacacct ttaccagcta tgggt

24

<210> 372
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 372
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 373
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 373
 atcagcgctt acaatggtaa caca

24

<210> 374
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 374
 Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
 1 5

<210> 375
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 375
 gcgagagatg ggagctactc ctggttcgac ccc 33

<210> 376
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 376
 Ala Arg Asp Gly Ser Tyr Ser Trp Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 377
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 377
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac ttcggcgga 300
 gggaccaagg tgagatcaa a 321

<210> 378
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 378
 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 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

<210> 379
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 379
 cagagcatta gcagctat

18

<210> 380
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 380
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 381
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 381
 gctgcatcc

9

<210> 382
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 382
 Ala Ala Ser
 1

<210> 383
 <211> 27

<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 383
caacagagtt acagtacccc gctcact

27

<210> 384
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 384
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 385
<211> 360
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 385
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caagtacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgaagacacg gccgtgtatt actgtgggag acaaagtggg 300
agctactact actacggtat ggacgtcttg ggccaaggga ccacgggtcac cgtctcctca 360

<210> 386
<211> 120
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 386
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

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

<210>	387
<211>	24
<212>	ADN
<213>	Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 387
ggtggctcca tcagtagtta ctac

24

<210>	388
<211>	8
<212>	PRT
<213>	Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 388
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 389
<211> 21
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 389
atctattaca gtgggagcac c

21

<210> 390
<211> 7
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

```
<400> 390
Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
  1             5
```

$\langle 210 \rangle$	391
$\langle 211 \rangle$	42

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 391

gggagacaaa gtgggagcta ctactactac ggtatggacg tc

42

<210> 392

<211> 14

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 392

Gly Arg Gln Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1

5

10

<210> 393

<211> 321

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 393

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca aagcatttagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatacagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgtagac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 394

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 394

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 85 90 95
 105

<210> 395
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 395
 caaagcatta gcagctat

18

<210> 396
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 396
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 397
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 397
 gctgcatcc

9

<210> 398
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 398
 Ala Ala Ser
 1

<210> 399
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 399
caacagagtt acagtacccc gtacact

27

<210> 400
<211> 9
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 400
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 401
<211> 528
<212> PRT
<213> Người

<400> 401
Met Glu Leu Lys Ala Glu Glu Glu Glu Val Gly Gly Val Gln Pro Val
1 5 10 15
Ser Ile Gln Ala Phe Ala Ser Ser Ser Thr Leu His Gly Leu Ala His
20 25 30
Ile Phe Ser Tyr Glu Arg Leu Ser Leu Lys Arg Ala Leu Trp Ala Leu
35 40 45
Cys Phe Leu Gly Ser Leu Ala Val Leu Leu Cys Val Cys Thr Glu Arg
50 55 60
Val Gln Tyr Tyr Phe His Tyr His His Val Thr Lys Leu Asp Glu Val
65 70 75 80
Ala Ala Ser Gln Leu Thr Phe Pro Ala Val Thr Leu Cys Asn Leu Asn
85 90 95
Glu Phe Arg Phe Ser Gln Val Ser Lys Asn Asp Leu Tyr His Ala Gly
100 105 110
Glu Leu Leu Ala Leu Leu Asn Asn Arg Tyr Glu Ile Pro Asp Thr Gln
115 120 125
Met Ala Asp Glu Lys Gln Leu Glu Ile Leu Gln Asp Lys Ala Asn Phe
130 135 140
Arg Ser Phe Lys Pro Lys Pro Phe Asn Met Arg Glu Phe Tyr Asp Arg
145 150 155 160
Ala Gly His Asp Ile Arg Asp Met Leu Leu Ser Cys His Phe Arg Gly
165 170 175
Glu Val Cys Ser Ala Glu Asp Phe Lys Val Val Phe Thr Arg Tyr Gly
180 185 190
Lys Cys Tyr Thr Phe Asn Ser Gly Arg Asp Gly Arg Pro Arg Leu Lys
195 200 205
Thr Met Lys Gly Gly Thr Gly Asn Gly Leu Glu Ile Met Leu Asp Ile
210 215 220
Gln Gln Asp Glu Tyr Leu Pro Val Trp Gly Glu Thr Asp Glu Thr Ser
225 230 235 240
Phe Glu Ala Gly Ile Lys Val Gln Ile His Ser Gln Asp Glu Pro Pro
245 250 255
Phe Ile Asp Gln Leu Gly Phe Gly Val Ala Pro Gly Phe Gln Thr Phe

				260					265					270		
Val	Ala	Cys	Gln	Glu	Gln	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Pro	Pro	Pro	Trp	Gly	
		275					280					285				
Thr	Cys	Lys	Ala	Val	Thr	Met	Asp	Ser	Asp	Leu	Asp	Phe	Phe	Asp	Ser	
	290					295					300					
Tyr	Ser	Ile	Thr	Ala	Cys	Arg	Ile	Asp	Cys	Glu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Val	
305					310					315					320	
Glu	Asn	Cys	Asn	Cys	Arg	Met	Val	His	Met	Pro	Gly	Asp	Ala	Pro	Tyr	
				325					330					335		
Cys	Thr	Pro	Glu	Gln	Tyr	Lys	Glu	Cys	Ala	Asp	Pro	Ala	Leu	Asp	Phe	
			340					345					350			
Leu	Val	Glu	Lys	Asp	Gln	Glu	Tyr	Cys	Val	Cys	Glu	Met	Pro	Cys	Asn	
		355					360					365				
Leu	Thr	Arg	Tyr	Gly	Lys	Glu	Leu	Ser	Met	Val	Lys	Ile	Pro	Ser	Lys	
	370					375					380					
Ala	Ser	Ala	Lys	Tyr	Leu	Ala	Lys	Lys	Phe	Asn	Lys	Ser	Glu	Gln	Tyr	
385					390					395					400	
Ile	Gly	Glu	Asn	Ile	Leu	Val	Leu	Asp	Ile	Phe	Phe	Glu	Val	Leu	Asn	
			405						410					415		
Tyr	Glu	Thr	Ile	Glu	Gln	Lys	Lys	Ala	Tyr	Glu	Ile	Ala	Gly	Leu	Leu	
		420						425					430			
Gly	Asp	Ile	Gly	Gly	Gln	Met	Gly	Leu	Phe	Ile	Gly	Ala	Ser	Ile	Leu	
	435						440					445				
Thr	Val	Leu	Glu	Leu	Phe	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Glu	Val	Ile	Lys	His	Lys	
	450					455					460					
Leu	Cys	Arg	Arg	Gly	Lys	Cys	Gln	Lys	Glu	Ala	Lys	Arg	Ser	Ser	Ala	
465					470					475					480	
Asp	Lys	Gly	Val	Ala	Leu	Ser	Leu	Asp	Asp	Val	Lys	Arg	His	Asn	Pro	
			485						490					495		
Cys	Glu	Ser	Leu	Arg	Gly	His	Pro	Ala	Gly	Met	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asn	
			500					505					510			
Ile	Leu	Pro	His	His	Pro	Ala	Arg	Gly	Thr	Phe	Glu	Asp	Phe	Thr	Cys	
		515					520					525				