



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0034178

(51)⁷ C07K 16/18; C07K 16/46; A61K 39/395 (13) B

(21) 1-2016-00679

(22) 29/08/2014

(86) PCT/KR2014/008106 29/08/2014

(87) WO2015/030539 05/03/2015

(30) 10-2013-0104112 30/08/2013 KR

(45) 26/12/2022 417

(43) 27/06/2016 339A

(73) APRILBIO CO., LTD. (KR)

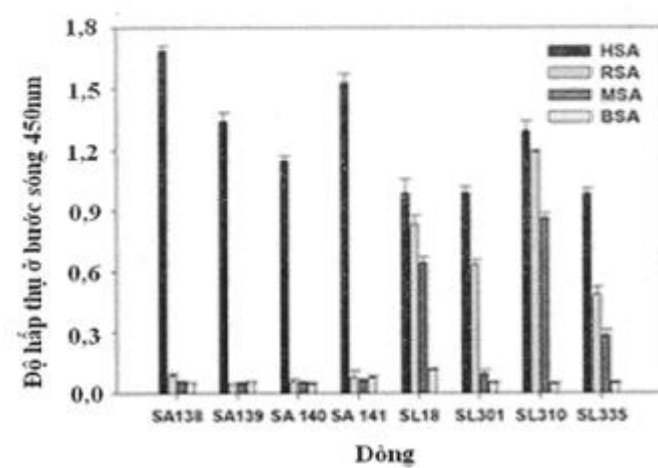
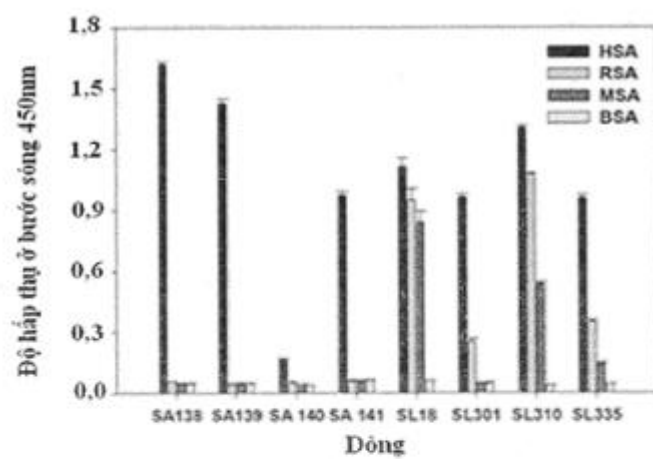
(202-208, A-dong, Kangwon National University Biomedical Science Building,
Hyoja-dong), 1, Gangwondaehak-gil, Chuncheon-si, Gangwon-do 200-701, Republic
of Korea

(72) CHA, Sanghoon (KR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) MẢNH GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN GẮN KẾT VỚI ALBUMIN HUYẾT
THANH CỦA NGƯỜI, CẤU TRÚC DUNG HỢP VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CẤU
TRÚC DUNG HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến mảnh gắn kết kháng nguyên gắn kết với albumin huyết thanh của người; cấu trúc dung hợp chứa mảnh gắn kết kháng nguyên này và gốc tác động có hoạt tính sinh học; vectơ biểu hiện; tế bào vật chủ chứa vectơ biểu hiện này; dược phẩm chứa cấu trúc dung hợp này; phương pháp làm tăng mức độ biểu hiện hòa tan của polypeptit hoặc protein có hoạt tính sinh học trong chu chất của *E. coli*; phương pháp làm tăng thời gian bán thải *in vivo* của polypeptit hoặc protein có hoạt tính sinh học; và phương pháp biểu hiện protein tái tổ hợp trong *E. coli*.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến mảnh gắn kết kháng nguyên gắn kết với albumin huyết thanh của người; cấu trúc dung hợp chứa mảnh gắn kết kháng nguyên này và gốc tác động có hoạt tính sinh học; vectơ biểu hiện; tế bào vật chủ chứa vectơ biểu hiện này; dược phẩm chứa cấu trúc dung hợp này; phương pháp làm tăng mức độ biểu hiện hòa tan của polypeptit hoặc protein có hoạt tính sinh học trong chu chất của *E. coli*; phương pháp làm tăng thời gian bán thải *in vivo* của polypeptit hoặc protein có hoạt tính sinh học; và phương pháp biểu hiện protein tái tổ hợp trong *E. coli*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chế phẩm chứa mảnh gắn kết kháng nguyên (Fab-antigen binding fragment) là một trong số các dược chất kháng thể đơn dòng thành công nhất. Ví dụ, Abciximab (ReoPro®), Ranibizumab (Lucentis®), và Certolizumab pegol (Cimzia®) v.v. đã được phê chuẩn để sử dụng làm thuốc ở nhiều quốc gia. Ngoài ra, các chế phẩm Fab đa dòng bao gồm Abciximab (ReoPro®), Ranibizumab (Lucentis®) và Certolizumab pegol (Cimzia®) cũng đang có trên thị trường châu Âu.

Quá trình tiếp hợp giữa gốc tác động (effector domain) ngoại sinh với các mảnh Fab có thể tạo ra tác dụng điều trị bệnh, khi chúng tạo ra cấu trúc dung hợp Fab-gốc tác động. Do đó, trên thực tế rất nhiều mảnh kháng thể trong các nghiên cứu lâm sàng được tạo tiếp hợp với gốc chức năng ngoại sinh. Trong cấu trúc protein dung hợp Fab (hoặc cấu trúc Fab-gốc tác động) như vậy, mảnh gắn kết kháng nguyên có thể có khả năng phân phối đặc hiệu đích, và protein hoặc polypeptit dung hợp (gốc tác động) có thể tạo ra các tác dụng điều trị bệnh. Các vùng dung hợp có nguồn gốc từ sinh vật chưa có nhân điển hình có thể chứa các độc tố tế bào, ví dụ, deBouganin (độc tố thực vật không có tính miễn dịch) (xem Entwistle *et al.*, (2012) *Cancer Biother Radiopharm.* 27, 582-92), staphylococcal enterotoxin (SE) (xem Ilack *et al.*, (2003) *Toxicology.* 185, 161-174) hoặc dạng đột biến của ngoại độc tố *Pseudomonas* (xem Choe *et al.*, (1994) *Cancer Res.* 54, 3460-3467; xem Kreitman *et al.*, (1994) *Int. J. Cancer* 57, 856-864). Ngoài ra, các miền

dung hợp chứa các polypeptit có nguồn gốc từ các sinh vật có nhân điển hình, như, scFv (xem Lu *et al.*, (2002) *J Immunolog Meth.* 267, 213- 226) hoặc xytokin (xem Holzer *et al.*, (1996) *Cytokine.* 8, 214-221; xem Sjogaard *et al.*, (1999) *Int J Oncol.* 15, 873-882), có thể được dùng làm các chất điều trị bệnh. Mặc dù chất đồng vị phóng xạ thường được tạo thể tiếp hợp bằng cách hóa học với mảnh Fab hoặc (Fab')₂, nhưng độc tố tế bào - xytokin hoặc enzym được dung hợp gen với Fab hoặc (Fab')₂. Đã biết rằng các phân tử Fab, không giống với scFv, Fv hoặc dsFv, có thể được tạo ra ở dạng hòa tan trong chu chất của *E. coli* ở nồng độ nhỏ 1 - 2 g/L (xem Humphreys *et al.*, *J. Immunol. Methods.* 209, 193-202; Carter *et al.*, *Biotechnology (N Y).* 10, 163167; Venturi *et al.*, *J Mol Biol.* 315, 1-8; Donzeau *et al.*, *Methods Mol Biol.* 378, 14-31), hoặc thậm chí là ở *Pseudomonas fluorescens* (xem Retallack *et al.*, *Prot Exp Purif.* 81, 157-165). Hiện nay, nhiều tác nhân sinh học có trên thị trường như rhGH, insulin hoặc nhiều loại xytokin khác nhau được tạo ra trong *E. coli* (xem Graumann and Premstaller, (2006) *Biotechnol J.* 1, 164-186; Chadd and Chamow, (2001) *Curr Opin Biotechnol.* 12, 188-194). Về mặt này, liên kết di truyền của miền trị liệu với mảnh Fab và các dược chất khác có nhiều ưu điểm trong việc phát triển thuốc sinh học mới, và cũng như làm tăng hiệu quả của các thuốc sinh học hiện nay. Hơn nữa, phân tử Fab có thể được dung hợp với các mảnh kháng thể khác như scFv, Fv, dsFv hoặc dAb để tạo ra phân tử kháng thể đặc hiệu kép hoặc tam đặc hiệu (xem Lu *et al.*, (2002) *J Immunolog Meth.* 267, 213-226). Tuy nhiên, sự biểu hiện của các protein dung hợp Fab-gốc tác động mà gốc tác động này có nguồn gốc từ sinh vật có nhân điển hình ở *E. coli* bị cản trở do gốc tác động không thể có chức năng sinh học do sự gấp nếp không thích hợp hoặc không có quá trình glycosyl hóa ở *E. coli*. Hơn thế nữa, cấu trúc dung hợp tối ưu để tạo ra các protein dung hợp Fab-gốc tác động ở chu chất của *E. coli* chưa được nghiên cứu một cách sâu rộng. Hầu hết các protein huyết thanh có phân tử lượng nhỏ nằm trong khoảng từ 50 kDa đến 60 kDa, như xytokin và các yếu tố sinh trưởng, có thời gian bán thải *in vivo* ngắn, ví dụ, từ vài phút đến vài giờ do khả năng thanh thải ở thận. Do đó, việc kéo dài thời gian bán thải của các polypeptit hoặc protein điều trị trong huyết thanh là một trong số các mục đích quan trọng nhất trong nghiên cứu sinh dược (xem Kontermann, (2012) Wiley, ISBN: 978-3-527-32849-9). Nhằm mục đích này, các phương pháp khác nhau bao gồm quá trình PEGyl hóa, polysialyl hóa, HESyl hóa, glycosyl hoá, hoặc chất tương tự PEG tái tổ hợp đã được dung hợp với chuỗi axit amin ưa nước và linh động (500 đến 600 axit amin) đã được phát triển (Xem Chapman,

2002; *Adv Drug Deliv Rev.* 54, 531~545; Schlapschy *et al.*, (2007) *Prot Eng Des Sel.* 20, 273~283; Contermann (2011) *Curr Op Biotechnol.* 22, 868~876; Jevsevar *et al.*, (2012) *Methods Mol Biol.* 901, 233~246). Hơn thế nữa, cơ chế quay vòng do FcRn gây ra được sử dụng một cách trực tiếp hoặc gián tiếp để kéo dài thời gian bán thải *in vivo* của các protein điều trị. Trong số các protein huyết thanh, đã biết rằng albumin huyết thanh người (human serum albumin - HSA) và globulin miễn dịch (cụ thể là IgG) có thời gian bán thải dài một cách bất ngờ thông qua cơ chế quay vòng do FcRn gây ra. Trong cơ thể người, thời gian bán thải của albumin trong huyết thanh là 19 ngày và thời gian bán thải của phân tử IgG kéo dài khoảng từ một tuần đến gần 4 tuần tùy thuộc vào loại phân nhóm IgG. Do đó, hai phân tử này được sử dụng làm các đối tác dung hợp để kéo dài thời gian bán thải của các protein và/hoặc polypeptit trị liệu.

hGH tái tổ hợp (~ 19kDa) đã được tạo ra trong bào chất hoặc chu chất của *E. coli* được sử dụng trên lâm sàng để điều trị các bệnh gây ra bởi sự thiếu hụt hormon sinh trưởng ở trẻ nhỏ cũng như ở người lớn, sau khi gấp nếp *in vitro* (xem Blethen *et al.*, (1997) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 418-420). Một nhược điểm lớn trong khi sử dụng rhGH là phải tiêm hằng ngày do thời gian bán thải ngắn (< 30 phút). Để kéo dài thời gian bán thải của hGH trong huyết thanh, cần có nhiều nỗ lực trong việc tạo ra thể tiếp hợp bằng cách hóa học của polyetylen glycol (xem các bài báo: Clark *et al.*, (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 21969-21977; Pradhananga *et al.*, 2002 *J Mol Endocrinol.* 29, 1114; Cho *et al.*, 2011; Sondergaard *et al.*, (2011) *J Clin Endocrinol Metabol.* 96, 681-688), và tạo ra thể tiếp hợp bằng cách hóa học của hGH đã được cải biến với một nhánh của Fab của CovX-IgG tiêu thể đã được làm giống như của người (xem Palanki *et al.*, (2013) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 402-406). Ngoài ra, việc kéo dài thời gian bán thải của hGH trong huyết thanh đạt được thành công bằng cách tạo dung hợp gen của albumin huyết thanh người (HSA) (Albutropin®) hoặc trình tự polypeptit chứa hàng trăm gốc Pro-Ala-Ser (PAS) (PASylation) (xem các bài báo: Osborn *et al.*, 2002 *Eur J Pharmacol.* 456, 149-158; Anderson *et al.*, (2011) *J Biol Chem.* 286, 5234-5241; Sleep *et al.*, (2013) *Biochimica et Biophysica Acta.* 1830, 5526-5534; Schlapschy *et al.*, (2013) *Protein Eng Des Sel.* 26, 489~501). Một chất đã được nghiên cứu kỹ lưỡng nhất trong lĩnh vực này là VRS-317, tức là rGH liên kết bằng cách di truyền với trình tự axit amin XTEN với đầu tận cùng N và đầu tận cùng C, do đó cho phép tạo ra phác đồ điều trị trong một tháng (xem Schellenberger *et al.*, (2007) *Nat Biotech.* 27, 1186-1190; Cleland *et al.*, (2012) *J*

Pharm Sci. 101, 2744-2754; Yuen et al., (2013) *J Clin Endocrinol Metab.* 98, 2595-2603). Ngoài ra, hGH cũng liên quan tới các bệnh về mạch (Xem Thomas J Merimee et al., (1973), *Diabetes*, 22, 813-819) và bệnh CRETZFELDT-JAKOB (Xem John Powell-Jackson et al., 1985, *Lancet*, 2, 244-246). Ngoài ra, IFN- γ làm tiến triển bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ (Xem Bruce R. Blazar et al., 2003, *The Journal of Immunology*, 171, 1272-1277) và IFN- α liên quan tới bệnh tự miễn (Xem A Imagawa et al., 1995, *The Journal of clinical endocrinology & metabolism*, 80, 922-926). Ngoài ra, GSCF cũng liên quan tới bệnh tự miễn (Xem Anke Franzke et al., 2003, *Blood*, 102, 734-739) và HCV liên quan tới bệnh gan (Xem Van Thiel DH et al., 1995, *Hepato-gastroenterology*, 42, 907-912).

Protein (hoặc polypeptit) dung hợp Fab là được chất tiềm năng lớn dùng để điều trị các bệnh mạn tính mà cần dùng liều thuốc lớn trong khoảng thời gian dài, cụ thể, đặc biệt là khi protein dung hợp Fab có thể được tạo ra trong hệ biểu hiện vi sinh vật với chi phí thấp. Mặc dù việc ứng dụng Fab có nhiều ưu điểm tiềm năng có thể như vậy, nhưng chưa từng có cố gắng ứng dụng kháng thể Fab kháng albumin huyết thanh (SA) nào trong việc phát triển thuốc chứa protein hoặc polypeptit có thời gian bán thải *in vivo* kéo dài. Trong bản mô tả này, các tác giả sáng chế đã tạo ra sáng chế bằng cách thiết kế cấu trúc dung hợp protein (hoặc polypeptit) Fab-gốc tác động kháng albumin huyết thanh (SA) mới, và chứng tỏ rằng việc tạo ra các cấu trúc dung hợp chức năng trong chu chất của *E. coli* sẽ có hiệu suất cao.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến mảnh gắn kết kháng nguyên (Fab-antigen binding fragment) có thời gian bán thải *in vivo* kéo dài trong huyết thanh.

Sáng chế cũng đề cập đến cấu trúc dung hợp Fab-gốc tác động có khả năng sản sinh tối ưu trong chu chất của tế bào vật chủ.

Sáng chế cũng đề cập đến vector biểu hiện và tế bào vật chủ để tạo ra các cấu trúc Fab-gốc tác động ở dạng hòa tan với hiệu suất cao.

Sáng chế cũng đề cập đến được phẩm chứa cấu trúc dung hợp nêu trên.

Để giải quyết các vấn đề nêu trên, sáng chế đề cập đến cấu trúc (hoặc dạng) dung hợp Fab-gốc tác động tối ưu để biểu hiện trong chu chất của *E. coli*, trong đó mảnh gắn

kết kháng nguyên này có miền biến đổi chuỗi nặng gắn kết với miền hằng định chuỗi nặng 1 (heavy chain constant 1 domain - C_{H1}), và có miền biến đổi chuỗi nhẹ gắn kết với miền hằng định chuỗi nhẹ (C_L).

Theo một phương án, Fab kháng SA của người được chọn làm mảnh kháng thể, cần nhắc rằng cấu trúc dung hợp của các protein điều trị khác nhau với albumin hoặc với các thành phần gắn kết với albumin, như các peptit có khối lượng nhỏ hoặc các kháng thể miền (domain antibody - dAb) có thời gian bán thải của các protein điều trị kéo dài thông qua cơ chế quay vòng do FcRn gây ra (xem các bài báo: Dennis *et al.*, (2002) *Biochimica et Biophysica Acta*. 1830, 5526-5534; Sleep *et al.*, (2013) *Biochimica et Biophysica Acta*. 1830, 5526-5534; Nguyen *et al.*, (2006) *Protein Eng Des Sel*. 19, 291-297; Kontermann, (2011) *Curr Op Biotechnol*. 22, 868~876). Theo các nghiên cứu trước, mảnh Fab có thời gian bán thải ngắn là 16-20 giờ ở người (Xem Ujhelyi and Robert, (1995) *Clin Pharmacokinet*. 28, 483-493) và ~ 3 giờ ở chuột sau khi sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch (xem Nguyen *et al.*, 2006 *Protein Eng Des Sel*. 19, 291 ~ 297). Đáng ngạc nhiên là, thời gian bán thải của Fab (SL335) theo sáng chế là 37 giờ ở chuột, dài hơn khoảng 12 lần so với Fab của người khỏe mạnh, và do đó đây là lí do để dự đoán rằng SL335 có thể có thời gian bán thải ít nhất nằm trong khoảng từ 160 đến 200 giờ (6 - 8 ngày) ở người. Đồng thời, hai miền Vk là dAbr3 và dAbr16 có ái lực gắn kết với RSA tương ứng bằng 13nM và 1mM, đã biết rằng chúng có các trị số $t_{1/2}$ là 53 giờ (dAbr3) và 43 giờ (dAbr16) ở chuột (xem Holt *et al.*, (2008) *Protein Eng Des Sel*. 21, 283 - 288). Hơn nữa, $t_{1/2b}$ của Ab Fab4D5-H với ái lực 92 nM với RSA là 26,9 giờ (xem bài báo của Nguyen *et al.*, 2006). Do đó, điều này có nghĩa là chức năng *in vivo* của SL335 là tương đương với chức năng của các dAb và peptit đặc hiệu với SA đã biết. Điều đáng chú ý là V_H và V_L của SL335 đều chỉ có chung độ tương đồng axit amin là 65 - 67% ở mức trình tự đầy đủ, và độ tương đồng axit amin ~ 50% ở mức vùng xác định bổ trợ (complementarity determining region - CDR) so với các dAb đặc hiệu với albumin đã được thông báo trước đó (dữ liệu không được thể hiện). Đặc biệt, theo một phương án, Fab đặc hiệu với albumin huyết thanh (SA) chứa miền biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1 (SA138 VH: QVQLQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYGISWVRQA PGQGLEWVGW INTYSGGTKYA QKFQGRVTMT RDTISITVYM ELSGLKSDDTAVY YCARLGHCQRGICSDAL DTWGQGTLVT VSS), SEQ ID NO.2 (SA139 VH: EVQLQSGAE VKEPGASVKV

SCKASGYTFS SYGISWVRQA PGQGLEWVGR INTYNGNTGYA QRLQGRVTMT TDTSTSIAYM EVRSLRSDDTAVY YCARLGHCQRGICSDAL DTWGQGTMTV VSS), SEQ ID NO.3 (SA140 VH: QVQLVQSGGG VVQTGGSLRL SCAASGFTFR NYGIHWVRQA PGKGLEWVAS ISYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSRNTVHV QMDSLRRGGDTAVY YCARDVHYYGSGSYNAF DIWGQGTLVT VSS), SEQ ID NO.4 (SA141 VH: QVQLVQSGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWLSV ISHDGGFQYYA DSVKGRFTVS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVY YCARAGWLRQYGM DVWGQGTLVT VSS), SEQ ID NO.5 (SL18 VH: EVQLVQSGTE VKKPGESLKI SCKISGYSFT AYWIAWVRQM PGKGLEWMGM IWPPDADARYS PSFQGQVTFS VDKSISTAYL QWHS�KTSDTAVY YCARLYSGSY SPWGQGTLVT VSS) và trình tự nêu trong SEQ ID NO.6 (SL301, SL310 và SL335 VH: QVQLVQSGGG PVKPGGSLRL SCAASGFMFR AYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSGRYIHYA DSVKGRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVY YCARETMAGKAL DYWGQGTLVT VSS); và miền biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7 (SA130: ELVLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSS RYLNWYQQKP GKAPKLLIYG ASRLESGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SDSVPVTFGQ GTRLEIKR), SEQ ID NO.8 (SA139 VL: DIVLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSS SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SYSTPPYTFGQ GTKLEIKR), SEQ ID NO.9 (SL18 VL: ELVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSIF NYVAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSKWPPTWTFGQ GTRVDIKR), SEQ ID NO.10 (SL301 VL: ELVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASETVSS RQLAWYQQKP GQAPRLLIYG ASSRATGIPD RFSGSGSGTD FTLTISRLEP EDSAVFYCQQ YGSSPRTFGG GTKLEIKR), SEQ ID NO.11 (SL310 VL: ELVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVSS SSLAWYQQKP GQAPRLLIYG ASSRATGIPD RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDAATYYCQK YSSYPLTFGQ GTKLEIKR) và trình tự nêu trong SEQ ID NO.12 (SL335 VL: ELVLTQSPGT LSLSPGETAT LSCRASQSVG SNLAWYQQKP GQAPRLLIYG ASTGATGVPA RFSGSRSGTD FTLTITSLQP EDFATYYCQQ YYSFLAKTFGQ GTQLEIKR). Và miền V_H của Fab nêu trên được gắn kết với miền hằng định chuỗi nặng 1 (miền C_{H1}), và miền V_L của Fab này được gắn

kết với miền hằng định chuỗi nhẹ (miền C_{κL}). Hơn thế nữa, Fab đặc hiệu với albumin huyết thanh (SA) theo sáng chế chứa các trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13 (CDR1)(AYSMN), 14 (CDR2) (SISSSGRYIHYADSVKG) và 15 (CDR3) (ETVMAGKALDY) trong vùng VH của SL335, và trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO.16 (CDR1)(RASQSVGSNLA), 17 (CDR2)(GASTGAT) và 18 (CDR3)(QQYYSFLLAKT) trong vùng VL của SL335.

Theo một phương án, axit amin xystein của miền C_{H1} và miền C_{κL} của Fab có thể được loại bỏ hoặc thay thế bằng các gốc serin. Cụ thể, như đối với SL335 nêu trên, axit amin xystein của miền C_{H1} là axit amin thứ 233 bắt đầu từ đầu tận cùng N của miền C_{H1}, và axit amin xystein của miền C_{κL} là axit amin thứ 214 bắt đầu từ đầu tận cùng N của miền C_{κL} được thế bằng các gốc serin. Để tránh nhầm lẫn, các chuỗi H và chuỗi L có Fab được gọi tên như sau: 1) Hxys: chuỗi H với xystein ở vị trí thứ 233, 2) Lxys: chuỗi L với xystein ở vị trí thứ 214, 3) Hser: chuỗi H với serin ở vị trí thứ 233, và 4) Lser: chuỗi L với serin ở vị trí thứ 214.

Theo một phương án khác, cấu trúc dung hợp Fab-gốc tác động được tạo ra bằng cách tạo liên kết giữa gốc tác động với đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của Fd hoặc chuỗi nhẹ của phân tử Fab thông qua quá trình dung hợp gen. Do các cơ chế gấp nếp và dimer hóa khác loại của các protein tái tổ hợp trong môi trường chu chất của *E. coli* diễn ra khá phức tạp và chưa được hiểu biết một cách rộng rãi, nên không thể dự đoán được rằng cấu trúc dung hợp Fab-gốc tác động có phải là dạng tối ưu để biểu hiện chức năng hay không.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến cấu trúc dung hợp chứa mảnh gắn kết kháng nguyên (Fab) và gốc tác động (gốc tác động có hoạt tính sinh học), trong đó axit amin xystein của miền C_{H1} và axit amin xystein của miền C_{κL} của Fab được loại bỏ hoặc thay thế bằng các gốc serin; và gốc tác động có hoạt tính sinh học là protein hoặc polypeptit; và Fab và gốc tác động có hoạt tính sinh học được liên kết cộng hóa trị bằng phương pháp dung hợp gen. Fab và gốc tác động có hoạt tính sinh học có thể được liên kết cộng hóa trị bằng phương pháp dung hợp gen nhờ sử dụng liên kết peptit giữa O với 20 axit amin. Trong số sáu dạng (hoặc cấu trúc) dung hợp Fab-gốc tác động chứa hGH theo sáng chế, các kết quả được chứng minh một cách rõ ràng rằng HserG/Lser có mức độ biểu hiện cao nhất ở *E. coli*. Tức là, theo phương án này, việc loại bỏ cả Xys²³³ trong

miền C_{H1} lẫn Xys^{214} trong C_{Lk} bằng cách khuyết hoặc thế bằng gốc axit amin khác sẽ cải thiện mức độ biểu hiện của cấu trúc tác động SL335-cấu trúc dung hợp trong dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy. Điều này đề cập đến ba vấn đề quan trọng. Thứ nhất, cấu trúc dung hợp của gốc tác động, ví dụ, hGH với đầu C của C_{H1} được ưu tiên hơn so với đầu C của C_{Lk} . Trước đó, Lu et al. đã thông báo rằng liên kết di truyền của scFv kháng Flt-1 với đầu C của C_{H1} của Fab kháng KDR làm cho hiệu suất cao hơn năm lần so với liên kết với đầu C của miền C_L (xem Lu et al., (2002) *J Immunolog Meth.* 267, 213 - 226). Mặc dù dữ liệu không được đưa ra, nhưng phân tích thẩm tách Western của các tác giả sáng chế bằng cách sử dụng dịch dung giải *E. coli* toàn phần cho thấy rằng các mảnh Fd của LxysG/Hxys và LserG/Hxys hầu hết bị thoái biến hoàn toàn, khiến cho không phát hiện được dạng hòa tan của các protein dung hợp trong dịch nổi trên bề mặt *E. coli*. Do các miền V_H có xu hướng kết tụ trong *E. coli* (Dudgeon et al., (2009) *Protein Eng Des Sel.* 22, 217 - 220), nên có thể suy đoán rằng sự có mặt của gốc tác động ở đầu C của C_L có thể cản trở quá trình tương tác của miền V_H với miền V_L và miền C_{H1} với miền C_L , làm kết tụ và thoái biến các mảnh Fd một cách nhanh chóng. Bằng cách so sánh mức độ biểu hiện hòa tan giữa LserG/Hxys và LserG/Hser, sự có mặt của Xys^{233} trong miền C_{H1} dường như có thể thúc đẩy quá trình này do tạo ra liên kết disulfua bất thường. Sau khi loại Xys^{233} trong miền C_{H1} , sự có mặt của gốc tác động ở đầu C_{H1} có thể có tác dụng có lợi trong việc làm giảm quá trình kết tụ miền V_H bằng cách phong bế một phần bề mặt kỵ nước trên miền V_H trước khi ghép đôi V_H-V_L . Thứ hai, sự có mặt của Xys^{214} của C_{Lk} còn làm giảm quá trình hòa tan của protein dung hợp SL335-hGH theo cách khác. Hiệu suất tạo HserG/Lxys thấp hơn so với HserG/Lser có thể được giải thích bởi xu hướng của các chuỗi L để tạo ra homodime, được biết là các protein Bence Jones (xem Kirsh et al., (2005) *J Immunol Methods.* 301, 173 - 185), trong đó Xys^{214} của C_{Lk} có thể có tác dụng làm ổn định homodime, hoặc liên quan tới việc tạo ra liên kết disulfua bất thường với các gốc xystein khác trong protein dung hợp. Cũng đã biết rằng liên kết disulfua giữa đầu C của C_{H1} và C_L trong Fab là liên kết rất linh hoạt với mức linh động đáng kể (xem các bài báo: Rothlisberger et al., (2005) *J. Mol. Biol.* 347, 773 - 789; Humphreys et al., (2007) *Protein Eng Des Sel.* 20, 227 - 234). Về mặt này, sáng chế đề cập đến mảnh gắn kết kháng nguyên (Fab) không có Xys^{233} của miền hằng định chuỗi nặng 1 (C_{H1}) và Xys^{214} của miền hằng định chuỗi nhẹ (C_{Lk}). Tương tự, HerGF/Lser và HserIFNb/Lser có mức độ biểu hiện cao nhất ở *E. Coli*. Trong cấu trúc dung hợp theo sáng chế, tỷ lệ mol của

polypeptit (hoặc protein) có hoạt tính sinh học và Fab nằm trong khoảng từ 1:1 đến 10:1, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1:1 đến 4:1. Thứ ba, mức độ biểu hiện lẫn khả năng tiếp cận của kháng thể kháng hGH với miền hGH đều gây cản trở ở mức độ nhất định khi có mặt hai gốc xystein có đầu C này ở SL335. Điều này có thể là quan trọng đối với chức năng điều trị bệnh của gốc tác động trong cấu trúc dung hợp Fab-gốc tác động nếu quá trình tương tác giữa gốc tác động và phối tử của nó cũng gây trở ngại. Các tác giả sáng chế đã chứng minh được rằng việc sử dụng Fab_{Δds} làm cấu trúc dung hợp là thích hợp không chỉ đối với hGH, do các gốc tác động khác như G-CSF và IFN- β tạo ra các kết quả giống nhau.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vector biểu hiện và chủng SUPEX5 đột biến của *E. Coli* (KCTC 12657BP) làm tế bào vật chủ. Chủng này được tạo ra bằng cách tạo đột biến hóa học ngẫu nhiên của chủng MC1061 của *E. coli* đã được chọn do nó có nguồn gốc từ chủng K12 của *E. coli*, là một trong số các chủng chủ chính để sản xuất được phẩm sinh học thương mại. Bằng cách so sánh với chủng MC1061 bố mẹ, việc sử dụng chủng SUPEX5 đột biến của *E. coli* làm chủng chủ biểu hiện còn tạo ra hiệu quả có lợi trong việc sản sinh HserG/Lser. Không những đối với cấu trúc dung hợp SL335-hGH, mà tổ hợp của Fab_{ds} và chủng SUPEX5 của *E. coli* thường cũng là có lợi trong việc biểu hiện hòa tan của protein dung hợp Fab-gốc tác động, điều này đã được chứng minh một cách rõ ràng bởi các kết quả thu được từ các cấu trúc dung hợp SL335-GCSF (SL335_{wt}-GCSF so với SL335_{Δds}-GCSF), cấu trúc dung hợp SL335-IFN β (SL335_{wt}-IFN β so với SL335_{Δds}-IFN β) cấu trúc dung hợp EGL4-hGH (EGL4_{wt}-hGH so với EGL4_{Δds}-hGH), và cấu trúc dung hợp 1 β 28-hGH (1 β 28_{wt}-hGH so với 1 β 28_{Δds}-hGH). Do đó, các kết quả này đã chứng minh một cách chắc chắn rằng việc sử dụng Fab_{Δds}, dạng đột biến của Fab không có Xys²³³ của C_{H1} và Xys²¹⁴ của C_{LK}, là có lợi hơn so với Fab thông thường trong quá trình biểu hiện hòa tan các protein dung hợp Fab-gốc tác động ít nhất ở chủng SUPEX5 của *E. coli*. Quá trình cùng biểu hiện các protein chaperon hoặc disulfua isomeraza (FkpA, SurA, Skp, Sec A, Sec B, DsbA hoặc Dsb C) có thể cải thiện được mức độ biểu hiện hòa tan và chức năng của SL335_{wt}-GCSF hoặc thậm chí là SL335_{Δds}-GCSF, do đã biết rằng các cấu trúc dung hợp này có khả năng làm tăng hiệu suất sản sinh chu chất của các mảnh Fab hòa tan trong *E. coli* (xem Schlapschy *et al.*, (2006) *Escherichia coli. Protein Eng Des Sel.* **19**, 385 - 390). Các tác giả sáng chế tin rằng việc sử dụng Fab_{ds} có thể là có lợi, đặc biệt khi các chaperon và phân xúc tác để tạo

ra disulfua trong lưới nội chất quá lớn do mức độ biểu hiện các protein dung hợp Fab-gốc tác động cao trong các tế bào vật chủ.

Theo một phương án, SL335_{Δds}-hGH đã được tạo ra ở nồng độ khoảng 10mg/L bằng cách sử dụng bình cầu nuôi cấy, có hiệu suất cao hơn so với các thông báo trước đây, mặc dù kích cỡ phân tử tăng gấp 4 lần theo sáng chế. Theo các thông báo trước đây, các nghiên cứu về mức độ biểu hiện hòa tan của rhGH trong chu chất của *E. coli* cho thấy rằng hiệu suất là 0,64 - 2,57mg/L đối với pelB-hGH và 0,32 - 2,29mg/L đối với ompA-hGH (xem Sockolosky and Szoka, (2013) *Protein Exp Purif.* 87, 129 - 135), đồng thời hiệu suất của rhGH phụ thuộc phần lớn vào các vùng khởi đầu và chùng chủ của *E. coli* được sử dụng (xem Soares *et al.*, (2003) *Protein Engineering.* 16, 1131 - 1138). Bằng cách tối ưu hóa môi trường đơn giản, các tác giả sáng chế thường thu được hiệu suất ~ 50mg/L trong dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy bằng cách sử dụng bình cầu nuôi cấy cho tới khi đạt tới mật độ tế bào OD_{600nm} = ~ 10 - 11 (bản thảo về quy trình điều chế), có thể được cải tiến tiếp đủ để áp dụng ở quy mô công nghiệp bằng cách điều chỉnh các thành phần đã được tinh chế của môi trường và hệ thống nuôi cấy cấp theo mẻ.

Theo một khía cạnh khác, các protein tác động SL335_{ds} có ái lực với HAS gia tăng. Theo một phương án, SL335_{ds}-hGH có khả năng đáp ứng với HAS (Albumin huyết thanh người) tăng từ năm đến chín lần và khả năng đáp ứng với RSA (Albumin huyết thanh chuột) giảm từ 1,3 đến 4 lần tùy thuộc vào độ pH so với SL335 bố mẹ. Quá trình tạo liên kết di truyền của mảnh kháng thể và gốc tác động có thể ảnh hưởng tới ái lực gắn kết với kháng nguyên của mảnh kháng thể này, và mức biến đổi ái lực có thể biến đổi trong khoảng rộng tùy thuộc vào bản chất của mảnh kháng thể, gốc tác động và cách liên kết với hai gốc chức năng này. Sự khác nhau về ái lực thu được khi không có mặt liên kết disulfua nội chuỗi hoặc khi có mặt miền dung hợp hGH vẫn chưa được hiểu một cách rõ ràng. Tuy nhiên, ảnh hưởng của cấu trúc dung hợp hGH đến ái lực gắn kết của SL335_{Δds} với các kháng nguyên đường như là khác nhau không đáng kể so với cấu trúc dung hợp IFN-α2b-DOM7 h-14, mà ái lực với SA của người, chuột nhắt và chuột giảm 7,7, 22,3 và 15,8 lần so với DOM7 h-14 bố mẹ (xem Walker *et al.*, (2010) *Protein Eng Des Sel.* 23, 271 - 278). Do đó, Fab có thể có lợi hơn so với Ab miền trong việc duy trì ái lực và gấp nếp gốc tác động do các miền C_{H1} và C_L tạo ra không gian nhằm làm giảm mức độ cản trở không gian giữa vùng gắn kết với kháng nguyên và gốc tác động gắn kết với các phối tử

tương ứng.

Theo một phương án khác, SL335_{Δds}-hGH có khả năng kéo dài thời gian bán thải trong huyết thanh một cách đáng kể vì $t_{1/2}$ của nó (16,6 giờ khi sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch) là tương đương với thời gian bán thải của PEG5-hGH (250 kDa) (xem Clark et al., 1996). Điều bất ngờ là, $t_{1/2}$ của SL335_{Δds}-hGH cao hơn 5,6 lần so với Albutropin® ($t_{1/2} = 2,96$ h), và $t_{1/2}$ giữa SL335_{Δds}-hGH và Albutropin® còn cao hơn nữa khi sử dụng S.C. (dưới da) lên tới 16 lần (97,2 giờ so với 5,93 giờ) (xem Osborn et al., 2002), mặc dù sự so sánh này là gián tiếp nếu các thử nghiệm không được tiến hành trong cùng một điều kiện. Tương tự, $t_{1/2}$ của IFN-a2b-DOM7 h-14 dài hơn khoảng 1,5 lần so với HSA-IFN-a2b (xem Walker et al., 2010). Do đó, có thể cho rằng cấu trúc dung hợp của chất gắn kết albumin có thời gian bán thải dài hơn so với cấu trúc dung hợp với albumin, và các cơ chế cơ bản vẫn chưa được xác định. Đáng chú ý là $t_{1/2}$ của SL335_{Δds}-hGH trong huyết thanh khi sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch là tương đương với của VRS-317 ($t_{1/2} = 15$ giờ) (Cleland et al., (2012) *J Pharm Sci.* 101, 27442754). Do đó điều này có nghĩa là liều dùng kéo dài một lần một tuần hoặc thậm chí một lần một tháng có thể chấp nhận được đối với SL335_{Δds}-hGH (được gọi là SAFAtropin®).

Theo một phương án khác, tác dụng dược lực học của SL335_{Δds}-hGH dường như là vượt trội hơn nhiều so với Albutropin®, và lớn hơn 7 lần so với Growtropin® trên cơ sở mol, từ đó xem xét phác đồ điều trị một lần một tuần. Điều đáng tiếc là, các tác giả sáng chế phải dừng nghiên cứu dược lực học trong 2 tuần ở ngày thứ 11 do một số chuột đã bị cắt bỏ tuyến yên, đặc biệt là các chuột thuộc nhóm chỉ cho sử dụng tá dược, bị chết sớm. Có thể nhận thấy rằng các chuột bị căng thẳng trầm trọng do vận chuyển một khoảng cách dài từ Nhật Bản tới Hàn Quốc sau khi phẫu thuật trong tháng tám, các chuột chỉ dùng tá dược bị giảm 5% khối lượng và các trị số về độ lệch chuẩn lớn hơn so với các tác giả sáng chế dự đoán. Tuy nhiên, dường như rõ ràng là SL335_{Δds}-hGH có tác dụng vượt trội để phát triển thành hGH có tác dụng kéo dài, và do đó, hiện các tác giả sáng chế cho rằng nó liên quan tới SAFAtropin®.

Theo một phương án khác, polypeptit có hoạt tính sinh học được dung hợp với Fab nêu trên là polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm hormon, xytokin, enzym, kháng thể, yếu tố sinh trưởng, yếu tố phiên mã, yếu tố đông máu, vacxin, protein cấu trúc, protein phối tử và thụ thể.

Theo một phương án khác, polypeptit có hoạt tính sinh học là polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm hormon sinh trưởng của người, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, interferon, thụ thể interferon, yếu tố kích thích tạo máu, peptit tương tự glucagon, thụ thể liên hợp với protein G, interleukin, thụ thể interleukin, enzym, protein gắn kết interleukin, protein gắn kết xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố tế bào B, yếu tố tế bào T, protein A, chất ức chế dị ứng, glycoprotein hoại tử tế bào, độc tố miễn dịch, lymphotoxin, yếu tố hoại tử khối u, chất kìm hãm khối u, yếu tố phát triển sự di căn, alpha-1 antitrypsin, albumin, alpha-lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin, erythropoietin đã được glycosyl hóa ở mức cao, angiopoietin, hemoglobin, trombin, peptit hoạt hóa thụ thể trombin, trombomodulin, yếu tố đông máu VII, yếu tố đông máu VIIa, yếu tố đông máu VIII, yếu tố đông máu IX, yếu tố đông máu XIII, yếu tố hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế renin, chất ức chế collagenaza, superoxit dismutaza, leptin, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu, yếu tố sinh trưởng biểu mô, yếu tố sinh trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố sinh trưởng xương, protein kích thích tạo xương, calcitonin, insulin, atriopeptin, yếu tố tạo sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hóa mô liên kết, chất ức chế quá trình của yếu tố mô, hormon kích thích nang, hormon tạo hoàng thể, hormon giải phóng hormon tạo hoàng thể, yếu tố sinh trưởng thần kinh, hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, somatomedin, yếu tố sinh trưởng tương tự insulin, hormon vỏ tuyến thượng thận, glucagon, cholexystokinin, polypeptit tuyến tụy, peptit giải phóng gastrin, yếu tố giải phóng corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp, autotaxin, lactoferin, myostatin, thụ thể, chất đối kháng thụ thể, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vacxin có nguồn gốc từ virus, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng và mảnh kháng thể.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm, trong đó dược phẩm này chứa cấu trúc dung hợp Fab-gốc tác động theo sáng chế và tá dược được dung, và có thời gian bán thải *in vivo* tăng. Dược phẩm theo sáng chế có thể được đưa vào cơ thể qua nhiều đường khác nhau bao gồm đường miệng, qua da, dưới da, tĩnh mạch, hoặc trong cơ, và tốt hơn nữa là có thể được dùng ở dạng dược phẩm dùng để tiêm. Ngoài ra, dược phẩm theo sáng chế có thể được bào chế bằng cách sử dụng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này để giải phóng hoạt chất nhanh, kéo dài hoặc chậm sau khi sử dụng các dược phẩm này. Dược phẩm này có thể ở dạng viên nén, viên

tròn, bột, gói nhỏ, cốm ngọt, hỗn dịch, nhũ tương, dung dịch, sirô, khí dung, viên nang mềm và viên nang cứng, dung dịch tiêm vô trùng, bột dạng gói vô trùng và các dạng tương tự. Ví dụ về các chất mang, tá dược và chất pha loãng thích hợp là lactoza, đextroza, sucroza, manitol, xylitol, erythritol, maltitol, tinh bột, gồm acaxia, alginat, gelatin, canxi phosphat, canxi silic oxit, xenluloza, metyl xenluloza, xenluloza dạng vi tinh thể, polyvinyl pyrrolidon, nước, metylhydroxybenzoat, propylhydroxybenzoat, bột talc, magie stearat và dầu khoáng. Hơn nữa, dược phẩm này có thể còn chứa chất độn, chất chống kết dính, chất làm trơn, chất gây ẩm, chất tạo hương, chất nhũ hoá, chất bảo quản và các chất tương tự.

Cần phải hiểu rằng lượng protein dung hợp hoặc polypeptit đã được dùng thực tế cần được xác định phụ thuộc vào các yếu tố có liên quan khác nhau bao gồm tình trạng bệnh lý cần được điều trị, đường đưa thuốc đã được chọn, tuổi tác, giới tính và thể trọng của từng đối tượng bị bệnh, và mức độ trầm trọng của triệu chứng của đối tượng bị bệnh; và loại polypeptit có hoạt tính sinh học của hoạt chất. Do protein dung hợp theo sáng chế có thời gian bán thải vượt trội trong máu, nên số lần và tần suất dùng các chế phẩm peptit chứa protein dung hợp theo sáng chế có thể được giảm xuống một cách đáng kể.

Trong bản mô tả này, các dạng từ số ít “một” cũng được dự định bao gồm dạng từ số nhiều, nếu không có chỉ dẫn cụ thể khác. Hơn thế nữa, ở mức độ nhất định khi các thuật ngữ “bao gồm”, “bao gồm”, “có”, “với”, “như” hoặc các biến thể của chúng, được sử dụng trong phần mô tả và/hoặc yêu cầu bảo hộ, thì các thuật ngữ này không bị giới hạn và dự định là bao hàm theo cách tương tự với thuật ngữ “chứa”.

Theo sáng chế, “polypeptit hoặc protein có hoạt tính sinh học” là polypeptit hoặc protein có hoạt tính sinh học có lợi khi được sử dụng cho động vật có vú bao gồm người.

Theo sáng chế, “cấu trúc (hoặc dạng) dung hợp Fab-gốc tác động” là cấu trúc trong đó polypeptit hoặc protein có hoạt tính sinh học liên kết cộng hoá trị với Fab. Ngoài ra, “cấu trúc (hoặc dạng) dung hợp Fab-gốc tác động” được hiểu là chứa protein dung hợp Fab, polypeptit dung hợp Fab, cấu trúc dung hợp và dạng dung hợp.

Liên quan tới vấn đề này, sáng chế được mô tả một cách chi tiết trong các ví dụ. Cần lưu ý rằng phần mô tả của các ví dụ không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế như đã được mô tả trong phần bản chất kỹ thuật nêu trên.

Sáng chế đề cập đến kỹ thuật liên quan đến Fab_{Δds} kháng albumin huyết thanh (anti-Serum Albumin Fab_{Δds}-Associated - SAFA) là kỹ thuật nền tảng mới để phát triển các chất trị liệu sinh học có tác dụng kéo dài. Liên quan tới vấn đề này, sáng chế có ưu điểm hơn so với các kỹ thuật thông thường khác bao gồm quá trình PEGyl hóa, dung hợp Fc, kỹ thuật AlbudAb và dung hợp albumin liên quan tới tác dụng kéo dài *in vivo*, duy trì cấu trúc của gốc tác động, ái lực gắn kết và quy trình sản xuất và thao tác đơn giản với chi phí thấp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện kết quả của thử nghiệm ELISA đối với thể thực khuẩn đơn dòng để xác định độ đặc hiệu gắn kết của các kháng thể của thể thực khuẩn Fab kháng SA.

Fig.2 thể hiện quá trình xác định độ đặc hiệu gắn kết với kháng nguyên của các dòng Fab của người bằng thử nghiệm ELISA.

Fig.3 thể hiện kết quả được động học *in vivo* của SL335.

Fig.4 là biểu đồ minh họa sáu cấu trúc dung hợp SL335-hGH được thiết kế cấu trúc trong nghiên cứu này.

Fig.5 thể hiện kết quả của thử nghiệm ELISA để xác định hiệu suất và khả năng phản ứng gắn kết của cấu trúc dung hợp SL335-hGH hòa tan trong dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy của *E. coli*. Dấu hiệu gắn kết được quan sát bằng mắt bằng cách sử dụng cơ chất TMB, và độ hấp thụ ở 450 nm được đo bằng cách sử dụng máy đọc ELISA. Dữ liệu được biểu thị bằng trị số trung bình $\pm$ SD của ba thử nghiệm.

Fig.6 thể hiện kết quả của thử nghiệm ELISA để xác định mức độ biểu hiện phụ thuộc vào nhiệt độ và *E. coli* chủ của các biến thể SL335 và SL335-hGH (20°C, A; 25°C, B; hoặc 30°C, C).

Fig.7 thể hiện kết quả của thử nghiệm ELISA để xác định hiệu suất của các cấu trúc dung hợp SL335-GCSF và SL335-IFN β hòa tan trong dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy của *E. coli*.

Fig.8 thể hiện kết quả của thử nghiệm ELISA để xác định hiệu suất của các cấu trúc dung hợp EGL4-hGH (A), và 1 β 28-hGH hòa tan (B) trong dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy của *E. coli*.

Fig.9 thể hiện kết quả phân tích SL335_{wt}-hGH và SL335_{ds}-hGH bằng phương pháp SDS-PAGE và thẩm tách Western.

Fig.10 thể hiện kết quả phân tích HcycG/Lxys và HserG/Lser bằng cách điện di mao quản trên cơ sở Chip.

Fig.11 thể hiện kết quả phân tích HcycG/Lxys và HserG/Lser bằng khối phổ MALDI-TOF.

Fig.12 thể hiện quá trình tinh chế HserG/Lser thông qua việc lọc gel bằng cách sử dụng FPLC.

Fig.13 thể hiện quá trình xác định hoạt tính sinh học hGH *in vitro* của SL335_{ds}-hGH bằng thử nghiệm tăng sinh tế bào Nb2-11.

Fig.14 thể hiện quá trình xác định độ ổn định trong huyết thanh của SL335_{ds}-hGH bằng thử nghiệm ELISA và thử nghiệm tăng sinh tế bào Nb2-11 *in vitro*.

Fig.15 thể hiện kết quả phân tích dược động học của Growtropin hoặc SL335_{ds}-hGH ở chuột.

Fig.16 thể hiện mức độ tăng khối lượng phụ thuộc liều ở chuột đã được cắt bỏ tuyến yên đã được điều trị bằng Growtropin® hoặc SL335_{Δds}-hGH. N= 3 chuột trong mỗi nhóm điều trị, cân mỗi chuột một lần một ngày.

Fig.17 thể hiện mức tăng phụ thuộc liều theo chiều dài xương chày của chuột đã được điều trị bằng Growtropin® hoặc SL335_{Δds}-hGH. N=3-4 chuột trong mỗi nhóm điều trị, đo chiều dài mỗi xương chày của một chuột.

Fig.18 thể hiện vector pHEKA theo sáng chế.

Fig.19 thể hiện trình tự axit nucleic của vector pHEKA theo sáng chế.

Fig.20 thể hiện trình tự axit amin suy ra của gen VH và VL đã được sử dụng bởi các dòng Fab kháng SA theo sáng chế.

Fig.21 thể hiện trình tự ADN của các gen VH (A) và VL (B) đã được sử dụng bởi các dòng Fab kháng SA theo sáng chế.

Fig.22 thể hiện thông tin trình tự của cấu trúc dung hợp Fab-gốc tác động theo sáng chế. Gốc liên kết và các gốc tác động được gạch chân và các vùng CDR được in

đậm.

Mô tả chi tiết sáng chế

1. Nguyên liệu và phân tích

1-(1) Tách dòng và các chủng

Tất cả các thử nghiệm tách dòng ADN được tiến hành theo quy trình tiêu chuẩn (Xem ấn phẩm: Sambrook *et al.*, (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed., (New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press)). Các oligonucleotit loại giải trình tự và các gen đã được tối ưu bộ ba mã hóa để tạo ra cấu trúc dung hợp SL335-gốc tác động được tổng hợp bởi Bioneer, Daejeon, Hàn Quốc. Quá trình khuếch đại PCR được thực hiện bằng cách sử dụng Pyrobest hoặc Ex-Taq ADN polymeaza (Takara, tsu, Nhật Bản) trong điều kiện 25 vòng ở nhiệt độ 94°C trong 1 phút, nhiệt độ 58°C trong 1 phút và nhiệt độ 72°C trong 1 phút, tiếp đó là nhiệt độ 72°C trong 10 phút, trừ khi có chỉ dẫn khác. Các endonucleaza giới hạn, phosphatase kiềm từ tôm (shrimp alkaline phosphatase - SIP) và T4 ADN ligaza cũng được mua từ Takara. Chủng MC1061 của *E. coli* [*araD139* *Del(araA-leu)7697* *Del(lac)X74* *galK16* *galE15*(GalS) *lambda-e14-mcrA0* *relA1* *rpsL150(strR)* *spoT1* *mcrB1* *hsdR2*] (ATCC, Manassas, USA) được sử dụng để tách dòng và chủng SUPES5 của *E. coli* được sử dụng để biểu hiện protein tái tổ hợp. Chủng TG1 của *E. coli* {F' [*traD36* *proAB*⁺ *lacI*^q *lacZ*ΔM15] *supE* thi-1 Δ(*lac-proAB*) Δ(*mcrB-hsdSM*)5, (*r_K⁻m_K⁻*)} (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) được sử dụng để tạo ra thể thực khuẩn tái tổ hợp.

1-(2) Sàng lọc sinh học thư viện kháng thể HuDV Fab-8L

Quá trình làm giàu thể thực khuẩn tái tổ hợp gắn kết với các kháng nguyên đích được thực hiện như đã được mô tả trước đó (xem Joo *et al.*, (2008) *J. Immunol. Method.* 333, 24-37; Hur *et al.*, (2010) *Immunol Lett.* 132, 24-30). Tóm lại, các hạt từ đã được tosyl hóa đã tạo tiếp hợp với albumin huyết thanh của người, chuột hoặc chuột nhắt (lần lượt là HSA, RSA hoặc MSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) được trộn với 10¹⁰ thể thực khuẩn từ thư viện kháng thể HuDV Fab-8L (AprilBio, Chuncheon, Hàn Quốc) trong 4 giờ ở nhiệt độ 4°C, và rửa ba lần bằng nước muối đệm phosphat chứa 0,02% Tween (PBST). Các kháng thể thể thực khuẩn gắn kết với các hạt này được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (glyxin 0,1M, độ pH = 2). Các tế bào TG1 mới mang các chuỗi

nhẹ tương ứng (L) ($V_L + C_{Lk}$) được gây nhiễm bằng thể thực khuẩn đã được rửa giải, và phát triển trong môi trường 2 YT chứa 25µg/mL ampicillin, 10µg/mL carbenicillin và 10µg/mL tetracycline ($2 \times$ YT/ACT). Sau đó, thể thực khuẩn tái tổ hợp này được khuếch đại bằng cách sử dụng thể thực khuẩn trợ giúp Ex-12 (AprilBio) để sàng lọc tiếp. Sau khi sàng lọc lần cuối cùng, tiến hành thử nghiệm ELISA đối với thể thực khuẩn đơn dòng để xác định các dòng dương tính. Các gen Fd ($V_H + C_{HI}$) thu được từ các dòng dương tính được tách dòng cấp hai thành vector pHg3A-3 (AprilBio, Chuncheon, Hàn Quốc), và quá trình tối ưu hóa chuỗi L được thực hiện bằng cách sử dụng 1410^8 thư mục chuỗi kL của người trong vector phagemit pLf1T-3 (AprilBio).

1-(3)- Phân tích trình tự ADN

Phagemit pHf1g3A-2 (AprilBio) và plasmit pLf1A-3 (AprilBio) được tách ra từ các tế bào *E. coli* sản sinh các phân tử Fab kháng SA bằng cách sử dụng kit Wizard Plasmid Miniprep (Promega, Madison, WI, USA). Hai đoạn môi giải trình tự khác nhau (5'-gtgccgttctatagccatagcac-3' (SEQ ID NO.19) và 5'-ggcactggctggttcgctaccgtg-3' (SEQ ID NO.20)) được bổ trợ với pHf1g3A-2 hoặc pLT-2 được sử dụng để đọc lần lượt các gen V_H và V_L . Quá trình giải trình tự ADN được thực hiện bởi SolGent, Daejeon, Hàn Quốc.

1-(4) Thiết kế vector biểu hiện pHEKA

Mảnh ADN #1 chứa vị trí giới hạn *Bgl* II + vùng khởi đầu *trc* + vị trí gắn kết ribosom (RBS) với vùng tăng cường dịch mã g10 thu được bằng cách khuếch đại PCR từ vector pTrcHis-B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) bằng cách sử dụng Pyrobest ADN polymeaza và cặp đoạn môi PCR #1 (5'-gggagatcttgaaatgagctgttgacaattaatcatccg-3' (SEQ ID NO.21)) và #2 (5'-cctctttaattttaataataaagttaatcgataattcc-3' (SEQ ID NO.22)). Mạch ADN #2 chứa vùng tăng cường dịch mã g10 + RBS + *Bam*H I + vị trí tách đa dòng (MCS) + vùng kết thúc phiên mã thu được bằng cách khuếch đại PCR từ cùng một khuôn như đã được nêu trên bằng cách sử dụng đoạn môi PCR #3 (5'-ggaattatcgattaactttattattaa-aaattaaagaggtatatattagatccgagctcgagttctgca-3' (SEQ ID NO.23)) và #4 (5'-gggcactacgtgcgaaaggccagctcttcgact-3' (SEQ ID NO.24)). PCR liên kết được thực hiện để lắp ráp hai mảnh ADN này bằng cách sử dụng Ex-*Taq* ADN polymeaza và cặp đoạn môi PCR #1 và #4. Mạch ADN ~520 bp thu được được phân lập bằng cách điện di trên gel agarosa. Sau đó, sản phẩm PCR liên kết và plasmit pET28a (Invitrogen) được cắt

giới hạn bằng *Bgl* II và *Dra* III và nối với nhau bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi biến nạp các tế bào điện khả biến MC1061 bằng 3mL chất phản ứng nối, các thể biến nạp của *E. coli* được chọn trên các đĩa 2 YT chứa 50µg/mL kanamycin (Sigma-Aldrich). Để tách dòng cấp hai các gen Fab vào vector pHEKA, các gen chuỗi Fd (V_H+C_{H1}) được khuếch đại PCR từ vector phagemit pHf1g3A-2 bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi PCR #5 (5'-ggccgcagatctgttaattaaggaggaatt-taaagaattcatgaaaaactgctgttcgcgattccgct-3' (SEQ ID NO.25)) và #6 (5'-gggaagcttattaaca-agattgggctcaactctctgtcc-3' (SEQ ID NO.26)), và các gen chuỗi L được khuếch đại PCR từ vector plasmit pLT-2 bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi PCR #7 (5'-gggggatccatgaaaaagacagctatcgcgattgcagt-3' (SEQ ID NO.27)) và #8 (5'-attcctccttaa-ttaacagatctgcggccgactcgagattaacactctcccctgttgaagctctttgt-3' (SEQ ID NO.28)). Các mảnh gen chuỗi Fd và L thu được được lắp ráp bằng cách tạo liên kết PCR nhờ sử dụng các đoạn mồi PCR #6 và #7, và sản phẩm PCR thu được có kích cỡ ~1,4 kbp được cắt ra khỏi gel agarosa. Sau đó, sản phẩm PCR và plasmit pHEKA được cắt giới hạn bằng *Bam*H I và *Hind* III, được nối với nhau bằng cách sử dụng T4 ADN ligaza trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng, và điện di vào các tế bào điện khả biến MC1061 hoặc SUPLEX5 của *E. coli*. Các đoạn mồi PCR đã được sử dụng để tạo ra vector biểu hiện pHEKA được thể hiện trong Bảng 1, và Fig.18 là biểu đồ của vector biểu hiện pHEKA.

Bảng 1

Các đoạn mồi PCR tạo ra vector biểu hiện pHEKA

Cấu trúc	Đoạn mồi	Trình tự oligonucleotit
pHEKA	Đoạn mồi 1	5' - gggagatcttgaaatgagctgttgacaattaatcatccg-3' (SEQ ID NO.21)
	Đoạn mồi 2	5' - cctctttaattttaataataaagttaatcgataattcc-3' (SEQ ID NO.22)
	Đoạn mồi 3	5' - ggaattatcgattaactttattattaaaaaattaaagaggtatatattaggatccgagctcgagttctgca-3' (SEQ ID NO.23)
	Đoạn mồi 4	5' - gggcactacgtgcgaaaggccagctcttcgact-3' (SEQ ID NO.24)
	Đoạn mồi 5	5' - ggccgcagatctgttaattaaggaggaatttaagaattcatgaaaaactgctgttcgcgattc-cgct-3' (SEQ ID NO.25)
	Đoạn mồi 6	5' - gggaagcttattaacaagatttgggctcaactctctgtcc-3' (SEQ ID NO.26)
	Đoạn mồi 7	5' - gggggatccatgaaaaagacagctatcgcgattgcagt-3' (SEQ ID NO.27)
	Đoạn mồi 8	5' - attcctccttaattaacagatctgcggccgactcgagattaacactctcccctgttgaagctctttgt-3' (SEQ ID NO.28)

1-(5)- Thiết lập chủng SUPLEX5 đột biến của *E. Coli*

Quá trình tạo đột biến hóa học được về cơ bản thực hiện như được mô tả trong các tài liệu đã nêu. Tóm lại, các tế bào MC1061 của *E. coli* biểu hiện phức hợp keto axit

dehydrogenaza mạch nhánh kháng người-E2(BCKD-E2) scFv được dung hợp với phosphatza kiềm (AP) được phát triển trong môi trường Luria Broth (LB) chứa 50µg/mL ampicilin cho tới khi OD₆₀₀ ~ 0,3. Các tế bào chứa trong 5mL môi trường nuôi cấy được thu gom bằng cách ly tâm ở 3000 g trong 10 phút, rửa hai lần bằng dung dịch đệm natri xitrat lạnh 0,1M (độ pH = 5,5). Sau đó, các tế bào được tạo hỗn dịch lại trong 1,9mL dung dịch đệm nêu trên, và xử lý bằng 50µg/mL N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ở nhiệt độ 37°C trong 15, 30 và 45 phút. Sau khi xử lý MNNG, các tế bào này được trộn, rửa hai lần và tạo hỗn dịch lại trong 2mL môi trường LB. Sau đó, thử nghiệm lai khuẩn lạc bằng hệ thống hai màng được tiến hành như đã được mô tả. Tóm lại, các đĩa LB aga chứa 50µg/mL ampicillin và 10µg/mL carbenicillin được phủ bằng màng ni-lông thứ nhất (màng thấm Nytran N Nylon 0,45 m) (GE Healthcare Life Science, Wauwatosa, WI, USA) có khả năng gắn kết với protein kém. Vi khuẩn đã đột biến được phết lên các màng này với mật độ 10⁶ tế bào/đĩa và phát triển trong 8 giờ ở nhiệt độ 37°C. Đồng thời, màng nitroxenluloza thứ hai (Bio-TraceTM NT Nitrocellulose Transfer Membrane) (PALL, Port Washington, NY, USA) được đặt nằm ngang trên các đĩa LB aga mới chứa 50µg/mL ampicillin, 10µg/mL carbenicillin và 1 mM isopropyl-D-1-thiogalactopyranosit (IPTG) (Sigma-Aldrich). Màng ni-lông thứ nhất được loại ra khỏi đĩa LB aga và đặt lên trên đỉnh của màng thứ hai, tiếp đó tiến hành ủ ở nhiệt độ 37°C trong 5 giờ. Sau khi ủ, màng thứ nhất (chứa các khuẩn lạc) được loại bỏ, được đặt lên các đĩa LB aga mới chứa 50µg/mL ampicillin và 10µg/mL carbenicillin, và bảo quản ở nhiệt độ 4°C để sau đó thu lại vi khuẩn. Màng thứ hai được rửa ba lần trong 10 phút trong dung dịch nước muối đệm phosphat mới chứa 0,1% thể tích/thể tích Tween 20 (PBS/Tween), và ngâm vào cơ chất nitro xanh da trời tetrazolium clorua (NBT)/5-brom-4-clo-3-indolyl phosphat (BCIP) (Duchefa, Haarelem, Netherlands) để quan sát bằng mắt hoạt tính AP của các khuẩn lạc. Các khuẩn lạc của *E. coli* có hoạt tính AP đặc trưng được chọn từ các bộ lọc thứ nhất tương ứng, được gộp lại vào nhau, và quá trình tạo đột biến thứ hai và thử nghiệm lai khuẩn lạc được tiến hành. Sau khi tiến hành thử nghiệm lai khuẩn lạc thứ hai, các dòng *E. coli* dương tính thử nghiệm được chọn, và nuôi cấy trong 10mL môi trường 2 YT chứa 50µg/mL ampicillin và 10µg /mL carbenicillin cho tới khi OD₆₀₀ bằng 0,5. IPTG được bổ sung vào môi trường nuôi cấy này ở nồng độ cuối cùng 0,1mM, và các tế bào được cho phát triển qua đêm ở nhiệt độ 27°C. Sau đó, dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy thu được bằng

cách ly tâm ở 3300 g trong 20 phút. Để tạo ra các phần chiết chu chất, các hạt tế bào được tạo hỗn dịch lại trong dung dịch chiết chu chất (2 dung dịch gốc: 200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, NaCl 2M, độ pH = 7,4), được làm đông lạnh và làm tan ba lần, và ly tâm ở 10000g trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Cuối cùng, phần chiết chu chất chứa cấu trúc dung hợp kháng BCKD-AP hòa tan thu được bằng cách thu gom dịch nổi trên bề mặt. Dung dịch pha loãng theo bậc của dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy và phần chiết chu chất được tạo ra bằng cách sử dụng PBS chứa 1% albumin huyết thanh bò (BSA) (Sigma-Aldrich), và 50mL mẫu dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy hoặc phần chiết chu chất được trộn với 100mL cơ chất p-nitrophenyl phosphat (pNPP) (Roche, South Sna Francisco, CA, USA) trong đĩa vi chuẩn độ 96 giếng (SPL, Hàn Quốc). Sau từ 5 đến 10 phút, 25μL NaOH 3M được bổ sung vào mỗi giếng để dừng phản ứng, và độ hấp thụ ở 415 nm được đo bằng cách sử dụng máy đọc ELISA (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Bốn chủng *E. coli* đột biến (M#5, M#7, M#54 và M#69) có mức độ biểu hiện của cấu trúc dung hợp kháng BCKD-AP tăng được phát triển trong môi trường 2 YT mà không có chất kháng sinh ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Sau đó, các tế bào này được phết lên các đĩa LB aga với mật độ $\sim 10^3$ tế bào/đĩa, và phát triển ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Các khuẩn lạc thu được được tái tạo lên các đĩa LB aga có hoặc không có 50μg/mL ampicillin. Các khuẩn lạc của *E. coli* được phát triển trong các đĩa LB aga mà không có chất kháng sinh nhưng không phát triển trong các đĩa LB aga chứa chất kháng sinh đã được chọn, và phát triển trong môi trường 2 YT mà không có chất kháng sinh cho tới khi OD₆₀₀ đạt tới $\sim 1,0$. Các dung dịch gốc chứa tế bào được tạo ra bằng cách bổ sung glyxerol (20% thể tích/thể tích), và bảo quản ở 80°C. Để tách dòng, các tế bào điện khả biến được tạo ra từ các chủng đột biến theo quy trình tiêu chuẩn, và bảo quản ở 80°C. M#5 là một trong số các chủng *E. coli* đột biến, được gọi là SUPLEX5 (KCTC 12657BP), và sử dụng để biểu hiện Fab và các protein dung hợp Fab-gốc tác động.

1-(6)- Thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA)

Để thử nghiệm ELISA đối với thể thực khuẩn đơn dòng, thể thực khuẩn tái tổ hợp thu được từ các dòng *E. coli* dương tính bằng cách giải phóng thể thực khuẩn, và $\sim 10^8$ CFU/giếng được bổ sung vào các đĩa MaxiSorb ELISA (Nunc, Roskilde, Đan mạch) được phủ bằng 5μg/mL HSA, RSA, MSA hoặc BSA. Thể thực khuẩn này được cho gắn kết với kháng nguyên ở độ pH = 6 hoặc ở độ pH = 7,4 trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Ab L

kappa kháng người của dê đã được tiếp hợp với HRPO (Sigma-Aldrich) được sử dụng làm kháng thể thứ cấp. Dấu hiệu gắn kết được quan sát bằng mắt bằng cơ chất TMB (BD Science, San Jose, CA, USA), và độ hấp thụ ở 450nm được đo bằng cách sử dụng máy đọc ELISA (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Dữ liệu được biểu thị bằng trị số trung bình của độ lệch chuẩn của ba thử nghiệm. Đối với ELISA thông thường, các kháng nguyên khác nhau [SA của người, SA của chuột, SA của chuột nhắt, SA của khỉ (Alpha diagnostic Intl., San Antonio, TX, USA), SA của chó (CUSABIO, Wuhan, Hubei, China), SA của thỏ (Sigma-Aldrich), thụ thể yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGFR) (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), phân tử bám dính tế bào biểu mô (EpCAM) (R&D systems), thụ thể IL-15 α (IL-15R α) (R&D systems), IL-1 β (eBioscience, San Diego, CA, USA), CD16a (R&D systems), c-MET (Sinobiological, Beijing, China)] ở nồng độ 5 μ g/mL được cố định trên các đĩa vi chuẩn độ, và các phân tử Fab được cho gắn kết với kháng nguyên, và phát hiện như đã nêu trên. Để xác định nồng độ của protein dung hợp Fab-hGH hoặc Fab hòa tan, thử nghiệm ELISA kẹp được thực hiện bằng cách sử dụng mAb của chuột nhắt kháng IgG Fd của người (AprilBio) làm Ab bắt giữ và pAb-HRPO của dê đã được tiếp hợp kháng chuỗi kappa L của người (Sigma-Aldrich) làm kháng thể phát hiện. Mảnh Fab của người (Bethyl, Montgomery, TX, USA) có nồng độ đã biết được sử dụng để tạo ra đường chuẩn. Để phát hiện miền hGH, T-20, pAb của dê đặc hiệu với đầu C của hGH (Santacruz Biotechnology, Dallas, Tx, USA) và NYThGH, mAb của chuột nhắt đặc hiệu với hGH có chiều dài đầy đủ (Prospec, East Brunswick, NJ, USA) được sử dụng, tiếp đó lần lượt sử dụng pAb-HRPO của thỏ đã được tiếp hợp kháng IgG của dê (Sigma-Aldrich) hoặc pAb-HRPO của dê đã được tiếp hợp kháng IgG của chuột nhắt (Sigma-Aldrich), làm kháng thể thứ cấp. pAb của dê kháng GCSF của người (R&D systems) được sử dụng để phát hiện miền G-CSF, và pAb của thỏ kháng IFN- β của người (PEPROTECH, Rocky Hill, USA) được sử dụng để phát hiện miền IFN- β .

1-(7)- Thiết kế mảnh Fab và protein dung hợp Fab-gốc tác động hòa tan

Fab và các protein dung hợp Fab-hGH hòa tan được tạo ra bằng cách nuôi cấy các tế bào SUPLEX5 của *E. coli* trong 10mL hoặc 1L môi trường 2 YT chứa 50 μ g/mL kanamycin ở nhiệt độ 37°C cho tới khi OD_{600nm} = 0,5, sau đó bổ sung IPTG 0,05mM. Sau 20 giờ ủ ở nhiệt độ 20°C bằng cách lắc mạnh, dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy và hạt tế bào được tách bằng cách ly tâm ở 3300g trong 20 phút. Các phần chiết chu chất

thu được như đã được nêu trên. Để tinh chế, sau đó dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy và/hoặc các phân chiết chu chất được cho đi qua nhựa Sepharosa 4B được cố định bằng HSA (AprilBio). Sau khi rửa kỹ, các phân tử Fab gắn kết với nhựa được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (glyxin 0,1M, glyxerol 10%, độ pH = 3), tiếp đó là trung hòa ngay bằng dung dịch đệm Tris (Tris HCl 0,5M, NaCl 2M, độ pH = 9,0). Ngoài ra, tiến hành lọc gel HserG/Lser sau khi tinh chế ái lực bằng cách sử dụng AKTA FPLC (GE Healthcare, Wauwatosa, WI, USA). Tóm lại, cột đã được nhồi trước HiprepTM16/60 SephacrylTM S-200HRP được tạo cân bằng bằng dung dịch đệm cân bằng (HEPES 20mM, NaCl 150mM, độ pH = 7,4), và mang 5 μ L HserG/Lser (cấu trúc dung hợp SL335 _{Δ ds}-hGH). Quá trình rửa giải được tiến hành bằng dung dịch đệm cân bằng ở áp suất báo động 0,35 Mpa và tốc độ chảy 0,5 μ L/phút. Phân đoạn số 13, 16, 19 và 23 được phân tích bằng SDS-PAGE như được mô tả.

1-(8) Đo ái lực bằng máy đo giao thoa lớp sinh học

Thử nghiệm gắn kết thời gian thực giữa SL335 đã được tinh chế và kháng nguyên (SA của người, SA của chuột hoặc SA của chuột nhắt) được tiến hành bằng cách sử dụng máy đo giao thoa lớp sinh học với hệ thống Octet RED (ForteBio, Menlo park, CA, USA) như đã được mô tả trước đó ngoại trừ rằng chất cảm biến sinh học phản ứng amin thế hệ hai (AR2G-Amin Reactive Second Generation) được sử dụng (Costin *et al.*, (2013) *J Virol.* 87, 52-66). Tóm lại, nồng độ của SL335 đã được xác định trước được liên hợp với chất cảm biến sinh học AR2G loại động học, và các mảnh Fab không gắn kết được loại ra khỏi bề mặt của chất dò bằng cách ủ trong dung dịch đệm động học (etanolamin 1M, độ pH = 8,5). Sau đó, các đầu dò được cho gắn kết với SA của người, SA của chuột hoặc SA của chuột nhắt ở các nồng độ đã được xác định trước trong các điều kiện độ pH = 6,0 hoặc độ pH = 7,4 (nồng độ SA của người ở độ pH = 6 và độ pH = 7,4: 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM và 12,5 nM; nồng độ SA của chuột ở độ pH = 6: 4 mM, 1 mM, 500 nM, 250 nM và 125 nM; Nồng độ SA của chuột ở độ pH = 7,4: 4 mM, 2 mM, 1 mM, 500 nM và 125 nM; nồng độ SA của chuột nhắt ở độ pH = 6 và độ pH = 7,4: 20 mM, 10 mM, 5 mM, 2,5 mM và 12,5 mM), tiếp đó là phân ly trong PBS chứa 0,1% BSA, độ pH = 6 hoặc độ pH = 7,4. Các thông số động học gắn kết và phân ly được tính toán bằng cách sử dụng gói phần mềm Octet QK, mà các đường cong gắn kết quan sát được phù hợp với mô hình gắn kết 1:1 để tính toán hằng số tốc độ liên kết. Các hằng số tốc độ liên kết và

phân ly được tính toán bằng cách sử dụng ít nhất ba nồng độ SA của người, SA của chuột hoặc SA của chuột nhất khác nhau. Hằng số phân ly cân bằng được tính toán là hằng số tốc độ phân ly động học chia cho hằng số tốc độ liên kết động học.

1-(9) Thiết kế cấu trúc dung hợp SL335-hGH

Để tạo SL335ds, Fd đột biến (thể Xys²³³ Ser²³³), được gọi là Hser, thu được bằng cách khuếch đại PCR từ gen chuỗi Fd được tối ưu bộ ba mã hóa của SL335 bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #9 (5'-ggggaattcatgaaatatctgctgcctacggcgggcgggcctgctgctgctgctgcacaa-3' (SEQ ID NO.29)) và #10 (5'-gggaagcttttagctgctcttcggtccacgcgtt-3' SEQ ID NO.30)). Sản phẩm PCR ~750 bp được xử lý bằng *EcoR* I/ *Hind* III và nối bằng pHEKA. Chuỗi L đột biến (thể Xys²¹⁴ → Ser²¹⁴), được gọi là Lser, cũng thu được bằng cách khuếch đại PCR từ gen chuỗi L được tối ưu bộ ba mã hóa của SL335 bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #11 (5'-gggggatccatgaaaaaactgcgattgcgattgcggtgctggccggctttg - 3' (SEQ ID NO.31)) và #12 (5'-gggctcgagtagctttcgc cgcggttaaagctctttg - 3' (SEQ ID NO.32)), cắt bằng *Bam*H I/*Xho* I và tách dòng thành pHEKA chứa Hser. Các quy trình tách dòng để tạo ra cấu trúc HxysG/Lxys được tiến hành như sau: Fd kiểu hoang với Xys²³³, được gọi là Hxys, được khuếch đại PCR từ Fd được tối ưu bộ ba mã hóa của SL335 bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #9 và #13 (5'-agatccaggagctggtgcagaaccgcagctcttcggtccacgcgtt-3' (SEQ ID NO.33)), và hGH chứa trình tự liên kết cũng được khuếch đại PCR từ gen hGH được tối ưu bộ ba mã hóa bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #14 (5'-gggtctgcaccagctcctggatcttttcgaccattccgctgagccg-3' (SEQ ID NO.34)) và #15 (5'-gggaagcttttagaagccgcaggagccctcca-3' (SEQ ID NO.35)). Các gen Hxys và hGH được liên kết với nhau để tạo ra HxysG bằng PCR tích hợp bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #9 và #15, cắt bằng *EcoR* I/*Hind* III, và tách dòng thành pHEKA chứa chuỗi L kiểu hoang với Xys²¹⁴ của SL335, được gọi là Lxys. Để tạo ra cấu trúc LxysG/Hxys, Lxys, được khuếch đại PCR từ chuỗi L được tối ưu bộ ba mã hóa của SL335 bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #11 và #16 (5'-agatccaggagctggtgcagaaccgcattcgccgcggttaaagctcttt-3' (SEQ ID NO.36)), và hGH chứa trình tự liên kết cũng được khuếch đại PCR từ gen hGH được tối ưu bộ ba mã hóa bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #14 và #17 (5'-gggctcgagtagaagccgcaggagccctcca-3' (SEQ ID NO.37)). Lxys và gen hGH được liên kết để tạo ra LxysG bằng PCR tích hợp bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #11 và #17, cắt bằng

BamH I/*Xho* I và tách dòng thành pHEKA chứa Fd kiểu hoang. Để tạo ra cấu trúc HserG/Lxys, Hser được khuếch đại PCR từ chuỗi Fd kiểu hoang được tối ưu bộ ba mã hóa bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi PCR #9 và #18 (5'-gggctcgagttagaagccgcaggagccctcca-3' (SEQ ID NO.38)). Tiến hành khuếch đại bằng PCR của hGH chứa trình tự liên kết, PCR tích hợp và tách dòng HserG được tiến hành để tạo ra cấu trúc HxysG/Lxys. Để tạo ra cấu trúc LserG/Hxys, Lser được khuếch đại PCR từ chuỗi L được tối ưu bộ ba mã hóa của SL335 bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi PCR #11 và #19 (5'-agatccaggagctggtgcagaaccgctgctcttcggttcacgcgtt-3' (SEQ ID NO.39)). Quá trình khuếch đại PCR của hGH chứa trình tự liên kết, PCR tích hợp và tách dòng LserG được tiến hành để tạo ra cấu trúc LxysG/Hxys. Để tạo ra cấu trúc HerG/Lser, tiến hành khuếch đại bằng PCR của HserG và hGH, và PCR tích hợp để tạo ra cấu trúc HserG/Lxys ngoại trừ rằng pHEKA chứa Lser được sử dụng để tách dòng. LserG/Hser cũng được thiết kế cấu trúc như thiết kế cấu trúc LserG/Hxys ngoại trừ rằng pHEKA chứa Hser được sử dụng để tách dòng. Các đoạn mồi PCR để tạo ra cấu trúc dung hợp SL335-hGH và cấu trúc dung hợp SL335_{Δds}-hGH được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

Các đoạn mồi PCR để khuếch đại cấu trúc dung hợp SL335-hGH hoặc SL335_{Δds}-hGH

Cấu trúc	Đoạn mồi	Trình tự oligonucleotit
SL335 _{Δds}	Đoạn mồi 9	5'-ggggaattcatgaaatatctgctgcctacggcggcggcgggcctgctgctggctgcacaa-3' (SEQ ID NO.29)
	Đoạn mồi 10	5'-gggaagcttttagctgctcttcggttcacgcgtt-3' (SEQ ID NO.30)
	Đoạn mồi 11	5'-gggggatccatgaaaaaactgcgattgcgattgcggtgctggccggctttg-3' (SEQ ID NO.31)
	Đoạn mồi 12	5'-gggctcgagttagctttcgccgcggttaaagctctttg-3' (SEQ ID NO.32)
Cấu trúc dung hợp SL335 _{wt} -hGH	Đoạn mồi 13	5'-agatccaggagctggtgcagaaccgcagctcttcggttcacgcgtt-3' (SEQ ID NO.33)
	Đoạn mồi 14	5'-ggttctgcaccagctcctggatctttccgaccattccgctgagccg-3' (SEQ ID NO.34)
	Đoạn mồi 15	5'-gggaagcttttagaagccgcaggagccctcca-3' (SEQ ID NO.35)
	Đoạn mồi 16	5'-agatccaggagctggtgcagaaccgcattcgccgcggttaaagctcttt-3' (SEQ ID NO.36)
	Đoạn mồi 17	5'-gggctcgagttagaagccgcaggagccctcca-3' (SEQ ID NO.37)
Cấu trúc dung hợp SL335 _{Δds} -hGH	Đoạn mồi 18	5'-agatccaggagctggtgcagaaccgctgctcttcggttcacgcgtt-3' (SEQ ID NO.38)
	Đoạn mồi 19	5'-agatccaggagctggtgcagaaccgctttcgccgcggttaaagctctttg-3' (SEQ ID NO.39)

1-(10)- Thiết kế cấu trúc dung hợp SL335-GCSF

Các quy trình tách dòng để thiết kế cấu trúc HxysGF/Lxys được thực hiện như được nêu dưới đây; Hxys được khuếch đại PCR từ chuỗi H được tối ưu bộ ba mã hóa của SL335 bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #9 và #20 (5'-agatccaggagctggtgcagaaccgctttcgccgcggttaaagctctttg-3' (SEQ ID NO.40)), và G-CSF chứa trình tự liên kết cũng được khuếch đại PCR từ gen G-CSF được tối ưu bộ ba mã hóa bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #21 (5'- ggttctgcaccagctcctggatctgcgctacctatcgcgcgagca-3' (SEQ ID NO.41)) và #22 (5'-gggaagcttattaaggctgtgccagatggcgag-3' (SEQ ID NO.42)). Các gen Hxys và G-CSF được liên kết với nhau bằng PCR tích hợp bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #9 và #22, cắt bằng *EcoR* I/*Hind* III, và tách dòng thành pHEKA chứa chuỗi L của SL335. Để tạo ra cấu trúc LxysGF/Hxys, Lxys được khuếch đại PCR từ chuỗi L được tối ưu bộ ba mã hóa của SL335 bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #11 và #23 (5'-agatccaggagctggtgcagaaccgcattcgccgcggttaaagctcttt-3' (SEQ ID NO.43)), và G-CSF chứa trình tự liên kết cũng được khuếch đại PCR từ gen G-CSF được tối ưu bộ ba mã hóa bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #21 và #24 (5'-taacagatctgcggccgcactcgagattaaggctgtgccagatggcgag-3' (SEQ ID NO.44)). Các gen Lxys và G-CSF được liên kết bằng PCR tích hợp bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #11 và #25 (5'-agatccaggagctggtgcagaaccgctgctcttcggttcacgcgtt-3' (SEQ ID NO.45)), cắt bằng *Bam*H I/*Xho* I và tách dòng thành pHEKA chứa Fd của SL335. Để tạo ra cấu trúc HserGF/Lser, Hser được khuếch đại PCR từ Fd được tối ưu bộ ba mã hóa của SL335 bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #9 và #25. Các gen Hser và G-CSF được liên kết với nhau bằng PCR tích hợp bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #9 và #22, cắt bằng *EcoR* I/*Hind* III, và tách dòng thành pHEKA chứa Lser. Để tạo ra cấu trúc LserGF/Hser, Lser được khuếch đại PCR từ chuỗi L được tối ưu bộ ba mã hóa của SL335 bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #11 và #26 (5'-agatccaggagctggtgcagaaccgctttcgccgcggttaaagctctttg-3' (SEQ ID NO.46)), và G-CSF chứa trình tự liên kết cũng được khuếch đại PCR từ gen G-CSF được tối ưu bộ ba mã hóa sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #21 và #24. Các gen Lxys và G-CSF được liên kết bằng PCR tích hợp bằng cách sử dụng cặp đoạn mỗi PCR #11 và #25, cắt bằng *Bam*H I/*Xho* I và tách dòng thành pHEKA chứa Hser. Các đoạn mỗi PCR để tạo ra cấu trúc dung hợp SL335-GCSH và cấu trúc dung hợp SL335_{Δds}-GCSF được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3

Đoạn mồi PCR của các cấu trúc dung hợp SL335-GCSH hoặc SL335_{Δds}-GCSF

Cấu trúc	Đoạn mồi	Trình tự oligonucleotit
Cấu trúc dung hợp SL335 _{wt} -GCSF	Đoạn mồi 20	5'-agatccaggagctggtgcagaaccgcagctcttcggtccacgcgtt-3' (SEQ ID NO.40)
	Đoạn mồi 21	5'-ggttctgcaccagctcctggatctgcgcctacctatcgcgcgagca-3' (SEQ ID NO.41)
	Đoạn mồi 22	5'-gggaagcttattaaggctgtgccagatggcgcag-3' (SEQ ID NO.42)
	Đoạn mồi 23	5'-agatccaggagctggtgcagaaccgcattcgccgcggttaaagctcttt-3' (SEQ ID NO.43)
	Đoạn mồi 24	5'-taacagatctgcggccgactcgagattaaggctgtgccagatggcgcag-3' (SEQ ID NO.44)
Cấu trúc dung hợp SL335 _{Δds} -GCSF	Đoạn mồi 25	5'-agatccaggagctggtgcagaaccgctgctcttcggtccacgcgtt-3' (SEQ ID NO.45)
	Đoạn mồi 26	5'-agatccaggagctggtgcagaaccgcttccgccggttaaagctctttg-3' (SEQ ID NO.46)

1-(11) Thiết kế cấu trúc dung hợp SL335-IFN-b

Các quy trình tách dòng để thiết kế cấu trúc HxysIFNb/Lxys được nêu. Hxys được khuếch đại PCR từ chuỗi H được tối ưu bộ ba mã hóa của SL335 bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi #9 và #27 (5'-agatccaggagctggtgcagaaccgcagctcttcggtccacgcgtt-3' (SEQ ID NO.47)), và IFN-*b* chứa trình tự liên kết cũng được khuếch đại PCR từ gen IFN-*b*1a được tối ưu bộ ba mã hóa bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi PCR #28 (5'-ggttctgcaccagctcctggatcttcatacaacctgctgggcttctg-3' (SEQ ID NO.48)) và #29 (5'-gggaagcttttagttgcgcagatagccgggtcag-3' (SEQ ID NO.49)). Hxys và các gen IFN-*b*1a được liên kết với nhau bằng PCR tích hợp bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi PCR #9 và #29, cắt bằng *EcoR* I/*Hind* III, và tách dòng thành pHEKA chứa Lxys. Để tạo ra cấu trúc HserIFN-*b*/Lser, Hser được khuếch đại PCR từ chuỗi H được tối ưu bộ ba mã hóa của SL335 bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi PCR #9 và #30 (5'-agatccaggagctggtgcagaaccgctgctcttcggtccacgcgtt-3' (SEQ ID NO.50)). Hser và gen IFN-*b* 1a được liên kết với nhau bằng PCR tích hợp bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi PCR #9 và #29, cắt bằng *EcoR* I/*Hind* III, và tách dòng thành pHEKA chứa Lser. Các đoạn mồi PCR để tạo ra cấu trúc dung hợp SL334-IFNb và cấu trúc dung hợp SL335_{Δds}-IFNb được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4

Đoạn mồi PCR của cấu trúc dung hợp SL335-IFNb hoặc SL335_{Δds}-IFNb

Cấu trúc	Đoạn mồi	Trình tự oligonucleotit
Cấu trúc dung hợp SL335 _{Δds} -IFNb và SL335-IFNb	Đoạn mồi 27	5'-agatccaggagctggtgcagaaccgcagctcttcggtccacgcgtt-3' (SEQ ID NO.47)
	Đoạn mồi 28	5'-ggttctgcaccagctcctggatcttcatacaacctgctgggcttctg-3' (SEQ ID NO.48)
	Đoạn mồi 29	5'-gggaagcttttagttgcgcagatagccgggtcag-3' (SEQ ID NO.49)
	Đoạn mồi 30	5'-agatccaggagctggtgcagaaccgctgctcttcggtccacgcgtt-3' (SEQ ID NO.50)

1-(12) Thiết kế cấu trúc dung hợp EGL4-hGH và 1b28-hGH

EGL4, Fab kháng EGFR của người, và 1b28, Fab kháng IL-1b của người, được tách ra từ thư viện kháng thể HuDV Fab-8L (chưa được công bố, AprilBio Co.). Để tạo ra EGL4_{wt} và EGL4_{Δds}, Hxys và Hser được khuếch đại PCR từ gen chuỗi H của EGL4 cADN bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi PCR #5 và #6, và #5 và #31 (5'-gggaagcttattaac-tagatttgggctcaactctcttg-3' (SEQ ID NO.51)), một cách tương ứng. Các sản phẩm PCR ~ 750 bp được xử lý bằng *EcoR* I/*Hind* III và nối bằng pHEKA, tiếp đó là biến nạp các tế bào khả biến MC1061. Lxys và Lser cũng được khuếch đại PCR gen chuỗi L của EGL4 cADN bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi PCR #11 và #32 (5'-gggctcgagtttagcattcgccgcgggttaaagctcttt-3' (SEQ ID NO.52)), và #11 và #33 (5'-gggctcgagtttagctttcgccgcgggttaaagctcttt-3' (SEQ ID NO.53)), một cách tương ứng. Chúng được cắt bằng *Bam*H I/*Xho* I và tách dòng thành pHEKA chứa Hxys hoặc Hser của EGL4, một cách tương ứng. Để tạo ra cấu trúc dung hợp EGL4_{wt}-hGH, các quy trình tách dòng để tạo ra cấu trúc HxysG/Lxys được tiến hành. Hxys được khuếch đại PCR từ chuỗi H của EGL4 cADN bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi PCR #5 và #34 (5'-agatccaggagctggtgcagaaccacaagatttgggctcaactctcttg-3' (SEQ ID NO.54)), và hGH chứa trình tự liên kết cũng được khuếch đại PCR từ gen hGH được tối ưu bộ ba mã hóa bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi PCR #14 và #15. Các gen Hxys và hGH được liên kết với nhau bằng PCR tích hợp bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi PCR #5 và #15, cắt bằng *EcoR* I/*Hind* III, và tách dòng thành pHEKA chứa Lxys của EGL4. Để tạo ra cấu trúc dung hợp EGL4_{Δds}-hGH, Hser được khuếch đại PCR từ chuỗi H của EGL4 cADN bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi PCR #5 và #35 (5'-agatccaggagctggtgcagaaccactagatttgggctcaactctcttg-3' (SEQ ID NO.55)), và hGH chứa trình tự liên kết cũng được khuếch đại PCR từ gen hGH được tối ưu bộ ba mã hóa bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi PCR #14 và #15. Các gen Hser và gen hGH được liên kết với nhau bằng PCR tích hợp bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi PCR #5 và #15, cắt bằng *EcoR* I/*Hind* III, và tách dòng thành pHEKA chứa Lser của EGL4_{Δds}. 1b28_{wt}, 1b28_{Δds}, 1b28_{wt}-hGH và 1b28_{Δds}-hGH được tạo ra ở cấu trúc dung hợp EGL4-hGH bằng cách sử dụng cùng một cặp đoạn mồi PCR ngoại trừ rằng 1b28 cADN đóng vai trò là các khuôn PCR. Các đoạn mồi PCR để tạo ra cấu trúc dung hợp EGL4-hGH và 1b28-hGH được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5

Các đoạn mồi PCR để tạo ra cấu trúc dung hợp EGL4-hGH và 1b28-hGH

Cấu trúc	Đoạn mồi	Trình tự oligonucleotit
Cấu trúc dung hợp EGL4-hGH và 1b28-hGH	Đoạn mồi 31	5'-gggaagcttattaactagatttgggctcaactctcttg - 3' (SEQ ID NO.51)
	Đoạn mồi 32	5'-gggctcgagtttagcattcgccgcggttaaagctcttt - 3' (SEQ ID NO.52)
	Đoạn mồi 33	5'-gggctcgagtttagctttcgccgcggttaaagctcttt - 3' (SEQ ID NO.53)
	Đoạn mồi 34	5' - agatccaggagctggtgcagaaccacaagatttgggctcaactctctgtc - 3' (SEQ IN NO. 54)
	Đoạn mồi 35	5' - agatccaggagctggtgcagaaccactagatttgggctcaactctctgtc - 3' (SEQ ID NO.55)

1-(13) Phân tích SDS-PAGE và thẩm tách Western

Để phân tích SDS-PAGE, các protein SL335_{wt}-hGH và SL335_{Δds}-hGH đã được tinh chế được tạo hỗn dịch lại trong dung dịch đệm mẫu NuPAGE® LDS (Invitrogen) có hoặc không có chất khử mẫu NuPAGE® (Invitrogen), và nạp lên gel ở nồng độ 7μg/giếng. Các dải protein được quan sát bằng mắt bằng cách sử dụng thuốc nhuộm xanh da trời Coomassie (Bio-Rad). Để phân tích thẩm tách Western, 500 ng SL335_{wt}-hGH và SL335_{Δds}-hGH đã được tinh chế ái lực được nạp lên mỗi giếng nêu trên, và chuyển đến màng nitroxenluloza. Sau khi phong bế màng này bằng 3% sữa tách béo (Bio-Rad) trong PBS chứa 0,01% Tween (Sigma-Aldrich), các protein được phát hiện bằng cách ủ với pAb chuỗi L kappa kháng người của dê đã được tiếp hợp với AP (Betyl). Cơ chất nitro xanh da trời tetrazolium clorua (NBT)/5-brom-4-clo-3-indolyl phosphat (BCIP) (Duchefa) được bổ sung lên màng này để quan sát dấu hiệu gắn kết bằng mắt.

1-(14) Điện di mao quản trên cơ sở chip

Phương pháp điện di mao quản trên cơ sở chip được thực hiện bằng hệ thống phân tích sinh học Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Các mẫu protein được chuẩn bị theo quy trình của nhà sản xuất và phân tích trên kit protein 80, được khuyến dùng để phân tích các protein có kích cỡ nằm trong khoảng từ 5 đến 80 kDa. Tóm lại, các mẫu này được trộn với dung dịch đệm mẫu với sự có mặt hoặc không có mặt của DTT để làm khử hoặc không khử quá trình điện di, một cách tương ứng. Các mẫu được làm biến tính ở nhiệt độ 95°C và nạp lên chip mà đã được nạp bằng các chất phản ứng thích hợp bao gồm thuốc nhuộm huỳnh quang và dung dịch gel. Sau đó, chip này được chèn vào hệ thống và chạy trên hệ thống bằng cách sử dụng phần mềm Expert 2100. Các kết quả được đưa vào sơ đồ để phản ánh đơn vị cường độ phát huỳnh quang theo

kích cỡ protein.

1-(15) Khối phổ MALDI-TOF

Khối phổ MALDI-TOF được thực hiện trên thiết bị Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Mẫu được trộn với cùng một thể tích chất nền MALDI (10mg/mL axit α -xyano-4-hydroxycinnamic) và tạo vết trên đĩa đích MALDI. Tiến hành hiệu chuẩn ngoại bằng kit hiệu chuẩn peptit và protein MALDI-MS (Sigma-Aldrich). Khối phổ trong khoảng m/z là 15000160000 và 1000070000 thu được lần lượt đối với cấu trúc dung hợp SL335_{wt}-hGH và cấu trúc dung hợp SL335_{Δds}-hGH, theo kiểu ion dương.

1-(16) Thử nghiệm hoạt tính sinh học hGH *in vitro*

Các tế bào u bạch huyết Nb2-11 của chuột (Sigma-Aldrich) được nuôi cấy trong DMEM hoàn chỉnh có bổ sung 5% huyết thanh ngựa (Sigma-Aldrich) và 1% PenicillinStreptomycin (Invitrogen) trong tủ cấy chứa 5% CO₂ được làm ẩm ở nhiệt độ 37°C (Tanaka *et al.*, 1980). Các tế bào được rửa hai lần bằng DMEM, được ly tâm ở 1000 g trong 5 phút và tạo hỗn dịch lại trong DMEM chứa 5% (thể tích/thể tích) huyết thanh ngựa ở 8×10^4 tế bào/mL. 50μg hỗn dịch chứa tế bào được bổ sung vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng, và ủ qua đêm. Sau đó, các tế bào được xử lý bằng cách tăng dần nồng độ (0 - 20 nM) GROWTROPIN® (rhGH không được cải biến; Dong-A Pharmaceuticals, Seoul, Hàn Quốc) hoặc SL335_{Δds}-hGH trong 50mL DMEM chứa 5% huyết thanh ngựa trong 48 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau khi ủ, 10μL CCK-8 (Dojindo, Mashiki-machi, Nhật Bản) được bổ sung vào mỗi giếng, và ủ trong 4 giờ. Độ hấp thụ được ghi lại trên máy đọc vi đĩa (Bio-Rad) ở bước sóng 450 nm.

1-(17) Độ ổn định trong huyết thanh của SL335_{Δds}-hGH

SL335_{wt} và SL335_{Δds}-hGH (nồng độ cuối cùng 10μg/mL) được tạo hỗn dịch lại trong huyết thanh bào thai bò (FBS) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) chứa 0,03% natri azit, và ủ trong 16 ngày ở nhiệt độ 37°C. Các phần nhỏ (50mL) được lấy ra mỗi ngày và bảo quản ở -20°C trước khi sử dụng. Khả năng phản ứng gắn kết với HSA được xác định bằng ELISA, và hoạt tính sinh học hGH *in vitro* được xác định bằng cách sử dụng các tế bào Nb2-11 (Sigma-Aldrich) như đã nêu trên.

1-(18) Thử nghiệm dược động học *in vivo*

Các nghiên cứu dược động học PK được tiến hành ở công ty CRO đã được cấp phép (ChemOn, Suwon, Hàn Quốc). Các chuột được cho ăn chế độ ăn tiêu chuẩn gồm các viên tròn dùng cho loài gặm nhấm và cho uống nước tùy thích và để ở trong phòng có độ ẩm và nhiệt độ ổn định kèm theo nguồn sáng được kiểm soát (12 giờ chiếu sáng, tiếp đó là 12 giờ trong bóng tối). Tóm lại, SL335 và Neg Fab (Fab không liên quan của người) được tiêm riêng rẽ qua đường tiêm tĩnh mạch (I.V.) hoặc tiêm dưới da (S.C.) vào các nhóm gồm ba chuột Sprague Dawley với liều lượng 1mg/kg, và các mẫu huyết thanh thu được ở một vài thời điểm (5 phút, 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 96 giờ và 144 giờ khi sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch, và 5 phút, 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 48 giờ, và 96 giờ khi sử dụng dưới da). Nồng độ SL335 và Neg Fab trong các mẫu huyết thanh được xác định bằng thử nghiệm ELISA kẹp bằng cách sử dụng mAb của chuột nhất kháng IgG Fd của người và pAb chuỗi L kappa kháng người của dê đã được tiếp hợp với HRPO lần lượt làm các kháng thể bắt giữ và phát hiện. Các mảnh Fab của người với nồng độ đã biết cũng bao gồm trong thử nghiệm này để thu được đường chuẩn. Các đường cong của nồng độ huyết thanh theo thời gian là thích hợp với mô hình không ngăn bằng cách sử dụng phần mềm WinNonlin (SL335 và Neg Fab) và vẽ bằng đồ thị bằng cách sử dụng phần mềm Sigma Plot. Tương tự, Growtropin® và SL335_{Δds}-hGH được tiêm riêng rẽ qua đường tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da vào nhóm gồm ba đến bốn chuột. Liều lượng của Growtropin® và SL335_{Δds}-hGH để sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch là 0,3mg/kg, và để sử dụng theo đường tiêm dưới da là 0,6mg/kg, một cách tương ứng. Các mẫu huyết thanh thu được ở một vài thời điểm (5 phút, 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 6 giờ và 8 giờ đối với Growtropin® và 5 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 96 giờ và 144 giờ đối với SL335_{Δds}-hGH. Lượng Growtropin® trong các mẫu huyết thanh được xác định bằng cách sử dụng kit phát hiện hGH ELISA (Genway, San Diego, CA, USA), và lượng SL335_{Δds}-hGH được xác định bằng thử nghiệm ELISA kẹp như đã nêu trên. Đường cong nồng độ huyết thanh theo thời gian là thích hợp với mô hình một ngăn bằng cách sử dụng phần mềm PhoenixTM WinNonlin (Version 6,2).

1-(19) Thử nghiệm dược lực học *in vivo*

Tác dụng của Growtropin® khi sử dụng hằng ngày và SL335_{Δds}-hGH khi sử dụng một lần trong tuần để thúc đẩy sự tăng khối lượng được phân tích trên chuột đã được cắt

bỏ tuyến yên bằng cách sử dụng theo đường tiêm dưới da ở ChemOn như đã được mô tả trước đó (xem Clark et al., (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 21969-21977). Tóm lại, chuột Sprague Dawley còn non đã được cắt bỏ tuyến yên (Harlan, Tokyo, Nhật Bản) được mua, và bất kỳ chuột nào tăng hơn 7g trong 15 ngày đầu tiên sau khi phẫu thuật bị loại ra khỏi nghiên cứu. Các chuột được chọn ngẫu nhiên vào các nhóm điều trị (chỉ chứa tá dược, hằng ngày tiêm 0,3mg/kg Growtropin® và tiêm một lần một tuần 0,6mg/kg, 1,2mg/kg hoặc 2,4mg/kg SL335_{Δds}-hGH). Thẻ trọng được ghi lại hằng ngày sau khi bắt đầu phác đồ liều. Mức phát triển xương chày được đo một cách cẩn thận bằng thước cặp xương. Tiến hành so sánh thống kê bằng cách sử dụng phân tích phương sai, tiếp theo thực hiện phép kiểm định so sánh Dunnetts Multiple Comparison, và các trị số *p* nhỏ hơn 0,05 được coi là có ý nghĩa thống kê.

2. Kết quả thử nghiệm

2-(1) Phân lập các dòng Fab kháng SA

Thư viện kháng thể HuDV Fab-8L được chọn đối với các hạt từ đã được tiếp hợp với SA của người, SA của chuột hoặc SA của chuột nhắt ở độ pH = 6 hoặc độ pH = 7,4. Sau ba lần sàng lọc sinh học, thử nghiệm ELISA đối với thể thực khuẩn đơn dòng được thực hiện để xác định các dòng kháng thể của thể thực khuẩn có đặc hiệu với kháng nguyên không. Hơn 60 dòng dương tính được nhận diện bằng thử nghiệm ELISA (dữ liệu không được thể hiện), và phân tích trình tự ADN của các gen V_H và V_L đã nhận diện tám kháng thể của thể thực khuẩn riêng rẽ, lần lượt được gọi là SA138, SA139, SA140, SA141, SL18, SL301, SL310 và SL335. Khả năng gắn kết của các dòng này với SA của người, SA của chuột, SA của chuột nhắt hoặc SA của bò được xác nhận bằng thử nghiệm ELISA đối với thể thực khuẩn đơn dòng trong điều kiện độ pH = 6 hoặc độ pH = 7,4 (Fig.1A & Fig.1B). Ba dòng kháng thể của thể thực khuẩn - SA138, SA139 và SA141, chỉ phản ứng với SA của người mà không liên quan tới các điều kiện độ pH. SA140 cũng chỉ nhận diện được SA của người ở độ pH = 7,4, nhưng khả năng gắn kết của nó lại không xuất hiện ở độ pH = 6. Mặt khác, SL18, SL310 và SL335 gắn kết với SA của người, SA của chuột và SA của chuột nhắt trong cả hai điều kiện độ pH có cường độ khác nhau không đáng kể. SL301 phản ứng một cách đáng kể với SA của người và SA của chuột ở cả hai độ pH, và phản ứng yếu với SA của chuột nhắt chỉ ở độ pH = 7,4. Tám dòng Fab đều không phản ứng với SA của bò. SL18, SL301, SL310 và SL335 còn được

đặc trưng do khả năng phản ứng chéo của chúng với SA từ ít nhất hai loài khác nhau. Các gen Fd và các gen chuỗi L của bốn dòng kháng thể của thể thực khuẩn được tách dòng cấp hai thành vector pHEKA để biểu hiện chu chất ở *E. coli*, và các mảnh Fab hòa tan được tạo ra từ dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy hoặc các phần chiết chu chất. Sau khi tinh chế ái lực, thử nghiệm ELISA được tiến hành để so sánh khả năng phản ứng gắn kết của các mảnh này với SA của người, SA của chuột hoặc SA của chuột nhắt trong các điều kiện độ pH = 6 (Fig.2A) và độ pH = 7,4 (Fig.2B). HSA, RSA, MSA hoặc BSA ở nồng độ 5µg/mL được cố định trong mỗi giếng của các đĩa vi chuẩn độ, và bốn các phân tử Fab đã được tinh chế (SL18, SL301, SL310 và SL335) được cho gắn kết với kháng nguyên ở độ pH = 6,0 (Fig.2A) hoặc ở độ pH = 7,4 (Fig.2B). Thẻ tiếp hợp pAb HRPO chuỗi kappa L kháng người của dê được sử dụng làm kháng thể thứ cấp. Dấu hiệu gắn kết được quan sát bằng mắt bằng cách sử dụng cơ chất TMB, và độ hấp thụ ở 450 nm được đo bằng cách sử dụng máy đọc ELISA (Bio-Rad). Dữ liệu được biểu thị bằng trị số trung bình của độ lệch chuẩn của ba thử nghiệm. Trong quá trình gắn kết với SA của người, thứ tự về các dấu hiệu gắn kết là SL335 > SL310 > SL301 > SL18 ở cả độ pH = 6 và độ pH = 7,4. Trong quá trình gắn kết với SA của chuột, thứ tự này là SL335 > SL310 > SL301 > SL18 ở độ pH = 6, và SL335 = SL310 > SL301 = SL18 ở độ pH = 7,4. Trong quá trình gắn kết với SA của chuột nhắt, thứ tự này là SL18 > SL335 > SL310 ở độ pH = 6, và SL335 > SL310 > SL18 ở độ pH = 7,4. Theo Fig.2, SL301 không gắn kết với SA của chuột nhắt ở độ pH = 6, nhưng gắn kết rất yếu ở độ pH = 7,4. Nhận thấy rằng SL335 là chất gắn kết tốt nhất trong số bốn dòng Fab với cả SA của người và SA của chuột mà không liên quan tới điều kiện độ pH. SL335 gắn kết với SA của người ở độ pH = 6 mạnh hơn gấp hai lần so với ở độ pH = 7,4 (50% dấu hiệu gắn kết ở 20ng/mL so với 40ng/mL), mạnh hơn gấp 20 lần so với khi gắn kết với SA của chuột trong cùng điều kiện độ pH (50% dấu hiệu gắn kết ở 20ng/mL so với 400ng/mL), và mạnh hơn gấp bốn lần so với khi gắn kết với SA của chuột ở độ pH = 7,4 (50% dấu hiệu gắn kết ở 40ng/mL so với 160ng/mL).

2-(2) Khả năng phản ứng chéo và ái lực gắn kết của SL335

Do SL335 là chất gắn kết tốt nhất trong số bốn dòng Fab SA kháng người, khả năng phản ứng chéo của nó còn được phân tích bằng ELISA. Khả năng phản ứng gắn kết với SA của người, SA của chuột và SA của chuột nhắt được sản sinh như được thể hiện

trong Fig.2. Cũng nhận thấy rằng SL335 nhận diện tốt SA của khỉ cynomolgus và gắn kết yếu với SA của chó. Tuy nhiên, SL335 không nhận diện được SA của thỏ cũng như khác các kháng nguyên không thích hợp bao gồm EGFR, EpCAM, IL-15Ra, IL-1b, CD16a hoặc c-MET. Ái lực gắn kết của SL335 với SA của người, SA của chuột và SA của chuột nhắt ở độ pH = 6 hoặc độ pH = 7,4 còn được xác định bằng máy đo giao thoa lớp sinh học bằng cách cho đi qua các kháng nguyên có nồng độ khác nhau trên các chất cảm biến sinh học đã được phủ bằng SL335 (xem Bảng 6 dưới đây). Các kết quả có mối tương quan mật thiết với dữ liệu ELISA ở Fig.2 ở chỗ các hằng số phân ly của SL335 với HAS lần lượt là 9 nM ở độ pH = 6 và 13 nM ở độ pH = 7,4, và các hằng số phân ly với RSA tương ứng bằng 122 nM và 65 nM ở độ pH = 6 và độ pH = 7,4. Ái lực gắn kết của SL335 đối với MSA là khoảng 10 mM ở độ pH = 6 và 1,6 mM ở độ pH = 7,4, nhưng các dữ liệu này không được đưa ra trong bảng 6 do thiếu độ tin cậy.

Bảng 6

Xác định ái lực gắn kết của SL335 và HserG/Lser bằng thử nghiệm gắn kết trên máy đo giao thoa lớp sinh học

Chất gắn kết	Kháng nguyên	Điều kiện độ pH	K _D (M)	K liên kết (1/Mgiây)	K phân ly (1/giây)	R ² đầy đủ	Trị số Chi2
SL335	HSA	độ pH = 6	8,68E-09	1,79E+05	1,55E-03	0,920807	0,479289
		độ pH = 7,4	1,30E-08	1,17E+05	1,52E-03	0,966233	0,378597
	RSA	độ pH = 6	1,22E-07	4,71E+04	5,76E-03	0,882417	1,299042
		độ pH = 7,4	6,53E-08	4,32E+04	2,82E-03	0,839612	2,718799
HserG/ Lser	HSA	độ pH = 6	1,68E-09	5,00E+05	8,41E-04	0,951998	1,015294
		độ pH = 7,4	1,51E-09	6,73E+05	1,02E-03	0,915507	0,652098
	RSA	độ pH = 6	4,99E-07	6,96E+04	3,47E-02	0,980042	0,214899
		độ pH = 7,4	8,36E-08	9,33E+04	7,80E-03	0,836744	1,101016

Các thông số động học gắn kết và động học phân ly được tính toán bằng cách sử dụng gói phần mềm Octet QK.

2-(3) Dược động học *in vivo* của SL335

Trong số tất cả các loại protein huyết tương, HSA có thời gian bán thải kéo dài một cách bất ngờ thông qua cơ chế quay vòng do FcRn gây ra, và thường được sử dụng làm cấu trúc dung hợp để kéo dài thời gian bán thải của các protein điều trị. Ngoài ra, đã biết rằng các mảnh kháng thể có liên quan tới albumin huyết thanh có tác dụng kéo dài thời gian bán thải trong huyết thanh. Do đó, phân tích dược động học được thực hiện để kiểm tra xem SL335 cũng có thời gian bán thải dài trong huyết thanh hay không. Fab

người có độ đặc hiệu gắn kết chưa biết được gọi là Fab đối chứng âm tính (Neg Fab). SL335 và Neg Fab được tiêm riêng rẽ qua đường tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da vào nhóm gồm ba chuột với liều 1mg/kg, và các mẫu huyết thanh được thu gom ở một vài thời điểm (5 phút, 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 96 giờ và 144 giờ khi sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch, và 5 phút, 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ, 24 giờ, 48 giờ, và 96 giờ khi sử dụng dưới da). Nồng độ của SL335 và Neg Fab trong các mẫu huyết thanh được đo bằng thử nghiệm ELISA kẹp bằng cách sử dụng mAb của chuột nhất kháng IgG Fd của người và pAb chuỗi L kappa kháng người của dê đã được tiếp hợp với HRPO làm các kháng thể bắt giữ và phát hiện, một cách tương ứng. Các mảnh Fab của người với nồng độ đã biết cũng được bao gồm trong thử nghiệm này để thu được đường chuẩn. Đường cong của nồng độ huyết thanh theo thời gian được làm thích hợp đối với mô hình một ngăn bằng cách sử dụng phần mềm WinNonlin (SL335 và Neg Fab) và mô hình hai ngăn bằng cách sử dụng phần mềm Sigma Plot. Khi sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch, thời gian bán thải tận cùng ($t_{1/2}$) của SL335 là 37 giờ và diện tích dưới đường cong nó ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$) là 187 giờmg/mL, chứng tỏ rằng $t_{1/2}$ tăng lên 10 lần và $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ tăng lên 26 lần so với Neg Fab (lần lượt là 3,8 giờ và 7 giờmg/mL) (Fig.3A). Khi tiêm SL335 dưới da cũng cho kết quả đo tương tự, bao gồm $t_{1/2}$ tăng lên chín lần (120 giờ so với 13 giờ) và $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ tăng lên 44 lần so với Neg Fab (87 so với 2 giờmg/mL) (Fig.3B). Các kết quả này rõ ràng chứng tỏ rằng thời gian bán thải trong huyết thanh của SL335 là dài, và điều này có nghĩa là SL335 có thể không làm ảnh hưởng tới quá trình tương tác giữa RSA và FcRn ở chuột.

2-(4) Sản xuất các cấu trúc dung hợp SL335-hGH

SL335 được sử dụng để tạo ra hai cấu trúc dung hợp SL335-hGH và bốn cấu trúc dung hợp SL335-hGH khác bằng phương pháp dung hợp gen hGH tái tổ hợp (27 - 191 aa) với đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của Fd hoặc chuỗi L thông qua liên kết peptit ngắn. hGH cADN tái tổ hợp (27 - 191 aa) được dung hợp với đầu C của chuỗi H hoặc L của SL335_{wt} ở dạng Fab cổ điển thông qua liên kết peptit ngắn, từ đó tạo ra cấu trúc của hai cấu trúc dung hợp (HxysG/Lxys và LxysG/Hxys). Bốn cấu trúc dung hợp khác (HserG/Lxys, LserG/Hxys, HserG/Lser và LserG/Hser) cũng được tạo ra như đã nêu trên ngoại trừ sử dụng SL335 ở dạng không hiệu lực (SL335_{null}) hoặc dạng ds Fab (SL335_{Δds}) mà xys²³³ ở đầu C của C_{H1} và/hoặc Xys²¹⁴ ở đầu C của C_{Lk} được thay bằng Ser. Để biểu

hiện chu chất của các protein dung hợp này, trình tự dẫn đầu ompA (MKKTAIAIAVLGAFATVAQA (SEQ ID NO.56)) được nằm sau chuỗi L hoặc cấu trúc dung hợp L-hGH, và trình tự dẫn đầu pelB (MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ IN No:57)) được nằm sau chuỗi H hoặc cấu trúc dung hợp H-hGH. Trong các thử nghiệm sơ bộ này, quá trình tạo liên kết di truyền giữa hGH với đầu tận cùng N của Fd hoặc chuỗi L làm giảm hoặc không biểu hiện các protein dung hợp hòa tan. Cấu trúc dung hợp của hGH với đầu C của Fd cũng tạo ra mức độ biểu hiện thấp, và dường như làm gián đoạn quá trình gấp nếp miền hGH do tạo liên kết disulfua bất thường trong cấu trúc dung hợp SL335-hGH (dữ liệu không được thể hiện). Trước đây, đã cho rằng việc loại liên kết disulfua nội chuỗi của Fab bằng cách tạo đột biến các gốc Xys có đầu C trong C_{H1} và C_{Lk} (lần lượt là Xys²³³ và Xys²¹⁴) không ảnh hưởng tới nồng độ tạo chu chất, độ ổn định trong quá trình chiết và tinh chế, độ ổn định trong huyết thanh hoặc thời gian bán thải trong huyết thanh (xem các bài báo: Kabat *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*; Humphreys *et al.*, (1997) *J. Immunol. Method.* 209, 193202; Humphreys *et al.*, (2007) *Protein Eng Des Sel.* 20, 227234.). Bằng cách thế cả Xys²³³ của C_{H1} lẫn Xys²¹⁴ của C_{Lk} bằng serin (thế Xys²³³ Ser²³³ và Xys²¹⁴ Ser²¹⁴), các tác giả sáng chế đã thử nghiệm liệu các gốc xys trong SL335 này có điều chỉnh mức độ biểu hiện hòa tan và quá trình gấp nếp thích hợp cấu trúc dung hợp SL335-hGH hay không. Fig.4 minh họa sáu cấu trúc dung hợp SL335-hGH. Khác với SL335_{wt} và SL335_{Δds}, một biến thể khác SL335, được gọi là SL335_{null}, cũng được tạo ra bằng cách thế Xys²³³ của C_{H1} hoặc Xys²¹⁴ của C_{Lk}, bằng Ser để giải thích mức độ ảnh hưởng của mỗi gốc xystein (Xys²³³ hoặc Xys²¹⁴) riêng rẽ. Hai dẫn xuất dung hợp SL335_{wt} là HxysG/Lxys (dung hợp HXys²³³-hGH được ghép đôi với Lxys²¹⁴) và LxysG/Hxys (dung hợp Lxys²¹⁴-hGH được ghép đôi với HXys²³³), hai dẫn xuất dung hợp SL335_{null} là HserG/Lxys (dung hợp HSer²³³-hGH được ghép đôi với Lxys²¹⁴) và LserG/Hxys (LSer²¹⁴-hGH dung hợp được ghép đôi với HXys²³³). Cuối cùng, hai dẫn xuất dung hợp SL335_{Δds} là HserG/Lser (dung hợp HSer²³³-hGH được ghép đôi với Lser²¹⁴) và LserG/Hser (dung hợp Lser²¹⁴-hGH được ghép đôi với HSer²³³). Sáu cấu trúc dung hợp SL335-hGH này được biểu hiện trong các tế bào SUPEX5 chủ của *E. coli*, hiệu suất và khả năng phản ứng gắn kết với HAS của sáu protein dung hợp SL335-hGH trong dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy được phân tích bằng thử nghiệm ELISA. Các dòng *E. coli* biểu hiện các protein dung hợp SL335-hGH được phát triển trong cùng một điều kiện khi có mặt IPTG, và dịch nổi trên

bề mặt môi trường nuôi cấy thu được bằng cách ly tâm nhanh. Nồng độ của cấu trúc dung hợp SL335-hGH hòa tan được đo bằng thử nghiệm ELISA kẹp bằng cách sử dụng Fa mAb kháng người của chuột nhất là Ab bắt giữ và pAb chuỗi L kappa kháng người của dê đã được tiếp hợp với HRPO được sử dụng làm kháng thể phát hiện (Fig.5A). Không phát hiện thấy dạng Fab hòa tan nào từ LxysG/Hxys hoặc LserG/Hxys. Mặc dù dữ liệu không được thể hiện, thử nghiệm tách Western có sử dụng dịch dung giải của tế bào *E. coli* cho thấy rằng Xys²³³ của Fd có liên quan đến quá trình thoái biến chuỗi nặng và không làm tiết các mảnh Fd do quá trình kết tụ protein. Hiệu suất của HxysG/Lxys là 0,5µg/mL, và hiệu suất của HserG/Lxys và LserG/Hser lần lượt khoảng 1,8µg/mL và 1,4µg/mL (Fig.5A). Điều bất ngờ là, hiệu suất của HserG/Lser là khoảng 4µg/mL cao hơn tám lần so với của HxysG/Lxys. Các phần chiết chu chất có mức độ biểu hiện tương đương, mặc dù tổng hiệu suất chỉ đạt ~30% so với các phần chiết có mặt trong dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy (dữ liệu không được thể hiện). Trong các thử nghiệm lặp lại, đã xác nhận được rằng sự khác nhau về hiệu suất giữa HxysG/Lxys và HserG/Lser là độc lập với sự biến đổi dòng hoặc tốc độ phát triển của các dòng *E. coli*. Khả năng phản ứng gắn kết của cấu trúc dung hợp SL335-hGH với HSA được so sánh với nhau bằng cách sử dụng đĩa vi chuẩn độ đã được phủ 5µg/mL HSA, và ủ bằng dung dịch pha loãng theo bậc của dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy chứa cấu trúc dung hợp SL335-hGH. Sau đó, các cấu trúc dung hợp SL335-hGH gắn kết với HSA được phát hiện bằng cách sử dụng pAb chuỗi L kappa kháng người của dê đã được tiếp hợp với HRPO. Mong muốn rằng việc phát hiện HserG/Lser gắn kết với HSA bằng pAb κL kháng người sẽ làm cho dấu hiệu gắn kết tăng lên tám lần so với HxysG/Lxys và dấu hiệu gắn kết tăng lên khoảng bốn lần so với HserG/Lxys và LserG/Hser (Fig.5B). Các dấu hiệu gắn kết tương tự cũng được quan sát khi T-20 là pAb của dê đặc hiệu với đầu C của hGH được sử dụng để phát hiện cấu trúc dung hợp SL335-hGH (Fig.5C). Tuy nhiên, trong quá trình phát hiện bằng NYThGH là mAb của chuột nhất đặc hiệu với hGH có chiều dài đầy đủ, HserG/Lser lại tạo ra dấu hiệu gắn kết cao hơn 30 lần so với của cả HserG/Lxys lẫn LserG/Hser và dấu hiệu gắn kết cao hơn 60 lần so với HxysG/Lxys (Fig.5D), nhận thấy rằng quá trình gắn kết của NYThGH với miền hGH của HxysG/Lxys gây trở ngại khi có mặt liên kết disulfua nội chuỗi trong SL335. Do HxysG/Lxys và HserG/LseR có mặt khi sử dụng SL335_{wt} và SL335_{Δds} để tạo ra cấu trúc dung hợp SL335-hGH, nên dưới đây các tác giả sáng chế lần lượt gọi chúng là cấu trúc dung hợp SL335_{wt}-hGH và cấu trúc dung

hợp SL335_{Δds}-hGH (Fig 5).

Để xác định hiệu suất cao của cấu trúc dung hợp SL335_{Δds}-hGH hòa tan tùy thuộc vào quá trình loại liên kết disulfua nội chuỗi trong SL335, các chủng *E. coli* chủ hoặc quá trình cảm ứng nhiệt, SL335_{wt}, SL335_{Δds}, cấu trúc dung hợp SL335_{wt}-hGH và cấu trúc dung hợp SL335_{Δds}-hGH được biểu hiện trong MC1061 bố mẹ cũng như các tế bào SUPLEX5 đột biến ở nhiệt độ 20°C (Fig.6A), 25°C (Fig.6B) hoặc 30°C (Fig.6C) và lượng của các phân tử Fab trong dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy được xác định bằng thử nghiệm ELISA. Hiệu suất của SL335_{wt} được biểu hiện trong chủng MC1061 là 1μg/mL ở nhiệt độ 20°C, cao hơn khoảng ba lần so với ở 25°C và 30°C. Kết quả này cho thấy rằng việc cảm ứng SL335_{wt} ở dưới 25°C là có lợi, đặc biệt là khi MC1061 được sử dụng làm chủng chủ. Các kết quả tương tự cũng thu được đối với chủng SUPLEX5. Trong trường hợp của SL335_{Δds}, hiệu suất là khoảng 1,3μg/mL ở nhiệt độ 20°C mà không liên quan tới các chủng *E. coli* chủ và cảm ứng nhiệt. Các kết quả này chứng tỏ rằng sự có mặt hoặc không có mặt liên kết disulfua nội chuỗi trong Fab không ảnh hưởng một cách đáng kể tới hiệu suất của việc tạo ra Fab hòa tan ở nhiệt độ 20°C mà không liên quan tới loại chủng *E. coli* chủ. Hiệu suất của cấu trúc dung hợp SL335_{wt}-hGH nằm trong khoảng từ 0,3μg/mL đến 0,5μg/mL mà không liên quan tới các loại chủng *E. coli* chủ và quá trình cảm ứng nhiệt. Mặt khác, hiệu suất của cấu trúc dung hợp SL335_{Δds}-hGH được biểu hiện ở chủng MC1061 là 1,8μg/mL ở cả hai nhiệt độ 20°C lẫn 25°C, và 1,5μg/mL ở nhiệt độ 30°C, chứng tỏ rằng nó phụ thuộc không đáng kể vào nhiệt độ, trong khi đó hiệu suất của dung hợp SL335_{Δds}-hGH được biểu hiện trong chủng SUPLEX5 là 4,0μg/mL ở cả hai nhiệt độ 20°C lẫn 25°C, và là 3,5μg/mL ở nhiệt độ 30°C. Các kết quả này chứng tỏ rằng việc sử dụng dạng SL335_{Δds} và chủng SUPLEX5 của *E. coli* có thể làm tăng hiệu suất của protein dung hợp SL335-hGH lên khoảng 12 lần so với tổ hợp của dạng SL335_{wt} và chủng MC1061 của *E. coli*.

2-(5) Thiết kế các cấu trúc dung hợp SL335-GCSF, SL335-IFN β , EGL4-hGH và 1b28-hGH

Để chứng minh hiệu quả có lợi của dạng Fab_{Δds} và chủng SUPLEX5 trong việc cải thiện mức độ biểu hiện hòa tan của protein dung hợp Fab-gốc tác động, các cấu trúc dung hợp Fab-gốc tác động khác nhau được tạo ra. Trước tiên, hai biến thể dung hợp SL335-GCSF (HxysGCSF/Lxys được gọi là SL335_{wt}-GCSF, HserGF/Lser được gọi là

SL335_{Δds}-GCSF) và hai biến thể dung hợp SL335-IFNb (HxysIFNb/Lxys được gọi là SL335_{wt}-IFNb, HserIFNb/Lser được gọi là SL335_{Δds}-IFNb) được tạo ra theo cách tương tự như tạo các cấu trúc dung hợp SL335_{wt}-hGH và SL335_{Δds}-hGH để xác định sự ảnh hưởng của gốc tác động. Quá trình cảm ứng nhiệt được thiết lập tới nhiệt độ tối ưu 20°C và mức độ biểu hiện các protein dung hợp này trong dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy *E. coli* được so sánh với nhau bằng thử nghiệm ELISA. Hiệu suất của SL335_{wt}-GCSF lần lượt là 0,3 và 0,6mg/mL trong MC1061 và SUPLEX5, và hiệu suất của SL335_{Δds}-GCSF lần lượt là 0,6 và 1,5mg/mL trong MC1061 và SUPLEX5 (Fig.7A). Trong khi đó, hiệu suất của SL335_{wt}-IFNb là khoảng 0,16mg/mL trong cả MC1061 và SUPLEX5, và hiệu suất của SL335_{Δds}-IFNb lần lượt là 0,2 và 0,5mg/mL in MC1061 và SUPLEX5 (Fig.7B). Do đó, tổ hợp của cấu trúc dung hợp SL335_{Δds}-GCSF và chủng SUPLEX5 làm cho hiệu suất của cấu trúc dung hợp SL335-GCSF cao hơn khoảng 5 lần so với tổ hợp của cấu trúc dung hợp SL335_{wt}-GCSF và chủng MC1061, và tổ hợp của dung hợp SL335_{Δds}-IFNb và chủng SUPLEX5 tạo ra lượng dung hợp SL335-IFNb cao hơn khoảng 3 lần so với tổ hợp của cấu trúc dung hợp SL335_{wt}-IFNb và chủng MC1061. Thứ hai, các tác giả sáng chế cũng tạo ra được hai cấu trúc dung hợp Fab-hGH bằng cách sử dụng EGL4 là Fab kháng EFGR của người, và 1b28 là Fab kháng IL-1b của người để xác định mức độ ảnh hưởng của Fab. Theo cách tương tự như khi tạo ra các cấu trúc dung hợp SL335_{wt}-hGH và SL335_{Δds}-hGH, hai cấu trúc dung hợp EGL4-hGH là cấu trúc dung hợp EGL4_{wt}-hGH ở dạng HxysG/Lxys và cấu trúc dung hợp EGL4_{Δds}-hGH ở dạng HserG/Lser. Tương tự, cấu trúc dung hợp 1b284-hGH là cấu trúc dung hợp 1b28_{wt}-hGH ở dạng HxysG/Lxys và cấu trúc dung hợp 1b28_{Δds}-hGH ở dạng HserG/Lser. Hiệu suất của cấu trúc dung hợp EGL4_{wt}-hGH là 8090ng/mL ở các chủng MC1061 và SUPLEX5, và hiệu suất tạo ra cấu trúc dung hợp EGL4_{Δds}-hGH là 140ng/mL ở chủng MC1061 và là 220ng/mL ở chủng SUPLEX5 (Fig.8A), chúng tỏ rằng tổ hợp của cấu trúc dung hợp EGL4_{Δds}-hGH và tế bào vật chủ SUPLEX5 tạo ra lượng protein dung hợp EGL4-hGH trong dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy cao hơn 2,4 lần so với tổ hợp của cấu trúc dung hợp EGL4_{wt}-hGH và tế bào vật chủ MC1061. Trong trường hợp cấu trúc dung hợp 1b28-hGH, hiệu suất tạo ra cấu trúc dung hợp 1b28_{wt}-hGH lần lượt là 50ng/mL ở chủng MC1061 và là 100ng/mL ở chủng SUPLEX5, và hiệu suất tạo ra cấu trúc dung hợp 1b28_{Δds}-hGH là 900ng/mL ở chủng MC1061 và là 4mg/mL ở chủng SUPLEX5 (Fig.8B), chúng tỏ rằng tổ hợp của cấu trúc dung hợp 1b28_{Δds}-hGH và tế bào vật chủ SUPLEX5 tạo

ra lượng cấu trúc dung hợp 1b28-hGH trong dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy cao hơn 800 lần so với tổ hợp của cấu trúc dung hợp 1b28_{wt}-hGH và tế bào vật chủ MC1061.

2-(6) Đặc điểm đặc trưng ở mức phân tử của SL335_{wt}-hGH và SL335_{Δds}-hGH

Các dung hợp SL335_{wt}-hGH và SL335_{Δds}-hGH còn được đặc trưng ở mức phân tử. Các protein dung hợp trong dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy được tinh chế ái lực bằng cách cho qua nhựa đã được phủ bằng HSA, và phân tích bằng kỹ thuật SDS-PAGE và thẩm tách Western trong các điều kiện khử và không khử. HxysG/Lxys (dòng 1) và HserG/Lser (dòng 2) được tinh chế ái lực từ dịch nổi trên bề mặt môi trường nuôi cấy bằng cách hạt sepharosa đã được cố định HSA, và SDS-PAGE được thực hiện bằng cách sử dụng 4-12% gel Bis-Tris trong các điều kiện khử hoặc không khử. Các hạt protein được quan sát bằng mắt bằng cách nhuộm Coomassie xanh da trời (Fig.9A). Các protein thu được từ các SDS-PAGE riêng rẽ được chuyển đến màng nitrocellulose, và Ab L kappa kháng người của dê đã được tiếp hợp với AP được sử dụng để phát hiện Lxys và Lser (Fig.9B). Dấu hiệu gắn kết được quan sát bằng mắt bằng cơ chất NBT/BCIP. Trong phân tích SDS-PAGE, cả SL335_{wt}-hGH lẫn SL335_{Δds}-hGH tạo ra hai loại hạt protein chủ yếu với kích cỡ 46kDa và 23kDa lần lượt tương ứng với dạng Fd-hGH và các chuỗi L trong các điều kiện khử. Trong các điều kiện không khử, bất ngờ SL335_{Δds}-hGH tạo ra hai hạt protein giống nhau do không có mặt liên kết disulfua nội chuỗi. Trong trường hợp SL335_{wt}-hGH, có thể quan sát được dải protein chính có kích cỡ 70 kD tương ứng với dạng heterodime chuẩn của SL335_{wt}-hGH. Ngoài ra, cũng nhận thấy rằng các dẫn xuất SL335_{wt}-hGH có nhiều kích cỡ khác nhau, bao gồm bốn hạt protein quan sát được có kích cỡ nằm trong khoảng từ 24 kDa đến 45 kDa với mật độ chưa biết và một cặp hạt protein liên kết yếu tương ứng kích cỡ nằm trong khoảng từ 100 kDa đến 135 kDa. Các protein có kích cỡ bằng 15 kDa và 12,5 kDa cũng được quan sát ở tất cả các mẫu. Sau đó, tiến hành phân tích thẩm tách Western bằng cách sử dụng Fd mAb kháng người, pAb chuỗi L kháng kappa và pAb kháng hGH, T-20. Phân tích thẩm này bằng Fd mAb kháng người chỉ phát hiện được HxysG và HserG có kích cỡ 46 kDa trong cả điều kiện không khử và khử (dữ liệu không được thể hiện). Mặt khác, bốn hạt protein có kích cỡ nằm trong khoảng từ 24 kDa đến 45 kDa cũng như các hạt có kích cỡ lớn hơn 70 kDa trong mẫu SL335_{wt}-hGH đều được phát hiện bởi pAb chuỗi L kháng kappa trong điều kiện

không khử (Fig.9B). Kết quả này chứng tỏ rằng Xys²¹⁴ của chuỗi L có liên quan tới sự tạo ra các chuỗi multime L khác nhau, ít nhất, bằng cách tạo ra liên kết disulfua bất thường. Phân tích thẩm tách Western bằng pAb kháng hGH T-20 nhận biết được một cách chính xác dạng heterodime có kích cỡ bằng 70 kDa của SL335_{wt}-hGH và monome HerG có kích cỡ ~ 45 kDa của SL335_{Δds}-hGH trong điều kiện không khử (Fig.9C). Các protein có kích cỡ bằng 15 kDa và 12,5 kDa không phát hiện được bởi kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể này, từ đó cho rằng chúng là các sản phẩm thoái biến từ các cấu trúc dung hợp hoặc các tạp chất từ protein chủ của *E. coli*.

Kỹ thuật điện di mao quản trên cơ sở Chip xác nhận phân tích SDS-PAGE. HxysG/Lxys (Fig.10A) và HserG/Lser (Fig.10B) được tạo ra bằng dung dịch đậm mẫu với sự có mặt hoặc không có mặt của DTT để tiến hành điện di khử hoặc không khử, và kỹ thuật điện di mao quản trên cơ sở Chip được thực hiện với hệ thống phân tích sinh học Agilent 2100 theo quy trình của nhà sản xuất bằng cách sử dụng kit protein 80. Các kết quả được minh họa bằng đồ thị biểu hiện đơn vị cường độ phát huỳnh quang theo kích cỡ protein. SL335_{wt}-hGH tạo ra một vài dẫn xuất SL335_{wt}-hGH có kích cỡ nằm trong khoảng từ 27,1 kDa đến 52,4 kDa trong điều kiện không khử, và nhiều dẫn xuất trong số các dẫn xuất này không xuất hiện trong điều kiện khử với sự có mặt của DTT (Fig.10A). SL335_{Δds}-hGH tạo ra hầu hết các pic protein giống nhau giữa các điều kiện không khử và khử ngoại trừ có sự thay đổi nhỏ về phân tử lượng (Fig.10B).

SL335_{wt}-hGH và SL335_{Δds}-hGH còn được phân tích bằng cách sử dụng khối phổ MALDI-TOF. Khối phổ MALDI-TOF được thực hiện trên thiết bị Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). HxysG/Lxys (Fig.11A) và HserG/Lser (Fig.11B) đã được tinh chế ái lực được trộn với chất nền MALDI, và phổ thu được nằm trong khoảng m/z 10000 - 150000 Da theo kiểu ion dương. Khối phổ trong khoảng m/z 10000 - 70000 thu được đối với SL335_{Δds}-hGH. Đối với SL335_{wt}-hGH, khối phổ trong khoảng m/z 15000 - 160000 thu được do mẫu có SL335_{wt}-hGH các dải protein có kích cỡ lớn hơn 70 kDa như được thể hiện trong Fig.8A. Phân tử khối của Lxys, HxysG và SL335_{wt}-hGH được xác định lần lượt là 23,226 Da, 46226 Da và 69,837 Da (Fig.11A). Nhận thấy rằng kích cỡ của ba protein riêng rẽ lớn hơn so với SL335_{wt}-hGH chuẩn là 92,824 Da, 117,455 Da và 139,347 Da. Trong trường hợp SL335_{Δds}-hGH, phân tử khối của Lser và HserG được xác định lần lượt là 23,334 Da và 46,667 Da (Fig.11B).

Pic của HserG nhỏ hơn so với Lser có thể có tác dụng ion hóa nhỏ hơn so với các phân tử có kích cỡ lớn, hoặc khi có mặt tỷ lệ mol nhỏ hơn của HserG so với Lser trong mẫu.

SL335_{Δds}-hGH đã được tinh chế ái lực còn được tinh chế bằng cách cho qua cột SephacrylS-200HR nhờ sử dụng FPLC. Tiến hành lọc gel HserG/Lser sau khi tinh chế ái lực bằng cách sử dụng cột đã sắp xếp sơ bộ SephacrylTM S-200HR và AKTA FPLC (GE Healthcare, Wauwatosa, WI, USA). Cột này được tạo cân bằng bằng dung dịch đệm (20 mM HEPES có độ pH = 7,4 chứa 150 mM NaCl), và đưa lên bằng HserG/Lser đã được tinh chế ái lực. Quá trình rửa giải được thực hiện bằng dung dịch đệm cân bằng với tốc độ chảy 0,5mL/phút. Các mũi tên biểu thị các phân đoạn đã chọn để phân tích SDS-PAGE (Fig.12A). Phân đoạn #13, #16, #19 và #23 thu hồi được từ hai pic riêng rẽ được phân tích bằng 4-12% gel Bis-Tris trong điều kiện khử (Fig.12B). Các hạt protein được quan sát bằng mắt bằng cách nhuộm Coomassie xanh da trời. Hai pic tương ứng với kích cỡ khoảng 66 kDa và 25 kDa nhìn thấy được từ phân đoạn #12 đến phân đoạn #27 (Fig.9A). Do đó, bốn phân đoạn (phân đoạn #13, #16, #19 và #23) được phân tích bằng SDS-PAGE trong điều kiện khử để xác định hàm lượng protein trong các phân đoạn này (Fig.9B). Các kết quả chỉ ra rằng các phân đoạn thu được từ pic 66 kDa (phân đoạn #13, #16 và #19) chứa heterodime SL335_{Δds}-hGH, và phân đoạn từ pic 25 kDa (phân đoạn #23) chủ yếu chứa Lser monome.

2-(7) Đặc điểm về chức năng *in vitro* của SL335_{Δds}-hGH

Để xác định xem việc loại liên kết disulfua nội chuỗi trong SL335_{wt} và cấu trúc dung hợp của hGH có ảnh hưởng tới ái lực gắn kết với HSA hoặc RSA hay không, tiến hành thử nghiệm đo giao thoa lớp sinh học bằng cách sử dụng SL335_{Δds}-hGH trong điều kiện độ pH = 6 và độ pH = 7,4 (xem Bảng 6 dưới đây). Các hằng số phân ly của SL335_{Δds}-hGH với HSA là 1,7 nM ở độ pH = 6 và 1,5 nM ở độ pH = 7,4, chứng tỏ rằng ái lực tăng lần lượt năm lần và 8,7 lần so với ái lực của SL335. Các hằng số phân ly với RSA là 499 nM và 83,6 nM trong điều kiện ở độ pH = 6 và độ pH = 7,4, chứng tỏ rằng ái lực giảm 4,2 lần và 1,3 lần ái lực so với ái lực của SL335.

Hoạt tính hGH *in vitro* của SL335_{ds}-hGH cũng được xác định bằng cách sử dụng các tế bào u bạch huyết Nb2-11 của chuột sản sinh trong quá trình xử lý bằng hGH theo cách phụ thuộc nồng độ. Các tế bào u bạch huyết Nb2-11 của chuột được tạo hỗn dịch lại trong DMEM chứa 5% (thể tích/thể tích) huyết thanh ngựa ở 8×10^4 tế bào/mL, và 50μL

hỗn dịch tế bào được bổ sung vào mỗi giếng của đĩa 96 giếng, tiếp đó là ủ qua đêm. Sau đó, các tế bào được xử lý bằng cách tăng dần nồng độ của Growtropin® hoặc HserG/Lser (0 - 20 nM) trong 50mL DMEM chứa 5% huyết thanh ngựa trong 48 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau ủ, 10µL dung dịch CCK-8 được bổ sung vào mỗi giếng, và các tế bào được ủ trong 4 giờ. Độ hấp thụ được ghi lại trên máy đọc vi đĩa ở bước sóng 450 nm. Dữ liệu được biểu thị bằng trị số trung bình SD của ba thử nghiệm. Khi không có mặt HSA, SL335_{Δds}-hGH có khả năng kích thích quá trình phát triển của Nb2-11 với EC₅₀ biểu kiến bằng 50 pM (3,5ng/mL) (Fig.13A). Trị số này là thấp hơn 6,7 lần so với trị số của Growtropin® là rhGH chuẩn (7,5 pM). Khi có mặt 10 mM HSA, hiệu lực tương ứng của Growtropin® và SL335_{Δds}-hGH là không bị ảnh hưởng nhiều, mặc dù SL335_{Δds}-hGH làm giảm hiệu lực khoảng năm lần so với hiệu lực của Growtropin® (Fig.13B). SL335 được sử dụng làm chất đối chứng âm tính không có tác dụng tăng sinh bất kỳ. Các kết quả này đã được chứng minh một cách rõ ràng về hoạt tính sinh học chức năng hGH của SL335_{Δds}-hGH.

Sau đó, độ ổn định trong huyết thanh được xác định bằng cách ủ SL335_{Δds}-hGH ở nhiệt độ 37°C trong 16 ngày. FBS được sử dụng thay cho huyết thanh người để tạo hỗn dịch lại các mẫu do khả năng gắn kết của SL335_{Δds}-hGH và SL335 với HSA trong huyết thanh người có thể làm phức tạp hơn cho các thử nghiệm tiếp theo. Các mẫu được thu gom mỗi ngày một lần, và khả năng phản ứng gắn kết với HSA và hoạt tính sinh học *in vitro* được xác định lần lượt bằng ELISA (Fig.14A) và thử nghiệm tăng sinh tế bào Nb2-11 (Fig.14B). SL335 cũng bao gồm làm chất đối chứng. Tương tự với SL335, khả năng phản ứng gắn kết với HSA và hoạt tính tăng sinh Nb2-11 của SL335_{Δds}-hGH không bị thay đổi ngay cả sau 16 ngày ủ ở nhiệt độ 37°C, chứng tỏ rằng SL335_{Δds}-hGH là ổn định như SL335 mặc dù không có mặt liên kết disulfua nội chuỗi.

2-(8) Các nghiên cứu về dược động học và dược lực ở chuột

Do SL335_{Δds}-hGH là chất dự tuyển hứa hẹn cho hGH có tác dụng kéo dài, các nghiên cứu hiệu quả *in vivo* được tiến hành. Đầu tiên, dược động học của Growtropin® và SL335_{Δds}-hGH được so sánh ở chuột bằng cách đo nồng độ trong huyết thanh của mỗi chất tương đồng là hàm số theo thời gian sau khi một lần tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da. Mỗi nhóm chuột (bốn con trong một nhóm) được cho tiêm dưới da (Fig.15A) một liều lớn 0,6mg/kg Growtropin hoặc SAFAtropin, hoặc tiêm tĩnh mạch (Fig.15B) một liều lớn 0,3mg/kg Growtropin hoặc SAFAtropin. Các mẫu huyết thanh được lấy cách nhau trong

khoảng thời gian 144 giờ tùy thuộc vào loại protein. Các mẫu huyết thanh được phân tích ở thời điểm đã định đối với Growtropin® hoặc SAFAtropin® bằng ELISA như đã nêu trên. Các thông số dược động học được thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 7

Thông số dược động học ở chuột đã tiêm Growtropin hoặc SAFAtropin tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da một lần

		$t_{1/2}$ (giờ)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0→∞} (hng/mL)	Cl/f (ml/giờ/kg)
Tĩnh mạch	Growtropin	0,23±0,05	5168,69±61,32	1759,97±145,03	171,04±13,66
	SAFAtropin	16,6±1,5	882,2±81,8	19580,3±999,3	15,34±0,76
Dưới da	Growtropin	1,35±0,13	283,42±28,84	821,8±52,56	714,79±45,63
	SAFAtropin	97,16±30,86	83,2±23,12	7689,4±2640,71	56,11±25,39

Các trị số này được thể hiện dưới dạng các trị số trung bình ± độ lệch chuẩn. Các chữ viết tắt là như sau: C_{max}: nồng độ tối đa; $t_{1/2}$: thời gian bán thải pha thải trừ; AUC_{0→∞}: diện tích dưới đường cong nồng độ-thời gian ngoại suy tới vô cùng; Cl/f: độ thanh thải biểu kiến toàn phần trong huyết tương.

SL335_{Δds}-hGH có $t_{1/2}$ dài một cách bất ngờ bất kể đường đưa thuốc thuốc nào. Khi sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch, SL335_{Δds}-hGH làm tăng $t_{1/2}$ 83 lần so với Growtropin (16,6 giờ so với 0,2 giờ) và tăng 69 lần khi sử dụng dưới da (97,2 giờ so với 1,4 giờ).

SL335_{Δds}-hGH cũng có AUC_{0→∞} tăng ~ 10 lần và độ thanh thải (Cl/f) chậm hơn 10 lần so với của Growtropin® mà không liên quan tới đường đưa thuốc thuốc. Mỗi nhóm chuột (bốn con trong một nhóm) được cho tiêm dưới da một liều lớn 0,6mg/kg Growtropin hoặc SAFAtropin, hoặc tiêm tĩnh mạch một liều lớn 0,3mg/kg Growtropin hoặc SAFAtropin. Các mẫu huyết thanh được lấy cách nhau trong khoảng thời gian 144 giờ tùy thuộc vào loại protein. Các mẫu huyết thanh được phân tích ở thời điểm đã định đối với Growtropin® hoặc SAFAtropin® bằng ELISA như đã nêu trên. Điều bất ngờ là, các trị số C_{max} của SL335_{Δds}-hGH thấp hơn 6 lần và 3 lần so với Growtropin® tùy thuộc vào đường đưa thuốc thuốc.

Tiếp theo, tốc độ phát triển của chuột đã được cắt bỏ tuyến yên được so sánh trong mười ngày sau khi sử dụng dưới da hằng ngày Growtropin® hoặc dung dịch đệm đối chứng chứa tá dược (chỉ chứa tá dược), hoặc một lần một tuần theo đường tiêm dưới da SL335_{ds}-hGH. Chuột đã được cắt bỏ tuyến yên được điều trị chỉ bằng tá dược hoặc

0,3mg/kg Growtropin® hằng ngày, hoặc liều tăng SAFAtropin® lên vào ngày thứ 0 và 7 (Fig.16). Các dòng có khối đặc biểu thị mức thay đổi phần trăm trung bình về thể trọng. Thanh sai số thể hiện độ lệch chuẩn. Chuột đã được điều trị bằng tá dược có thể trọng giảm khoảng 5% khối lượng. Đồng thời, khi tiêm Growtropin® (0,3mg/kg) hằng ngày lại làm tăng 5% khối lượng, dẫn đến làm tăng tổng số 10% khối lượng so với nhóm chỉ được điều trị bằng tá dược. Khi tiêm một lần một tuần SL335_{Δds}-hGH làm tăng khối lượng phụ thuộc liều ở chỗ khi sử dụng liều 2,4mg/kg sẽ làm tăng 15% khối lượng, và khi sử dụng liều 0,6mg/kg sẽ làm tăng 3,5% khối lượng. Phác đồ liều SL335_{Δds}-hGH (1,2mg/kg) đẳng mol làm tăng 5% khối lượng là tương đương với kết quả thu được khi tiêm Growtropin® hằng ngày.

Fig.17 thể hiện việc dùng một lần một tuần 0,6mg/kg SL335_{Δds}-hGH làm tăng chiều dài xương chày tương đương với khi sử dụng Growtropin® hằng ngày. Các thanh có khối đặc biểu thị chiều dài xương chày trung bình đo được. Thanh sai số biểu thị độ lệch chuẩn.

Thông tin lưu trữ vi sinh vật

Chủng *Escherichia coli* SUPEX5 theo sáng chế được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hàn Quốc, có địa chỉ tại Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 125, Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Republic of Korea vào ngày 20 tháng 08 năm 2014, với mã số lưu trữ là KCTC 12657BP theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest về sự công nhận quốc tế đối với việc lưu trữ vi sinh vật nhằm mục đích đăng ký sáng chế với mã đăng ký nêu trên dưới tên APRILBIO CO., LTD.

Khả năng ứng dụng công nghiệp

Sáng chế có thể được dùng để phát triển các dược chất protein hoặc polypeptit có hoạt tính sinh học, do cấu trúc dung hợp theo sáng chế có thể được tạo ra để chứa nhiều loại gốc tác động khác nhau bao gồm hormon sinh trưởng của người, interferon, erythropoietin, yếu tố kích thích tạo máu hoặc dẫn xuất của chúng, và các dẫn xuất kháng thể, v. v.. Việc đề cập tới tất cả các patent, công bố đơn và tài liệu viện dẫn được nêu trong bản mô tả này được đưa toàn bộ vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Mảnh gắn kết kháng nguyên gắn kết với albumin huyết thanh của người, trong đó mảnh gắn kết kháng nguyên này chứa:

(a) miền biến đổi chuỗi nặng (miền V_H) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6; và

(b) miền biến đổi chuỗi nhẹ (miền V_L) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.11 và SEQ ID NO.12, trong đó mảnh gắn kết kháng nguyên này gắn kết đặc hiệu với albumin huyết thanh của người.

2. Mảnh gắn kết kháng nguyên gắn kết với albumin huyết thanh của người, trong đó mảnh gắn kết kháng nguyên này chứa:

(a) các trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.13 (CDR1), SEQ ID NO.14 (CDR2) và SEQ ID NO.15 (CDR3) xác định các vùng xác định bổ sung (CDR-complementarity determining region) của miền V_H ; và

(b) các trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.16 (CDR1), SEQ ID NO.17 (CDR2) và SEQ ID NO.18 (CDR3) xác định các vùng CDR của miền V_L .

3. Mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 2, trong đó miền V_H được gắn kết với miền hằng định chuỗi nặng 1 (miền C_{H1}), và miền V_L được gắn kết với miền hằng định chuỗi nhẹ (miền C_{KL}).

4. Mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 3, trong đó miền V_H có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.6 và miền V_L có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.12.

5. Mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 1 hoặc 2, trong đó mảnh gắn kết kháng nguyên này còn chứa miền C_{H1} và miền C_{KL} , và ít nhất một trong số các axit amin xystein của miền C_{H1} và miền C_{KL} được loại bỏ hoặc thay thế bằng một gốc axit amin khác, bao gồm serin, ngoại trừ xystein.

6. Mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 5, trong đó axit amin xystein của miền C_{H1} là axit amin thứ 233 bắt đầu từ đầu tận cùng N của miền C_{H1} , và axit amin xystein của miền C_{KL} là axit amin thứ 214 bắt đầu từ đầu tận cùng N của miền C_{KL} .

7. Cấu trúc dung hợp chứa mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 1 hoặc 2 và gốc tác động có hoạt tính sinh học, trong đó gốc tác động có hoạt tính sinh học là protein hoặc polypeptit; và mảnh gắn kết kháng nguyên này và gốc tác động có hoạt tính sinh học được liên kết cộng hóa trị bằng phương pháp dung hợp gen.
8. Cấu trúc dung hợp theo điểm 7, trong đó mảnh gắn kết kháng nguyên này và gốc tác động có hoạt tính sinh học được liên kết cộng hóa trị bằng phương pháp dung hợp gen bằng cách sử dụng gốc liên kết peptit chứa từ 1 đến 20 axit amin.
9. Cấu trúc dung hợp theo điểm 7, trong đó gốc tác động có hoạt tính sinh học được chọn từ nhóm bao gồm hormon, xytokin, enzym, kháng thể, yếu tố sinh trưởng, yếu tố phiên mã, yếu tố đông máu, vaccin, protein phối tử và thụ thể.
10. Cấu trúc dung hợp theo điểm 7, trong đó gốc tác động có hoạt tính sinh học được chọn từ nhóm bao gồm hormon sinh trưởng của người, hormon giải phóng hormon sinh trưởng, peptit giải phóng hormon sinh trưởng, interferon, thụ thể interferon, yếu tố kích thích tạo máu, peptit tương tự glucagon, thụ thể liên hợp với protein G, interleukin, thụ thể interleukin, enzym, protein gắn kết interleukin, protein gắn kết xytokin, yếu tố hoạt hóa đại thực bào, peptit đại thực bào, yếu tố tế bào B, yếu tố tế bào T, protein A, glycoprotein hoại tử tế bào, lymphotoxin, yếu tố hoại tử khối u, chất kìm hãm khối u, yếu tố phát triển sự di căn, alpha-1 antitrypsin, albumin, alpha-lactalbumin, apolipoprotein-E, erythropoietin, erythropoietin đã được glycosyl hóa ở mức cao, angiopoietin, hemoglobin, thrombin, peptit hoạt hóa thụ thể trombin, thrombomodulin, yếu tố đông máu VII, yếu tố đông máu VIIa, yếu tố đông máu VIII, yếu tố đông máu IX, yếu tố đông máu XIII, yếu tố hoạt hóa plasminogen, peptit gắn kết fibrin, urokinaza, streptokinaza, hirudin, protein C, protein phản ứng C, chất ức chế renin, chất ức chế collagenaza, superoxit dismutaza, leptin, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu, yếu tố sinh trưởng biểu mô, yếu tố sinh trưởng biểu bì, angiostatin, angiotensin, yếu tố sinh trưởng xương, protein kích thích tạo xương, calcitonin, insulin, atriopentin, yếu tố tạo sụn, elcatonin, yếu tố hoạt hóa mô liên kết, chất ức chế quá trình của yếu tố mô, hormon kích thích nang, hormon tạo hoàng thể, hormon giải phóng hormon tạo hoàng thể, yếu tố sinh trưởng dây thần kinh, hormon tuyến cận giáp, relaxin, secretin, somatomedin, yếu tố sinh trưởng tương tự insulin, hormon vỏ tuyến thượng thận, glucagon, cholexystokinin, polypeptit tuyến tụy, peptit giải phóng gastrin, yếu tố giải phóng corticotropin, hormon kích thích tuyến giáp,

autotaxin, lactoferrin, myostatin, thụ thể, chất đối kháng thụ thể, kháng nguyên bề mặt tế bào, kháng nguyên vacxin có nguồn gốc từ virus, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, và mảnh kháng thể.

11. Cấu trúc dung hợp theo điểm 10, trong đó gốc tác động có hoạt tính sinh học là hormon sinh trưởng của người (hGH), yếu tố kích thích tạo máu bạch cầu hạt (GCSF), hoặc interferon (IFNs).

12. Cấu trúc dung hợp theo điểm 7, trong đó tỷ lệ mol giữa polypeptit hoặc protein có hoạt tính sinh học và mảnh gắn kết kháng nguyên nằm trong khoảng từ 1:1 đến 10:1.

13. Cấu trúc dung hợp theo điểm 7, trong đó tỷ lệ mol giữa polypeptit hoặc protein có hoạt tính sinh học và mảnh gắn kết kháng nguyên nằm trong khoảng từ 1:1 đến 4:1.

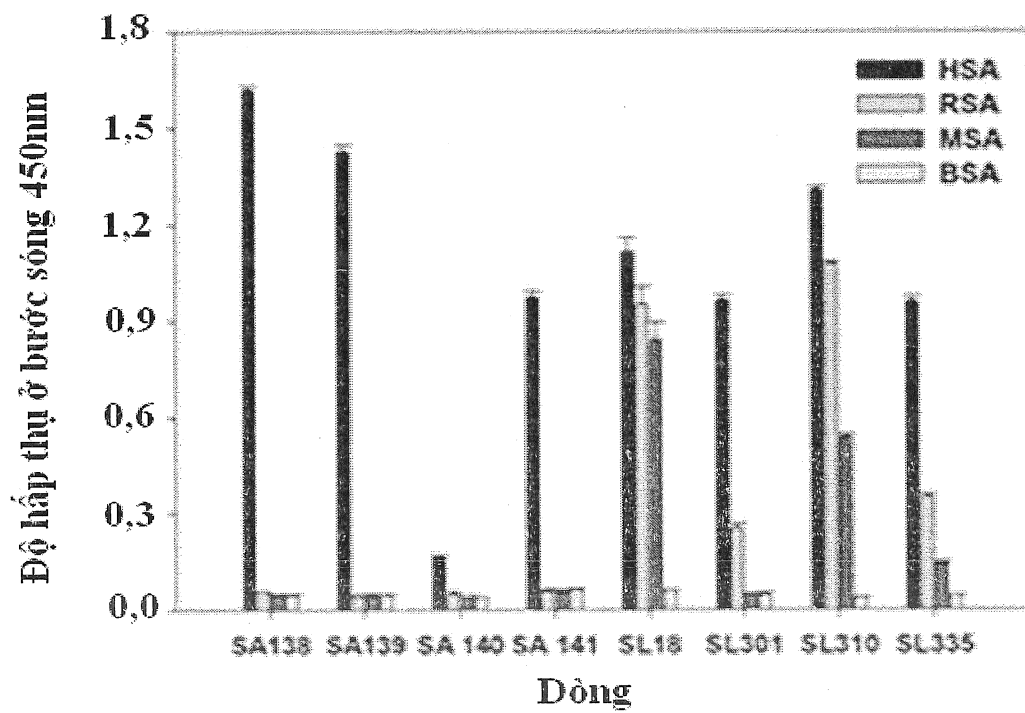
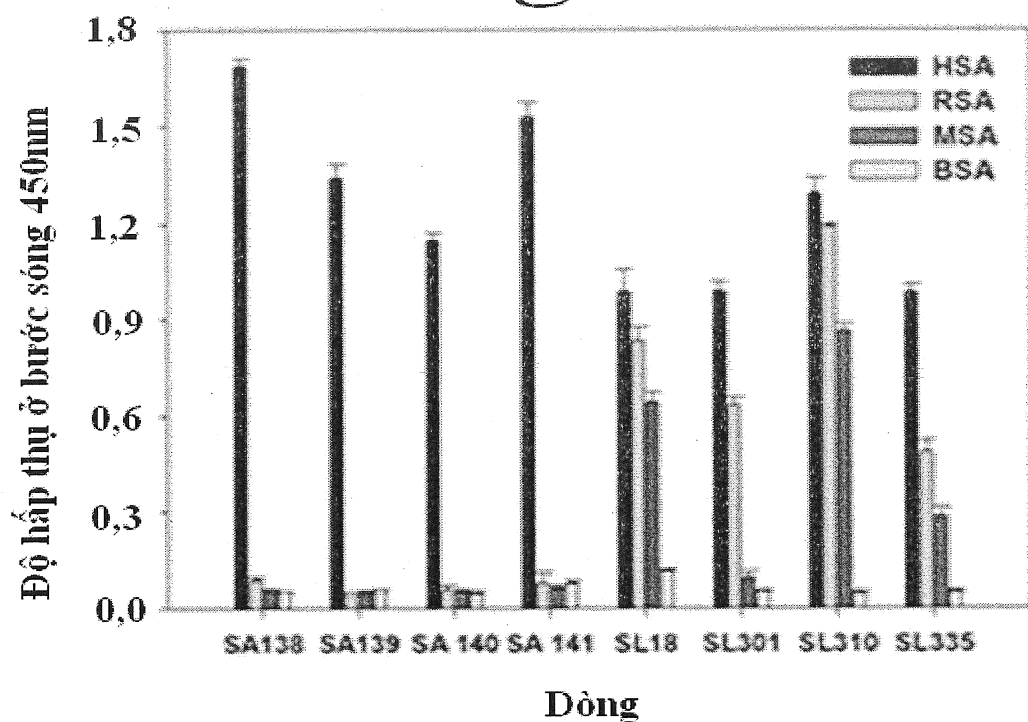
14. Vector biểu hiện chứa: (a) vùng khởi đầu; (b) trình tự axit nucleic thứ nhất mã hóa mảnh gắn kết kháng nguyên theo điểm 1 hoặc 2; và (c) trình tự axit nucleic thứ hai mã hóa polypeptit hoặc protein có hoạt tính sinh học và tùy ý gốc liên kết, trong đó vùng khởi đầu, trình tự axit nucleic thứ nhất và trình tự axit nucleic thứ hai này được liên kết điều khiển với nhau.

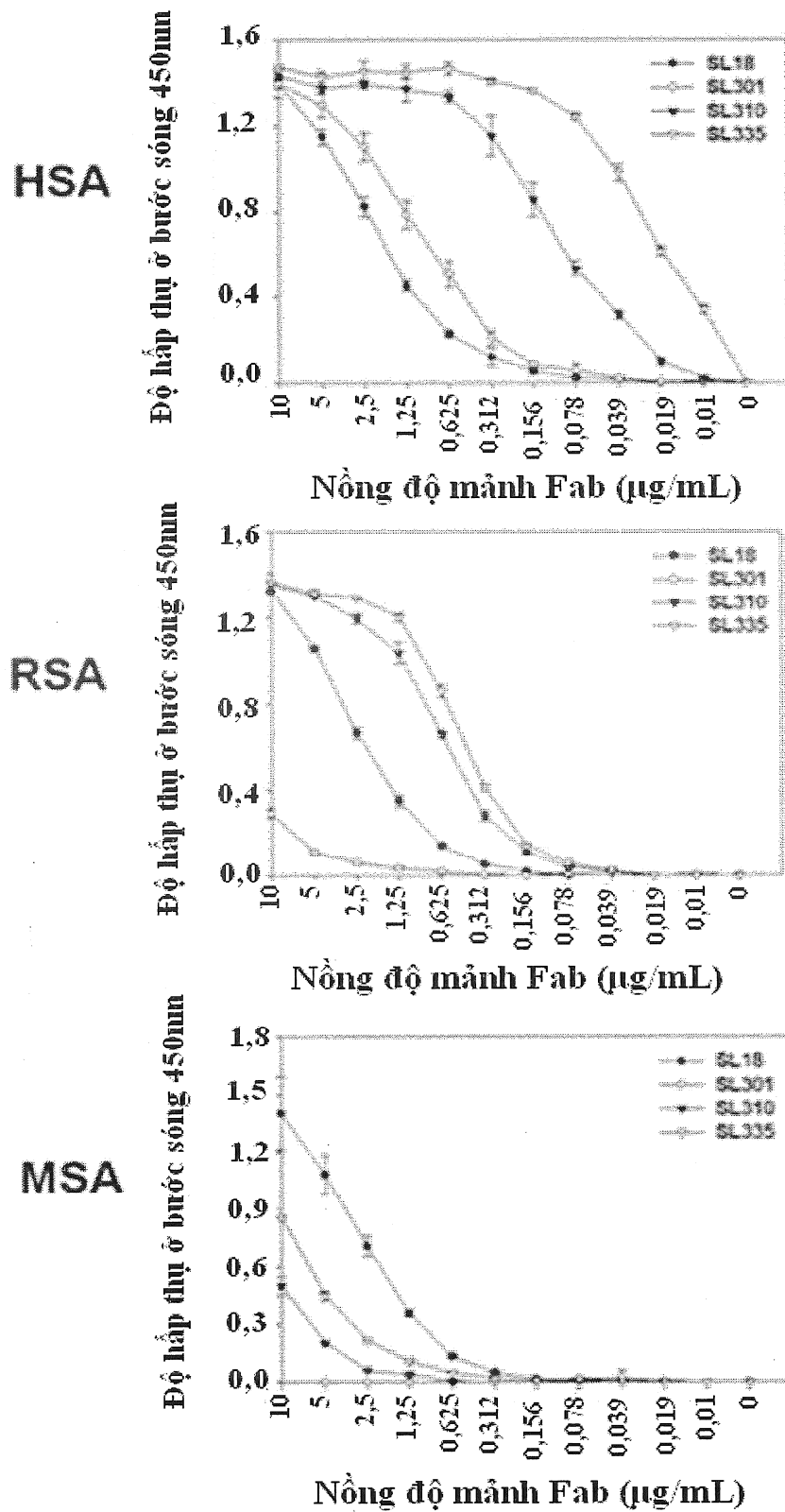
15. Tế bào vật chủ chứa vector biểu hiện theo điểm 14.

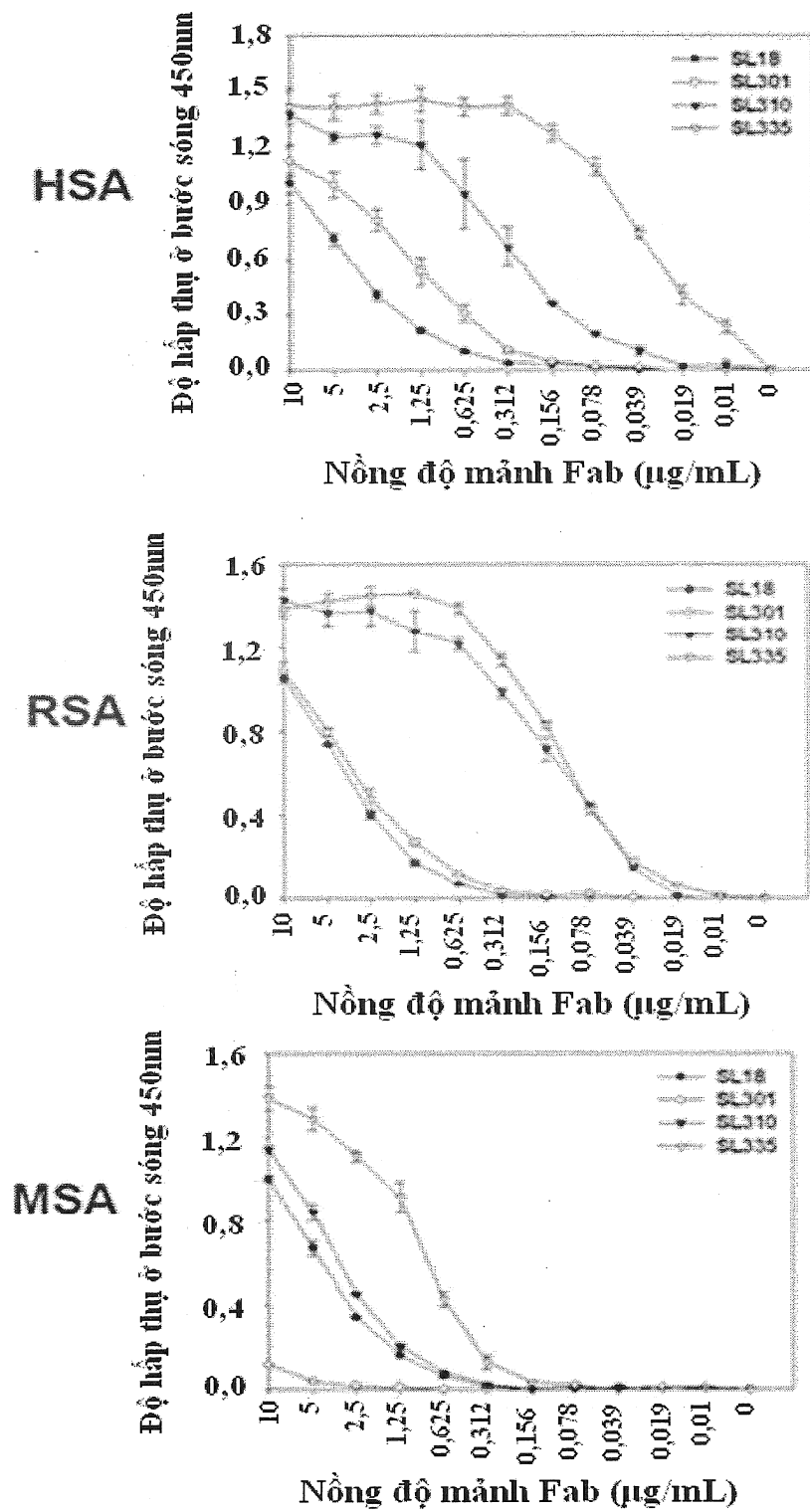
16. Tế bào vật chủ theo điểm 15, trong đó tế bào vật chủ này là *Escherichia coli*.

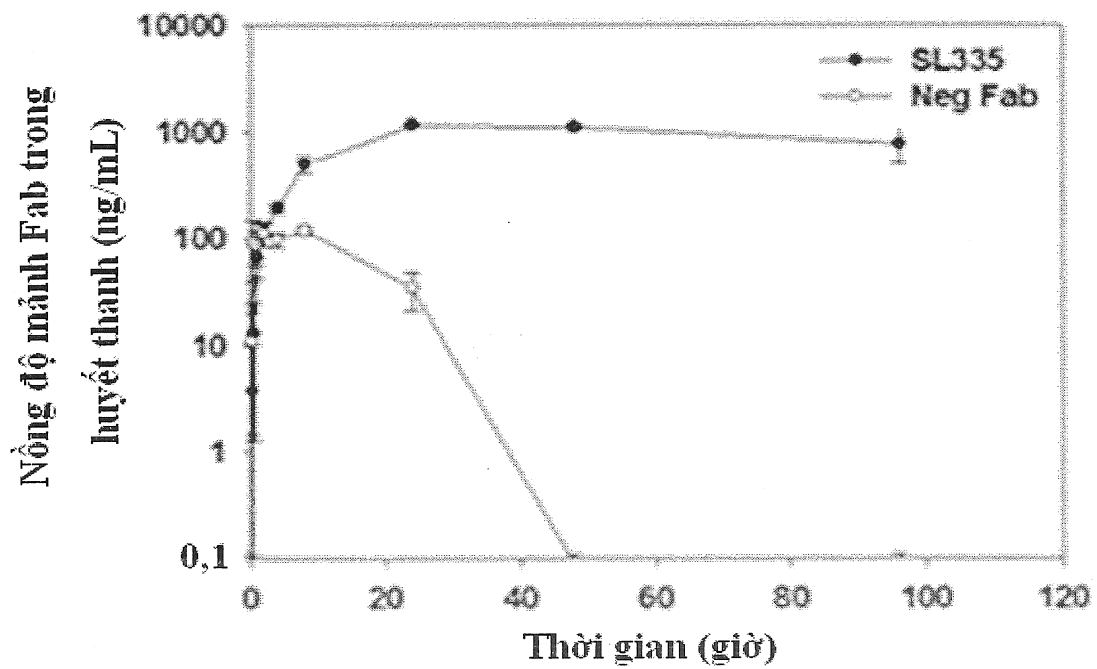
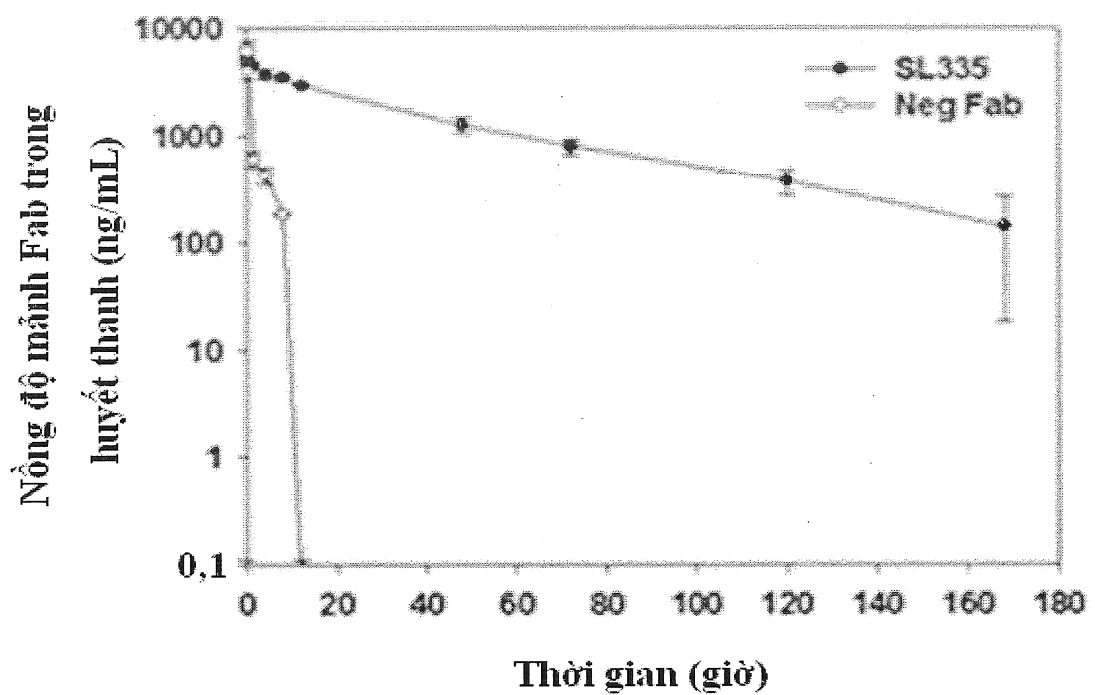
17. Tế bào vật chủ theo điểm 16, trong đó tế bào vật chủ này là chủng *Escherichia coli* SUPEX5 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật và tế bào Hàn Quốc với mã số lưu trữ là KCTC 12657BP.

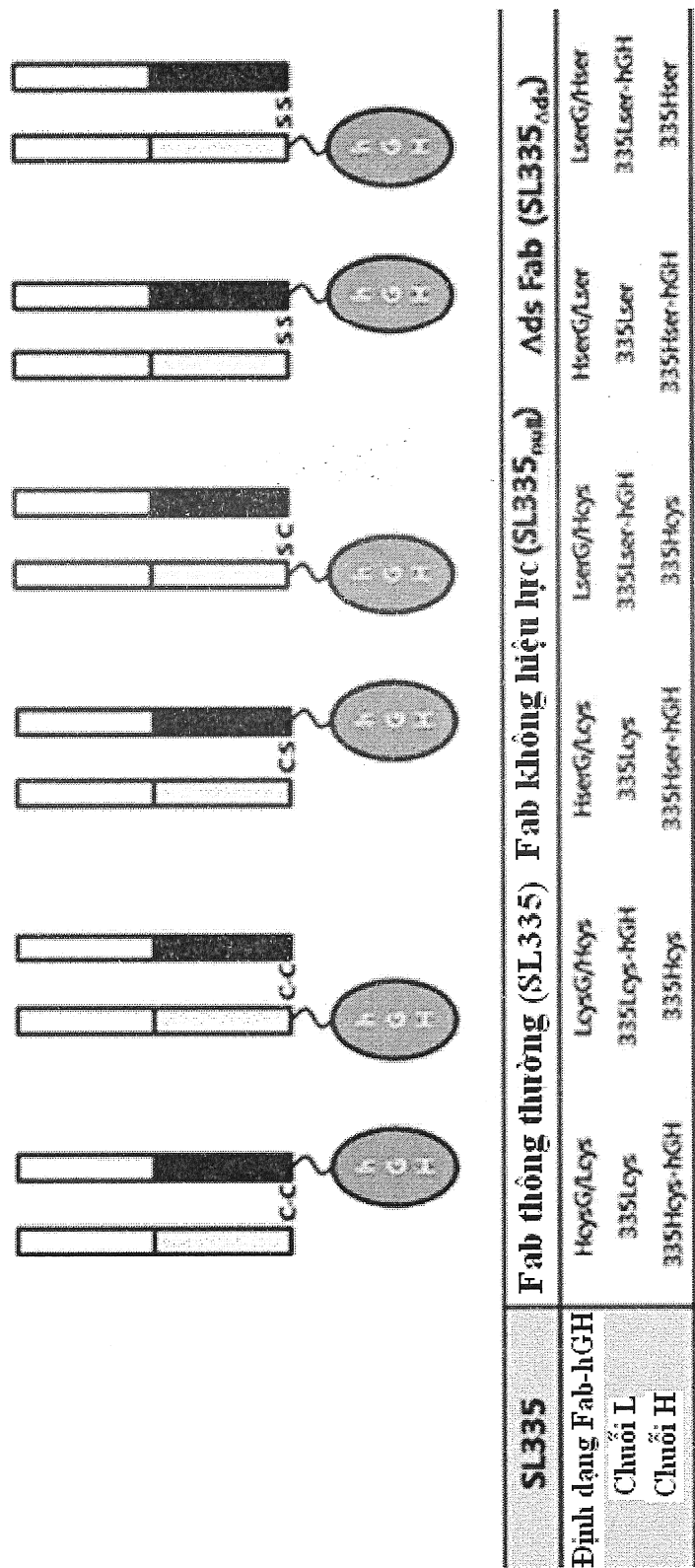
18. Dược phẩm chứa cấu trúc dung hợp theo điểm 7, và tá dược được dụng.

**Fig.1A****Fig.1B**

**Fig.2A**

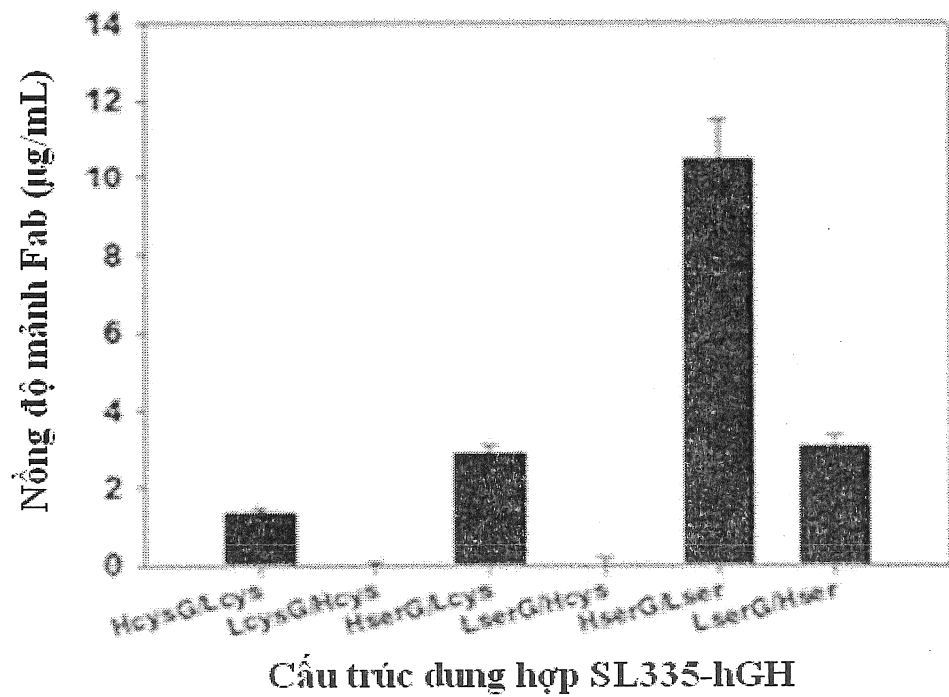
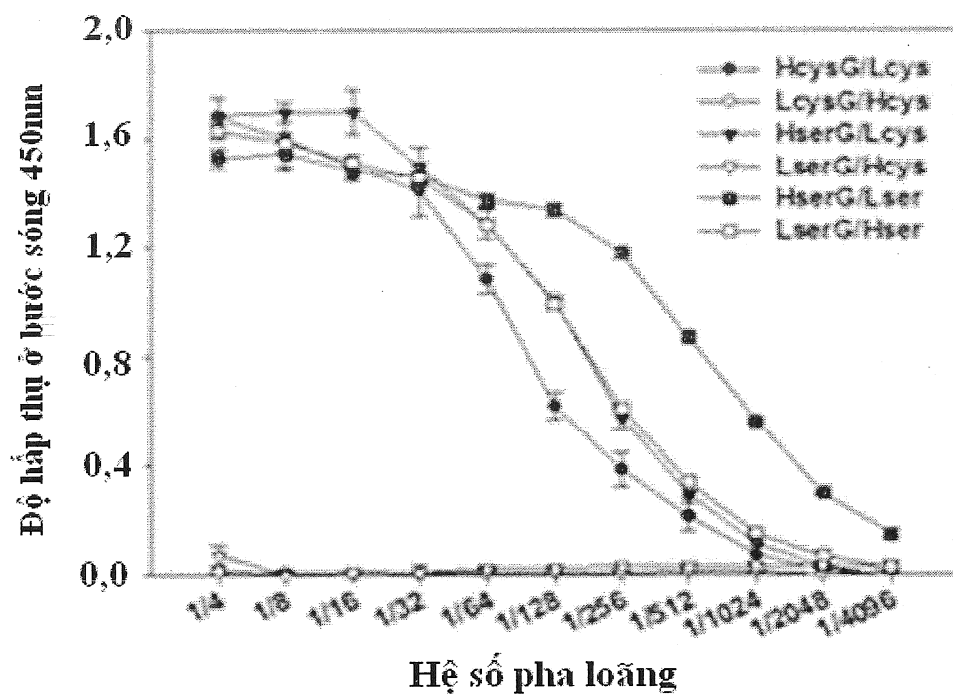
**Fig.2B**

**Fig.3B****Fig.3A**

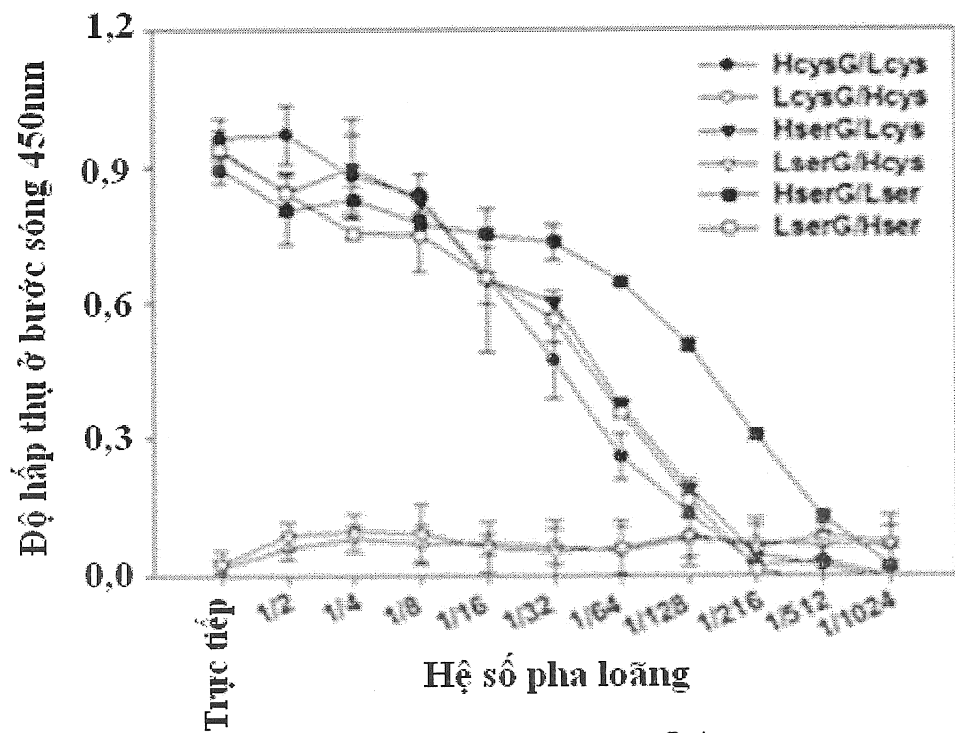
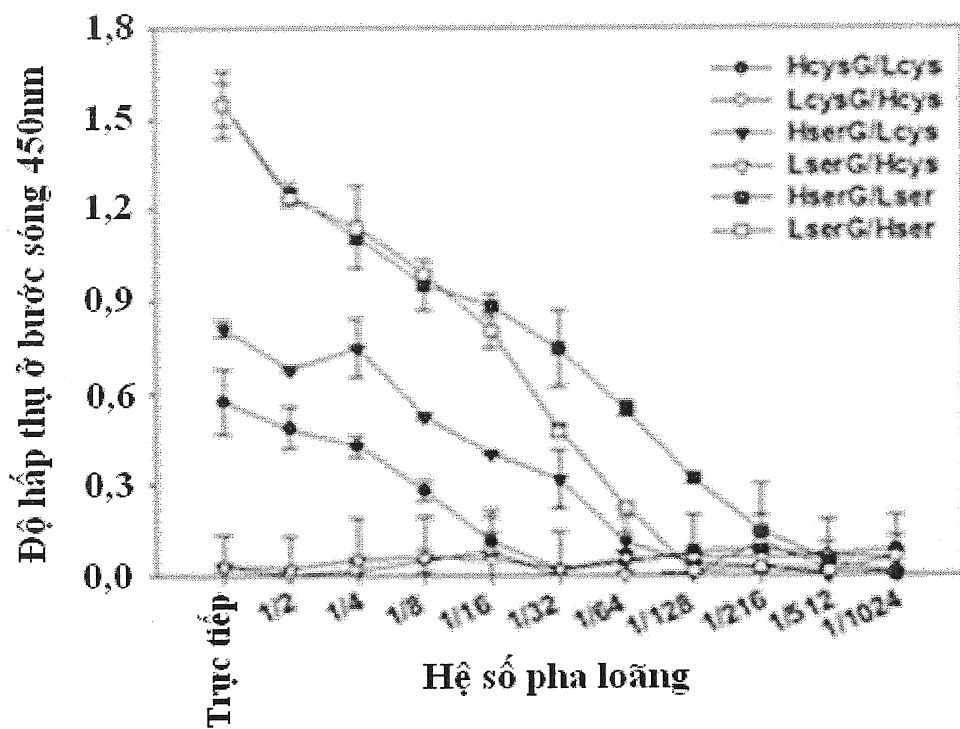


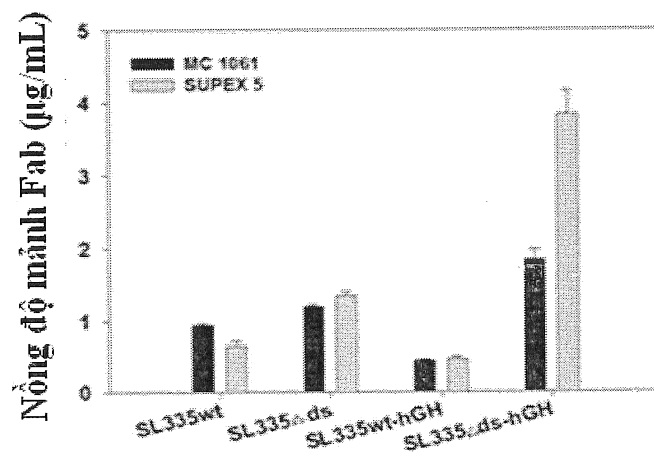
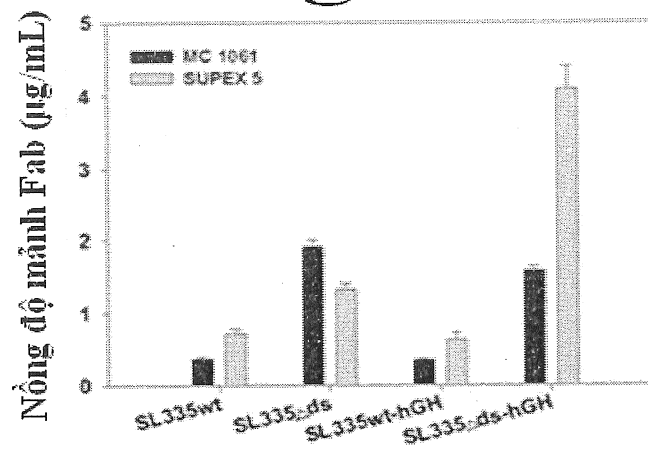
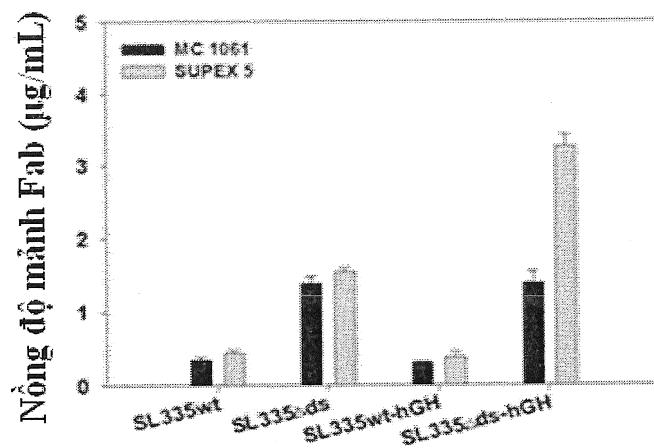
Hcys = chuỗi H chứa Cys²³³, Lcys = chuỗi L chứa Cys²¹⁴, Hser = chuỗi H chứa Ser²³³ = chuỗi L chứa Ser²¹⁴

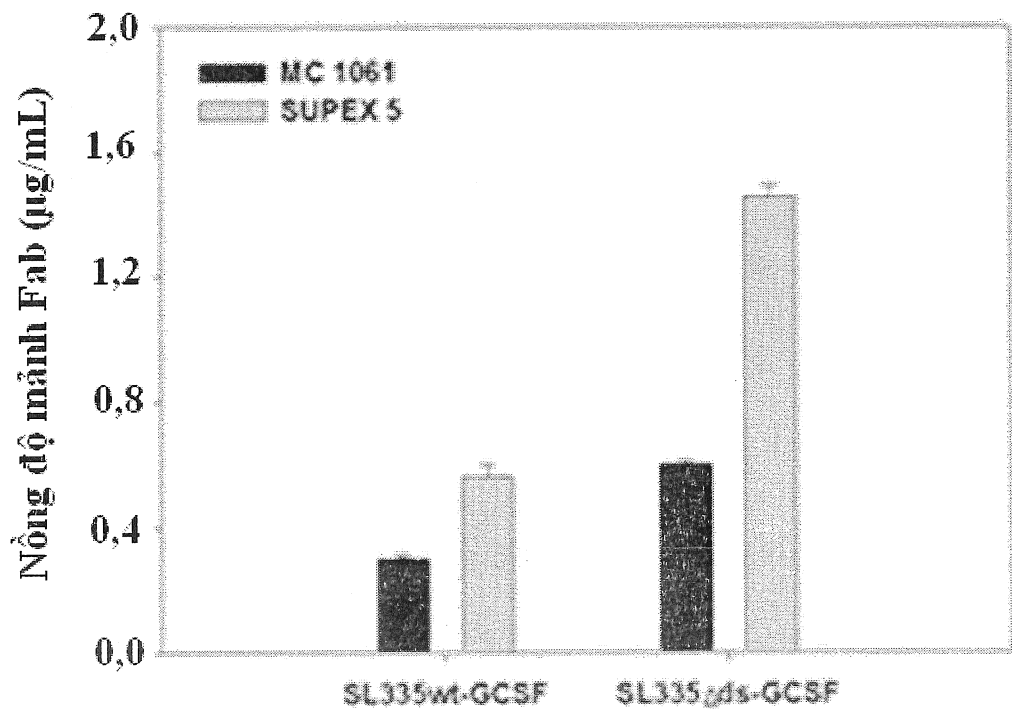
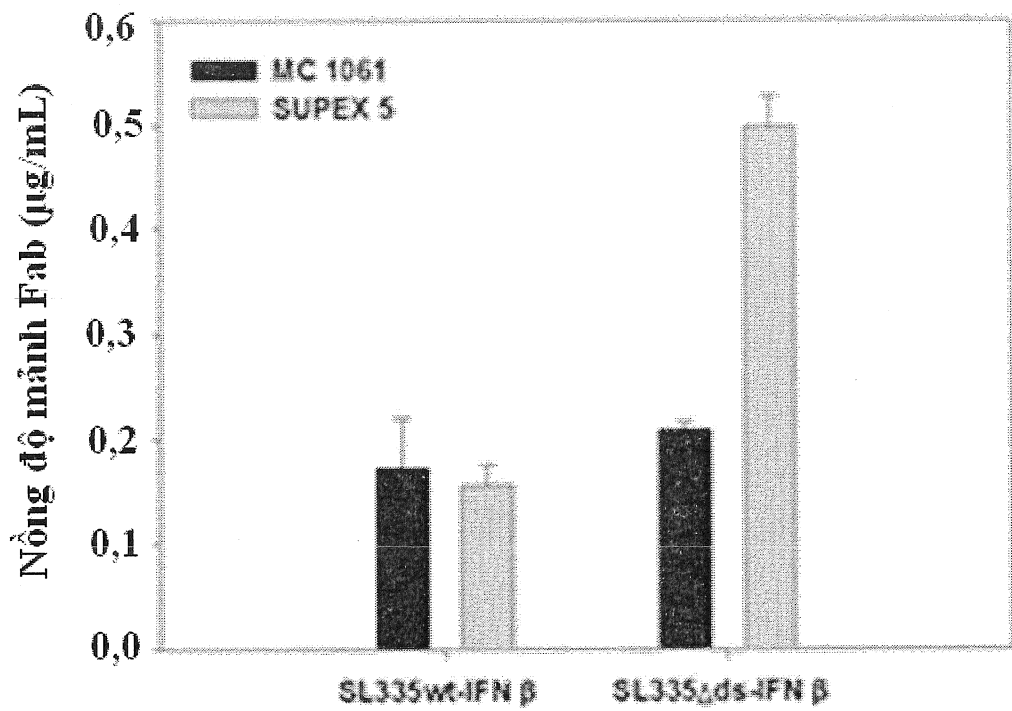
Fig.4

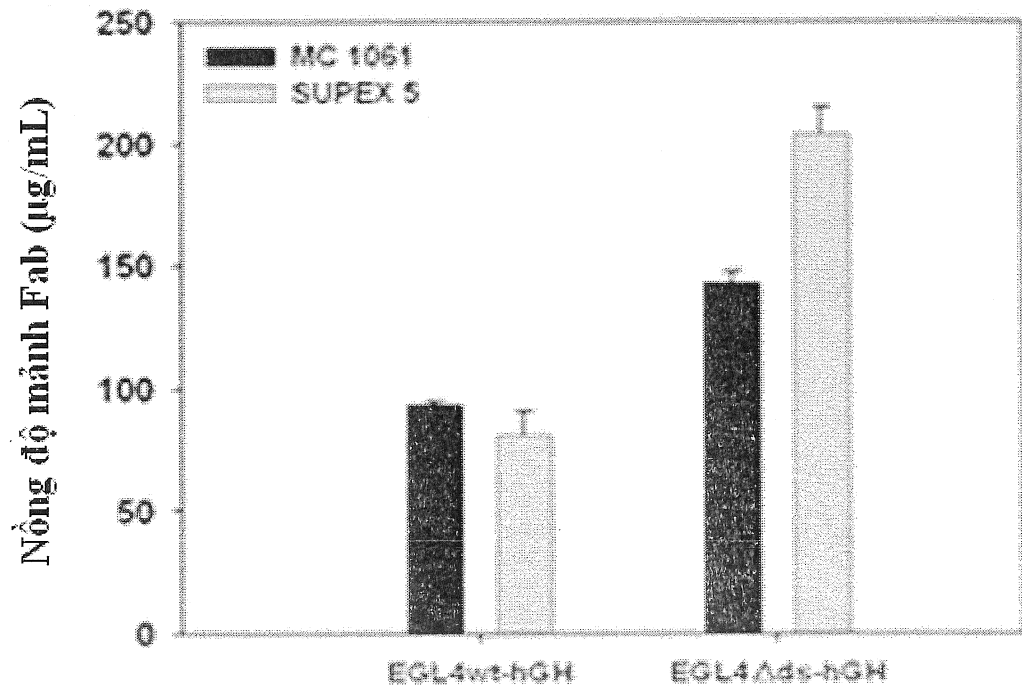
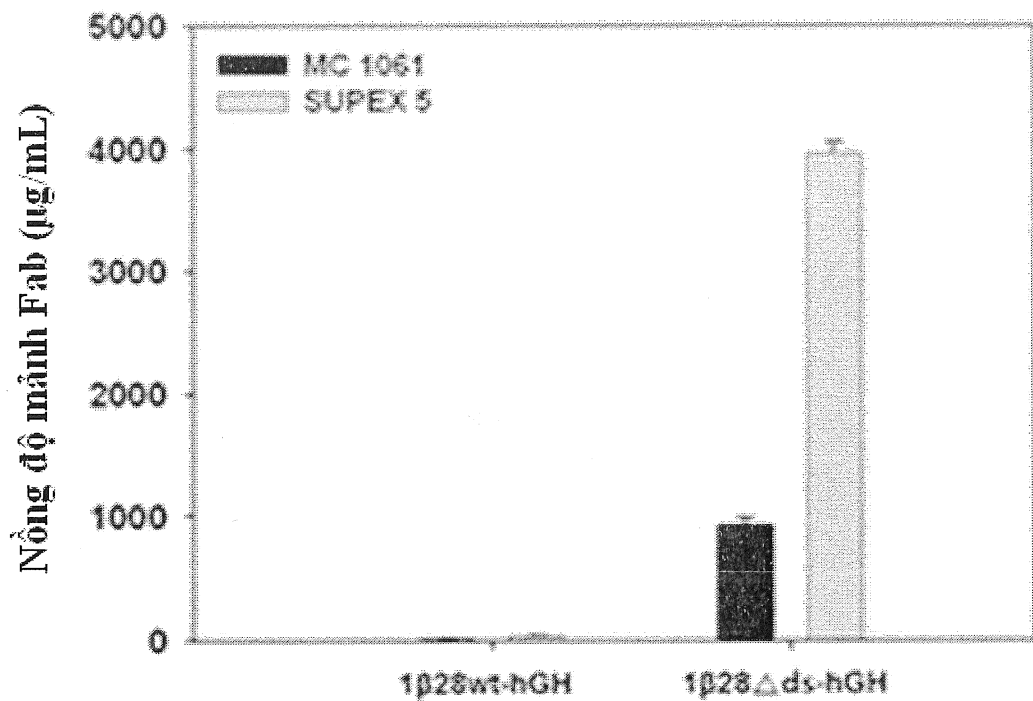
**Fig.5A****Fig.5B**

Cấu trúc dung hợp SL335-hGH

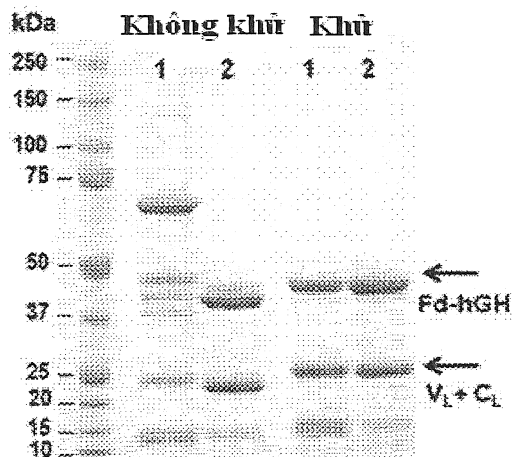
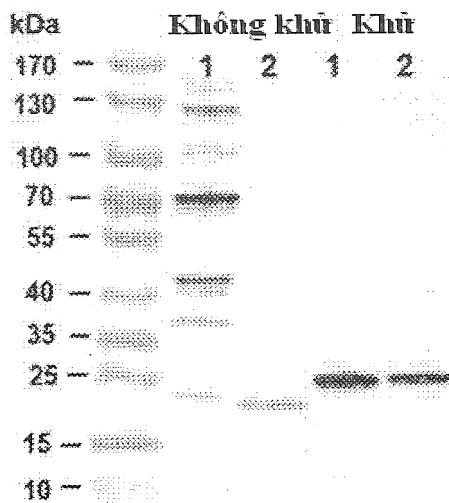
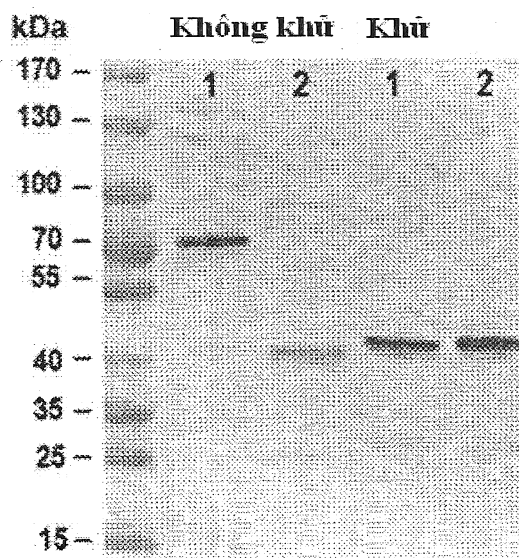
**Fig.5C****Fig.5D**

**Fig.6A****Fig.6B****Fig.6C**

**Fig.7A****Fig.7B**

**Fig.8A****Fig.8B**

11/36

Fig.9A**Fig.9B****Fig.9C**

12/36

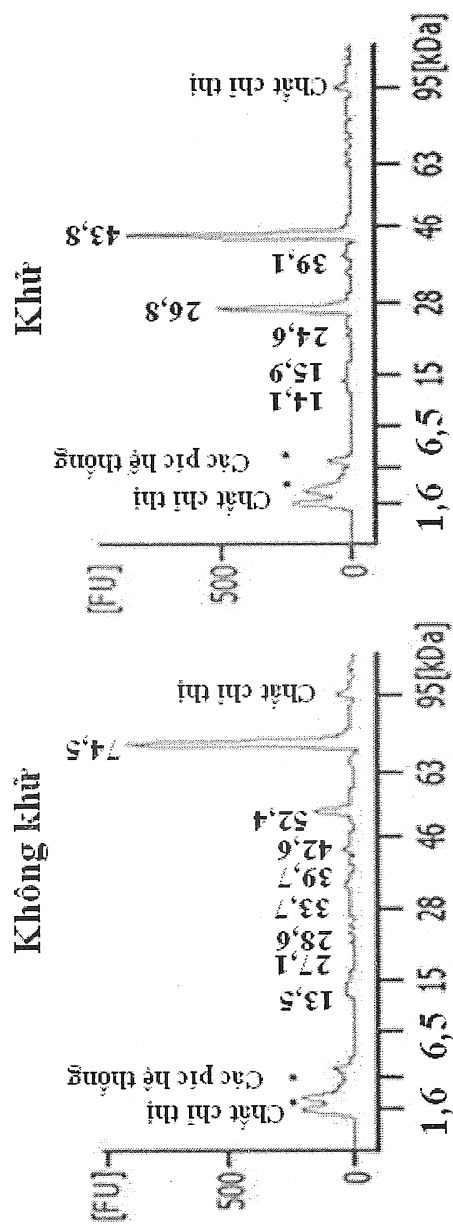


Fig.10A

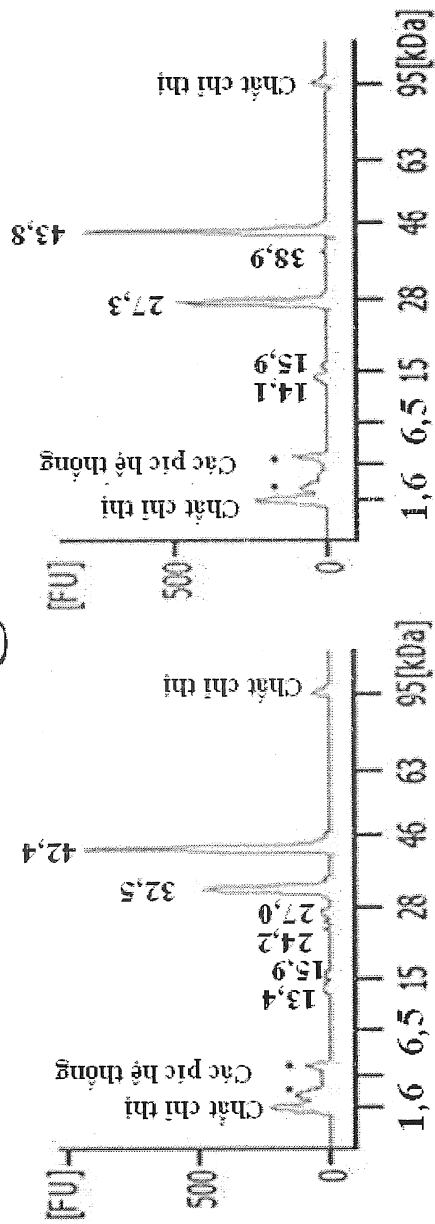
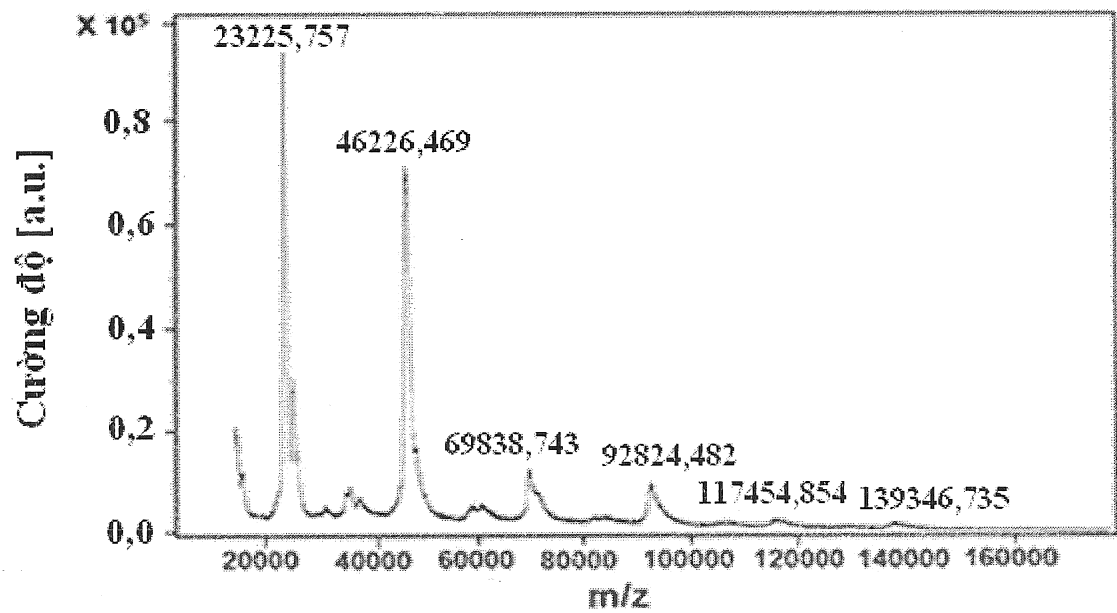
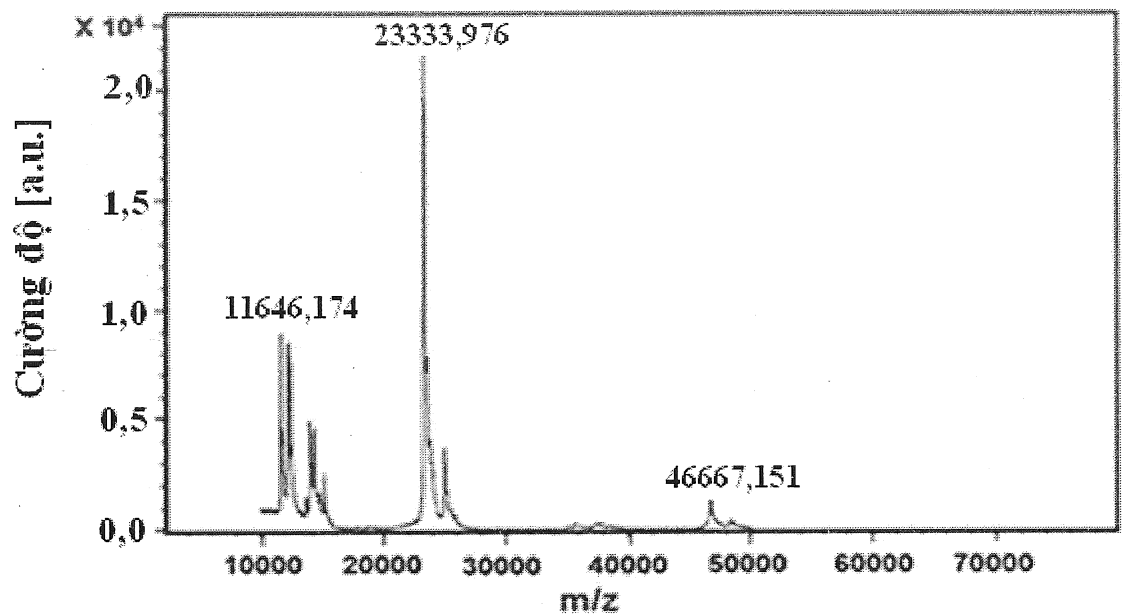
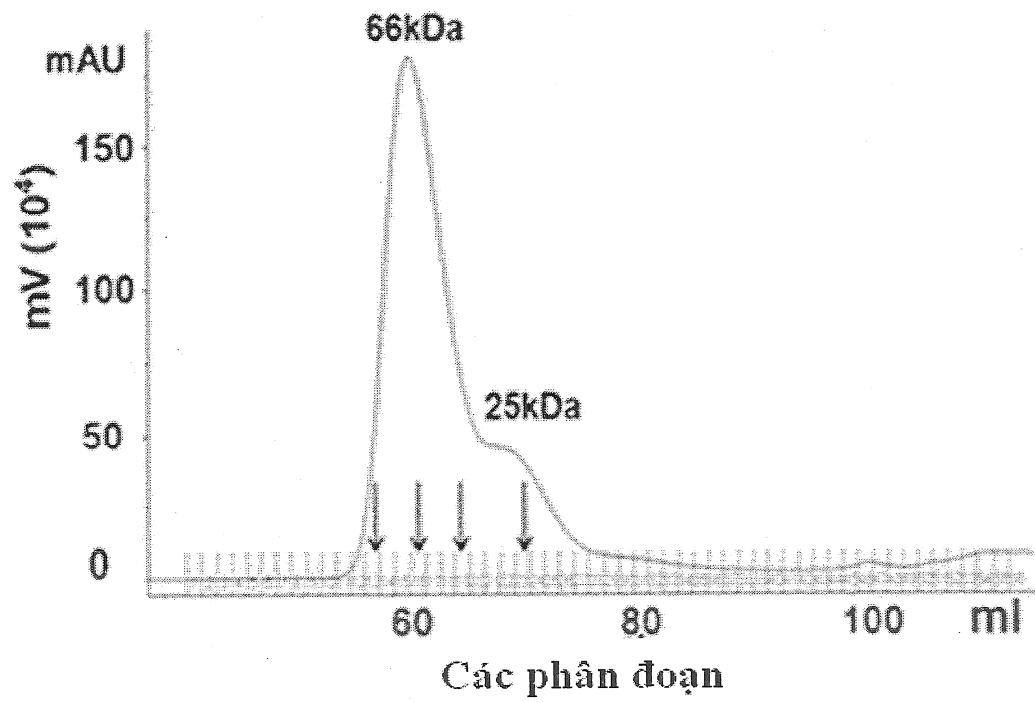
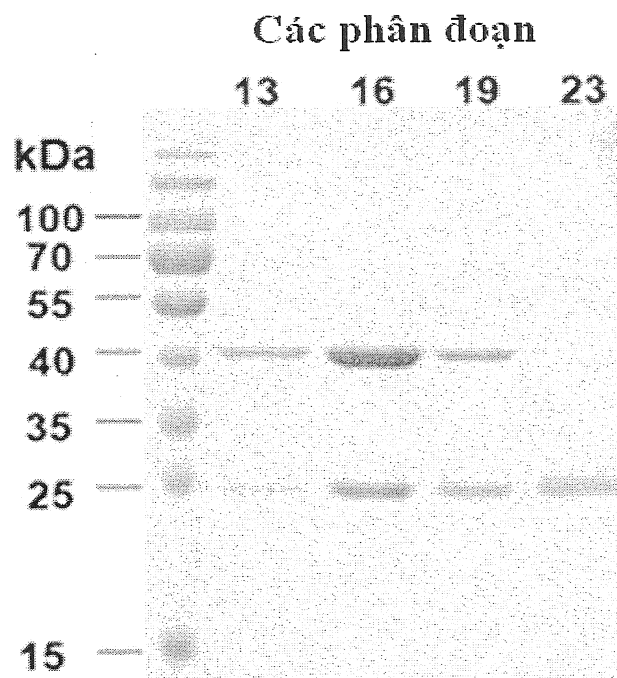
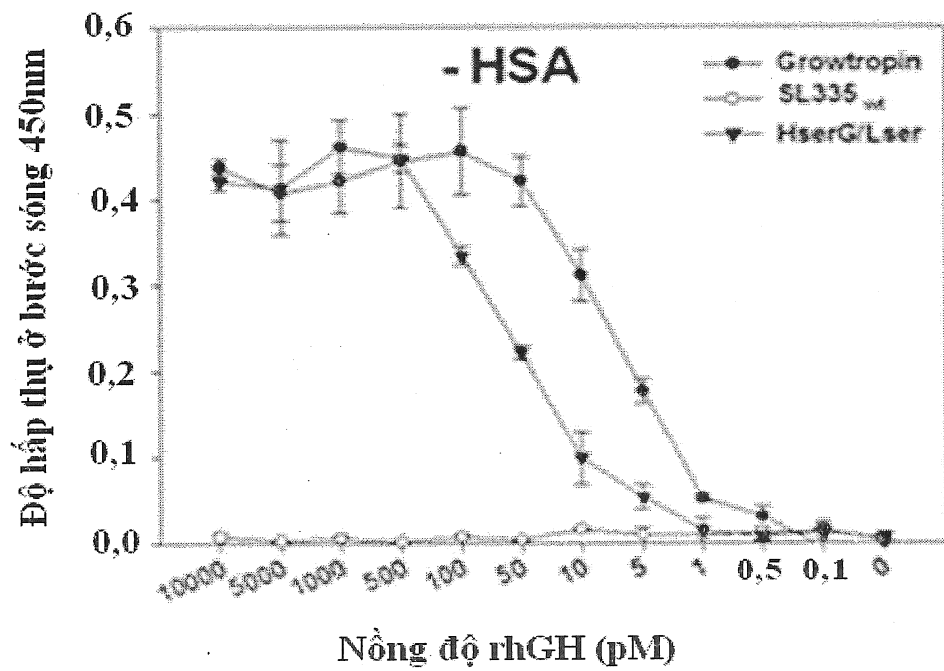
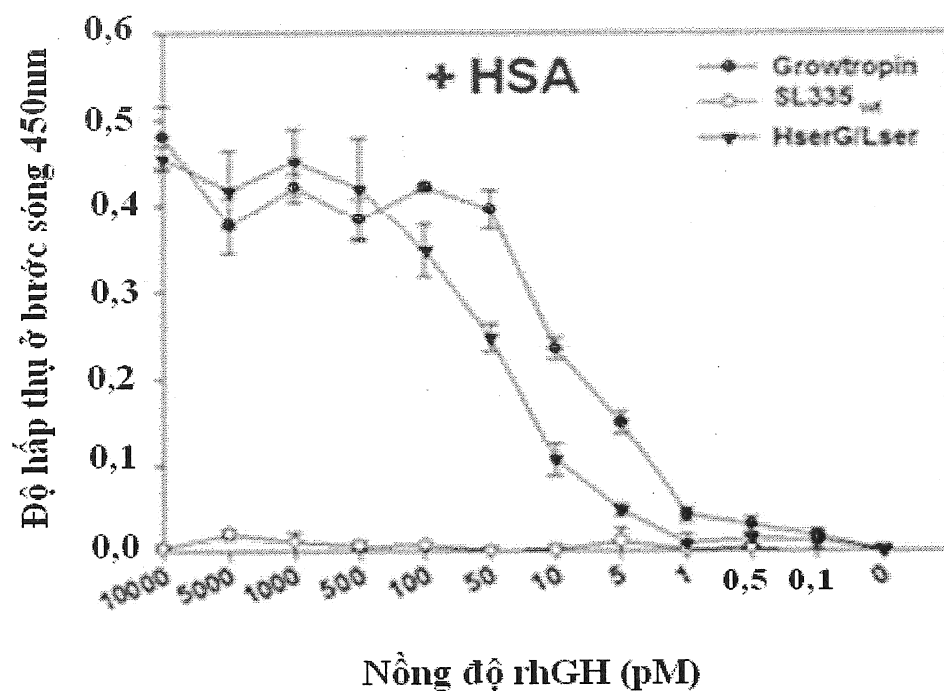


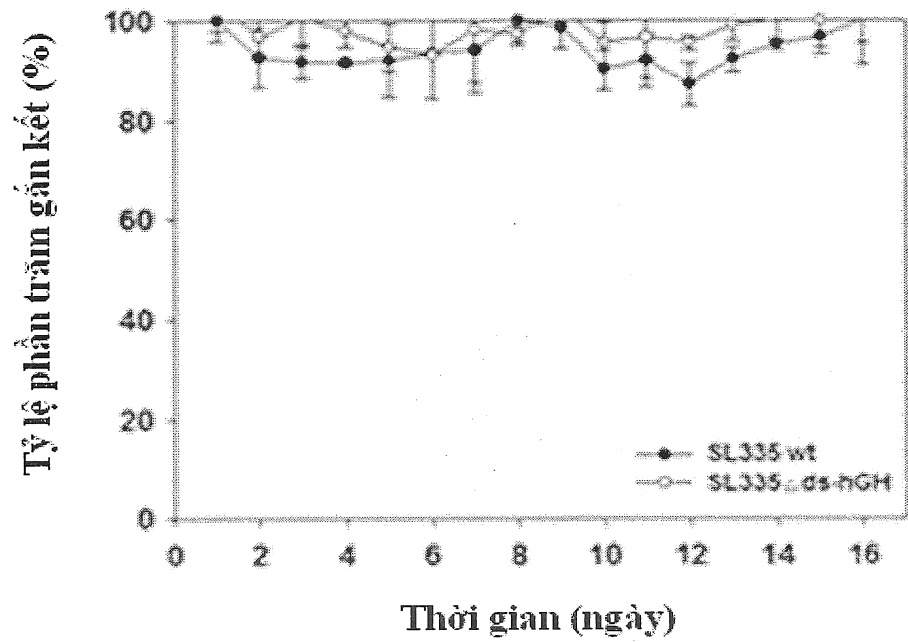
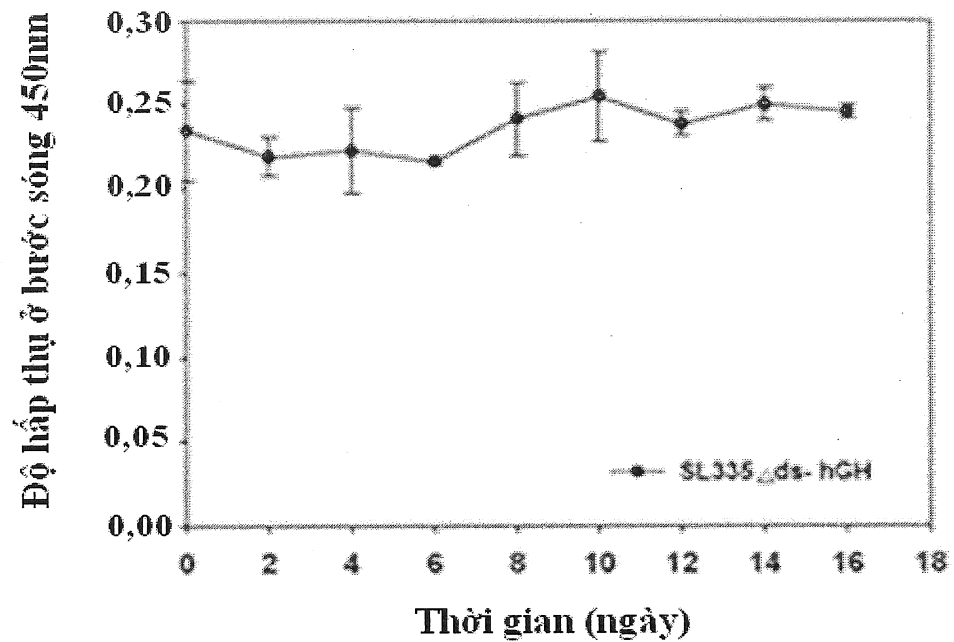
Fig.10B

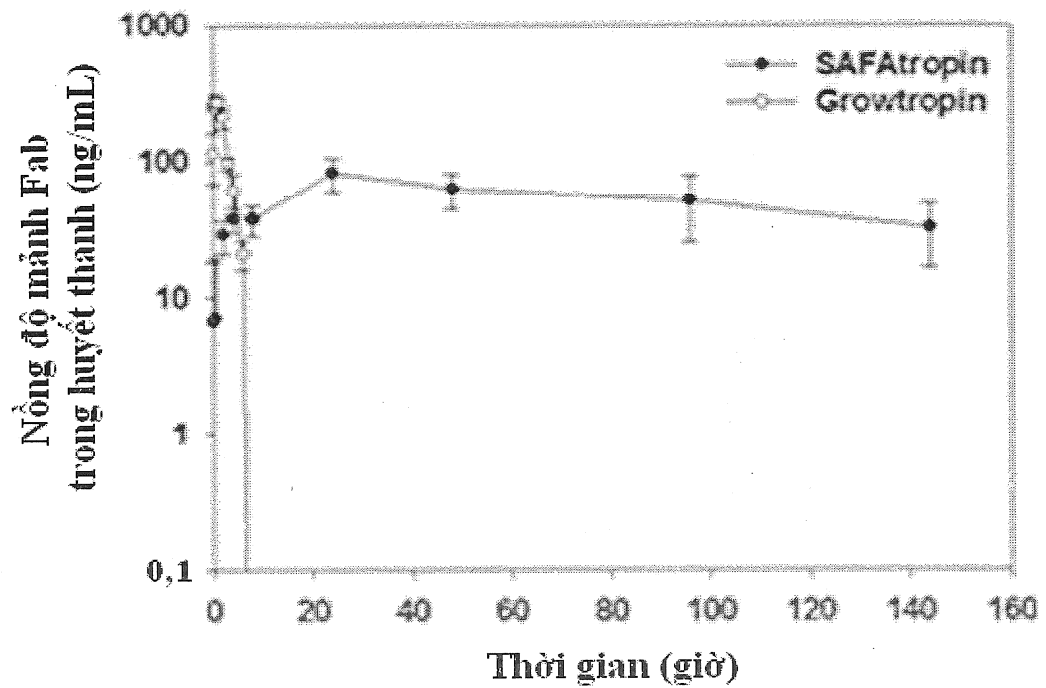
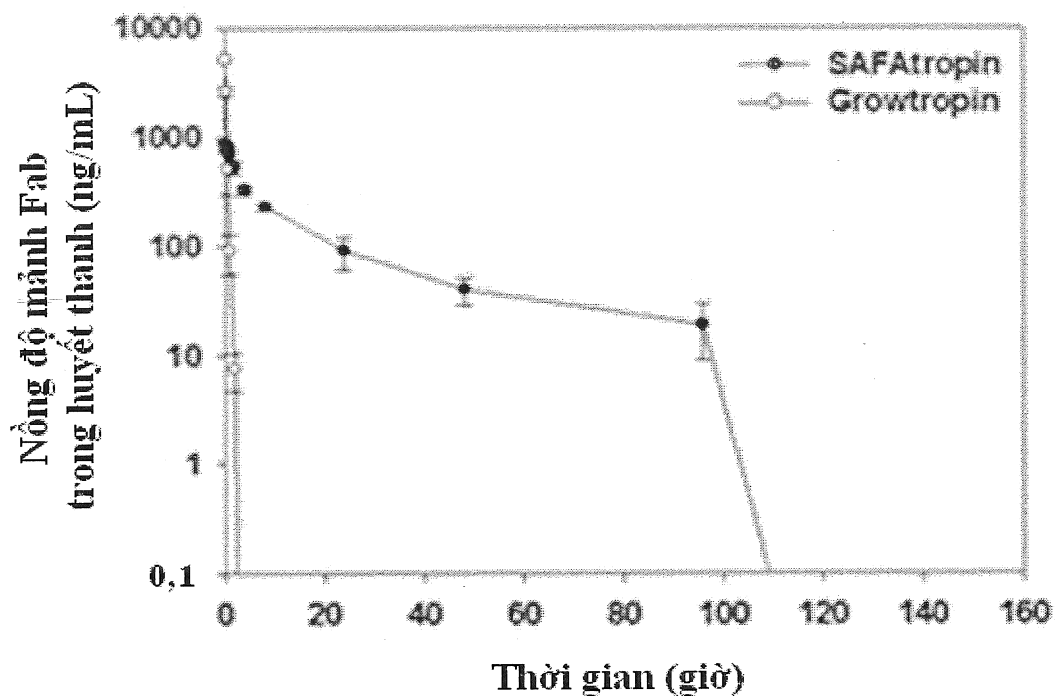
**Fig.11A****Fig.11B**

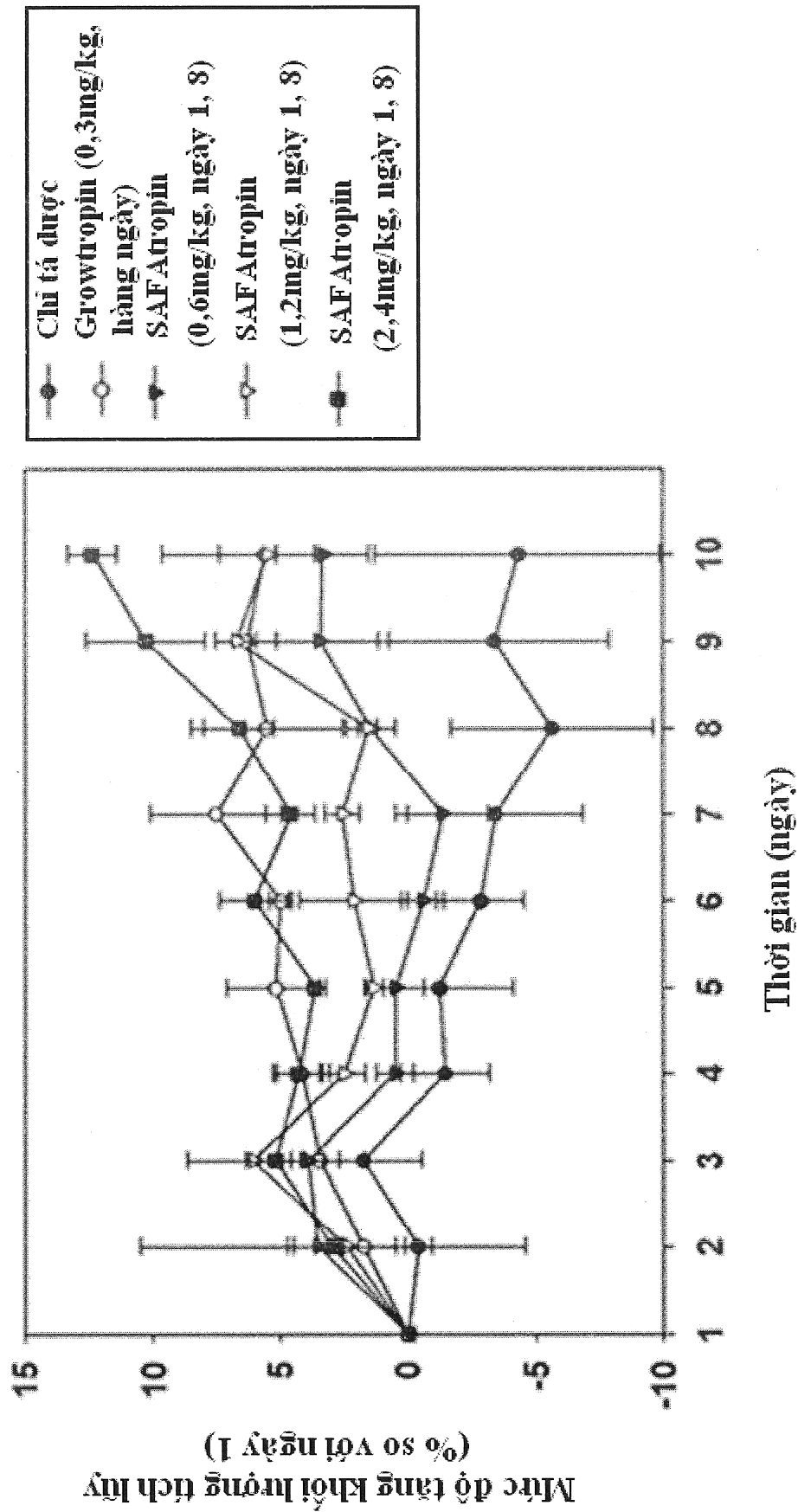
**Fig.12A****Fig.12B**

**Fig.13A****Fig.13B**

16/36

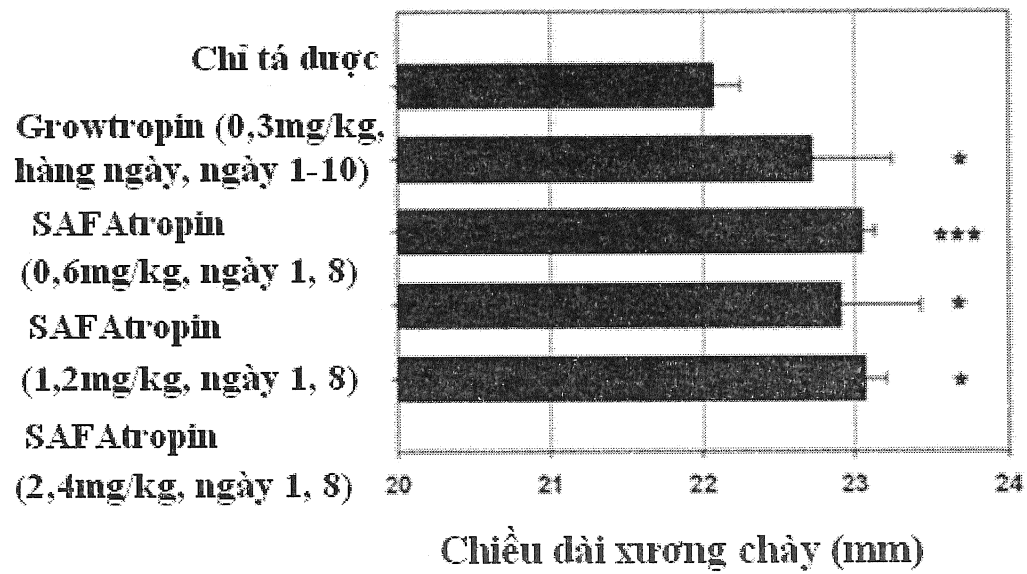
**Fig.14B****Fig.4A**

**Fig.15A****Fig.15B**



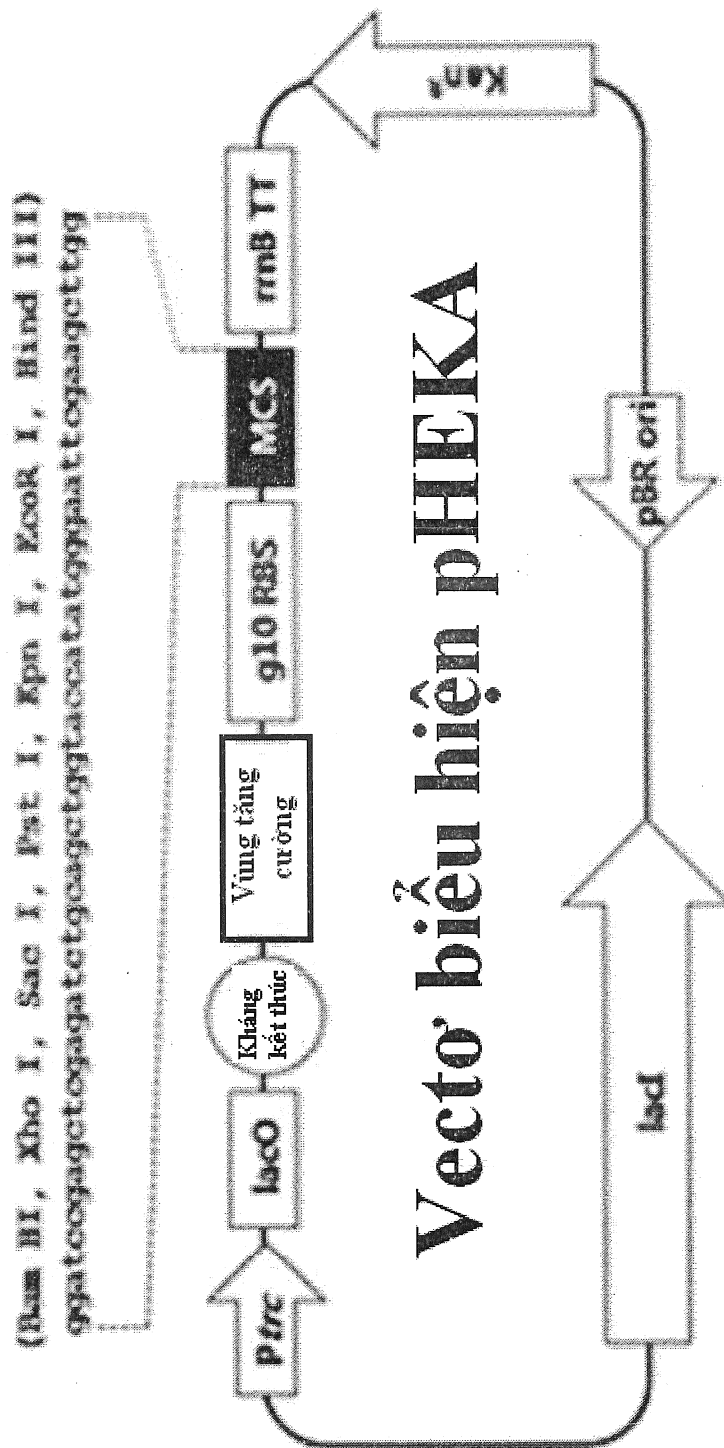
* $P < 0,05$, ** $P < 0,001$ so với Đối chứng, ANOVA một chiều, Dunnett

Fig.16



* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ so với Đối chứng, ANOVA một chiều, Dunnett

Fig.17

**Fig.18**

Trình tự pHEKA (5240bp)

```

1  cgaagagccg agtatattga atagagattt agttattatt gatgccttgc gttacactat atagataggg gagaacccac actaacatcg aggtacagga
101 atttactctt tgaatttcgg atgggggagc gggggagcac agagctactg cagcagagga aattctggtt tatcagagcg atttataggt atgatttaac
201 atgtatcagg atgaaatctt tatatctctt gggggagcac ccaagcttgc aattccctta tggtaacagg tgaagctctc aggtataga gaaatcagag
301 tgggtatctt atatatctct atttaatttt taattatata gttactatgt aattccagtc gantgcacac caagatttgc tgaataattg ttacagagac
401 gtagcagctt gattttctct agggggagcg ttctctgtgt gaaatttt ta tgggtatcga atccacacac ttatagagcg aggtatagtt atgtatcga
501 gattatctta agtatctgat cactatagcg gaaagctatg tggggagcat caccagagcg aaggtttggg ttgtatggcg ctatctatgc agaatcagcg
601 atgggagaga tggggctcgc caatttcagg taattagcgc ttgtttcggc gtggttatag tggggagcac agttatcggt ggaattgttg gggatctatc
701 atttatagca caattctctg agggggaggt gttcacagcg atcaaatgc tactgggttg attctaatag aggtatagcg ataggggagc ggttcagagt
801 cccggagcac ataatatagc gaaaaacatt tgggtataga gaaatagcg gctggagaga ggttatcttg aggttatgta atgtacacac agtatagttc
901 tatcagagcg ttctcagagc ttctcagagc ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg
1001 agggatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg
1101 gaaagagagc tgggaatttg tgggttaggt tatcagagcg ttctcagagc ttctcagagc ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg
1201 tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
1301 gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
1401 tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
1501 gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
1601 atcagagctt ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg
1701 cctcagagctt ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg
1801 ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg
1901 ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg
2001 agggagagcg atcagagagc atgagagagc gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
2101 atctttatc atgagagagc tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
2201 atgagagagc tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
2301 cagagagagc tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
2401 gaaataggt tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
2501 tgggttaggt gaaataggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
2601 atgagagagc tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
2701 atgagagagc tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
2801 gaaataggt tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
2901 gaaataggt tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
3001 gaaataggt tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
3101 gaaataggt tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
3201 gaaataggt tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
3301 tatcagagcg ttctcagagc ttctcagagc ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg
3401 gaaataggt tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
3501 gaaataggt tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
3601 gaaataggt tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
3701 tatcagagcg ttctcagagc ttctcagagc ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg
3801 tgggttaggt tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
3901 gaaataggt tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
4001 tatcagagcg ttctcagagc ttctcagagc ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg
4101 gaaataggt tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
4201 gaaataggt tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
4301 tatcagagcg ttctcagagc ttctcagagc ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg
4401 gaaataggt tgggttaggt gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
4501 tatcagagcg ttctcagagc ttctcagagc ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg
4601 tatcagagcg ttctcagagc ttctcagagc ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg ggttatagcg
4701 ataatatagc aatttatatt ttgagagagc gaaataggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
4801 tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
4901 tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt tgggttaggt
5001 aagttcagcg tgaatttctc aagtttcttc ttttttcttc atctctcttc aattttcttc aattttcttc aattttcttc aattttcttc aattttcttc
5101 aattttcttc aattttcttc aattttcttc aattttcttc aattttcttc aattttcttc aattttcttc aattttcttc aattttcttc aattttcttc
5201 agggagagag cagttatagc agggagagag cagttatagc agggagagag cagttatagc agggagagag cagttatagc agggagagag cagttatagc

```

Fig.19

V_H		Nhóm phụ VH									
		11	21	31	41	51	61				
SA138 VH	QVQLQSGAE	VKKRQASVKV	SKKASGYTFT	SYGISHWVQA	PGGLEKRVQM	LEYSGGTGYA	QKPKGRVTMT				
SA139 VH	EVQLQSGAE	VKKRQASVKV	SKKASGYTFT	SYGISHWVQA	PGGLEKRVQM	LEYSGGTGYA	QKPKGRVTMT				
SA140 VH	QVQLVQSGAG	VVQYKHSIRL	SCAASGFTFR	NYGIDHWVQA	PGGLEKRVAS	ISYDGSMTGYA	DSVKGKFTIS				
SA141 VH	QVQLVQSGAG	LVQKHSIRL	SCAASGFTFR	SYGMSHWVQA	PGGLEKRLIV	ISHDGGIYQA	DSVKGKFTIV				
SL18 VH	EVQLVQSGTE	VKKKHSIRL	SKKISGYST	AIWIANVVMQ	PGGLEKRMCM	INPPDADARYA	PSYQQQVTFD				
SL301 VH	QVQLVQSGRG	VKKKHSIRL	SCAASGFTFR	AYGMSHWVQA	PGGLEKRVES	ISSGGYIHYA	DSVKGKFTIS				
V_L		71	81	91	101	111					
SA138 VL	RDTGISIVYM	ELIGLESDTAVY	YCARLGHQMGICSDAL	DTWQQTLYVT	VSS	I					
SA139 VL	TDTSTSIAYM	KVRSIRSDTAVY	YCARLGHQMGICSDAL	DTWQQTLYVT	VSS	I					
SA140 VL	RNSNTIVY	QMSLIGGGTAVY	YCARDVHYTSGSYTNAF	DINGQSTLYVT	VSS	III					
SA141 VL	RNSNTIYL	QMSLIGGGTAVY	YCARAGMLRQEM	DVWQQTLYVT	VSS	III					
SL18 VL	VDEKISTAYL	QMSLIGGGTAVY	YCARLISGSI	SPWQQTLYVT	VSS	I					
SL301 VL	RNRKNSIYL	QMSLIGGGTAVY	YCARETVMKDAL	DVWQQTLYVT	VSS	III					
V_L		11	21	31	41	51	61				
SA138 VL	KLIVTQSPSS	LSASVGDHVT	ITCRASQ·SIS	RYLWYQCKP	GKAPKLLIYG	ASRLSSGVPD	RFGSGSGTSD				
SA139 VL	KLIVTQSPSS	LSASVGDHVT	ITCRASQ·SIS	RYLWYQCKP	GKAPKLLIYA	ASRLSSGVPD	RFGSGSGTSD				
SL18 VL	KLIVTQSPGT	LSLSFGHEAT	LSCRASQ·SIF	RYLWYQCKP	GQAPKLLIYG	ASRATGIVD	RFGSGSGTSD				
SL301 VL	KLIVTQSPGT	LSLSFGHEAT	LSCRASQ·SIS	RYLWYQCKP	GQAPKLLIYG	ASRATGIVD	RFGSGSGTSD				
SL310 VL	KLIVTQSPGT	LSLSFGHEAT	LSCRASQ·SIS	RYLWYQCKP	GQAPKLLIYG	ASRATGIVD	RFGSGSGTSD				
SL335 VL	KLIVTQSPGT	LSLSFGHEAT	LSCRASQ·SVG	RYLWYQCKP	GQAPKLLIYG	ASRATGIVD	RFGSGSGTSD				
V_L		71	81	91	101		Nhóm phụ VL				
SA138 VL	FTLTISLQF	KDFAVYTCQQ	SDSVVVT·FQD	GTRLEIKR	I						
SA139 VL	FTLTISLQF	KDFAVYTCQQ	SYSTPPT·FQD	GTRLEIKR	I						
SL18 VL	FTLTISLQF	KDFAVYTCQQ	RSMPPTWTTCQ	GTRVDIKR	III						
SL301 VL	FTLTISLQF	KDFAVYTCQQ	YGSSPPT·FQD	GTRLEIKR	III						
SL310 VL	FTLTISLQF	KDFAVYTCQQ	YSSYLT·FQD	GTRLEIKR	III						
SL335 VL	FTLTISLQF	KDFAVYTCQQ	YYSFLAT·FQD	GTRLEIKR	III						

Fig.20

SA138 VH									
1	11	21	31	41	51	61	71	81	91
101	111	121	131	141	151	161	171	181	191
201	211	221	231	241	251	261	271	281	291
301	311	321	331	341	351	361	371	381	391
401	411	421	431	441	451	461	471	481	491
501	511	521	531	541	551	561	571	581	591
601	611	621	631	641	651	661	671	681	691
701	711	721	731	741	751	761	771	781	791
801	811	821	831	841	851	861	871	881	891
901	911	921	931	941	951	961	971	981	991
SA139 VH									
1	11	21	31	41	51	61	71	81	91
101	111	121	131	141	151	161	171	181	191
201	211	221	231	241	251	261	271	281	291
301	311	321	331	341	351	361	371	381	391
401	411	421	431	441	451	461	471	481	491
501	511	521	531	541	551	561	571	581	591
601	611	621	631	641	651	661	671	681	691
701	711	721	731	741	751	761	771	781	791
801	811	821	831	841	851	861	871	881	891
901	911	921	931	941	951	961	971	981	991
SA140 VH									
1	11	21	31	41	51	61	71	81	91
101	111	121	131	141	151	161	171	181	191
201	211	221	231	241	251	261	271	281	291
301	311	321	331	341	351	361	371	381	391
401	411	421	431	441	451	461	471	481	491
501	511	521	531	541	551	561	571	581	591
601	611	621	631	641	651	661	671	681	691
701	711	721	731	741	751	761	771	781	791
801	811	821	831	841	851	861	871	881	891
901	911	921	931	941	951	961	971	981	991

Fig.21A

SAL41 VII									
1	11	21	31	41	51	61	71	81	91
101	111	121	131	141	151	161	171	181	191
201	211	221	231	241	251	261	271	281	291
301	311	321	331	341	351				
401	411	421	431	441	451				
501	511	521	531	541	551				
601	611	621	631	641	651				
701	711	721	731	741	751				
801	811	821	831	841	851				
901	911	921	931	941	951				
SIL10 VII									
1	11	21	31	41	51	61	71	81	91
101	111	121	131	141	151	161	171	181	191
201	211	221	231	241	251	261	271	281	291
301	311	321	331	341	351				
401	411	421	431	441	451				
501	511	521	531	541	551				
601	611	621	631	641	651				
701	711	721	731	741	751				
801	811	821	831	841	851				
901	911	921	931	941	951				
SIL301, SIL310 and SIL335 VII									
1	11	21	31	41	51	61	71	81	91
101	111	121	131	141	151	161	171	181	191
201	211	221	231	241	251	261	271	281	291
301	311	321	331	341	351				
401	411	421	431	441	451				
501	511	521	531	541	551				
601	611	621	631	641	651				
701	711	721	731	741	751				
801	811	821	831	841	851				
901	911	921	931	941	951				

Fig.21B

SA138 VL

```

1      11      21      31      41      51      61      71      81
gaqetegt tqaecqagte teactetee etqetqtet etqtqtqet atactetee qqaqattee qqaqattee
101
atqqtatet qqaqaatet qqaqaatet etactetee etactetee etactetee etactetee etactetee
201
tqqaqatet teactetee etactetee etactetee etactetee etactetee etactetee etactetee
301
qtacacqae tqqaqatet aqa

```

SA139, SA140, SA141 VL

```

1      11      21      31      41      51      61      71      81
gaqetegt tqaecqagte teactetee etqetqtet etqtqtqet atactetee qqaqattee qqaqattee
101
atqqtatet qqaqaatet qqaqaatet etactetee etactetee etactetee etactetee etactetee
201
tqqaqatet teactetee etactetee etactetee etactetee etactetee etactetee etactetee
301
caqqaqae atqqtatet aqa

```

SL18 VL sequence

```

1      11      21      31      41      51      61      71      81
gaqetegt tqaecqagte teactetee etqetqtet etqtqtqet atactetee qqaqattee qqaqattee
101
atqqtatet qqaqaatet qqaqaatet etactetee etactetee etactetee etactetee etactetee
201
tqqaqatet teactetee etactetee etactetee etactetee etactetee etactetee etactetee
301
qqaqattee etactetee atactetee

```

Fig.21C

SL301 VL									
1	11	21	31	41	51	61	71	81	91
101	111	121	131	141	151	161	171	181	191
201	211	221	231	241	251	261	271	281	291
301	311	321	331	341	351	361	371	381	391
SL310 VL									
1	11	21	31	41	51	61	71	81	91
101	111	121	131	141	151	161	171	181	191
201	211	221	231	241	251	261	271	281	291
301	311	321	331	341	351	361	371	381	391
SL335 VL									
1	11	21	31	41	51	61	71	81	91
101	111	121	131	141	151	161	171	181	191
201	211	221	231	241	251	261	271	281	291
301	311	321	331	341	351	361	371	381	391

Fig.21D

1) SL335_h-hGH

Chuỗi nặng (định dạng Hcys+ hGH)	ADN	CAAGTTCAGCTGGTTCAGAGCGGTGGCGGCCCGGTGAACCAAGTGGCAGCCTGGG TCTGTCTGGCGCGCGAGCGGTTTATGTTTCGTGGGTATAGCATGAACCTGGGTGGG CCAGGCGCGCGGCAAAAGGCTGGGAATGGGTGAGCAGCATTAGCAGCAGTGGCGGC TATATTCTATTATGCGGACAGTGTAAAGGTGCTTTTACCATTTCTCGTGACAATGCC AAAAACAGCCTGTATCTGCAAAATGAATAGCTGCGCGCGGAAGACACCGCGGTGTA CTACTGTGGCGCGGAAACCGTGATGGCGGGCAAAAGCACTGGATTATTTGGGTGAGG GCACCTCGGTGACCGTGAGCAGCGCGAGCACCAAAAGGCGGAGCGCGAGCACCAA AGGCCCGAGCGGTGTTCCGCTGGCACCTAGTTCGAAATCAACGAGCGGTGGCACCG CGGCTCTGGGCTGCCTGGTGAAAGATTATTTCCCGAACCTGTTACCGTGAGCTGGA ACAGCGGTGCGTTGACGAGTGGTGTGATACCTTTCCCGCAGTTCTGCAATCGAGC GGCCTGTACTCACTGAGCAGCGTGGTTACGGTTCGGAGCAGTAGCCTGGGTACACA GACCTATATTGTAAAGTGAACACAAGCCTTCGAACACGAAAGTTGACAAAGCGG TGGAAACGAAGAGCTGGCGGTCTGACACAGCTCCTGGATCTTTCCGACCATTCGCG TGAGCCGCTGTTCGATAACGGGATGCTGGCGGCCACCGCTGATCAACATGGCTT TTGATACCTATCAGGAGTTTGGGAAAGCGTACATCCCGAAGGAACAGAAATATTTCT TTCTGCAAGAACCCACAGACGAGCCTGTGCTTTAGCGGAATCTATCCCGACCCGCTCC AACCGCGAAGAAACCCAAACAGAAAGTCTAACCTGGAAACTGCTGGGTATCTCTGCT GCTGATTCAATCTGGCTGGGACCGGTTCATTTCTGGGTAGCGTGTGTTGGGAATC TCTGGTGTATGGCGCGCTGAGCTCTAACGTGTATGACCTGCTGAAAGATCTGGAAG AAGGCATCCAAACTCTGATGGGCGGCTGGAGGACGGCTCTCCAGGTACCGGCCAG ATCTTTAAACAGACCTATAGCAAAATTTGACACCAATCTCACAACGATGATGGCTG CTGAAAAACTATGGCCTGCTGTATTGCTTCCGTAAAGACATGGATAAAGTTGAAAC GTTCTTGGCATTTGTTCACTGCTGCTGGGAGGGCTCCTGCGGCTTC
	Axit amin	QVQLVQSGGGLPVKPGGSLRLSCAASGFMRAYSMTNWVRQAPGKGLEWVYSSISS GRYIFYAUSVKGRTISKDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARETVMAGKALDYW GGGTLVTYSSASTKGPSAVFLPSSKSTSGGTAAALGLVYKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHRPSNTRVDKRVEPKS CGSAPAPGSEFTPLSRLFDNAMLRHRLHQLAFDTYOEIEAYIPKEQKYSFLQNPOTS LCFSESIPTPSNRFETQOKSNLELLRISLLIQSWLEIPVQLRSVFANSLVYGASDSNVYD LLKDLLEEGITLLMGRLEDGSPRTGGIFKOTYSKFDINSHNDALLKNYGLLYCFRKDM DKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
Chuỗi nhẹ (định dạng Lcys)	ADN	GATATCGTTCGACCAATCTCCGGGTACGCTGAGCCTGAGCCCGGGCGAAACCGC GACCTGAGCTGCCGGCGAGCCAAAGCGTGGGTCTAATCTGGCTGGTATCAGC AGAAACCGGGTCAGGCCCGCGCTGCTGATCTATGGGCGGAGUACGGGGGCTACC GGCGTTCGGCGCGCTTTAGTGGCAGTCGCGAGCGGCACCGATTTTACCCTGACATT ACAAGTCTGCAGCCGGAAGATTTTGGGACCTATTATTGCCAGCAATATTATAGCTTC CTGGCGAAAACCTTTGGTCAAGGACCCAGCTGGAATTAACGCGACCGTGGCGGC ACCGAGCGTGACGGTGGCGGCAACCGCGTGTTATTTTCTCCAGTGATGAACA GCTGAAAAGCGGGACCGCGAGTGTGTGTGCCGTGTGAACAACCTCTATCCTCGCG AAGCGAAAGTGCAAGTGGAAAGTGGATAACGCATTGCAGAGCGGCAACAGTCAAGG AAGCGTTACTGAACAGGATAGCAAAAGATAGTACGTACAGCTTGAGCAACACTGTGA CCCTGAGTAAAGCGGATTATGAAAAACATAAAGTGTATGCTATCGCAAGTTACGCAT CAAGGGCTGAGCAGTCCGGTGACAAAGAGCTTAAACCGCGCGCAATGC
	Axit amin	DIVLTQSPGTLISLSPGETATISCRASQSVGSNLAWYQOKPGQAPRLLIYGASTGATGVP ARFSGSRSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQYVYSLAKTFFGGGTGLEIKRTVAAPSVTV APSVFIIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLNLTILSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC

* Góc liên kết và các miền tác động được gạch chân và các vùng CDR được in đậm.

Fig.22A

2) SL335_{Δ46}-hGH

Chuỗi nặng (định dạng Hser+ hGH)	ADN	CAAGTTCAGCTGGTTCAGAGCGGTGGCGGCCCGGTGAACCAGGTGGCAAGCCTGCGTCTGTCCTGGCGGCGAGCGGTTTATGTTTCGTGCGTATAGCATGAACCTGGGTGCGCCAGCGCGCCGGCAAAGGCTTGAATGGGTGAGCAGCATTAGCAGCAGTGGCCGCTATATTCATTATGCCGACAGTGTTAAAGGTGCTTTACCATTTCTGTTGACAATGCGAAAAACAGCCTGTATCTGCAAAATGAATAGCCTGCGCGCGGAAGACACCGCGGTGTACTACTGTGCGCGCGAAACCGTGATGGCGGGCAAAGCACTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCCGGGTGACCGGTGAGCAGCGCGGAGCACCAAAGGCCGAGCGCGAGCACCAAAGGCCGAGCGGTGTTCCGCTGGCACCTAGTTCGAAATCAACGAGCGGTGGCACCAGCGGCTCTGGCTGCTGGTGAAAGATTATTTCCGGAACTGTTACCGTGAGCTGGAAACAGCGGTGGCTGACGAGTGGTGTGCATACCTTTCCCGCAGTCTGC AATCGAGCGGCTGTACTCAGTGAGCAGCGTGTTACGGTCTTGAGCAGTAGCTGGGTACACAGACCTATATTTGTAACGTGAACCACAAGCCTTCGAAACAGAAAGTTGACAAACGCGTGGAAACCGAAGAGCAGCGGTTCGTCACCAGCTCCGGGATCTTTCCGACCATTCGCTGAGCCGCCGTTCGATAACGCGATGCTGCGCGCCACCGCTGCATCAACTGGCTTTTGATACCTATCAAGGAGTTTGAGGAAGCGTACATCCGAAGGAACAGAAATATCTTTCTGACAGAACCCACAGACGAGCTGTGCTTTAGCGAACTATCCCGACCCCGTCCAAACCGCGAAGAAACCCAACAGAAAGTCAACCTGGAACTGCTGCGTATCTCTCTGCTGCTGATTCAATCTGGCTGGAAACCGGTTCATTTCTGCTAGCGGTGTTGCGAACTCTCTGCTGATGGCGCTGACTCTAAACGTGATGACCTGCTGAAAGATCTGGAAGAAGGCATCCAAACTCTGATGGGCCGCTGGAGGACGGCTCTCCACGTACCGGCCAGATCTTTAAACAGACCTATA GCAAAATTTGACACCAATTTCCACAAAGATGATGCGCTGCTGAAAAACTATGGCCGCTGTATTGCTTCCGTAAAGACATGGATAAAGTTGAAACGTTCTCGCGCATTTGTTACGTGCGTTCGTTGGAGGGCTCCGCGCTTC
	Axit amin	QVQLVQSGGSPVKPFGGSLRLSCAASGFMTRAYSMNWVRQAPGKGLEWYSSISSSGRYIHVADSVKGRFTISRDNAKNSLYLUMNSLRKEDTAVYYCAKEFVMAGKALDIWGQGTLVTVSSASTKGPSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVIVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVTPKSSGSAPAPGSEFTIPLSRIFDNAMLRHRLHQLAFDTYQETEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSILCTSESIFTPSNREFTQOKSNLELLRLISLLIQSWLEFPVQFLRSVANSIYYGASPSNVYDILLKDEELGQTLMGRLDGSFRTGQIFKQTYSKFDINSINDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSGCF
Chuỗi nhẹ (định dạng Lser)	ADN	GATATCGTTCGACCAATCTCCGGGTACGCTGAGCCTGAGCCCGGGCGAAACCGCGACCTGAGCTGCGCGCGGAGCCAAAGCGTGGGTCTAATCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTCAGGCCCGCGCGCTGCTGATCTATGGGCGGAGCACGGGGGTACCGGCGTTCCGGCGCGCTTAGTGGCAGTGGCAGCGGACCGATTTFACCGTGACATTACAAAGTCTGCAGCGGGAAGATTTGCGACCTATTATTGCCAGCAATATTATAGCTTCCTGGCGAAAACCTTTGGTCAAGGGCACCCAGCTGGAATAAAGCGACCGTGGCGGCAACCCAGCGTGACGGTGGCGGCAACCCAGCGGTGTTATTTTCCTCCCACTGATGAACAGCTGAAAAGCGGGACCGCGAGTGTGTGTGCTGTTGAACAACCTCTATCCTCGCGAAGCGAAA GTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCATTGCGAGCGGCAACAGTCAAGAAAGCGTTACTGAACAGGATAGCAAAAGATAGTACGTACAGCTTGAGCAACACTCTGAUCCCTGAGTAAA GCGGATTATGAAAAACATAAAGTGTATGCATCCGAAGTTACGCATCAGGGGCTGAGCAGTCCGGTGACAAAGAGCTTTAACCAGCGCGGAAAGC
	Axit amin	DIVLTQSPGTLSPGSETATLSRASQSVGSNLAWYQOKPGQAPRLIYGAATGATGVPA RFSGRSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQQVYSFLAKTFGGGTGLEIKRTVAAPSVTVAAAPSVTFIPPSDEQLKSGTASVVCILNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLNLTLSKADYERKRVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGDS

* Gốc liên kết và các miền tác động được gạch chân và các vùng CDR được in đậm.

Fig.22B

3) SL335_{wt}-GCSF

Chuỗi nặng (định dạng Hcys+ GCSF)	ADN	CAAGTTCAGCTGGTTCAGAGCGGTGGCGGCCCGGTGAAACCAAGTGGCAGCCTGCGT CTGTCTCGCGCGGCGAGCGGTTTATGTTTCGTGCGTATAGCATGAACGGGTGCGCC AGGCGCCGGGCAAAAGGCTGGAATGGGTGAGCAGCATTAGCAGCAGTGGCCGCTAT ATTCATTATGCCGACAGTGTIAAAGGTCGTTTACCATTCTCGTGACAAATGCGAAAA ACAGCCCTGTATCTGCAAAATGAATAGCCCTGCGCGGGAAGACACCGCGGTGTACTACT GTGCGCGCGAAACCGTGTATGGCGGGCAAAAGCACTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCC TGGTGACCGGTGAGCAGCGCGAGCACCAAAAGGCCCGAGCGCGAGCACCAAAAGGCCCG AGCGTGTITCCGCTGGCACCTAGTTCGAAATCAACGAGCGGTGGCACCGCGGCTCTG GGCTGCCCTGGTGAAGATTATTTCCCGGAACCTGTTACCGTGAGCTGGAAACAGCGGT GCGTGTACGAGTGGTGTGCATACCTTTCCCGCAGTTCTGCAATCAGCGGCTGTACT CACTGAGCAGCGTGGTTACGGTCCCGAGCAGTAGCCTGGGTACACAGACCTATATTT GTAACGTGAACCAAGCCCTTCGAACACGAAAGTTGACAAACGCGTGGAAACCGAAG AGCTGGCGGTTCGACACAGCTCTGGATCTGCGGCTACCTATCGCGGAGCAGGCTGC CGCAGTCGTTTCTGCTGAAAAGCCTGGAAACAGGTGCGCAAGATTTCAGGGTGACGGCG CAGCTCTGCAAGAAAAACTGTGCGCGACCTACAAAATTGTGCCACCTTGAGGAACTCG TTCTGCTGGGCCATAGTCTGGGCATTCCGTGGGCGCGCGTGAGCAGTGGCCGTGCGA GGCATTGCAAGCTGGCTGGCTGTCTGAGCCAGTTACATAGCGGTCTGTGTTCTGTATCAG GGCTGCTGCAAGCGCTGGAAGGCATCAGTCTGAGTGGGTTCGACCTTGGATACC TTACAGCTGGATGTGGCGGATTTCGCAACCAACCTTTGGCAGCAGATGGAAGAAATTG GGCATGGCTCCGGCGTTGCAAGCGCAUCCAGGGCGGATGCTTGGGTTCGCAAGCGGT TTTCAGCGCGCGCGGGTGGGTGCTGGTGGCGTGCACCTTGACAGAGTCTCTGGAA GTGAGCTACCGTGTCTGCGCCATCTGTCACAGCT
	Axit amin	QVQLVQSGGPGPVKPGGSLRLSCAASGEMFRAYS MIN WVRQAPGKGLEWVSSISSG RYIHVADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARETYMAGKALDY WGQGTLYTVSSASTKGPSASTKGPSVPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYTPPEPTVSWN SGALTSGVHTTPAVLQSSGLYSLSVVTVPPSSLTGTQTYICNVNHPSTKVDKRVPEKSC GSAPAPGSAFTYRASSLPSTLLKSLQVRKIQGDDGAAQELCATYKLCHEPLVLIGH LGIWAPLSSCPSQLQLAGCLSLHSGLFLYQGLLQALEGSPGLPTLDTLLQDVADFA TTIWQOMETLGMAPALQPTOGAMPAPASAFORRAGGVLVASHLQSFLEVSRYRLRLA QP
Chuỗi nhẹ (định dạng Lcys)	ADN	GATATCGTTCGACCCAATCTCCGGGTACGCTGAGCCTGAGCCGGGGCGAAACCGCG ACCCGTGAGCTGCCGCGCGAGCCAAAGCGTGGGTTCATATCTGGCTTGGTATCAGCAG AAACCGGGTCAGGCCCGCGGCTGCTGATCTATGGGGCGAGCACGGGGGCTACCGGC GTTCGGCGCGCTTTAGTGGCAGTCGCAAGCGGCACCGATTTTACCCGTGACATTACAA GTCTGCAGCCGGAAGATTTTGCACCTATTATGCCAGCAATATTATAGCTTCCTGGC GAAAACCTTTGGTCAGGGCACCCAGCTGGAAATTAACGCGACCGTGGCGCACCCAG CGTGACCGGTGGCGGCCACCCAGCGGTGTTATTTTCCTCCAGTGATGAACAGCTGAAA AGCGGGACCGCGAGTGTGTGTGCTGTGTAACAACCTTCTATCTCGCGAAGCGGAAA GTGCACTGGAAAGTGGATAACGCATTGCAAGCGCGCAACAGTCAAGGAAAGCGTACT GAACAAGGATAGCAAAAGATAGTACGTACAGCTTGAGCAACACTCTGACCTGAGTAAA GCGGATTATGAAAAACATAAAGTGTATGCATGCCGAAGTTACGCATCAGGGGCTGAGC AGTCCGCTGACAAAGAGCTTTAACCGCGCGCAATGC
	Axit amin	DIVLTQSPGTLSPGETATLSCRASQSVGSNLAWYQOKPQAPRLLIVGASTGATGVPA RFSGRSGTDFLITLTSLOPEDFATYVCOQVYSFLAKTGGGTGLEEKRTVAAPSIVVAAP SVTEPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY SLNLTLSKADYERIKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

* Góc liên kết và các miền tác động được gạch chân và các vùng CDR được in đậm.

Fig.22C

4) SL335_h-GCSF

Chuỗi nặng (định dạng Hser+ GCSF)	ADN	CAAGTTTCAGCTGGTTCAGAGCGGTGGCGGCCCGGTGAACACAGGTGGCAGCCTGCCTCTGTCCTGGCGCGCGAGCGGTTTATGTTTCGTGCGTATAGCATGAACAGGTGGCGCCAGGCGCCGGGCAAAGGCCCTGGAAATGGGTGAGCAGCATTAGCAGCAGTGGCCGCTATATTCAATTATGGCCGACAGTGTTAAAGGTGCTTTTACCATTCTCGTGACAAATGCGAAAAACAGCCTGTATCTGCAAAATGAATAGCCTGGCGCGCGGAAGACACCGCGGTGTACTACTGTGCGCGGAAACCGTGATGGCGGGCAAAGCACTGGATTATTGGGGTCAAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCGAGCACCAAAGGCCCGAGCGCGAGCACCAAAGGCCCGAGCGTGTTCCGCTGGCACCTAGTTTCGAAATCAACGAGCGGTGGCACCGCGGCTCTGGCTGCCCTGGTGAAAGATTATTTCGCGGAACCTGTTACCGTGAGCTGGAACAGCGGTGCGTTGACGAGTGGTGTGCTACCTTTCGCGCAGTTCTGCAATCAGCGCGCTGTACTCACTGAGCAGCGTGTTACGGTCCCGAGCAGTAGCCTGGGTACACAGACCTATATTTGTAACGTGAACACAAGCTTTCGAACACGAAAGTTGACAAACGCGTGGAACCGAAGAGCAGCGGTTCTGCACCAGCTCCTGGATCTGCGCCTACCTATCGCGCGAGCAGCCTGCGCAGTCGTTCTGCTGAAAAAGCCTGGAACAGGTGCGCAAGATTAGGCTGACGGCGCAGCTCTGCAAGAAAACTGTGCGCGACCTACAAATGTGCCACCTGAGGAACCTGGTTCGTGCTGGGCCATAGTCTGGGCAATTCGCTGGGCGCTCGTGAGCAGCTGCCGTGCGAGGCATTGACAGTGGCTGGCTGTGCTGAGCCAGTTACATAGCGGTCTGTGTTCTGTATCAGGGCTGCTGCAAGCGCTGGAAGGCATCAGTCTGAGTTGGGTCCGACCTGGATACCTTACAGCTGGATGTGGCGGATTTCGCAACCACTATTGGCAGCAGATGGAAGAATTGGCATGGCTCCGGCGTTGACGCCGACCCAGGGCGCGATGCTGGCTTTCGAAGCGCTTTTCAGCGCGCGCGGTGGGTGGCTGGTGGCGCTGCGACTTGCAGAGCTTCTCTGGAATGAGCTACCGTGCTCTGCGCCATCTGGCACAGCT
	Axit amin	QVQLVQSGGGPVKPGGSLRLSCAASGFMFRAYSMINWVRQAPGEGLEWVSISISSCRYIHYADSVKGRFTISRDNAKNSLYIQMNSLR AEDTAVYYCARETVMAGKALDYWGQGTLVTVSSASTKGPSASTKGPSVFLAPSSKSTSGDTAALGCLVKDYTPPEPVTVSWNSGALTSGVHTTFAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHIKPSNTRKVERVEPKSSSGSAFAPGSAPTYRASSLPQSFLKSLFQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCIHPPELVLEQHSLEGPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTITWQQMIEELGMAPALQPTQGAMPAPASAFQRIAGGYLVASHLQSFLEVSRYRVLRIHAQF
Chuỗi nhẹ (định dạng Lser)	ADN	GATATCGTCTGACCCAATCTCCGGGTACGCTGAGCCTGAGCCCGGGCGGAAACCGGACCCCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAAAGCGTGGGTCTAATCTGGCTTGGTATCAGCAGAAACCGGGTCAGGCCCCGCGCCTGCTGATCTATGGGGCGAGCACGGGGGTACCGGCGTTCCGGCGCGCTTTAGTGGCAGTCCGAGCGGCACCGATTTTACCTGACCATTAACAA GTCTGCAGCCGGAAGATTTTGGCAGCTATTATTGCCAGCAATATTATAGCTTCTCTGGCGAAAACCTTTGGTCAGGGCACCCAGCTGAAAATTAAACGCACCTGGCGCGCACCCAGCGTGACGGTGGCGGCACCCAGCGGTGTTATTTTCCTCCAGTGATGAACAGCTGAAAAGCGGGACCGCGAGTGTTGTGTGCTGTGAACAACCTCTATCTCGCGGAAGCGAAA GTGCAGTGGAAGTGGATAACGCATTGTCAGAGCGGCAACAGTCAGGAAAGCGTTACTGAACAGGATAGCAAAGATAGTACGTACAGCTTGACCAACACTCTGACCTTGAGTAAA GCGGATTATGAAAAACATAAAGTGTATGCATGCGAAGTTACGCATCAGGGGCTGAGCAGTCCGGTGACAAAGAGCTTTAACC CGCGCGAAAGC
	Axit amin	DIVLTQSPGTLSLSPGETATISCRASQSVGSNLA WYQQKPKGQAPRLIYGASTGATGVPARFSGSRSGTIDFTLTITSLQPEDFATYYCQOYYSFLAKITFGQGTGLEIKRTVAAPSVTVAAPSVFIIPPSDEQLKSGTASVYVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSNITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES

* Góc liên kết và các miền tác động được gạch chân và các vùng CDR được in đậm.

Fig.22D

5) SL335_α-IFNβ

Chuỗi nặng (định dạng Hcys+ IFNβ)	ADN	CAAGTTCAGCTGGTTTCAGAGCGGTGGCGGCCGGGTGAAACCAGGTGGCAGCCTGCGT CTGTCTTGGCGGGCGAGCGGTTTTATGTTTCGTGCGTATAGCATGAACCTGGGTGCGCC AGGGCGCCGGCAAAGGCCCTGGAATGGGTGAGCAGCATTAGCAGCAGTGGCGGCTAT ATTTCATTATGCCGACAGTGTAAAGGTGCTTTTACCATTCTCGTGACAATCGGAAAA ACAGCCCTGTATCTGCAATGAATAGCTTCCGCGCGGAAGACACCGCGGTGTACTACT GTGGCGCGGAAACCGTGATGGCGGGCAAAGCACTGGATTATTGGGGTCAGGGCACCC TGGTGACCGTGGAGCAGCGCGAGCACCAAAGGCCCGAGCGCGAGCACCAAAGGCCCG AGCGTGTTCCGCTGGCAGCTAGTTCGAAATCAACGAGCGGTGGCACCGCGGCTCTG GGCTGCCGTGGTGAAGATTATTTCCCGGAACCTGTTACCGTGAGCTGGAAACAGCGGT GCGTTGACGAGTGGTGTGCATACCTTTCCCGCAGTTCTGCAATCGAGCGGCTGTACT CACTGAGCAGCGGTGTTACCGTCCCGAGCAGTAGCCTGGGTACACAGACCTATATTT GTAACGTGAACCAAGCCTTCGAACAGGAAAGTTGACAAACGCGTGGAAACCGAAG AGCTGCGGTTCTGCACGAGCTTCCTGGATCTTCATACAACCTGCTGGGCTTCTGCAAC GTAGCAGTAACTTTCAGAGCCAGAAGCTGTTATGGCAACTGAACGGCGGCTGGAGT ACTGCCCTGAAGGATCCCATGAACTTTGATATTCCGGAAGAAATTAACACAGCTGCAAC AGTTCAGAAAGAAGATGCGCGCTGACCATTTATGAATGCTGCAAAACATTTTTC CGATTTTTCGCAAGATAGTAGCAGCAGCGCTGGAAACGAAACCAATTGTGGAAAAAC TGCTCGCCAAACGTGTACCATCAGATTAAACACCTGAAGACCGTGTGGAAGAAAAAC TGGAAAAAGAAGATTTTACCGCGGCAAACTGATGAGCAGCTGCATCTGAACAGCT ATTATGGCGGCTTCTCCATTATCTGAAAGCCAAAGAGTATTCCTGCTGGTGGAC CATGTTCGCGTGGAAATCTGCGCAACTTTATTTTATTAACCGGCTGACCGGCTATC TGGCAAC
	Axit amin	QVQLVQSGGPGVPEGGSLRLSCAASGFMFRAYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSGRYHI YADSVKGRITISKDNAKNSLYLQMNSERAEDTAVYYCARETYMAGKALDYWGQGHV TVSSASTKGPSASTKGPSVPLAPSSKSTSGTAAIGCLVKDYFPEPVFVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVYVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVPEPKSGSAPAPGS SYNLLGFLQRSSNFQSKLLWQLNGRLVCLKDRMNFDIPEEKQLQOFKQEDAAALITYE MLQNIFAIRQDSSSTQWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEKLEKEDTRGKLMSSHL KRYVGRILHYLKAEVYSHCAWTTVRVEHLRNFYFINRLTGYLRN
Chuỗi nhẹ (định dạng Lcys)	ADN	GATATCGTTCGACCCCAATCTCCGGGTACCGTGAGCCTGAGCCCGGGGGAACCCGG ACCTGAGCTGCCGCGCGAGCCAAAGCGTGGGTTCCTAATCTGGCTTGGTATCAGCAG AAACCGGGTCAGGCCCGCGGCTGCTGATCTATGGGGCGAGCACGGGGGCTACCGGC GTTCCGGCGCGCTTTAGTGGCAGTCCGAGCGGCACCGATTTTACCTTGACCATTAAC GTCTGACCGGGAAGATTTTGGACCTATTATTGCCAGCAATATTATAGCTTCCTGCG GAAAACCTTTGGTCAGGGCACCCAGCTGGAAATTAACCGCACCGTGGCGGCACCCAG CGTGACCGTGGCGGCACCCAGCGTGTATTATTTTCTCTCCAGTGATGAACAGCTGAAA AGCGGGACCGCGAGTGTGTGTGCTGTTGAACAACCTCTATCTCGCGGAAGCGAAA GTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCATTGACAGAGCGGCAACAGTCAGGAAAGCGTTACT GAACAGGATAGCAAAGATAGTACGTACAGCTTGAGCAACACTCTGACCTGAGTAAA GCGGATTATGAAAAACATAAAGTGTATGCAATCGAAGTTACGCATCAGGGGCTGAGC AGTCCGGTGACAAAGAGCTTTAACCGCGCGCAATGC
	Axit amin	DIVLTQSPGTLSPGETATLSCRASQSVGSNLAWYQOKPGQAPRLLIYGASTGATGVPA RFGSGRSGTDFTLITSLQPEDFATYYCQYYSFLAKTGGGTGLEIKRTVAAPSVTVAAP SVFIFFPSDEQLKSGTASVCLLNINYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITY SLSNITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSRNGEC

* Gốc liên kết và các miền tác động được gạch chân và các vùng CDR được in đậm.

Fig.22E

6) SL335_α-IFNβ

Chuỗi nặng (định dạng Hser+ IFNβ)	ADN	CAAGTTCAGCTGGTTCAGAGCGGTGGCGGCCCGGTGAAACCAGGTGGCAGCCTGGCT CTGTCCCTGGCGCGCGAGCGGTTTTATGTTTCGTGGGTATAGCATGAACCTGGGTGGCGC AGGCGCCGGGCAAAAGGCTGGGAATGGGTGAGCAGCATTAGCAGCAGTGGCGGCTAT ATTCAATTATGCCGACAGTGTAAAGGTGGTTTTACCATTTCTGGTGACAATGCGAAAA ACAGCCTGTATCTGCAAAATGAATAGCCTGGCGCGCGGAAGACACCGCGGTGTACTACT GTGCGCGCGAAAAACCGTGATGGCGGGCAAAAGCACTGGATTATTGGGGTCAAGGGCACCC TGGTGACCGTGAGCAGCGCGAGCACCAAAAGGCCCGAGCGCGAGCACCAAAAGGCCCG AGCGTGTTCGGCTGGCACCTAGTTCGAAATCAACGAGCGGTGGCACCGCGGCTCTG GGCTGGCTGGTGAAAGATTATTTCCGGGAACCTGTTACCGTGAGCTGGAAACAGCGGT GGCTTGACGAGTGGTGTGCATACCTTTCCCGCAGTTCTGCAATCGAGCGGCTGTACT CACTGAGCAGCGGTGTTACGGTCCCGAGCAGTAGCCTGGGTACACAGACCTATATTT GTACCGTGAACCACAAGCCTTCGAACACGAAAGTTGACAAACGCGTGGAAACCGAAG AGCAGCGGTCTGCAACAGCCTCGGATCTTCATACAACCTGGTGGGCTTCCTGCAAC GTAGCAGTAACCTTCAGAGCCAGAAGCTGTTATGGCAACTGAACGGCGGCTGGAGT ACTGCGTGAAGGATCGCATGAACCTTGATATTCGGGAAGAAATTAACAGCTGCAAC AGTTCAGAAAGAAGATGGCGCGCTGACCATTTATGAAATGCTGCAAAACATTTTG CGATTTTTCGCCAAGATAGTAGTAGCACCGGCTGGAAACGAAACCATTTGTGAAAAAC TGCTCGCCAACGTGTACCATCAGATTAAACCACCTGAAGACCGTGGTGGAAAGAAAAAC TGGAAAAAGAAATTTTACCGCGCGCAAACTGATGAGCAGCCTGCACTGAAACGCT ATTATGGCGCATCTCCATTATCTGAAAGCCAAAGAGTATTCACCACTGTGCTTGGAC CATTTGTCGCGTGGAAATCTGCGCAACTTTATTTTATTAAACCGCTGACCGGCTATC TCCGAAC
	Axit amin	QVQLVQSGGPGPVKPGSRLSCAASGFMFRAYSMNWVRQAPGKGLWVYSISSSGRVH YADSVKGRFTISRDNAKNSLYIQMNSLRADIVAYYCARETVMAGKALDYWGQGITLV TVSSASTKGPSASTKGPSVTPAPSSKSTSGGTAAAGCLVVDYEPETVSWNSGALTSGV HTTFAVLQSSGLYSLSVYVTPSSSLGTQTYICNVNHIKPSNTKVDKRVPEKSSGAPAPGS SYNLLGFLQRSSNQSKLIWQNGRIEYCLKDRMNFDPPEIKQLQDFQKEDAAITVE MLQNFATPRQSSSTQWNETIVENILANVYHQINHLKTVLEERLEKDFTRKLMSSLIHL KRYVGRILHYLKAKYSHCAWTVRVLHLRNFYINRLTGILRN
Chuỗi nhẹ (định dạng Lser)	ADN	GATATCGTTCGACCCAAATCTCCGGGTACGCTGAGCCTGAGCCCGGGCGAAACCGCG ACCCCTGAGCTGCGCGCGAGCCAAAGCGTGGGTCTTAATCTGGCTTGGTATCAGCAG AAACCGGGTCAGGCCCGCGGCTGTGATCTATGGGCGAGCACGGGGCTACCGGC GTCCGGCGCGCTTATGTGGCAGTCGACGCGGCACCGATTTTACCTGACCATTACAA GTCTGCAGCCGGAAGATTITGCGACCTATTATTGCCAGCAATATTATAGCTTCTCTGGC GAAAACTTTTGGTCAAGGCACTTGGTGAATTAACCGCACTGGTGGTGGTACCTAG CGTGACCGTGGCGGCACCCAGCGGTGTTATTTTCTCCAGTGATGAACAGCTGAAA AGCGGGAACCGGAGTGTGTGTGCTGTTGAACAACCTCTATCCTCGCGAAAGCGAAA GTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCATTGCAGAGCGGCAACAGTCAGGAAAGCGTACT GAACAGGATAGCAAAAGATAGTACGTACAGCTTGAGCAACACTCTGACCTGAGTAAA GCGGATTATGAAAAACATAAAGTGTATGCATGCGAAGTTACGCATCAGGGGCTGAGC AGTCCGGTGACAAAGAGCTTTAACCAGCGCGCAAGC
	Axit amin	DIVLTQSPGTLISLSPGETATLSCRASQSVGSNLAWYQQKPGQAPRLIYGASTGATGVPA RFSQSRSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQQVYSFLAKTFGGGTGLEIKRTVAAPSVTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVYCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTY SLSNLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGDS

* Góc liên kết và các miền tác động được gạch chân và các vùng CDR được in đậm.

Fig.22F

7) EGL4_α-hGH

Chuỗi nặng (định dạng Hcys- hGH)	ADN	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGTTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGA CTCTCCCGCACAGCCCTCGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACCTGGGTCCGGC AAGCTCCAGGGGAAGGGCCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATGGTGGTAGCG TAGTCTATGCGGACTCTGTGAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGA ACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTCTGAGAAGTGAAGACACGGCCGTCTATTACTG TGGGAGAGATTACGGTTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAAGGAACCTGGTAC CGTCTCCTCATCGGCCACATTGGCCGCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTG GCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGAGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCGTGGTGAAG GACTACTTCCCGAACCCTGGTACGGTGTCTGGGAACCTCAGGGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG TGACCGTGGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA AGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGGTCTGTCAC CAGCTCCCTGGATCTTTTCCGACCAITCCCGTGAAGCCGCTGTTCGATAACCGGATGCT GCGCGCCACCGCCCTGCATCACTGGCCCTTGATACCTATCAGGAGTTTGAGGAAGC GTACATCCCGAAGGAACAGAAATAATCTTTTCTGCAAGCCACAGACGAGCTGTG CTTTCAGCGAATCTATCCCGACCCCGTCCCAACCGCGAAGAAACCAACAGAACTTAA CCTGGAACTGCTGGGTATCTCTCTGCTGTGATTCAATCTGGGTGGAACCGGTTCAA TTTCTGCTGAGCGTGTCTGCGAATCTCTGGTGTATGGCGCGCTGACCTTAACTGT ATGACCTGCTGAAAGATCTGGAAGAAGGCATCCAAACTCTGATGGACCGTCTGGAGG ACGGCTCTCCAGTACCGGCCAGATCTTAAACAGACCTATAGCAAAATTTGACACCA ATTCTACAACGATGATGCGCTCTGAAAACTATGGCTGCTGTATGCTTCCGTAA AGACATGGATAAAGTTGAAACGTTCTTGGCATGTGTICAGTGGCGTTCCGTGGAGGG CTCTGGCGCTTC
	Axit amin	EVQLVDSGGGLVQPRSLRLSCTASGETEDBYAMHWVRFQAPGKGLEWVS ^h ISWNGGSV VYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMSLRIEDTAVYYCAR ^h DVGYVGM ^h DVWGQGLTVT VSSSAI ^h LAASTKGPSVFPLAPSSKSTSECTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVLPKSCGSA ^h PAPGSGFTI PLSR ^h FDNAMLR ^h AHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSLE ^h QNPOTSLCFSESI ^h TPSNREE TQOKSNLELLRISLLIQSWLEPVQFLRSVFA ^h NSLYVGASDSNVYDLLKDLLEGIGITLMGR LEDGSPRTGQIFKQ ^h ITYSKFD ^h INSHNDALLKNYGLLYCTRE ^h DMDKVETFLRIVQCRSV ^h EG SCGF
Chuỗi nhẹ (định dạng Lcys)	ADN	GATATTGTGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGTGGGGCGAGTCAGAATAATTGGCAGCTGGTTAGCTTGGTATCAGCAGA AACCAGGTAACGCCCTTAAGTTGTGATCTATAGAGCATCCAATTTCGGAAGTGGGG TCCCATCAAGGTTACGGCCAGTGGCTCTGGGACAGATTTCCTTACCATCAGCAG CCTGCAGCCTGAAGATTTCGCAACTTACTTTTGTCACACAGGCTACCATTTTCCCTCTCA CTTTCGGCGGAGGGACCCCGGTGGATATCAAAACGTTCTAGAGCTGTGGCTGCACCAT CTGTCTTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTGAATCTGGAACCTGCCTCTGTGTG TGCC ^h TGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTTGGATAAC GCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG CACCTACAGCCTCAGCAACACCTGACCGTGAACAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGTTCCGCCGCTCACAAAGAGCTT CAACAGGGGAGAGTGT
	Axit amin	DIVMTQSPSSVSASVGRVIT ^h CRASQNGSWLAWYQQK ^h PGNAPKLLIYRASNLISGVPS RFSGSGSGTDIT ^h TISSLPEDFATYFCQQATIEPLT ^h FGGGTRVDIKRSRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVYCLNNIYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSNLT LSKADYVEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

* Góc liên kết và các miền tác động được gạch chân và các vùng CDR được in đậm.

Fig.22G

8) EGL4₂₋₉-hGH

Chuỗi nặng (định dạng Hser-hGH)	ADN	GAGGTGCAGCTGGTGCACTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCTTGAGA CTCTCCTGCACAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCCTGGGTCCGGCA AGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAAATGGTGGTAGCGT AGTCTATGCGGACTCTGTTCAGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAA CTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTCTGAGAACTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGT GCGAGAGATTACGGTTACTACGGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGAAACCCCTGGTCACT GTCTCCTCATCGGCCACATTTGGCCGCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCTCTGG CACCTCTCTCAAGAGCACCTCTGAGGGCACAGCGGCCCTGGGGTGGCTGGTCAAGG ACTACTTCCCAGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGGCCCTGACCAGCGCGGT GCACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTAGTGGTCTGCAACCAG CTCTTGGATCTTTCCGACCATTCCTGAGCCGCTGTCTGATAACCGCATGCTGGCC GCCACCGCTGCACTCAACTGGCCCTTGTATACCTATCAGGAGTTTGGGAAGCGTACA TCCGAAGGAACAGAAATATCTTTCTGACAGAACCCACAGACGAGCCCTGTGCTTAG CGAATCTATCCGACCCCGTCCAACCGCGAAGAAACCAACAGAAAGTCAATCAACCTGGA ACTGCTGCGTATCTCTCTGCTGATTTCAATCTGGCTGGAAACCGGTCTCAATCTGCTG GTAGCGGTGTTTGGCAACTCTCTGGTGTATGGCGCTCTGACTCTAACGTGTATGACT GCTGAAAGATCTGGAAGAAGGCATCCAACTCTGATGGGCCGCTGGAGGACCGCTC TCCACGTACCGGCCAGATCTTAAACAGACCTATAGCAAAATTTGACACCAATTTCTAC AACGATGATGCGCTGCTGAAAAACTATGGCTGCTGTATGTCTTCCGTAAAGACAATGG ATAAAGTTGAAACGTTCTTGGCATGTCTAGTGCCGTTCCTGGAGGGCTCTTGGCG CTTC
	Axit amin	EVQLVQSGGGLVQPGKSLRLSCTASGFTEDDYAMHWVRQAPGKGLWVSCHSWNCCSV VYADSVYRGRTISRDNAKNSLYIQMNSLRTEDTAVYYCARDYGYGMDVWGQGTIVT VSSATLAASTKPSVTPPLPSSKSTSEGTAAAGCLVKDYEPPTVSWNSGALTSGVHTT PAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHRKPSNTKYDKRVEPKSSGSAAPAGSFTT PLSRLFDNAMLRAHRIHQLAFTDYQEFEEAYIPKFKYSFLQNPQTSICPSESIPTPSNREE TQKSNLELLRISLLIQSWLEPVQFLISVFAANSLVYGASDSNVYDLEKDLLEEGQITLMGR LEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHINDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVLGG SCGF
Chuỗi nhẹ (định dạng Lser)	ADN	GATATTGTGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCA CCATCACTTGTCCGGCGAGTCAAGAAATTTGGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAA ACCAGGTAAACGCCCTAAGTTGTGTGATCTATAGAGCAACCAATTTGCGAAGTGGGGTC CCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGCTCTGGGACAGATTTCCTCTTACCATCAGCAGCC TGCAGCCTGAAGATTTCGCAACTTACTTTGTCAACAAGCTACCAATTTCCCTCTCCTACT TTCGGCCGAGGGACCCGGTGGATAATLAAACGTCTTACAGCTGTGGCTGCACCACTCTG TCTTCTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGAACTGCCTCTGTTGTGTGC CTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTTGGATAACGCC CTCCAAATCGGGTAACTCCCAAGGAGAGTGTCAAGAGCAGGACAACCAAGGACAGCACC TACAGCCTCAGCAACACCCCTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC TACGCTTGCAGAGTCAACCATCAGGGCTGAGTTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA GGGGAGAGAGT
	Axit amin	DIYMTQSPSSVSASVGDRTVTCRASONIGSWLAWYQQKPGNAPKLLIYRASNLRSQVPSR PSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQATIFPLTFGGGTRVDIKRSTRVAAPSVTIFPPSDE QLKSGTASVYCLINNYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSNLTLS KADYERHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGES

* Gốc liên kết và các miền tác động được gạch chân và các vùng CDR được in đậm.

Fig.22H

9) 1828_{hGH}

Chuỗi nặng (định dạng Hcys _{hGH})	ADN	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGGAGGCCCTGGTCAGGCCGGGGGGTCCCTGAG ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCATATTTCAGTAATTATAGCATGAACCTGGGTCCGC CAGGCTCCGGGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCAATAAGTAGTGGTGGTAGTTAC AAATACTACACAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG AAGTCACTGTATCTGCCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGACGACACGGGCCCTCTATTAC TGTGCAAGAGGGGACTATGATACGGGCATGGAGCCCTGGGGCCAAGGCCACCATGGTC ACCGTCTCTCATCGGCCACATTGGCCGCCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCC TGGCACCTCTCTCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGGTCTGGGAACCTAGGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT GGTGACCGTGGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAAGAGAGTTGAGGCCAAATCTTGTGGTCTGCG ACCAAGCTCCTGGATCTTTCCGACCATTCGGCTGAGCCGCTGTTCGATAACCGGATG CTGGCGCCCAACCGCTTGCATCAACTGGCTTTTGATACCTATCAGGAGTTTGAGGAAG CGTACATCCCGAAGGAACAGAAATATTCTTTCTGCAAGAACCCACAGACGAGCCTGT GCTTTAGCGAATCTATCCCGACCCCGTCCAAACCGGAAGAAACCCCAACAGAAGTCTA ACCTGGAACTGCTGGCTATCTCTCTGCTGCTGATCAATCTTGGCTGGAAACCGTTCA ATTCTGGCTAGCGTGTGTGGCAACTCTCTGGTGTATGGCGCGTCTGACTCTAACGTG TATGACCTGTGAAAGATCTGGAAGAAAGGCATCCAAACTCTGATGGGCCCTTGGAG GACGGCTCTCCAGTACCGGCCAGATCTTAAACAGACCTATAGCAAAATTGACACC AATCTCACAAACGATGATGCTCTGTGAAAAACTATGGCTGTCTGTATGCTTCCGTA AAGACATGGATAAAGTTGAAACGTTCTTGGCCTATGTTTCAGTGCCGTTCCCGTGGAGG GCTCTGCGGCTTC
	Axit amin	QVQLVQSGGGLVRPFGGSLRLSCAASGLIFSNYSMNWVRQAPGRGLEWVSSISSAGSVKY YTD ^{SV} KGRFTISRDNAKKSLYLQMSLRLVDDITAVYYCARGD ^{YD} TGM ^{EP} WGQGTMTVTV SSSATLAASITKGPVPLAPSSKSTSEGTAAALGCLVKDYTPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNIHPSNTKVIDKRVPEPKSCGAPAPGSEPTIP LSRLFDNAMLRAHRLHQLAIDTYQFTTEAYIPKQKQYSTLQNPQSLCFSESIPTPSNREET QOKSNLELLRISLLLIQSWLEPVGFLRSVFA ^{NSL} VYGASDSNVYD ^{LL} KDLELGQITLMGRL EDGSPRTGQIFRQYISKFDINSINDDALLKNYGLYCPRKDMDKVETFLRIVQCRSYVGS CGF
Chuỗi nhẹ (định dạng Lcys)	ADN	GAGCTCGAGCTCGTGTGAGCGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCJGCATCTGTGGGAGACA GAGTCACCACTACTTGGCCGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGGTATTTAAATTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAGATTAGAAAG TGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGTTCGGGACAGACTTCACCTCACCATC AACAGCCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCC CTCTAACTTTTGGCCAGGGACCCGAGTGGAAATTAACGFGCTGTGGCTGCAUATC TGTCTTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTCTGTGTGT GCTGTCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAATGGAAGGTGGATAAAG CCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAACACCTTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCTTGGGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGTTGCCCCGTCAAAAGAGCTT CAACAGGGGAGAGTGT
	Axit amin	ELYSTQSPSSLSASVGD ^{RV} TTTCRASQ ^{SI} SR ^{YL} NWYQKPGKAPRLLIVGASRL ^{ES} GVPSR ^F SGSGSGTDFTLTINSIQPEDFATYYCQ ^Q SYSTPLTGGGT ^{RV} EIKRSRTVAAPS ^{VI} FI ^{EP} PSDE QLKSGTASVVC ^{LL} NNFYPREAKYQWKVDNALQSGNSQ ^{ES} YTEQDSKDS ^{TS} YSLN ^{TL} ILS RADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

* Góc liên kết và các miền tác động được gạch chân và các vùng CDR được in đậm.

Fig.22I

10) 1p28_{ant}-hGH

Chuỗi nặng (định dạng Hser- hGH)	ADN	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAAGGGGAGGCCCTGGTCAGGCCGGGGGGGTCCCTGAG ACCTCTCTGTGCAGCCTCTGGACTCATATTCAGTAATTATAGCATGAACCTGGGTCCGC CAGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCAATAAGTAGTGCTGGTAGTTAC AAATACTACACAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCA/CATCTCCAGAGACAACGCCAAG AAGTCACTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGTCCAGGACACGGCCGTCTATTAC TGTGCAAGAGGGGACTATGATACGGGCATGGAGCCCTGGGGCCAAGGCCACCATGGTC ACCGTCTCCTCATCGGCCACATTGGCCGCCCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCC TGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACACGGGCCCTGGGCTGGCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT GGTGACCGTGGCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTAGTGGTCTGC ACCAGCTCCTGGATCTTTTCCGACCATTCCGCTGAGCCGCCCTGTCGATAACGGCATG CTGCGCGCCACCGCCTGCATCAACTGGCCTTTGATACCTATCAGGAGTTTGAGGAAG CGTACATCCCGAAGGAACAGAAATATTCTTTCTGCAAGAACCCACAGACGAGCCTGT GCTTAGCGAATCTATCCCGACCCCGTCCAACCGCGAAGAAACCCAAACAGAAGTCTA ACCTGGAACCTGTGCGTATCTCTCTGTCTGCTGATTCAATCTGGCTGGAAACCGTCA ATTCTGCGTAGCGTGTITGGGAACCTCTGGGTATAGGGCGCTTCAAGCTTAACGTG TAGGACCTGCTGAAAGATCTGGAAGAAGGCATCCAAACTCTGATGGCCCGTCTGGAG GACGGCTCTCCACGTACCGGCCAGATCTTTAAACAGACCTATAGCAAATTTGACACC AATCTCACAAACGATGATGGCTGCTGAAAAACTATGGCCTGCTGATTTGCTTCCGTA AAGACATGGATAAAGTTGAAACGTTCTGCGCATTTGTTAGTGCCGTTCCGTTGGAGG GCTCTTGGGCTTC
	Axit amin	QVQLVQSGGGLVRPGGSRIRISCAASGIFSNVSMNWVRQAPGKTHFWYSSISSAGSVKY YTDVSKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRVDDITAVYYCARGDYDTGMPEPWGGTMTVT SSSATLAASTKGPSVFPLAPSSKSTSEGLAALGCLVEDYTPPTVTSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNIKPSNTKYDKRVEPKSSGSAPAPGSEPTIP LSRLFDNAMLRAHRLHOLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLSLCSSENPSPSNKEET QQKSNLFLRLISLLIQSWLEPVPQIRSVFANSLVYGASDSNVYDELKIDLEEGLQTLMLGRL EDGSPRTGQIFKQTYSKFDINSHNDALLKNYGLLYCFRKMMDRVETFLRIVQCRSVEGS CGE
Chuỗi nhẹ (định dạng Lser)	ADN	GAGCTCGAGCTCGTGTGCGACGCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACA GAGTCACCAATTACTTGGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGGTATTTAAATTTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAGATTAGAAAG TGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGTTCFQGGACAGACTTCACTCTCACCATC AACAGCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCC CTCTAACTTTTGGCCAGGGGACCCGAGTCGAAATTAACCTGCTGTGGCTGCACCATC TGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTCTGTGTGT GCCTGTGTAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACG CCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAACACCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCTTGGGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCCGTCACAAAGAGCTT CAACAGGGGAGAGAGT
	Axit amin	ELVSTQSPSSLSASVGDRTTICRASQSSIRYLNWYQOKPGKAIKLLIVGASRLSGVPSRF SGSGSGTDFTLINSLOPEDFATYYCOQSYSTPLTFGGGTIRVEIKSRVVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPKEAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLNITLS KADYERHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES

*Gốc liên kết và các miền tác động được gạch chân và các vùng CDR được in đậm.

Fig.22J

DANH MỤC TRÌNH TỰ

```

<110> APRILBIO CO., LTD
<120> MÀNH GẮN KẾT KHÁNG NGUYÊN GẮN KẾT VỚI ALBUMIN HUYẾT THANH CỦA NGƯỜI, CẤU TRÚC DUNG HỢP VÀ DƯỢC
PHẨM CHỨA CẤU TRÚC DUNG HỢP NÀY
<130> IPNB53438
<150> PCT/KR 10-2013-0104112
<151> 2013-08-30
<160> 97
<170> KopatentIn 2.0
<210> 1
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1
Gln Val Gln Leu Leu 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 Val
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Gly Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Leu Gly His Cys Gln Arg Gly Ile Cys Ser Asp Ala Leu Asp
100 105 110
Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 2
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2
Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Glu Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Asn Thr Tyr Asn Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Arg Leu
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Ile Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Val Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Leu Gly His Cys Gln Arg Gly Ile Cys Ser Asp Ala Leu Asp
100 105 110
Thr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 3
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Thr 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
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Thr Val His
65 70 75 80
Val Gln Met Asp Ser Leu Arg Gly Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Val His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn Ala Phe
100 105 110
Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 4
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

```

Gln Val Gln Leu Val Gln 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 Leu
 35 40 45
 Ser Val Ile Ser His Asp Gly Gly Phe Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Val 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 Ala Gly Trp Leu Arg Gln Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

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

<210> 6
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

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

<210> 7
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

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

<210> 8
 <211> 109

```

<212>    PRT
<213>    Homo sapiens
<400>    8
Asp Ile Val Leu 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 Pro
      85             90             95
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
      100             105

<210>    9
<211>    110
<212>    PRT
<213>    Homo sapiens
<400>    9
Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1             5             10             15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Phe Asn Tyr
      20             25             30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
      35             40             45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
      50             55             60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
      65             70             75             80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro
      85             90             95
Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Asp Ile Lys Arg
      100             105             110

<210>    10
<211>    109
<212>    PRT
<213>    Homo sapiens
<400>    10
Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1             5             10             15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Thr Val Ser Ser Arg
      20             25             30
Gln Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
      35             40             45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
      50             55             60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
      65             70             75             80
Pro Glu Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
      85             90             95
Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
      100             105

<210>    11
<211>    109
<212>    PRT
<213>    Homo sapiens
<400>    11
Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1             5             10             15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
      20             25             30
Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
      35             40             45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
      50             55             60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
      65             70             75             80
Pro Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Ser Ser Tyr Pro
      85             90             95
Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
      100             105

<210>    12
<211>    109
<212>    PRT
<213>    Homo sapiens
<400>    12

```

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

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

Ala Tyr Ser Met Asn
 1 5

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

Ser Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Ile His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly
 <210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

Glu Thr Val Met Ala Gly Lys Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

Gly Ala Ser Thr Gly Ala Thr
 1 5

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Leu Ala Lys Thr
 1 5 10

<210> 19
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

gtgccgttct atagccatag cac

23

<210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

ggcactggct ggtttcgcta ccgtg

25

<210> 21
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 21

gggagatctt gaaatgagct gttgacaatt aatcatccg

39

<210> 22
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

```

<400> 22
cctctttaat ttttaataat aaagttaatc gataattcc 39
<210> 23
<211> 70
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 23
ggaattatcg attaacttta ttattaaaaa ttaaagaggt atatattagg atccgagctc 60
gagttctgca 70
<210> 24
<211> 34
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 24
gggcactacg tgcgaaaggc ccagtctttc gact 34
<210> 25
<211> 69
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 25
ggcgcgagat ctgttaatta aggaggaatt taaagaattc atgaaaaaac tgctgttcgc 60
gattccgct 69
<210> 26
<211> 41
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 26
gggaagctta ttaacaagat ttgggctcaa ctctcttgct c 41
<210> 27
<211> 39
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 27
gggggatcca tgaaaaagac agctatcgcg attgcagtg 39
<210> 28
<211> 69
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 28
attcctcctt aattaacaga tctgcgggcg cactcgagat taacactctc ccctgttgaa 60
gctctttgt 69
<210> 29
<211> 63
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 29
ggggaattca tgaaatatct gctgcctacg gcggcgcgcg gctgctgct gctggctgca 60
caa 63
<210> 30
<211> 35
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 30
gggaagcttt tagctgctct tcggttccac gcgtt 35
<210> 31
<211> 52
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 31
gggggatcca tgaaaaaac tgcgattgcg attgcggtgc tggccggctt tg 52
<210> 32
<211> 38
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 32
gggctcgagt tagctttcgc cgcggttaaa gctctttg 38
<210> 33
<211> 47
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 33
agatccagga gctggtgcag aaccgcagct cttcggttcc acgcgtt 47
<210> 34
<211> 47
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 34
ggttctgcac cagctcctgg atcttttccg accattccgc tgagccg 47
<210> 35

```

```

<211> 32
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 35
gggaagcttt tagaagccgc aggagccctc ca 32
<210> 36
<211> 49
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 36
agatccagga gctggtgcag aaccgcattc gccgcggtta aagctcttt 49
<210> 37
<211> 32
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 37
gggctcgagt tagaagccgc aggagccctc ca 32
<210> 38
<211> 32
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 38
gggctcgagt tagaagccgc aggagccctc ca 32
<210> 39
<211> 47
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 39
agatccagga gctggtgcag aaccgctgct ctcggttcc acgcgtt 47
<210> 40
<211> 50
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 40
agatccagga gctggtgcag aaccgcttcc gccgcggtta aagctctttg 50
<210> 41
<211> 46
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 41
ggttctgcac cagctcctgg atctgcgcct acctatcgcg cgagca 46
<210> 42
<211> 34
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 42
gggaagctta ttaaggctgt gccagatggc gcag 34
<210> 43
<211> 49
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 43
agatccagga gctggtgcag aaccgcattc gccgcggtta aagctcttt 49
<210> 44
<211> 50
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 44
taacagatct gcggccgcac tcgagattaa ggctgtgcc gatggcgag 50
<210> 45
<211> 47
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 45
agatccagga gctggtgcag aaccgctgct ctcggttcc acgcgtt 47
<210> 46
<211> 50
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 46
agatccagga gctggtgcag aaccgcttcc gccgcggtta aagctctttg 50
<210> 47
<211> 47
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 47
agatccagga gctggtgcag aaccgcagct ctcggttcc acgcgtt 47
<210> 48
<211> 48

```

```

<212>     ADN
<213>     Homo sapiens
<400>     48
ggttctgcac cagctcctgg atcttcatac aacctgctgg gcttcctg      48
<210>     49
<211>     33
<212>     ADN
<213>     Homo sapiens
<400>     49
gggaagcttt tagttgcgca gatagccggt cag      33
<210>     50
<211>     47
<212>     ADN
<213>     Homo sapiens
<400>     50
agatccagga gctgggtgcag aaccgctgct cttcggttcc acgcggt      47
<210>     51
<211>     38
<212>     ADN
<213>     Homo sapiens
<400>     51
gggaagctta ttaactagat ttgggctcaa ctctcttg      38
<210>     52
<211>     37
<212>     ADN
<213>     Homo sapiens
<400>     52
gggctcgagt tagcattcgc cgcgggttaaa gctcttt      37
<210>     53
<211>     37
<212>     ADN
<213>     Homo sapiens
<400>     53
gggctcgagt tagctttcgc cgcgggttaaa gctcttt      37
<210>     54
<211>     51
<212>     ADN
<213>     Homo sapiens
<400>     54
agatccagga gctgggtgcag aaccacaaga ttggggtca actctcttgt c      51
<210>     55
<211>     51
<212>     ADN
<213>     Homo sapiens
<400>     55
agatccagga gctgggtgcag aaccactaga ttggggtca actctcttgt c      51
<210>     56
<211>     20
<212>     PRT
<213>     Homo sapiens
<400>     56
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Leu Ala Gly Phe Ala Thr
  1         5         10        15
Val Ala Gln Ala
      20
<210>     57
<211>     22
<212>     PRT
<213>     Homo sapiens
<400>     57
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala
  1         5         10        15
Ala Gln Pro Ala Met Ala
      20
<210>     58
<211>    1287
<212>     ADN
<213>     Homo sapiens
<400>     58
caagttcagc tggttcagag cgggtggcggc ccggtgaaac caggtggcag cctgcgtctg      60
tcctgcgcgg cgagcgggtt tatgtttcgt gcgtatagca tgaactgggt gcgccaggcg      120
ccgggcaaaag gcctggaatg ggtgagcagc attagcagca gtggccgcta tattcattat      180
gccgacagtg ttaaaggctc ttttaccatt tctcgtgaca atgcgaaaaa cagcctgtat      240
ctgcaaatga atagcctgcg cgcggaagac accgcgggtgt actactgtgc gcgcgaaacc      300
gtgatggcgg gcaaagcact ggattattgg ggtcagggca ccctggtgac cgtgagcagc      360
gcgagcacca aaggcccag cgcgagcacc aaaggcccga gcgtgtttcc gctggcacct      420
agttcgaaat caacgagcgg tggcaccgcg gctctgggct gcctggtgaa agattatttc      480
ccggaacctg ttaccgtgag ctggaacagc ggtgcgttga cgagtgggtg gcataccttt      540
cccgcagttc tgcaatcgag cggcctgtac tctactgagca gcgtggttac ggtcccagac      600

```



```

agtagcctgg gtacacagac ctatatttgt aacgtgaacc acaagccttc gaacacgaaa 660
gttgacaaac gcgtggaacc gaagagctgc ggttctgcac cagctcctgg atcttttccg 720
accattccgc tgagccgcct gttcgataac gcgatgctgc gcgcccaccg cctgcatcaa 780
ctggcctttg atacctatca ggagtttgag gaagcgtaca tcccgaagga acagaaatat 840
tcttttctgc agaaccaca gacgagcctg tgccttagcg aatctatccc gaccccgctc 900
aaccgcgaag aaacccaaca gaagtctaac ctggaactgc tgcgtatctc tctgctgctg 960
attcaatcct ggctggaacc ggttcaattt ctgcgtagcg tgtttgcgaa ctctctggtg 1020
tatggcgctg ctgactctaa cgtgtatgac ctgctgaaag atctggaaga aggcatacaa 1080
actctgatgg gccgtctgga ggacggctct ccacgtaccg gccagatctt taaacagacc 1140
tatagcaaat ttgacaccaa ttctcacaac gatgatgcgc tgctgaaaaa ctatggcctg 1200
ctgtattgct tccgtaaaga catggataaa gttgaaacgt tcctgcgcat tgttcagtgc 1260
cgttccgtgg agggctcctg cggcttc 1287
<210> 59
<211> 429
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 59
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Pro Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Met Phe Arg Ala Tyr
20 25 30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Ile His 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 Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Thr Val Met Ala Gly Lys Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Ala
115 120 125
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
130 135 140
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
145 150 155 160
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
165 170 175
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
180 185 190
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
195 200 205
Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
210 215 220
Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser Ala Pro Ala Pro Gly Ser Phe Pro
225 230 235 240
Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His
245 250 255
Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala
260 265 270
Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr
275 280 285
Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu
290 295 300
Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu
305 310 315 320
Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala
325 330 335
Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu
340 345 350
Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp
355 360 365
Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe
370 375 380
Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu
385 390 395 400
Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg
405 410 415
Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
420 425
<210> 60
<211> 666
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 60
gatatcgctt tgacccaatc tccgggtacg ctgagcctga gcccgggcga aaccgcgacc 60
ctgagctgcc gcgcgagcca aagcgtgggt tctaactctgg cttgggtatca gcagaaaccg 120
ggtcaggccc cgcgcctgct gatctatggg gcgagcacgg gggctaccgg cgttccggcg 180

```

cgcttttagtg gcagtcgcag cggcaccgat tttaccctga ccattacaag tctgcagccg 240
 gaagattttg cgacctatta ttgccagcaa tattatagct tcctggcgaa aacctttggt 300
 cagggcacc agctggaaat taaacgcacc gtggcgccac ccagcgtgac ggtggcgga 360
 cccagcgtgt ttatttttcc tccagtgat gaacagctga aaagcgggac cgcgagtgtt 420
 gtgtgcctgt tgaacaactt ctatcctcgc gaagcgaaag tgcagtggaa agtggataac 480
 gcattgcaga gggcaacag tcaggaaagc gttactgaac aggatagcaa agatagtacg 540
 tacagcttga gcaacactct gaccctgagt aaagcggatt atgaaaaaca taaagtgtat 600
 gcatgcgaag ttacgcatca ggggctgagc agtccggtga caaagagctt taaccgcggc 660
 gaatgc 666

<210> 61
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 61
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Gly Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Leu Ala
 85 90 95
 Lys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Gln Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 115 120 125
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 130 135 140
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 145 150 155 160
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 165 170 175
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 180 185 190
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 195 200 205
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 62
 <211> 1287
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 62
 caagttcagc tggttcagag cgggtggcggc ccggtgaaac caggtggcag cctgcgtctg 60
 tcctgcgcgg cgagcgggtt tatgtttcgt gcgtatagca tgaactgggt gcgccaggcg 120
 ccgggcaaaag gcctggaatg ggtgagcagc attagcagca gtggccgcta tattcattat 180
 gccgacagtg ttaaaggtcg ttttaccatt tctcgtgaca atgcgaaaaa cagcctgtat 240
 ctgcaaatga atagcctgcg cgcggaagac accgcggtgt actactgtgc gcgcgaaacc 300
 gtgatggcgg gcaaagcact ggattattgg ggtcagggca ccctggtgac cgtgagcagc 360
 gcgagcacca aagccccgag cgcgagcacc aaaggccccga gcgtgtttcc gctggcacct 420
 agttcgaaat caacgagcgg tggcaccgcg gctctgggct gcctggtgaa agattatttc 480
 ccggaacctg ttaccgtgag ctggaacagc ggtgcgttga cgagtgggtg gcataccttt 540
 cccgcagttc tgcaatcgag cggcctgtac tactgagca gcgtgggtac ggtccccgagc 600
 agtagcctgg gtacacagac ctatatattgt aacgtgaacc acaagccttc gaacacgaaa 660
 gttgacaaaac gcgtggaacc gaagagcagc ggttctgcac cagctcctgg atcttttccg 720
 accattccgc tgagccgcct gttcgataac gcgatgctgc gcgcccaccg cctgcatcaa 780
 ctggcctttg atacctatca ggagtttgag gaagcgtaca tcccgaagga acagaaatat 840
 tcttttctgc agaaccaca gacgagcctg tgcttttagc aatctatccc gaccccgctc 900
 aaccgcgaag aaacccaaca gaagtctaac ctggaactgc tgcgtatctc tctgctgctg 960
 attcaatcct ggctggaacc ggttcaattt ctgcgtagcg tgtttgcgaa ctctctggtg 1020
 tatggcgcgt ctgactctaa cgtgtatgac ctgctgaaaag atctggaaga aggcaccaa 1080
 actctgatgg gccgtctgga ggacggctct ccacgtaccg gccagatctt taaacagacc 1140
 tatagcaaat ttgacaccaa ttctcacaac gatgatgcg tgcgtaaaaa ctatggcctg 1200
 ctgtattgct tccgtaaaga catggataaa gttgaaacgt tcctgcgcat tgttcagtgc 1260
 cgttccgtgg agggctcctg cggcttc 1287

<210> 63
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 63
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Pro Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Met Phe Arg Ala Tyr
 20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Ile His 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 Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Thr Val Met Ala Gly Lys Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Ala
 115 120 125
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 130 135 140
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 195 200 205
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 210 215 220
 Val Glu Pro Lys Ser Ser Gly Ser Ala Pro Ala Pro Gly Ser Phe Pro
 225 230 235 240
 Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His
 245 250 255
 Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala
 260 265 270
 Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr
 275 280 285
 Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu
 290 295 300
 Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu
 305 310 315 320
 Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala
 325 330 335
 Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu
 340 345 350
 Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp
 355 360 365
 Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe
 370 375 380
 Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu
 385 390 395 400
 Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg
 405 410 415
 Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 420 425
 <210> 64
 <211> 666
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 64
 gatatcggtc tgacccaatc tccgggtacg ctgagcctga gcccgggcga aaccgcgacc 60
 ctgagctgcc gcgcgagcca aagcgtgggt tctaactctgg cttggtatca gcagaaaccg 120
 ggctcaggccc cgcgcctgct gatctatggg gcgagcacgg gggctaccgg cgttccggcg 180
 cgcttttagtg cgactcgcag cggcaccgat tttaccctga ccattacaag tctgcagccg 240
 gaagattttg cgacctatta ttgccagcaa tattatagct tcctggcgaa aacctttggt 300
 cagggcaccc agctggaaat taaacgcacc gtggcggcac ccagcgtgac ggtggcgga 360
 cccagcgtgt ttatttttcc tcccagtgat gaacagctga aaagcgggac cgcgagtgtt 420
 gtgtgcctgt tgaacaactt ctatcctcgc gaagcgaaag tgcagtggaa agtggaatac 480
 gcattgcaga gcggcaacag tcaggaaaagc gttactgaac aggatagcaa agatagtagc 540
 tacagcttga gcaacactct gaccctgagt aaagcggatt atgaaaaaca taaagtgtat 600
 gcatgcgaag ttacgcatca ggggctgagc agtccgggtga caaagagctt taaccgcggc 660
 gaaagc 666
 <210> 65
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 65
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Gly Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Leu Ala
 85 90 95
 Lys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Gln Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 115 120 125
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 130 135 140
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 145 150 155 160
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 165 170 175
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 180 185 190
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 195 200 205
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser
 210 215 220
 <210> 66
 <211> 1236
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 66
 caagttcagc tgggttcagag cgggtggcggc ccggtgaaac caggtggcag cctgcgtctg 60
 tctctgcgcg cgagcgggtt tatgtttcgt gcgtatagca tgaactgggt gcgccaggcg 120
 ccgggcaaaag gcctggaatg ggtgagcagc attagcagca gtggcgcgcta tattcattat 180
 gccgacagtg ttaaagggtcg ttttaccatt tctcgtgaca atgcgaaaaa cagcctgtat 240
 ctgcaaatga atagcctgcg gcggaagac accgcggtgt actactgtgc gcgcgaaacc 300
 gtgatggcgg gcaaagcact ggattattgg ggtcagggca ccctgggtgac cgtgagcagc 360
 gcgagcacca aaggcccagc gcgagcacc aaaggcccga cgtgtgttcc gctggcacct 420
 agttcgaat caacgagcgg tggcacccgc gctctgggct gcctggtgaa agattatttc 480
 ccggaacctg ttaccgtgag ctggaacagc ggtgcgttga cgagtgggtg gcataccttt 540
 cccgcagttc tgcaatcgag cggcctgtac tctactgagca gcgtgggttac ggtcccagc 600
 agtagcctgg gtacacagac ctatatattgt aacgtgaacc acaagccttc gaacacgaaa 660
 gttgacaaac gcgtggaacc gaagagctgc ggttctgcac cagctcctgg atctgcgcct 720
 acctatcgcg cgagcagcct gccgcagtcg tttctgctga aaagcctgga acaggtgcgc 780
 aagattcagg gtgacggcgc agctctgcaa gaaaaactgt gcgcgaccta caaattgtgc 840
 caccctgagg aactggttct gctgggcat agtctgggca ttccgtgggc gccgctgagc 900
 agctgcccgt cgcaggcatt gcagctggct ggctgtctga gccagttaca tagcggctcg 960
 tttctgtatc agggcctgct gcaagcgcgt gaaggcatca gtctgagtt ggttccgacc 1020
 ctggatacct tacagctgga tgtggcggat ttcgcaacca ccatttgga gcagatggaa 1080
 gaattgggca tggctccggc gttgcagccg acccagggcg cgatgcctgc gtttgcaagc 1140
 gcttttcagc gccgcgcggg tgggggtgct gtggcgtcgc acttgacagag cttcctggaa 1200
 gtgagctacc gtgtcctgcg ccattctggca cagcct 1236
 <210> 67
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 67
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Pro Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Met Phe Arg Ala Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Ile His 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 Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Thr Val Met Ala Gly Lys Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Ala
 115 120 125
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 130 135 140
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 195 200 205
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg

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

 <210> 68
 <211> 666
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 68
 gatatacgttc tgacccaatc tccgggtacg ctgagcctga gcccgggcga aaccgcgacc 60
 ctgagctgcc gcgcgagcca aagcgtgggt tctaattctgg ctggtatca gcagaaaccg 120
 ggtcaggccc cgccctgct gatctatgg gcgagcacgg gggctaccgg cggtccggcg 180
 cgcttttagtg gcagtcgcag cggcaccgat tttaccctga ccattacaag tctgcagccg 240
 gaagattttg cgacctatta ttgccagcaa tattatagct tcttggcgaa aacctttggt 300
 cagggcacccc agctggaaat taaacgcacc gtggcggcac ccagcgtgac ggtggcggca 360
 cccagcgtgt ttatttttcc tcccagtgat gaacagctga aaagcgggac cgcgagtgtt 420
 gtgtgcctgt tgaacaactt ctatcctcgc gaagcgaag tgcagtggaa agtggataac 480
 gcattgcaga gcggcaacag tcaggaaaag gttactgaac aggatagcaa agatagtacg 540
 tacagcttga gcaacactct gaccctgagt aaagcggatt atgaaaaaca taaagtgtat 600
 gcatgcgaag ttacgcatca ggggctgagc agtccggtga caaagagctt taaccgcggc 660
 gaatgc 666

 <210> 69
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 69
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Gly Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Leu Ala
 85 90 95
 Lys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Gln Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 115 120 125
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 130 135 140
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 145 150 155 160
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 165 170 175
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 180 185 190
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 195 200 205
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

 <210> 70
 <211> 1236
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

```

<400> 70
caagttcagc tggttcagag cgggtggcggc cgggtgaaac caggtggcag cctgcgtctg 60
tcctgcgcgg cgagcgggtt tatgtttcgt gcgtatagca tgaactgggt gcgccaggcg 120
ccgggcaaaag gcttggaaatg ggtgagcagc attagcagca gtggccgcta tattcattat 180
gccgacagtgt ttaaaggctcg ttttaccatt tctcgtgaca atgcgaaaaa cagcctgtat 240
ctgcaaatga atagcctgcg cgcggaagac accgcggtgt actactgtgc gcgcgaaacc 300
gtgatggcgg gcaaagcact ggattattgg ggtcagggca ccctggtgac cgtgagcagc 360
gcgagcacca aaggcccgag cgcgagcacc aaaggcccgga gcgtgtttcc gctggcacct 420
agttcgaaat caacgagcgg tggcaccgcg gctctgggct gcctggtgaa agattatttc 480
ccggaacctg ttaccgtgag ctggaacagc ggtgcgttga cgagtgggtg gcataccttt 540
cccgcagttc tgcaatcgag cggcctgtac tcaactgagca gcgtggttac ggtcccagagc 600
agtagcctgg gtacacagac ctatatattgt aacgtgaacc acaagccttc gaacacgaaa 660
gttgacaaac gcgtggaaac gaagagcagc ggttctgcac cagctcctgg atctgcgcct 720
acctatcgcg cgagcagctg gccgcagtcg tttctgctga aaagcctgga acaggtgcgc 780
aagattcagg gtgacggcgc agctctgcaa gaaaaactgt gcgcgacctt caaattgtgc 840
caccctgagg aactggttct gctgggcat agtctgggca ttccgtgggc gccgctgagc 900
agctgccccg cgaggcatt cgagctggct ggctgtctga gccagttaca tagcgggtctg 960
tttctgtatc agggcctgct gcaagcgtcg gaaggcatca gtcctgagtt gggtcgcgac 1020
ctggatacct tacagctgga tgtggcggat ttcgcaacca ccatttggca gcagatggaa 1080
gaattgggca tggctccggc gttgcagccg acccagggcg cgatgcctgc gtttcaagc 1140
gcttttcagc gccgcgcggg tggggtgctg gtggcgtcgc acttgagag cttcctggaa 1200
gtgagctacc gtgtcctgcg ccactctggca cagcct 1236

<210> 71
<211> 412
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 71
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Pro Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Met Phe Arg Ala Tyr
20 25 30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Ile His 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 Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Thr Val Met Ala Gly Lys Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Ala
115 120 125
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
130 135 140
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
145 150 155 160
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
165 170 175
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
180 185 190
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
195 200 205
Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
210 215 220
Val Glu Pro Lys Ser Ser Gly Ser Ala Pro Ala Pro Gly Ser Ala Pro
225 230 235 240
Thr Tyr Arg Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Ser Leu
245 250 255
Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys
260 265 270
Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu
275 280 285
Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser
290 295 300
Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu
305 310 315 320
Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu
325 330 335
Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala
340 345 350
Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu
355 360 365
Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg
370 375 380
Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu
385 390 395 400
Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
405 410

```

<210> 72
 <211> 666
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 72
 gatatcggttc tgacccaatc tccgggtacg ctgagcctga gcccgggcga aaccgcgacc 60
 ctgagctgcc gcgcgagcca aagcgtgggt tctaactctgg cttggtatca gcagaaaccg 120
 ggtcaggccc cgcgcctgct gatctatggg gcgagcacgg gggctaccgg cgttcggcgg 180
 cgcttttagtg gcagtcgcag cggcaccgat tttaccctga ccattacaag tctgcagccg 240
 gaagattttt cgacctatta ttgccagcaa tattatagct tectggcgaa aacctttggt 300
 cagggcaccc agctggaaat taaacgcacc gtggcgccac ccagcgtgac ggtggcgcca 360
 cccagcgtgt ttatttttcc tcccagtgat gaacagctga aaagcgggac cgcgagtgtt 420
 gtgtgcctgt tgaacaactt ctatcctcgc gaagcgaag tgcagtggaa agtggataac 480
 gcattgcaga gcggcaacag tcaggaaaagc gttactgaac aggatagcaa agatagtagc 540
 tacagcttga gcaaacactct gaccctgagt aaagcggatt atgaaaaaca taaagtgtat 600
 gcatgcgaag ttacgcacatc ggggctgagc agtccggtga caaagagctt taaccgcggc 660
 gaaagc 666
 <210> 73
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 73
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Gly Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Leu Ala
 85 90 95
 Lys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Gln Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 115 120 125
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 130 135 140
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 145 150 155 160
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 165 170 175
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 180 185 190
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 195 200 205
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser
 210 215 220
 <210> 74
 <211> 1209
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 74
 caagttcagc tggttcagag cgggtggcggc ccggtgaaac caggtggcag cctgcgtctg 60
 tctgcgcgg cgagcgggtt tatgtttcgt gcgtatagca tgaactgggt gcgccaggcg 120
 ccgggcaaa gtcctggaatg ggtgagcagc attagcagca gtggcccgcta tattcattat 180
 gccgacagtg ttaaaaggctg ttttaccatt tctcgtgaca atgcgaaaaa cagcctgtat 240
 ctgcaaatga atagcctgcg cgcggaagac accgcggtgt actactgtgc gcgcgaaacc 300
 gtgatggcgg gcaaagcact ggattattgg ggtcagggca cctcgtgtgac cgtgagcagc 360
 gcgagcacca aaggcccag cgcgagcacc aaaggcccga gcgtgtttcc gctggcacct 420
 agttcgaaat caacgagcgg tggcaccgcg gctctgggct gctcgttgaa agattatttc 480
 ccggaacctg ttaccgtgag ctggaacacg ggtgcgttga cgagtgtgtg gcataccttt 540
 cccgcagttc tgcaatcgag cggcctgtac tactgagca gcgtgggttac ggtcccagac 600
 agtagcctgg gtacacagac ctatatttgt aacgtgaacc acaagccttc gaacacgaaa 660
 gttgacaaac cgttggaacc gaagagctgc ggttctgcac cagctcctgg atcttcatac 720
 aacctgctgg gcttctcgca acgtagcagt aactttcaga gccagaagct gttatggcaa 780
 ctgaacggcc ccttgagta ctgcctgaag gatcgcatga actttgatat tccggaagaa 840
 attaaacagc tgcaacagtt ccagaaagaa gatgcggcgc tgaccattta tgaaatgctg 900
 caaaaacatt ttgcgatttt tgcgcaagat agtagtagca ccggctggaa cgaaaccatt 960
 gtggaaaaac tgcctcgcaa cgtgtaccat cagattaacc acctgaagac cgtgctggaa 1020
 gaaaaactgg aaaaagaaga ttttaccgc ggcaactga tgagcagcct gcacttgaaa 1080
 cgctattatg gccgattct ccattatctg aaagccaaag agtattccca ctgtgcttgg 1140
 accattgttc gcgtggaaat tctgcgcaac ttttatttta ttaaccgcct gaccgctat 1200
 ctgcgcaac 1209
 <210> 75
 <211> 403
 <212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 75
 Asn Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Pro Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Gly Phe Met Phe Arg Ala
 20 25 30
 Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Ile His Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60
 Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp 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 Thr Val Met Ala Gly Lys Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Ala
 115 120 125
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 130 135 140
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 195 200 205
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 210 215 220
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser Ala Pro Ala Pro Gly Ser Ser Tyr
 225 230 235 240
 Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser Gln Lys
 245 250 255
 Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg
 260 265 270
 Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln
 275 280 285
 Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe
 290 295 300
 Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile
 305 310 315 320
 Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys
 325 330 335
 Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys
 340 345 350
 Leu Met Ser Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His
 355 360 365
 Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg
 370 375 380
 Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr
 385 390 395 400
 Leu Arg Asn
 <210> 76
 <211> 666
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 76
 gatatcgttc tgacccaatc tccgggtacg ctgagcctga gcccgggcga aaccgcgacc 60
 ctgagctgcc gcgcgagcca aagcgtgggt tctaactctgg cttggtatca gcagaaaccg 120
 ggtcaggccc cgcgcctgct gatctatggg gcgagcacgg gggctaccgg cgttccggcg 180
 cgcttttagtg gcagtcgcag cggcaccgat tttaccctga ccattacaag tctgcagccg 240
 gaagattttg cgacctatta ttgccagcaa tattatagct tectggcgaa aaccttttgt 300
 cagggcaccc agctggaaat taaacgcacc gtggcggcac ccagcgtgac ggtggcggca 360
 cccagcgtgt ttatttttcc tccagtgat gaacagctga aaagcgggac cgcgagtgtt 420
 gtgtgcctgt tgaacaactt ctatcctcgc gaagcgaaa tgacgtggaa agtggataac 480
 gcattgcaga gcggcaacag tcaggaaagc gttactgaac aggatagcaa agatagtacg 540
 tacagcttga gcaacactct gacctgagt aaagcggatt atgaaaaaca taaagtgtat 600
 gcatgcgaag ttacgcatca ggggctgagc agtccggtga caaagagctt taaccgcggc 660
 gaatgc 666
 <210> 77
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 77
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Gly Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Leu Ala
 85 90 95
 Lys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Gln Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 115 120 125
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 130 135 140
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 145 150 155 160
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 165 170 175
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 180 185 190
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 195 200 205
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220
 <210> 78
 <211> 1209
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 78
 caagttcagc tgggttcagag cgggtggcggc ccggtgaaac caggtggcag cctgcgtctg 60
 tcttgccggg cgagcgggtt tatgtttcgt gcgtatagca tgaactgggt gcgccaggcg 120
 ccgggcaaag gcctggaatg ggtgagcagc attagcagca gtggccgcta tattcattat 180
 gccgacagtg ttaaagggtcg ttttaccatt tctcgtgaca atgcgaaaaa cagcctgtat 240
 ctgcaaatga atagcctgcy cgcggaagac accgcggtgt actactgtgc gcgcgaaacc 300
 gtgatggcgg gcaaagcact ggattattgg ggtcagggca ccctggtgac cgtgagcagc 360
 gcgagcacca aaggcccgag cgcgagcacc aaaggcccgga cgtgtgttcc gctggcacct 420
 agttcgaat caacgagcgg tggcaccgcy gctctgggct gcctggtgaa agattatttc 480
 ccggaacctg ttaccgtgag ctggaacagc ggtgcgttga cgagtgggtg gcataccttt 540
 cccgcagttc tgcaatcgag cggcctgtac tctactgagca cgtgtgttac ggtcccagc 600
 agtagcctgg gtacacagac ctatatttgt aacgtgaacc acaagccttc gaacacgaaa 660
 gttgacaaac gcgtggaacc gaagagcagc ggttctgcac cagctcctgg atcttcatac 720
 aacctgctgg gcttctgca acgtagcagt aactttcaga gccagaagct gttatggcaa 780
 ctgaaacggcc gcctggagta ctgcctgaag gatcgcatga actttgatat tccggaagaa 840
 attaaacagc tgcaacagtt ccagaaagaa gatgcggcgc tgaccattta tgaaatgctg 900
 caaaaacatt ttgcgatttt tcgccaagat agtagtagca ccggttgga cgaaccatt 960
 gtggaacacc tgctcgccaa cgtgtaccat cagattaacc acctgaagac cgtgctggaa 1020
 gaaaaactgg aaaaagaaga ttttaccgcy ggcaaaactga tgagcagcct gcattctgaaa 1080
 cgctattatg gccgcattct ccattatctg aaagccaaag agtattccca ctgtgcttgg 1140
 accattgttc gcgtggaaat tctgcgcaac ttttatttta ttaaccgcct gaccggctat 1200
 ctgcgcaac 1209
 <210> 79
 <211> 403
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 79
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Pro Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Met Phe Arg Ala Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Ile His 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 Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Thr Val Met Ala Gly Lys Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Ala
 115 120 125
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 130 135 140
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu

180 185 190
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 195 200 205
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 210 215 220
 Val Glu Pro Lys Ser Ser Gly Ser Ala Pro Ala Pro Gly Ser Ser Tyr
 225 230 235 240
 Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Ser Gln Lys
 245 250 255
 Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg
 260 265 270
 Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln
 275 280 285
 Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe
 290 295 300
 Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile
 305 310 315 320
 Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys
 325 330 335
 Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys
 340 345 350
 Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His
 355 360 365
 Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg
 370 375 380
 Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr
 385 390 395 400
 Leu Arg Asn
 <210> 80
 <211> 666
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 80
 gatatcggttc tgacccaatc tccgggtacg ctgagcctga gcccgggcga aaccgcgacc 60
 ctgagctgcc gcgcgagcca aagcgtgggt tctaattctgg ctgggtatca gcagaaaccg 120
 ggtcaggccc cgcgcctgct gatctatggg gcgagcacgg gggctaccgg cgttccggcg 180
 cgctttagtg gcagtcgcag cggcaccgat ttaccctga ccattacaag tctgcagccg 240
 gaagattttg cgacctatta ttgccagcaa tattatagct tcctggcgaa aacctttggt 300
 cagggcaccc agctggaaat taaacgcacc gtggcggcac ccagcgtgac ggtggcggca 360
 cccagcgtgt ttatttttcc tcccagtgat gaacagctga aaagcgggac cgcgagtgtt 420
 gtgtgcctgt tgaacaactt ctatcctcgc gaagcgaaaag tgcagtgga agtgataaac 480
 gcattgcaga gcggcaacag tcaggaaaag gttactgaac aggatagcaa agatagtacg 540
 tacagcttga gcaacactct gaccctgagt aaagcggatt atgaaaaaca taaagtgtat 600
 gcatgcgaag ttacgcatca ggggctgagc agtccgggtga caaagagctt taaccgcggc 660
 gaaagc 666
 <210> 81
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 81
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Gly Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Leu Ala
 85 90 95
 Lys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Gln Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 115 120 125
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 130 135 140
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 145 150 155 160
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 165 170 175
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 180 185 190
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 195 200 205
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser
 210 215 220
 <210> 82

<211> 1275
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 82
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
 tcctgcacag cctctggatt cacctttgat gattatgcc a tgcaactgggt ccggcaagct 120
 ccagggaagg gccttgagtg ggtctcagggt attagttgga atgggtggtag cgtagtctat 180
 gcggactctg tcagggggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag aactgaggac acggccgtct attactgtgc gagagattac 300
 ggttactacg gtatggacgt ctgggggcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcatcggcc 360
 acattggccg cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 420
 acctctgagg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 480
 acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgacgg tgccctccag cagcttgggc 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga 660
 gttgagccca aatcttgttg ttctgcacca gctcctggat cttttccgac cattccgctg 720
 agccgcctgt tcgataacgc gatgctgcgc gccaccgcc tgcatacaact ggcctttgat 780
 acctatcagg agtttgagga agcgtacatc ccgaaggaa agaaatattc ttttctgcag 840
 aaccacaga cgagcctgtg ctttagcgaa tctatccga ccccgccaa ccgcgaagaa 900
 acccaacaga agtctaact ggaactgctg cgtatctctc tgctgctgat tcaatcctgg 960
 ctggaaccgg ttcaatttct gcgtagcgtg ttgcgaaact ctctggtgta tggcgctgt 1020
 gactctaacg tgtatgacgt gctgaaagat ctggaagaag gcataccaaac tctgatgggc 1080
 cgctcggagg acggctctcc acgtaccggc cagatcttta aacagaccta tagcaaattt 1140
 gacaccaatt ctcaacaaga tgatgcgctg ctgaaaaact atggcctgct gtattgcttc 1200
 cgtaaagaca tggataaagt tgaacgctc ctgcgcattg ttcagtgcg ttccgtggag 1260
 ggctcctgcg gcttc 1275
 <210> 83
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 83
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr 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 Gly Gly Ser Val Val Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Arg 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 Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ser Ala Thr Leu Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Glu Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Gly Ser Ala Pro Ala Pro Gly Ser Phe Pro Thr Ile Pro Leu
 225 230 235 240
 Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
 245 250 255
 Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
 260 265 270
 Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
 275 280 285
 Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
 290 295 300
 Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
 305 310 315 320
 Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
 325 330 335
 Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
 340 345 350
 Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
 355 360 365
 Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
 370 375 380

His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
 385 390 395 400
 Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
 405 410 415
 Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 420 425
 <210> 84
 <211> 648
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 84
 gatattgtga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctggttgaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtc gaattattggc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 ggtaacgccc ctaagttgtt gatctataga gcatccaatt tgcgaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggctc tgggacagat ttcactctta ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatttcg caacttactt ttgtcaacag gctaccattt tccctctcac ttctggcgga 300
 gggaccgggg tggatatcaa acgttctaga gctgtggctg caccatctgt cttcatcttc 360
 ccgcatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420
 ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgcccctcca atcgggtaac 480
 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcaacacc 540
 ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgctgcca agtcacccat 600
 cagggcctga gttcgcccg cacaagagc ttcaacagg gagagtgt 648
 <210> 85
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 85
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Arg 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 Phe Cys Gln Gln Ala Thr Ile Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Asp Ile Lys Arg Ser Arg Thr Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 86
 <211> 1275
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 86
 gaggtgcagc tgggtgcagtc tgggggagggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
 tcctgcacag cctctggatt cacctttgat gattatgcc tgcactgggt ccggcaagct 120
 ccagggaagg gctctggagtg ggtctcaggt attagttgga atgggtgtag cgtagtctat 180
 gcggactctg tcaggggccc attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag aactgaggac acggcgtct attactgtgc gagagattac 300
 gggtactacg gtatggacgt ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcatcggcc 360
 acattggccg cctccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc 420
 acctctgagg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 480
 acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgacc tgccctccag cagcttgggc 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga 660
 gttgagccca aatctagtgg ttctgcacca gctcctggat cttttccgac cattccgctg 720
 agccgcctgt tcgataacgc gatgctgcgc gccaccgcc tgcatacaact ggcctttgat 780
 acctatcagg agtttgagga agcgtacatc ccgaaggaa agaaatattc ttttctgcag 840
 aaccacaga cgagcctgtg ctttagcgaa tctatccgga ccccgcccaa ccgcgaagaa 900
 acccaacaga agtctaacct ggaactgctg cgtatctctc tgctgctgat tcaatcctgg 960
 ctggaaccgg ttcaatttct gcgtagcgtg ttgcgaaact ctctggtgta tggcgctct 1020
 gactctaacg tgtatgacct gctgaaagat ctggaagaag gcatccaaac tctgatgggc 1080

```

cgctctggagg acggtctctcc acgtaccggc cagatcttta aacagaccta tagcaaattt 1140
gacaccaatt ctcacaaga tgatgcgtg ctgaaaaact atggcctgct gtattgcttc 1200
cgtaaagaca tggataaagt tgaacgttc ctgcgcattg ttcagtgcg ttcctggag 1260
ggctctgcg gcttc 1275
<210> 87
<211> 425
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 87
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr 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 Gly Gly Ser Val Val Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Arg 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 Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ser Ala Thr Leu Ala Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Glu Gly
130 135 140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
210 215 220
Ser Ser Gly Ser Ala Pro Ala Pro Gly Ser Phe Pro Thr Ile Pro Leu
225 230 235 240
Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
245 250 255
Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
260 265 270
Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
275 280 285
Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
290 295 300
Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
305 310 315 320
Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
325 330 335
Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
340 345 350
Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
355 360 365
Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
370 375 380
His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
385 390 395 400
Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
405 410 415
Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
420 425
<210> 88
<211> 648
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 88
gatattgtga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgttgaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc gaattattggc agctggttag cctggtatca gcagaaacca 120
ggtaacgccc ctaagttggt gatctataga gcatccaatt tgcgaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggctc tgggacagat ttcactctta ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagatttcg caacttactt ttgtcaacag gctaccattt tccctctcac ttccggcgga 300
gggacccggg tggatatcaa acgttctaga gctgtggctg caccatctgt cttcatcttc 360
ccgccatctg atgacagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgcccctcca atcggttaac 480
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcaacacc 540
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaagtct acgcctgcga agtcacccat 600

```

cagggcctga gttcgcccggt cacaaagagc ttcaacaggg gagagagt

648

<210> 89

<211> 216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Asp Ile Val Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ala

1 5 10 15

Thr Ile Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Asp Ile Lys

20 25 30

Arg Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser

35 40 45

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn

50 55 60

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala

65 70 75 80

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys

85 90 95

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp

100 105 110

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

115 120 125

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser Met Thr Gln

130 135 140

Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr

145 150 155 160

Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Gly Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

165 170 175

Lys Pro Gly Asn Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu

180 185 190

Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

195 200 205

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

210 215

<210> 90

<211> 1275

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 90

caggtgcagc tgggtgcagtc aggggggagc ctgggtcaggc cggggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggact catattcagc aattatagca tgaactgggt ccgccaggct 120

ccgggggaagg ggctggagtg ggtctcatca ataagtagtg ctggtagtta caaatactac 180

acagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa gtcactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agtcgacgac acggccgtct attactgtgc aagaggggac 300

tatgatacgg gcatggagcc ctggggccaa ggcaccatgg tcaccgtctc ctcacgggcc 360

acattggcgg cctccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc 420

acctctgggg gcacagcgcg cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 480

acgggtgtcgt ggaactcagg cgcctcgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540

cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgccctccag cagctggggc 600

accagacact acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga 660

gttgagccca aatcttgagg ttctgcacca gctcctggat cttttccgac cattccgctg 720

agcgcctgt tcgataacgc gatgctgcgc gcccacggcc tgcatacaact ggcctttgat 780

acctatcagg agtttgagga agcgtacatc ccgaaggaa agaaatattc ttttctgcag 840

aaccacaga cgagcctgtg ctttagcgaa tctatccga ccccgctcaa ccgcgaagaa 900

accacacaga agtctaact ggaactgctg cgtatctctc tgctgtgtag tcaatcctgg 960

ctggaaccgg ttcaatttct gcgtagcgtg tttgcaact ctctggtgta tggcgcgtct 1020

gactctaacg tgtatgacct gctgaaagat ctggaagaag gcatccaaac tctgatgggc 1080

cgtctggagg acggctctcc agtaccggc cagatcttta aacagaccta tagcaaattt 1140

gcaccaatt cgcacaaga tgaatgcgtg ctgaaaaact atggcctgct gtattgcttc 1200

cgtaaagaca tggataaagt tgaaacgttc ctgcgcattg ttcagtgcgg ttccgtggag 1260

ggctcctgcg gcttc 1275

<210> 91

<211> 425

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Ile Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ala Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Asp Thr Gly Met Glu Pro Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110
 Met Val Thr Val Ser Ser Ser Ala Thr Leu Ala Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Glu Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Gly Ser Ala Pro Ala Pro Gly Ser Phe Pro Thr Ile Pro Leu
 225 230 235 240
 Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
 245 250 255
 Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
 260 265 270
 Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
 275 280 285
 Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
 290 295 300
 Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Ile Gln Ser Trp
 305 310 315 320
 Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
 325 330 335
 Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
 340 345 350
 Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
 355 360 365
 Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
 370 375 380
 His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
 385 390 395 400
 Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
 405 410 415
 Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 420 425
 <210> 92
 <211> 648
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 92
 gagctcgagc tcgtgtcgac gcagtcctcca tcctccctgt ctgcatctgt gggagacaga 60
 gtcaccatta cttgcccggc aagtcagagc attagcaggt atttaaattg gtatcagcag 120
 aaaccagggg aagcccctaa gctcctgatc tatggtgcat ccagattaga aagtgggggtc 180
 ccatcaaggt tcagtggcag tggttctggg acagacttca ctctcaccat caacagcctg 240
 caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagagtt acagtacccc tctaactttt 300
 ggccagggga cccgagtcga aattaaacgt gctgtggctg caccatctgt cttcatcttc 360
 ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420
 ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgcccctcca atcgggtaac 480
 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcaacacc 540
 ctgacgctga gcaaagcaga ctacagaaaa cacaagctct acgctgcga agtcacccat 600
 cagggcctga gttcgcccgt cacaagagc ttcaacaggg gagagtgt 648
 <210> 93
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 93
 Glu Leu Val Ser 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 Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Arg 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 Asn 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 Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys Arg Ser Arg Thr Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg

130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 94
 <211> 1275
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 94
 caggtgcagc tgggtgcagtc aggggggaggc ctgggtcaggc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggact catattcagt aattatagca tgaactgggt cgcagggct 120
 ccggggaagg ggctggagtg ggtctcatca ataagtagtg ctggtagtta caaatactac 180
 acagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa gtcactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agtcgacgac acggccgtct attactgtgc aagaggggac 300
 tatgatacgg gcatggagcc ctggggccaa ggcacatgg tcaccgtctc ctcatcggcc 360
 acattggccg cctccaccaaa ggtcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 420
 acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg 480
 acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgctgc acaccttccc ggctgtccta 540
 cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtgggtgacc tgccctccag cagcttgggc 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga 660
 gttgagccca aatctagtgg ttctgcacca gctcctggat cttttccgac cattccgctg 720
 agccgcctgt tgcataacgc gatgctgcgc gccaccgcc tgcatacaact ggcctttgat 780
 acctatcagg agtttgagga agcgtacatc ccgaaggaa agaaatattc ttttctgcag 840
 aaccacaga cgagcctgtg ctttagcgaa tctatcccga ccccgccaa ccgcgaagaa 900
 acccaacaga agtctaact ggaactgctg cgtatctctc tgctgctgat tcaatcctgg 960
 ctggaaccgg ttcaatttct gcgtagcgtg ttgcgaaact ctctggtgta tggcgctgt 1020
 gactctaacg tgtatgacct gctgaaagat ctggaagaag gcatacaaac tctgatgggc 1080
 cgctcggagg acggtctctc acgtaccggc cagatcttta aacagaccta tagcaaattt 1140
 gacaccaatt ctcaacaaga tgatgcgctg ctgaaaaact atggcctgct gtattgcttc 1200
 cgtaaagaca tggataaagt tgaacgctt ctgcgcattg ttcagtgcg ttccgtggag 1260
 ggctcctgcg gcttc 1275
 <210> 95
 <211> 425
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 95
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Ala Gly Ser Tyr Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Tyr Asp Thr Gly Met Glu Pro Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Met Val Thr Val Ser Ser Ser Ala Thr Leu Ala Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Glu Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Ser Gly Ser Ala Pro Ala Pro Gly Ser Phe Pro Thr Ile Pro Leu
 225 230 235 240
 Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
 245 250 255
 Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
 260 265 270
 Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
 275 280 285

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
 290 295 300
 Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
 305 310 315 320
 Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
 325 330 335
 Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
 340 345 350
 Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
 355 360 365
 Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
 370 375 380
 His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
 385 390 395 400
 Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
 405 410 415
 Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 420 425
 <210> 96
 <211> 648
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 96
 gagctcgagc tcgtgtcgac gcagtcctcca tcctccctgt ctgcatctgt gggagacaga 60
 gtcaccatta ctgcccggc aagtcagagc attagcaggt atttaaattg gtatcagcag 120
 aaaccaggga aagcccctaa gctcctgac tatgggtcat ccagattaga aagtggggtc 180
 ccatacaggt tcagtggcag tggttctggg acagacttca ctctcaccat caacagcctg 240
 caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagagtt acagtacccc tctaactttt 300
 ggccagggga cccgagtcga aattaaacgt gctgtggctg caccatctgt cttcatcttc 360
 ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 420
 ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgcccctcca atcgggtaac 480
 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcaacacc 540
 ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaagctct acgctgcga agtcacccat 600
 cagggcctga gttcgcccgt cacaagagc ttcaacaggg gagagagt 648
 <210> 97
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 97
 Glu Leu Val Ser 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 Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Arg 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 Asn 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 Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys Arg Ser Arg Thr Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser
 210 215