



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

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

(11)



1-0047364

(51)^{2020.01} A61K 45/00; G01N 33/53; A61K 47/64; (13) B
A61K 47/65; A61K 47/68; A61K 48/00;
A61P 1/04; A61P 11/06; A61P 17/00;
A61P 17/02; A61P 17/06; A61P 17/16;
A61P 25/00; A61P 29/00; A61P 35/00;
A61P 37/08; A61P 43/00; C07K 14/81;
C07K 16/00; C07K 19/00; C12N 1/15;
C12N 1/19; C12N 1/21; C12N 15/12;
C12N 15/63; C12N 5/10; C12N 9/64;
C12P 21/02; C12Q 1/37; G01N 33/15;
G01N 33/50; A61K 35/12; A61K 38/57

(21) 1-2021-03108

(22) 06/11/2019

(86) PCT/JP2019/043384 06/11/2019

(87) WO 2020/095921 14/05/2020

(30) 2018-209729 07/11/2018 JP

(45) 25/06/2025 447

(43) 25/08/2021 401A

(73) DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (JP)

3-5-1, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo 103-8426, Japan

(72) NISHIMIYA, Daisuke (JP); YANO, Hidenori (JP); TAKAHASHI, Hidenori (JP);
YAMAGUCHI, Shinji (JP); OFUCHI, Shiho (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) PEPTIT BIẾN THỂ SPINK2 ỨC CHẾ KLK5, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA PEPTIT
VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PEPTIT

(21) 1-2021-03108

(57) Sáng chế đề xuất peptit mới. Peptit này chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 61 và ức chế proteaza. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra peptit và được phẩm chứa peptit.

[Fig.69]

Công thức của peptit đột biến SPINK2

GPQFGLFSKYRTPNCX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇CX₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂PVCGSDMSTYANE
CTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (SEQ ID NO: 61)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến peptit, polynucleotit, vector, tế bào, phương pháp tạo ra peptit, peptit thu được bằng phương pháp này, thể liên hợp chứa peptit này, chế phẩm chứa peptit hoặc thể liên hợp này, dược phẩm, dược phẩm để điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh khác nhau, sử dụng peptit hoặc thể liên hợp này để điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh khác nhau, phương pháp điều trị các bệnh khác nhau bao gồm bước sử dụng peptit hoặc thể liên hợp này, chế phẩm để chẩn đoán hoặc xét nghiệm các bệnh khác nhau chứa peptit hoặc thể liên hợp này, và tương tự.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kalikrein 5 (KLK5) là một serin proteaza tương tự trypsin (Clan PA, họ S1) và còn được gọi là enzym trypsin lớp sừng (stratum corneum tryptic enzyme, SCTE). Kalikrein 7 (KLK7) là một proteaza tương tự chymotrypsin (Clan PA, họ S1) và còn được gọi là enzym chymotrypsin lớp sừng (stratum corneum chymotryptic enzyme, SCCE). Ngoài ra, kalikrein 14 (KLK14) là một proteaza tương tự trypsin (Clan PA, họ S1). KLK5, KLK7, và KLK14 thuộc về họ kalikrein mô bao gồm 15 loại serin proteaza tương tự trypsin hoặc chymotrypsin được bảo toàn cao. KLK5 được biểu hiện trong các tế bào và sau đó được biến đổi thành KLK5 hoạt tính bằng cách tự hoạt hóa, trong khi KLK7 và KLK14 được biểu hiện dưới dạng tiền chất của tiền enzym (preproenzym) không hoạt tính và được biến đổi thành các dạng hoạt tính bằng cách phân cắt các trình tự của tiền protein của chúng bằng các proteaza được thể hiện bằng KLK5 (tài liệu phi sáng chế 1). Sự biểu hiện của KLK5 đã được quan sát trong da, và được thông báo là phân hủy các yếu tố liên quan đến sự bám dính tế bào như Desmoglein và Desmocollin (tài liệu phi sáng chế 2). KLK5, KLK7, và KLK14 là quan trọng đối với sự tróc vảy da và còn tham gia vào sự hoạt hóa thụ thể được hoạt hóa bởi proteinaza 2 (proteinase-activated receptor, PAR-2) (tài liệu phi sáng chế 3). Sự hoạt hóa PAR-2 cảm ứng các xytokin và chemokin và làm tăng tính miễn dịch, các phản ứng viêm, và tương tự.

Hội chứng Netherton là một trong số các hội chứng bệnh vảy cá với tình trạng viêm da nặng, tróc vảy, tóc bất thường, và các triệu chứng dị ứng như hen và viêm da dị ứng do

di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường, và là bệnh hiếm gặp (OMIM256500) (tài liệu phi sáng chế 4). Do bệnh viêm da tróc vảy phát triển từ thời điểm sinh ra, tình trạng mất nước, nhiễm trùng, hoặc tương tự có thể gây bởi sự tổn hại đáng kể chức năng bảo vệ của da và có thể đi kèm với chậm phát triển. Mặc dù các dữ liệu dịch tễ học chi tiết là không có sẵn, bệnh này được cho là có tỷ lệ tử vong sau khi sinh cao. Hội chứng Netherton phát triển do sự giảm chức năng của chất ức chế serin proteaza (LEKTI) sau khi đột biến gen (SPINK5) mã hóa LEKTI được biểu hiện trong các tế bào biểu mô của da. LEKTI bao gồm 15 vùng ức chế giống Kazal. Ở các bệnh nhân bị hội chứng Netherton, nhiều vị trí đột biến đã được phát hiện trong SPINK5 dọc theo trình tự mã hóa mỗi vùng, và các triệu chứng và mức độ nặng thay đổi liên quan đến vị trí đột biến (các tài liệu phi sáng chế 4 và 5).

Chuột nhắt thiếu SPINK5 ($Spink5^{-/-}$) có các triệu chứng trên da tương tự hội chứng Netherton, và hoạt tính proteaza cao của KLK5 và KLK7 được quan sát trong biểu mô của da (tài liệu phi sáng chế 1). Mặc dù chuột nhắt thiếu SPINK5 bị chết trong vòng vài giờ sau khi sinh, sự cải thiện tỷ lệ tử vong sơ sinh được thông báo ở chuột nhắt ($Spink5^{-/-}Klk5^{-/-}$) thu được bằng cách lai chuột nhắt thiếu KLK5 với chuột nhắt thiếu SPINK5 (tài liệu phi sáng chế 6). Ngoài ra, ở chuột nhắt $Spink5^{-/-}Klk5^{-/-}$, các khiếm khuyết nặng của hàng rào bảo vệ da, các khiếm khuyết về cấu trúc biểu mô, viêm da, và tương tự quan sát được ở $Spink5^{-/-}$ đã được hồi phục. Tương tự, chuột nhắt có đột biến SPINK5 $Spink5^{A135X/A135X}$ được quan sát ở các con chuột bị hội chứng Netherton thể hiện các triệu chứng trên da giống hội chứng Netherton, và cái chết được quan sát trong vòng 12 giờ sau khi sinh, trong khi hàng rào bảo vệ da và các triệu chứng da nghiêm trọng được cải thiện ở $Klk5^{-/-}Spink5^{A135X/A135X}$ thu được bằng cách lai với chuột nhắt thiếu KLK5 (tài liệu phi sáng chế 7). Ngoài ra, các triệu chứng da bất thường được loại trừ bằng cách lai với chuột nhắt thiếu KLK7 ($Klk5^{-/-}Klk7^{-/-}Spink5^{A135X/A135X}$). Đã có thông báo rằng KLK5 chuột nhắt chuyển gen cũng có các triệu chứng trên da giống hội chứng Netherton (tài liệu phi sáng chế 8). Hoạt tính proteaza cao giống như trypsin và chymotrypsin được quan sát trong lớp sừng của các bệnh nhân bị hội chứng Netherton và chuột nhắt của mô hình hội chứng Netherton, và đã gợi ý rằng họ kalikrein nằm xuôi dòng, như KLK7 và KLK14, có liên quan đến hoạt tính proteaza trong lớp sừng, ngoài KLK5. Từ điều nêu trên, đã cho rằng hội chứng Netherton được gây bởi sự đột biến gen SPINK5 và phát triển với hoạt tính proteaza KLK5,

KLK7, hoặc KLK14 cao bất thường trong lớp sừng. Hiện nay, không có chất điều trị cơ bản mà chỉ điều trị triệu chứng như bôi chất làm ẩm.

KLK5 cũng đã được gợi ý là có liên quan đến bệnh trứng cá đỏ, đây là một bệnh viêm mạn tính ở mặt. Ở các bệnh nhân bị bệnh trứng cá đỏ, mức biểu hiện gia tăng của KLK5 và peptit kháng vi sinh vật Cathelicidin đã được thông báo. Mặc dù các chi tiết về nguyên nhân của nó là chưa được biết, đã cho rằng KLK5 có mức biểu hiện tăng làm phân hủy Cathelicidin, bằng cách đó tạo ra peptit gây ra bệnh trứng cá đỏ (tài liệu phi sáng chế 9).

Có nhiều thông báo rằng các đa hình SPINK5 có liên quan đến mức độ nặng của bệnh viêm da dị ứng (các tài liệu phi sáng chế 10 đến 14). Đã có thông báo rằng, trong da của bệnh nhân bị bệnh viêm da dị ứng có các gen SPINK5 mã hóa LEKTI trong đó gốc axit amin 420 là lysin trong cả hai alen, mức biểu hiện Desmoglein1 giảm đi ở cấp độ protein, và hoạt tính của các proteaza, bao gồm KLK5 và KLK7, tăng lên so với trường hợp trong đó axit glutamic được mã hóa trong cả hai alen (tài liệu phi sáng chế 15). Đã cho rằng sự hoạt hóa các proteaza này tạo thuận lợi cho sự xâm nhập của các dị ứng nguyên do sự giảm chức năng hàng rào bảo vệ da và tạo ra tình trạng mà ở đó phản ứng viêm dễ dàng xảy ra.

Chất ức chế serin proteaza Kazal-type 2 (Serine Protease Inhibitor Kazal-type 2, SPINK2) bao gồm vùng giống Kazal có ba liên kết disulfua và hoạt động như chất ức chế trypsin/acrosin (tài liệu phi sáng chế 16), nhưng mối liên hệ của SPINK2 và các thể đột biến của nó với các bệnh như hội chứng Netherton, bệnh trứng cá đỏ, và bệnh viêm da dị ứng chưa được làm rõ.

Danh mục các tài liệu viện dẫn:

Các tài liệu phi sáng chế:

Tài liệu phi sáng chế 1: Ovaere P, et al., công bố năm 2009, Trends Biochem Sci., Vol. 34, No. 9: trang 453-463

Tài liệu phi sáng chế 2: Descargues P, et al., công bố năm 2005, Nat Genet., Vol. 37, No. 1: trang 56-65

Tài liệu phi sáng chế 3: Rattenholl A, et al., công bố năm 2008, Drug News Perspect., Vol. 21, No. 7: trang 369-381

Tài liệu phi sáng chế 4: Hovnanian A., công bố năm 2013, Cell Tissue Res., Vol. 351, No. 2: trang 289-300

Tài liệu phi sáng chế 5: Sarri CA, et al., công bố năm 2017, Mol Diagn Ther., Vol. 21, No. 2: trang 137-152

Tài liệu phi sáng chế 6: Furio L, et al., công bố năm 2015, PLoS Genet., Vol. 11, No. 9: e1005389

Tài liệu phi sáng chế 7: Kasperek P, et al., công bố năm 2017, PLoS Genet., Vol. 13, No. 1: e1006566

Tài liệu phi sáng chế 8: Furio L, et al., công bố năm 2014, J Exp Med., Vol. 211, No. 3: trang 499-513

Tài liệu phi sáng chế 9: Yamasaki K, et al., công bố năm 2007, Nat Med., Vol. 13, No. 8: trang 975-980

Tài liệu phi sáng chế 10: Nishio Y, et al., công bố năm 2003, Genes Immun., Vol. 4, No. 7: trang 515-517

Tài liệu phi sáng chế 11: Kusunoki T, et al., công bố năm 2005, J Allergy Clin Immunol., Vol. 4, No. 7: trang 515-517

Tài liệu phi sáng chế 12: Lan CC, et al., công bố năm 2011, Exp Dermatol., Vol. 20, No. 12: trang 975-979

Tài liệu phi sáng chế 13: Kato A, et al., công bố năm 2003, Br J Dermatol., Vol. 148, No. 4: trang 665-669

Tài liệu phi sáng chế 14: Zhao LP, et al., công bố năm 2012, J Eur Acad Dermatol Venereol., Vol. 26, No. 5: trang 572-577

Tài liệu phi sáng chế 15: Fortugno P, et al., công bố năm 2012, Hum Mol Genet., Vol. 21, No. 19: trang 4187-4200

Tài liệu phi sáng chế 16: Chen T, et al., công bố năm 2009, Proteins., Vol. 77, No. 1: trang 209-219

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất peptit ức chế KLK5 mới, thể liên hợp chứa peptit này, dược phẩm chứa peptit hoặc thể liên hợp này, và tương tự.

Giải pháp cho vấn đề

Sáng chế đề cập đến:

(1) Peptit đột biến SPINK2 chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 61 (Fig.69)

và ức chế hoạt tính proteaza của KLK5 hoạt tính của người;

(2) Peptit theo mục (1), trong đó peptit này ức chế hoạt tính proteaza của KLK7 của người hoặc KLK14 của người;

(3) Peptit theo mục (1), trong đó peptit này ức chế chọn lọc KLK5 của người và tùy ý KLK7 hoặc KLK14 của người;

(4) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3), trong đó Xaa16 (X₁) là Ala, Asp, Gly, Gln, Leu, Ser, hoặc Thr;

(5) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (4), trong đó Xaa17 (X₂) là Arg, Glu, Asn, Gln, hoặc Ser;

(6) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (5), trong đó Xaa18 (X₃) là Asp, Gln, Ile, Thr, Trp, hoặc Tyr;

(7) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (6), trong đó Xaa19 (X₄) là Arg, Gly, Met, Gln, hoặc Thr;

(8) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (7), trong đó Xaa20 (X₅) là Asp, Glu, Leu, Lys, Thr, hoặc Tyr;

(9) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (8), trong đó Xaa21 (X₆) là Glu, Gly, His, Leu, Ser, Gln, hoặc Tyr;

(10) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (9), trong đó Xaa22 (X₇) là Asp, Gly, Gln, Ser, hoặc Tyr;

(11) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (10), trong đó Xaa24 (X₈) là Ala, Asp, Glu, Gly, Asn, Ser, hoặc Thr;

(12) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (11), trong đó Xaa25 (X₉) là Arg hoặc Lys;

(13) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (12), trong đó Xaa26 (X₁₀) là Asp, Glu, Gln, Ser, hoặc Val;

(14) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (13), trong đó Xaa27 (X₁₁) là Phe hoặc Tyr;

- (15) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (14), trong đó Xaa28 (X₁₂) là Asp hoặc Glu;
- (16) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (15), trong đó peptit này bao gồm các axit amin ở các vị trí 1 đến 63 trong trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, và 20 (các hình vẽ Fig.14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, và 28);
- (17) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3), trong đó Xaa16 (X₁) là Gly, Met, hoặc Tyr;
- (18) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (17), trong đó Xaa17 (X₂) là Glu, Gln, hoặc Thr;
- (19) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3), (17), và (18), trong đó Xaa18 (X₃) là His, Met, hoặc Tyr;
- (20) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (17) đến (19), trong đó Xaa19 (X₄) là Ala, Arg, Lys, hoặc Gln;
- (21) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (17) đến (20), trong đó Xaa20 (X₅) là Gly, Arg, hoặc Ser;
- (22) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (17) đến (21), trong đó Xaa21 (X₆) là Arg, Lys, Gln, hoặc Ser;
- (23) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (17) đến (22), trong đó Xaa22 (X₇) là Gly;
- (24) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (17) đến (23), trong đó Xaa24 (X₈) là His, Thr, hoặc Tyr;
- (25) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (17) đến (24), trong đó Xaa25 (X₉) là His hoặc Tyr;
- (26) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (17) đến (25), trong đó Xaa26 (X₁₀) là Asp, Glu, hoặc His;
- (27) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (17) đến (26), trong đó Xaa27 (X₁₁) là Tyr;
- (28) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (17) đến (27), trong đó Xaa28 (X₁₂) là Asp hoặc Glu;

- (29) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (17) đến (28), trong đó peptit này bao gồm các axit amin ở các vị trí 1 đến 63 trong trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 22, 24, 26, và 28 (các hình vẽ Fig.30, 32, 34, và 36);
- (30) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3), trong đó Xaa16 (X₁) là Gly, Ser, hoặc Tyr;
- (31) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (30), trong đó Xaa17 (X₂) là Asp hoặc Gln;
- (32) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3), (30), và (31), trong đó Xaa18 (X₃) là Thr hoặc Val;
- (33) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (30) đến (32), trong đó Xaa19 (X₄) là Thr hoặc Val;
- (34) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (30) đến (33), trong đó Xaa20 (X₅) là Glu hoặc Thr;
- (35) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (30) đến (34), trong đó Xaa21 (X₆) là His hoặc Thr;
- (36) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (30) đến (35), trong đó Xaa22 (X₇) là Tyr;
- (37) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (30) đến (36), trong đó Xaa24 (X₈) là Asn hoặc Ser;
- (38) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (30) đến (37), trong đó Xaa25 (X₉) là Arg;
- (39) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (30) đến (38), trong đó Xaa26 (X₁₀) là Asp hoặc Glu;
- (40) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (30) đến (39), trong đó Xaa27 (X₁₁) là Tyr;
- (41) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (30) đến (40), trong đó Xaa28 (X₁₂) là Asp;
- (42) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (3) và (30) đến (41), trong đó peptit này bao gồm các axit amin ở các vị trí 1 đến 63 trong trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 30 và 32 (các hình vẽ Fig.38 và 40);

- (43) Peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (42), trong đó peptit này có ba liên kết disulfua và có cấu trúc ba chiều được đặc trưng bởi bao gồm cấu trúc vòng, cấu trúc xoắn α , và cấu trúc gấp nếp β ;
- (44) Polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (43);
- (45) Vector chứa polynucleotit theo mục (44);
- (46) Tế bào chứa polynucleotit theo mục (44) hoặc vector theo mục (45) hoặc tạo ra peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (43);
- (47) Phương pháp tạo ra peptit đột biến SPINK2, bao gồm các bước (i) và (ii) dưới đây: (i) nuôi cấy tế bào theo mục (46); và (ii) thu hồi peptit đột biến SPINK2 từ dịch nuôi cấy;
- (48) Phương pháp tạo ra peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (43), bao gồm bước điều chế peptit bằng cách tổng hợp hóa học hoặc dịch mã in-vitro;
- (49) Peptit đột biến SPINK2 thu được bằng phương pháp theo mục (47) hoặc (48);
- (50) Thẻ liên hợp chứa peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (43) và (49) trong đó peptit này được liên kết bởi một và tùy ý nhiều hơn một gốc;
- (51) Thẻ liên hợp theo mục (50), trong đó một hoặc nhiều gốc tùy ý nêu trên bao gồm peptit thứ hai không là thể đột biến SPINK2;
- (52) Thẻ liên hợp theo mục (51), trong đó peptit thứ hai nằm ở phía đầu tận cùng amino của thể đột biến SPINK2;
- (53) Thẻ liên hợp theo mục (51), trong đó peptit thứ hai nằm ở phía đầu tận cùng carboxyl của thể đột biến SPINK2;
- (54) Thẻ liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (51) đến (53), trong đó peptit thứ hai là kháng thể hoặc mảnh của nó và chứa một hoặc nhiều vùng Fc;
- (55) Thẻ liên hợp theo mục (54), trong đó vùng hoặc mỗi vùng Fc này là vùng Fc của globulin miễn dịch của người, hoặc mảnh của nó;
- (56) Thẻ liên hợp theo mục (54) hoặc (55), trong đó vùng hoặc mỗi vùng Fc này là vùng Fc của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, và/hoặc IgE, hoặc mảnh của nó;
- (57) Thẻ liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (54) đến (56), trong đó vùng hoặc mỗi vùng Fc này là vùng Fc của IgG1 của người, hoặc mảnh của nó;

- (58) Thể liên hợp theo mục (57), trong đó vùng hoặc mỗi vùng Fc của IgG1 của người bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 87 (Fig.95);
- (59) Thể liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (54) đến (57), trong đó vùng hoặc mỗi vùng Fc này là kiểu đại hoặc vùng Fc đột biến;
- (60) Thể liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (51) đến (59), trong đó thể liên hợp này chứa một đến một số axit aspartic và/hoặc axit glutamic được bổ sung vào đầu tận cùng amino của nó;
- (61) Thể liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (50) đến (60), trong đó thể liên hợp này bao gồm trình tự axit amin được mô tả trong mục (i) hoặc (ii) dưới đây: (i) trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, và 96 (các hình vẽ Fig.42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, và 106); hoặc (ii) trình tự axit amin của thể liên hợp có mức độ giống bằng hoặc lớn hơn 90% với trình tự axit amin được mô tả trong mục (i) nêu trên và ức chế hoạt tính proteaza của KLK5;
- (62) Thể liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (51) đến (61), trong đó thể đột biến SPINK2 và peptit thứ hai được liên kết với nhau thông qua nhóm liên kết;
- (63) Thể liên hợp theo mục (62), trong đó nhóm liên kết là peptit thứ ba không là thể đột biến SPINK2 hoặc peptit thứ hai;
- (64) Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (50) đến (63), bao gồm các bước (i) và (ii) dưới đây: (i) nuôi cấy tế bào chứa polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của thể liên hợp hoặc vector mà trong đó polynucleotit được chèn vào; và (ii) thu hồi thể liên hợp peptit đột biến SPINK2 hoặc gốc peptit được bao gồm trong thể liên hợp này từ dịch nuôi cấy;
- (65) Phương pháp tạo ra thể liên hợp peptit đột biến SPINK2 theo mục bất kỳ trong số các mục từ (50) đến (63), bao gồm bước điều chế thể liên hợp hoặc gốc peptit được bao gồm trong thể liên hợp này bằng cách tổng hợp hóa học hoặc dịch mã *in-vitro*;
- (66) Thể liên hợp peptit đột biến SPINK2 thu được bằng phương pháp theo mục (64) hoặc (65);
- (67) Kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó mà liên kết với peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (43) và (49);

(68) Chế phẩm chứa peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (43) và (49), polynucleotit theo mục (44), vector theo mục (45), tế bào theo mục (46), thể liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (50) đến (63) và (66), và/hoặc kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục (67);

(69) Dược phẩm chứa peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (43) và (49), polynucleotit theo mục (44), vector theo mục (45), tế bào theo mục (46), và/hoặc thể liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (50) đến (63) và (66);

(70) Dược phẩm theo mục (69), để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh liên quan đến KLK5;

(71) Dược phẩm theo mục (70), trong đó bệnh liên quan đến KLK5 là hội chứng Netherton, bệnh viêm da dị ứng, bệnh trứng cá đỏ, tổn thương da do UV, bệnh vẩy nến, bệnh hen, tổn thương tủy sống, bệnh ung thư, hoặc bệnh thực quản Barrett;

(72) Dược phẩm theo mục bất kỳ trong số các mục từ (69) đến (71), để sử dụng kết hợp với sản phẩm dược bổ sung;

(73) Chế phẩm để xét nghiệm hoặc chẩn đoán chứa peptit theo mục bất kỳ trong số các mục từ (1) đến (43) và (49), polynucleotit theo mục (44), vector theo mục (45), tế bào theo mục (46), thể liên hợp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (50) đến (63) và (66), và/hoặc kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục (67);

(74) Phương pháp theo mục bất kỳ trong số các mục từ (47), (48), (64), và (65), bao gồm bước thực hiện tinh chế ái lực bằng cách sử dụng kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó theo mục (67);

(75) Phương pháp xác định peptit ức chế KLK5 đột biến SPINK2, bao gồm các bước (i) đến (iii) dưới đây: (i) ủ proteaza KLK5 và cơ chất khi có mặt và không có mặt của peptit đột biến SPINK2 thử nghiệm; (ii) đo hoạt tính proteaza của KLK5 khi có mặt và không có mặt của peptit đột biến SPINK2 thử nghiệm; và (iii) xác định peptit là dương tính khi hoạt tính proteaza của KLK5 khi có mặt của peptit này là thấp hơn hoạt tính proteaza của KLK5 khi không có mặt peptit này;

(76) Phương pháp xác định hợp chất ức chế KLK5, bao gồm các bước (i) đến (iii) dưới đây, sử dụng peptit chứa trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, và 32 (các hình vẽ Fig.14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, và 40) hoặc thể liên hợp chứa peptit này làm hợp chất

tham chiếu: (i) ủ proteaza KLK5 và cơ chất khi có mặt và không có mặt hợp chất thử nghiệm; (ii) đo hoạt tính proteaza của KLK5 khi có mặt và không có mặt hợp chất thử nghiệm; và (iii) xác định hợp chất thử nghiệm là dương tính khi hoạt tính proteaza của KLK5 với sự có mặt của hợp chất thử nghiệm là thấp hơn hoạt tính proteaza của KLK5 khi không có mặt hợp chất thử nghiệm;

(77) Phương pháp xác định hợp chất ức chế KLK5, bao gồm các bước (i) đến (iii) dưới đây: (i) đo hoạt tính ức chế proteaza đối với KLK5 của hợp chất thử nghiệm; (ii) đo hoạt tính ức chế proteaza đối với KLK5 của hợp chất tham chiếu là peptit chứa trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, và 32 (các hình vẽ Fig.14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, và 40) hoặc thể liên hợp chứa peptit này; và (iii) xác định hợp chất thử nghiệm là dương tính khi hoạt tính ức chế proteaza đối với KLK5 của hợp chất thử nghiệm là tương đương với hoặc cao hơn hoạt tính ức chế proteaza đối với KLK5 của hợp chất tham chiếu;

(78) Phương pháp đo hoạt tính proteaza KLK5, bao gồm các bước (i) và (ii) dưới đây, sử dụng peptit chứa trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, và 32 (các hình vẽ Fig.14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, và 40) hoặc thể liên hợp chứa peptit này làm hợp chất tham chiếu: (i) ủ proteaza KLK5 với cơ chất, và tùy ý thành phần khác; và (ii) xác định lượng cơ chất và/hoặc lượng sản phẩm sau bước (i);

(79) Peptit đột biến SPINK2 ức chế KLK5 hoặc thể liên hợp peptit đột biến SPINK2, có hằng số phân ly (K_D) đối với KLK5, được xác định bằng phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách cố định peptit hoặc thể liên hợp này và bổ sung KLK5 vào đó, là bằng hoặc nhỏ hơn 1×10^{-9} M;

(80) Thể liên hợp chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 34 (Fig.42);

(81) Thể liên hợp chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 36 (Fig.44);

(82) Thể liên hợp chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 38 (Fig.46);

(83) Thể liên hợp chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 40 (Fig.48);

(84) Thể liên hợp chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 42 (Fig.50);

(85) Thể liên hợp chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 44 (Fig.52);

(86) Thể liên hợp chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 46 (Fig.54);

- (87) Thể liên hợp chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 48 (Fig.56);
 (88) Th thể liên hợp chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 50 (Fig.58);
 (89) Th thể liên hợp chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 52 (Fig.60);
 (90) Th thể liên hợp chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 54 (Fig.62);
 (91) Th thể liên hợp chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 56 (Fig.64);
 (92) Th thể liên hợp chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 58 (Fig.66);
 (93) Th thể liên hợp chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 60 (Fig.68); và
 (94) Th thể liên hợp chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 96 (Fig.106).

Hiệu quả của sáng chế

Peptit được đề xuất bởi sáng chế, thể liên hợp chứa peptit này, và dược phẩm chứa peptit hoặc thể liên hợp này có hoạt tính ức chế KLK5 và có thể dùng để điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh liên quan đến KLK5 (các bệnh này sẽ được mô tả dưới đây).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 bao gồm các hình vẽ so sánh sự giống nhau trong các trình tự axit amin của KLK5, KLK7, và KLK14 của người.

Fig.2 bao gồm các đồ thị thể hiện hoạt tính ức chế KLK5 (nồng độ ức chế 50%: IC₅₀) của mỗi peptit ức chế KLK5, khi sử dụng tỷ lệ phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá hoạt tính ức chế KLK5, KLK5 có nồng độ cuối 10nM và Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng.

Fig.3A bao gồm các đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của mỗi peptit ức chế với các proteaza, khi sử dụng sự phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá hoạt tính ức chế trypsin của bò, trypsin (Pierce, 20233) có nồng độ cuối 5nM và cơ chất peptit Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng. Để đánh giá hoạt tính ức chế trypsin của người, trypsin (Sigma-Aldrich Co. LLC, T6424) có nồng độ cuối 1nM và cơ chất peptit Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng. Để đánh giá hoạt tính ức chế α -chymotrypsin của bò, chymotrypsin (Worthington Biochemical Corporation, LS001434) có nồng độ cuối 10nM và cơ chất peptit Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3120-v) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng.

Fig.3B bao gồm các đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của mỗi peptit ức chế với các proteaza, khi sử dụng sự phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá hoạt tính ức chế chymotrypsin của người, chymotrypsin (Sigma-Aldrich Co. LLC, C8946) có nồng độ cuối 10nM và cơ chất peptit Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3120-v) có nồng độ cuối 10 μ M được sử dụng. Để đánh giá hoạt tính ức chế tryptaza của người, tryptaza (Sigma-Aldrich Co. LLC, T7063) có nồng độ cuối 1nM và cơ chất peptit Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3107-v) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng. Để đánh giá hoạt tính ức chế chymaza của người, chymaza (Sigma-Aldrich Co. LLC, C8118) có nồng độ cuối 100nM và cơ chất peptit Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3120-v) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng.

Fig.3C bao gồm các đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của mỗi peptit ức chế với các proteaza, khi sử dụng sự phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá hoạt tính ức chế plasmin của người, plasmin (Sigma-Aldrich Co. LLC, P1867) có nồng độ cuối 50nM và cơ chất peptit Boc-Val-Leu-Lys-MCA (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3104-v) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng. Để đánh giá hoạt tính ức chế thrombin của người, thrombin (Sigma-Aldrich Co. LLC, T6884) có nồng độ cuối 1nM và cơ chất peptit Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng. Để đánh giá hoạt tính ức chế elastaza bạch cầu trung tính của người, elastaza bạch cầu trung tính (Enzo Life Sciences, BML-SE284) có nồng độ cuối 0,00001 U/ μ l và cơ chất peptit Suc (OMe)-Ala-Ala-Pro-Val-MCA (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3153-v) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng.

Fig.3D bao gồm các đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của mỗi peptit ức chế với các proteaza, khi sử dụng sự phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá hoạt tính ức chế matriptaza của người, matriptaza (R&D Systems, Inc., 3946-SE) có nồng độ cuối 1nM và cơ chất peptit Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES014) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng. Để đánh giá hoạt tính ức chế protein C của người, protein C (Sigma-Aldrich Co. LLC, P2200) có nồng độ cuối 100nM và cơ chất peptit Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3112-v) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng. Để đánh giá hoạt tính ức chế tPA của người, tPA (Sigma-Aldrich Co. LLC,

T0831) có nồng độ cuối 10nM và cơ chất peptit Pyr-Gly-Arg-MCA (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3145-v) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng.

Fig.3E bao gồm các đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của mỗi peptit ức chế với các proteaza, khi sử dụng sự phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá hoạt tính ức chế uPA của người, uPA (Sigma-Aldrich Co. LLC, U0633) có nồng độ cuối 2nM và cơ chất peptit Pyr-Gly-Arg-MCA (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3145-v) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng. Để đánh giá hoạt tính ức chế kalikrein huyết thanh của người, kalikrein huyết thanh (R&D Systems, Inc., 2497-SE) có nồng độ cuối 0,125 μ g/ml và cơ chất peptit Z-Phe-Arg-MCA (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3095-v) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng.

Fig.3F bao gồm các đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của mỗi peptit ức chế với các proteaza, khi sử dụng sự phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá hoạt tính ức chế KLK1 của người, hKLK1 (R&D Systems, Inc., 2337-SE) có nồng độ cuối 0,1 μ g/ml và cơ chất peptit Pro-Phe-Arg-MCA (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3096-v) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng. Để đánh giá hoạt tính ức chế KLK2 của người, hKLK2 (R&D Systems, Inc., 4104-SE) có nồng độ cuối 2 μ g/ml và peptit cơ chất Pro-Phe-Arg-MCA (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3096-v) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng. Để đánh giá hoạt tính ức chế KLK4 của người, hKLK4 (R&D Systems, Inc., 1719-SE) có nồng độ cuối 1 μ g/ml và peptit cơ chất Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng.

Fig.3G bao gồm các đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của mỗi peptit ức chế với các proteaza, khi sử dụng sự phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá hoạt tính ức chế KLK7 của người, hKLK7 có nồng độ cuối 1 μ g/ml và cơ chất peptit Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys (Dnp)-NH₂ (R&D Systems, Inc., ES002) có nồng độ cuối 20 μ M được sử dụng. Để đánh giá hoạt tính ức chế KLK8 của người, hKLK8 (UniProt: O60259, được điều chế bởi các tác giả sáng chế) có nồng độ cuối 5nM và cơ chất peptit Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng. Để đánh giá hoạt tính ức chế KLK12 của người, hKLK12 (R&D Systems, Inc., 3095-SE) có nồng độ cuối 0,1 μ g/ml và cơ chất peptit Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng.

Fig.3H bao gồm các đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của mỗi peptit ức chế với các proteaza, khi sử dụng sự phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá hoạt tính ức chế KLK13 của người, hKLK13 (R&D Systems, Inc., 2625-SE) có nồng độ cuối 0,5 $\mu\text{g/ml}$, cơ chất peptit Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) có nồng độ cuối 100 μM , và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm được sử dụng. Để đánh giá hoạt tính ức chế KLK14 của người, hKLK14 có nồng độ cuối 0,2 $\mu\text{g/ml}$ và cơ chất peptit Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) có nồng độ cuối 100 μM được sử dụng.

Fig.4 là hình vẽ thể hiện phức chất KLK5/peptit ức chế KLK5 thu được bằng cách phân tích cấu trúc tinh thể tia X. Peptit ức chế K51034 được liên kết với vùng chứa vị trí hoạt tính của KLK5.

Fig.5 bao gồm các đồ thị thể hiện hoạt tính ức chế KLK5 (IC_{50}) của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5, khi sử dụng tỷ lệ phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá hoạt tính ức chế KLK5, KLK5 có nồng độ cuối 10nM và Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) có nồng độ cuối 100 μM được sử dụng.

Fig.6A bao gồm các đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế với các proteaza, khi sử dụng sự phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá các hoạt tính ức chế trypsin của bò, trypsin của người, và α -chymotrypsin của người, các điều kiện giống như trên Fig.3A được sử dụng.

Fig.6B bao gồm các đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế với các proteaza, khi sử dụng sự phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá các hoạt tính ức chế chymotrypsin của người, tryptaza của người, và chymaza của người, các điều kiện giống như trên Fig.3B được sử dụng.

Fig.6C bao gồm các đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế với các proteaza, khi sử dụng sự phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá các hoạt tính ức chế plasmin của người, thrombin của người, và elastaza bạch cầu trung tính của người, các điều kiện giống như trên Fig.3C được sử dụng.

Fig.6D bao gồm các đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế với các proteaza, khi sử dụng sự phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ

số. Để đánh giá các hoạt tính ức chế matriptaza của người, protein C của người, và tPA của người, các điều kiện giống như trên Fig.3D được sử dụng.

Fig.6E bao gồm các đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế với các proteaza, khi sử dụng sự phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá hoạt tính ức chế uPA của người và kalikrein huyết tương của người, các điều kiện giống như trên Fig.3E được sử dụng.

Fig.6F bao gồm các đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế với các proteaza, khi sử dụng sự phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá hoạt tính ức chế KLK1 của người, KLK2 của người, và KLK4 của người, các điều kiện giống như trên Fig.3F được sử dụng.

Fig.6G bao gồm các đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế với các proteaza, khi sử dụng sự phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá hoạt tính ức chế KLK7 của người, KLK8 của người, và KLK12 của người, các điều kiện giống như trên Fig.3G được sử dụng.

Fig.6H bao gồm các đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế với các proteaza, khi sử dụng sự phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá hoạt tính ức chế KLK13 của người và KLK14 của người, các điều kiện giống như trên Fig.3H được sử dụng.

Fig.7 là đồ thị thể hiện nhóm được sử dụng thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 có tác dụng ngăn chặn sự mất nước qua biểu bì (transepidermal water loss, TEWL) ở chuột mô hình Crusty2. Với đột biến dị hợp tử SPINK5 (+/-), tình trạng viêm da không phát triển, nhưng với đột biến SPINK5 đồng hợp tử (+/+), tình trạng viêm da phát triển mạnh, điều này làm tăng TEWL. Việc sử dụng thể dung hợp Fc peptit cho chuột nhất Crusty2 có đột biến SPINK5 đồng hợp tử (+/+) đã cải thiện bệnh viêm da và làm giảm TEWL. Số lượng trường hợp chuột nhất Crusty2 (+/-) là 9, và số lượng trường hợp chuột nhất Crusty2 (+/+) là 12, trong mỗi nhóm sử dụng PBS và nhóm sử dụng D1-K50055-Fc. Các thanh lỗi trên hình vẽ thể hiện các lỗi chuẩn.

Fig.8 bao gồm các hình vẽ so sánh mức độ giống trình tự trong SPINK2 của người, D8 và D9 của SPINK5 của người, và SPINK9 của người. Đã biết rằng D8 và D9 của SPINK5 của người, và SPINK9 của người có hoạt tính ức chế KLK5 của người, nhưng đã

thấy rằng mức độ giống trình tự axit amin với SPINK2 của người, mà không có thông báo về hoạt tính ức chế KLK5 của người, là thấp trong tất cả các trường hợp.

Fig.9 là trình tự axit amin của SPINK2 của người (SEQ ID NO: 1).

Fig.10 là trình tự axit amin của KLK5 của người (SEQ ID NO: 2).

Fig.11 là trình tự axit amin của KLK7 của người (SEQ ID NO: 3).

Fig.12 là trình tự axit amin của KLK14 của người (SEQ ID NO: 4).

Fig.13 là trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K50032 (SEQ ID NO: 5).

Fig.14 là trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K50032 (SEQ ID NO: 6).

Fig.15 là trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K50055 (SEQ ID NO: 7).

Fig.16 là trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K50055 (SEQ ID NO: 8).

Fig.17 là trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K51072 (SEQ ID NO: 9).

Fig.18 là trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K51072 (SEQ ID NO: 10).

Fig.19 là trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K50016 (SEQ ID NO: 11).

Fig.20 là trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K50016 (SEQ ID NO: 12).

Fig.21 là trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K51034 (SEQ ID NO: 13).

Fig.22 là trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K51034 (SEQ ID NO: 14).

Fig.23 là trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K50062 (SEQ ID NO: 15).

Fig.24 là trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K50062 (SEQ ID NO: 16).

Fig.25 là trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K51090 (SEQ ID NO: 17).

Fig.26 là trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K51090 (SEQ ID NO: 18).

Fig.27 là trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K50098 (SEQ ID NO: 19).

Fig.28 là trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K50098 (SEQ ID NO: 20).

Fig.29 là trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51028 (SEQ ID NO: 21).

Fig.30 là trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51028 (SEQ ID NO: 22).

Fig.31 là trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51005 (SEQ ID NO: 23).

Fig.32 là trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51005 (SEQ ID NO: 24).

Fig.33 là trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK7 K50031 (SEQ ID NO: 25).

Fig.34 là trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK7 K50031 (SEQ ID NO: 26).

Fig.35 là trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51057 (SEQ ID NO: 27).

Fig.36 là trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51057 (SEQ ID NO: 28).

Fig.37 là trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK14 K51069 (SEQ ID NO: 29).

Fig.38 là trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK14 K51069 (SEQ ID NO: 30).

Fig.39 là trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK14 K50015 (SEQ ID NO: 31).

Fig.40 là trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK14 K50015 (SEQ ID NO: 32).

Fig.41 là trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50032dN-Fc (SEQ ID NO: 33).

Fig.42 là trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50032dN-Fc (SEQ ID NO: 34).

Fig.43 là trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50055-Fc (SEQ ID NO: 35).

Fig.44 là trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50055-Fc (SEQ ID NO: 36).

Fig.45 là trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51072-Fc (SEQ ID NO: 37).

Fig.46 là trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51072-Fc (SEQ ID NO: 38).

Fig.47 là trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50016dN-Fc (SEQ ID NO: 39).

Fig.48 là trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50016dN-Fc (SEQ ID NO: 40).

Fig.49 là trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51034-Fc (SEQ ID NO: 41).

Fig.50 là trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51034-Fc (SEQ ID NO: 42).

Fig.51 là trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50062-Fc (SEQ ID NO: 43).

Fig.52 là trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50062-Fc (SEQ ID NO: 44).

Fig.53 là trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51090-Fc (SEQ ID NO: 45).

Fig.54 là trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51090-Fc (SEQ ID NO: 46).

Fig.55 là trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50098dN-Fc (SEQ ID NO: 47).

Fig.56 là trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50098dN-Fc (SEQ ID NO: 48).

Fig.57 là trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K51028-Fc (SEQ ID NO: 49).

Fig.58 là trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K51028-Fc (SEQ ID NO: 50).

Fig.59 là trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K51005-Fc (SEQ ID NO: 51).

Fig.60 là trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K51005-Fc (SEQ ID NO: 52).

Fig.61 là trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K50031-Fc (SEQ ID NO: 53).

Fig.62 là trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K50031-Fc (SEQ ID NO: 54).

Fig.63 là trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K51057-Fc (SEQ ID NO: 55).

Fig.64 là trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K51057-Fc (SEQ ID NO: 56).

Fig.65 là trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK14 D3-K51069dN-Fc (SEQ ID NO: 57).

Fig.66 là trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK14 D3-K51069dN-Fc (SEQ ID NO: 58).

Fig.67 là trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK14 D3-K50015-Fc (SEQ ID NO: 59).

Fig.68 là trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK14 D3-K50015-Fc (SEQ ID NO: 60).

Fig.69 là công thức của peptit đột biến SPINK2 (SEQ ID NO: 61).

Fig.70 là trình tự nucleotit của đoạn môi 1 (SEQ ID NO: 62).

Fig.71 là trình tự nucleotit của đoạn môi 2 (SEQ ID NO: 63).

Fig.72 là trình tự nucleotit của đoạn môi 3 (SEQ ID NO: 64).

Fig.73 là trình tự nucleotit của đoạn môi 4 (SEQ ID NO: 65).

Fig.74 là trình tự nucleotit của đoạn môi 5 (SEQ ID NO: 66).

Fig.75 là trình tự nucleotit của đoạn môi 6 (SEQ ID NO: 67).

Fig.76 là trình tự nucleotit của đoạn môi 7 (SEQ ID NO: 68).

Fig.77 là trình tự nucleotit của đoạn môi 8 (SEQ ID NO: 69).

Fig.78 là trình tự nucleotit của đoạn môi 9 (SEQ ID NO: 70).

Fig.79 là trình tự nucleotit của đoạn môi 10 (SEQ ID NO: 71).

Fig.80 là trình tự nucleotit của đoạn môi 11 (SEQ ID NO: 72).

Fig.81 là trình tự nucleotit của đoạn môi 12 (SEQ ID NO: 73).

Fig.82 là trình tự nucleotit của đoạn môi 13 (SEQ ID NO: 74).

Fig.83 là trình tự nucleotit của đoạn môi 14 (SEQ ID NO: 75).

Fig.84 là trình tự nucleotit của đoạn môi 15 (SEQ ID NO: 76).

Fig.85 là peptit cơ chất KLK7 (trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 77).

Fig.86 là peptit cơ chất α -chymotrypsin của bò (trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 78).

Fig.87 là peptit cơ chất elastaza bạch cầu trung tính (trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 79).

Fig.88 là peptit cơ chất protein C của người (trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 80).

Fig.89 là trình tự nucleotit của đoạn mồi 16 (SEQ ID NO: 81).

Fig.90 là trình tự nucleotit của đoạn mồi 17 (SEQ ID NO: 82).

Fig.91 là trình tự nucleotit của đoạn mồi 18 (SEQ ID NO: 83).

Fig.92 là trình tự nucleotit của đoạn mồi 19 (SEQ ID NO: 84).

Fig.93 là trình tự nucleotit của đoạn mồi 20 (SEQ ID NO: 85).

Fig.94 là trình tự nucleotit của đoạn mồi 21 (SEQ ID NO: 86).

Fig.95 là trình tự axit amin của Fc của IgG1 của người (SEQ ID NO: 87).

Fig.96 là trình tự axit amin của D8 của SPINK5 của người (SEQ ID NO: 88).

Fig.97 là trình tự axit amin của D9 của SPINK5 của người (SEQ ID NO: 89).

Fig.98 là trình tự axit amin của SPINK9 của người (SEQ ID NO: 90).

Fig.99 là trình tự axit amin của KLK5 của chuột nhắt (SEQ ID NO: 91).

Fig.100 là trình tự axit amin của KLK7 của chuột nhắt (SEQ ID NO: 92).

Fig.101 là trình tự axit amin của KLK14 của chuột nhắt (SEQ ID NO: 93).

Fig.102 bao gồm các đồ thị đánh giá hoạt tính ức chế KLK5 của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 ($n = 3$, giá trị trung bình $\pm$ SD), khi sử dụng tỷ lệ phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số, để tính các hằng số ức chế K_i . Để đánh giá hoạt tính ức chế KLK5, KLK5 có nồng độ cuối 10nM và Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng.

Fig.103A bao gồm các sơ đồ để đánh giá hoạt tính ức chế KLK5 của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5, khi sử dụng sự phân hủy Desmoglein1 của người làm chỉ số. Để đánh giá hoạt tính ức chế KLK5, KLK5 có nồng độ cuối 1 μ M và protein thể khảm Desmoglein-1 Fc tái tổ hợp của người (R&D Systems, Inc., 944-DM-100) có nồng độ cuối 1 μ M được sử dụng. Việc phân tích được thực hiện bằng phương pháp thấm Western bằng

cách sử dụng kháng thể Desmoglein 1 (aa471-499) (LSBio, LS-C167542) và mảnh F(ab')₂ liên kết với HRP, kháng IgG thỏ của lừa (GE healthcare, NA9340V).

Fig.103B bao gồm các sơ đồ đánh giá hoạt tính ức chế KLK5 của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5, khi sử dụng sự phân hủy Desmocollin1 của người làm chỉ số. Để đánh giá hoạt tính ức chế KLK5, KLK5 có nồng độ cuối 0,2 μ M và protein Desmocollin-1 tái tổ hợp của người có đuôi His đầu tận cùng C (R&D Systems, Inc., 4955-DC-050) có nồng độ cuối 2 μ M được sử dụng. Việc phân tích được thực hiện bằng phương pháp thẩm Western bằng cách sử dụng thể liên hợp Penta His HRP (QIAGEN, 34460).

Fig.104 là trình tự nucleotit của đoạn mỗi 22 (SEQ ID NO: 94).

Fig.105 là trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D1-K50055-Fc (SEQ ID NO: 95).

Fig.106 là trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D1-K50055-Fc (SEQ ID NO: 96).

Fig.107A là đồ thị thể hiện hoạt tính ức chế KLK5 (IC₅₀) của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D1-K50055-Fc, khi sử dụng tỷ lệ phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Để đánh giá hoạt tính ức chế KLK5, KLK5 có nồng độ cuối 10nM và Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) có nồng độ cuối 100 μ M được sử dụng.

Fig.107B là đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D1-K50055-Fc với KLK7, khi sử dụng tỷ lệ phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Các điều kiện giống như trên Fig.3G được sử dụng.

Fig.107C là đồ thị để đánh giá khả năng phản ứng chéo của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D1-K50055-Fc với KLK14, khi sử dụng tỷ lệ phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Các điều kiện giống như trên Fig.3H được sử dụng.

Mô tả chi tiết sáng chế

1. Định nghĩa

Theo sáng chế, thuật ngữ "gen" nghĩa là phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của protein hoặc sợi bổ sung của nó. Nghĩa của "gen" này bao gồm sự liên kết dạng sợi đơn, sợi kép, sợi ba hoặc nhiều sợi hơn của sợi ADN và sợi ARN, và hỗn hợp của các ribonucleotit và các deoxyribonucleotit trên một sợi, và các phân tử axit nucleic sợi kép, sợi ba hoặc nhiều sợi hơn chứa các sợi này.

Theo sáng chế, "gen", "polynucleotit", và "các phân tử axit nucleic" có nghĩa giống nhau và không bị giới hạn chút nào bởi số lượng các ribonucleotit, deoxyribonucleotit, nucleotit, nucleosit, và tương tự, đây là các đơn vị cấu tạo của chúng. Ví dụ, ADN, ARN, mARN, cADN, cARN, đoạn dò, oligonucleotit, đoạn mồi, và tương tự, cũng được bao gồm trong phạm vi của các thuật ngữ này. "Các phân tử axit nucleic" có thể được viết tắt là "các axit nucleic".

Theo sáng chế, "polypeptit", "peptit", và "protein" có nghĩa giống nhau.

Theo sáng chế, peptit mà nhận biết phân tử đích X hoặc liên kết với phân tử đích X (sau đây, tác dụng nhận biết hoặc liên kết này sẽ được gọi chung là "hoạt tính liên kết X") có thể được gọi là "peptit liên kết X". Ngoài ra, peptit mà nhận biết phân tử đích X hoặc liên kết với phân tử đích X và ức chế hoặc ngăn chặn một hoặc nhiều hoạt tính hoặc chức năng của phân tử đích X (sau đây, tác dụng ức chế hoặc ngăn chặn này sẽ được gọi chung là "hoạt tính ức chế X") có thể được gọi là "peptit ức chế X".

Theo sáng chế, "SPINK2" có nghĩa là chất ức chế serin proteaza Kazal-typ 2, đây là protein 7kDa bao gồm vùng giống Kazal có ba liên kết disulfua. SPINK2 tốt hơn là thu được từ người. Theo sáng chế, SPINK2 của người (SEQ ID NO: 1, Fig.9) sẽ được gọi đơn giản là "SPINK2", trừ khi được nói rõ theo cách khác.

Theo sáng chế, "KLK5" là protein bao gồm propeptit đầu tận cùng N và vùng có hoạt tính proteaza và có hoạt tính proteaza giống trypsin và giống chymotrypsin với mạch đường dạng N được bổ sung ở ba vị trí. KLK5 tốt hơn là thu được từ người. Theo sáng chế, KLK5 của người (SEQ ID NO: 2, Fig.10) có thể được gọi đơn giản là "KLK5", trừ khi được nói rõ theo cách khác.

Theo sáng chế, "KLK7" là protein bao gồm propeptit đầu tận cùng N và vùng có hoạt tính proteaza giống trypsin, có mạch đường dạng N được bổ sung vào. KLK7 tốt hơn là thu được từ người. Theo sáng chế, KLK7 của người (SEQ ID NO: 3, Fig.11) có thể được gọi đơn giản là "KLK7", trừ khi được nói rõ theo cách khác.

Theo sáng chế, "KLK14" còn được gọi là neuropsin và là protein bao gồm propeptit đầu tận cùng N và vùng có hoạt tính proteaza giống trypsin, với mạch đường dạng N được bổ sung vào. KLK14 tốt hơn là thu được từ người. Theo sáng chế, KLK14 của người (SEQ

ID NO: 4, Fig.12) có thể được gọi đơn giản là "KLK14", trừ khi được nói rõ theo cách khác.

Theo sáng chế, "KLK5 dạng tiền chất" nghĩa là tiền KLK5, bao gồm propeptit và vùng có hoạt tính proteaza. "KLK5 hoạt tính" nghĩa là KLK5 hoạt tính, bao gồm vùng có hoạt tính proteaza. KLK5 hoạt tính tốt hơn là thu được từ người.

Theo sáng chế, "KLK7 dạng tiền chất" nghĩa là tiền KLK7, bao gồm propeptit và vùng có hoạt tính proteaza. "KLK7 hoạt tính" nghĩa là KLK7 hoạt tính, bao gồm vùng có hoạt tính proteaza. KLK7 hoạt tính tốt hơn là thu được từ người.

Theo sáng chế, "KLK14 dạng tiền chất" nghĩa là tiền KLK14, bao gồm propeptit và vùng có hoạt tính proteaza. "KLK14 hoạt tính" nghĩa là KLK14 hoạt tính, bao gồm vùng có hoạt tính proteaza. KLK14 hoạt tính tốt hơn là thu được từ người.

Theo sáng chế, "peptit ức chế KLK5", "peptit ức chế KLK5/KLK7", hoặc "peptit ức chế KLK5/KLK14" lần lượt có nghĩa là peptit ức chế hoặc ngăn chặn một hoặc nhiều hoạt tính hoặc chức năng của KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14.

Phạm vi của các thuật ngữ "peptit ức chế KLK5", "peptit ức chế KLK5/7", và "peptit ức chế KLK5/KLK14" bao gồm các đoạn của peptit này, và thể liên hợp được tạo ra bằng cách bổ sung hoặc liên kết các gốc khác với peptit này hoặc các mảnh của nó mà duy trì hoạt tính ức chế (liên kết) KLK5, hoạt tính ức chế (liên kết) KLK5/KLK7, hoặc hoạt tính ức chế (liên kết) KLK5/KLK14 một cách tương ứng. Tức là, "peptit ức chế KLK5", "peptit ức chế KLK5/KLK7", hoặc "peptit ức chế KLK5/KLK14" bao gồm các đoạn, sản phẩm cộng, và các dạng được cải biến (như thể liên hợp) của peptit này mà duy trì hoạt tính ức chế (liên kết) KLK5, hoạt tính ức chế (liên kết) KLK5 và hoạt tính ức chế (liên kết) KLK7, hoặc hoạt tính ức chế (liên kết) KLK5 và hoạt tính ức chế (liên kết) KLK14 một cách tương ứng.

Theo sáng chế, "các vị trí" mà peptit liên kết với, tức là, "các vị trí" được nhận ra bởi peptit có nghĩa là trình tự axit amin liên tục hoặc gián đoạn một phần hoặc các cấu trúc bậc cao hơn một phần trên các phân tử đích mà peptit liên kết với hoặc nhận ra. Theo sáng chế, các vị trí này có thể được gọi là các epitop hoặc các vị trí liên kết trên các phân tử đích.

Theo sáng chế, "tế bào" bao gồm các tế bào khác nhau thu được từ các cá thể động vật, các tế bào cấy chuyển, các tế bào nuôi cấy sơ cấp, các dòng tế bào, các tế bào tái tổ hợp, nấm men, và các vi sinh vật.

Theo sáng chế, "thể đột biến SPINK2" nghĩa là peptit chứa trình tự axit amin được tạo ra bằng cách thay thế một hoặc nhiều axit amin bằng axit amin khác với các axit amin kiểu dại, xóa một hoặc nhiều axit amin kiểu dại, hoặc chèn một hoặc nhiều axit amin không được phát hiện trong kiểu dại (sau đây chúng sẽ được gọi chung là "đột biến"), trong trình tự axit amin của SPINK2 kiểu dại. "Các thể đột biến SPINK2" mà có hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5 và hoạt tính ức chế KLK7 (hoạt tính ức chế KLK5/KLK7), hoặc hoạt tính ức chế KLK5 và hoạt tính ức chế KLK14 (hoạt tính ức chế KLK5/KLK14) được bao gồm trong peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14. Theo sáng chế, "sự chèn" có thể được bao gồm trong phạm vi của "sự bổ sung".

Theo sáng chế, "một số" trong cụm từ "một đến một số" nghĩa là ba đến mười.

Theo sáng chế, cụm từ "lai trong các điều kiện nghiêm ngặt" nghĩa là lai trong dung dịch chứa $5 \times \text{SSC}$ ở 65°C và sau đó rửa trong dung dịch nước chứa $2 \times \text{SSC}$ -0,1%SDS ở 65°C trong 20 phút, trong dung dịch nước chứa $0,5 \times \text{SSC}$ -0,1%SDS ở 65°C trong 20 phút, và trong dung dịch nước chứa $0,2 \times \text{SSC}$ -0,1%SDS ở 65°C trong 20 phút, hoặc lai trong điều kiện tương đương với các điều kiện trên. SSC nghĩa là dung dịch nước 150mM NaCl-15mM natri xitrat, và " $n \times \text{SSC}$ " nghĩa là SSC có nồng độ n lần.

Theo sáng chế, các thuật ngữ "đặc hiệu" và "tính đặc hiệu" có nghĩa giống như "chọn lọc" và "tính chọn lọc" một cách tương ứng, và có thể thay đổi lẫn nhau. Ví dụ, peptit ức chế đặc hiệu KLK5 có nghĩa giống như peptit ức chế chọn lọc KLK5, và peptit ức chế đặc hiệu KLK5 và KLK7 có nghĩa giống như peptit ức chế chọn lọc KLK5 và KLK7 một cách tương ứng.

2. Peptit

2-1. Axit amin

Thuật ngữ "axit amin" có nghĩa là hợp chất hữu cơ chứa nhóm amino và nhóm carboxyl, và tốt hơn là có nghĩa là α -axit amin được chứa dưới dạng đơn vị cấu tạo trong protein, tốt hơn nữa là trong protein tự nhiên. Theo sáng chế, các ví dụ thích hợp hơn về

axit amin bao gồm Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, và Val, và thuật ngữ "axit amin" nghĩa là tổng cộng 20 axit amin này, nếu không được lưu ý theo cách khác. Tổng cộng 20 axit amin này có thể được gọi là "axit amin tự nhiên". Peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế tốt hơn là chứa axit amin tự nhiên.

Theo sáng chế, "các gốc axit amin" có thể được viết tắt là "các axit amin".

Ngoài ra, theo sáng chế, axit amin có thể là L-axit amin, D-axit amin, hoặc hỗn hợp của nó (DL-axit amin) nhưng có nghĩa là L-axit amin nếu không được quy định theo cách khác.

Axit amin tự nhiên có thể được phân loại, ví dụ, thành các nhóm sau dựa trên các đặc tính của các mảnh bên chung của chúng:

- (1) nhóm axit amin kỵ nước: Met, Ala, Val, Leu, và Ile;
- (2) nhóm axit amin trung tính ưa nước: Cys, Ser, Thr, Asn, và Gln;
- (3) nhóm axit amin có tính axit: Asp và Glu;
- (4) nhóm axit amin có tính bazơ: His, Lys, và Arg;
- (5) nhóm axit amin ảnh hưởng đến sự định hướng của mạch chính: Gly và Pro; và
- (6) nhóm axit amin thơm: Trp, Tyr, và Phe.

Tuy nhiên, sự phân loại axit amin tự nhiên không bị giới hạn ở các nhóm này.

Theo sáng chế, axit amin tự nhiên có thể được thay thế axit amin bảo toàn.

Thuật ngữ "sự thay thế axit amin bảo toàn" nghĩa là sự thay thế bằng axit amin tương đương hoặc tương tự về chức năng. Sự thay thế axit amin bảo toàn trong peptit dẫn đến sự thay đổi tính trong trình tự axit amin của peptit này. Ví dụ, một hoặc nhiều axit amin có độ phân cực giống nhau tác dụng tương đương về mặt chức năng, dẫn đến sự thay đổi tính trong trình tự axit amin của peptit. Nói chung, sự thay thế trong một nhóm có thể được cho là bảo toàn về cấu trúc và chức năng. Tuy nhiên, như sẽ rõ đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này, vai trò của gốc axit amin cụ thể có thể được xác định trong ngữ cảnh cấu trúc ba chiều của các phân tử chứa axit amin. Ví dụ, gốc cysteine có thể có dạng được oxy hóa (disulfua) ít phân cực hơn, so với dạng khử (thiol). Gốc béo dài của mạch bên arginin có thể tạo thành đặc điểm quan trọng về cấu trúc và chức năng. Ngoài ra, mạch bên chứa vòng thơm (như tryptophan, tyrosin, và phenylalanin) có thể góp phần vào các tương tác ion-

thơm hoặc các tương tác cation-pi. Trong trường hợp này, ngay cả khi axit amin có các mạch bên này được thế bằng axit amin thuộc nhóm axit hoặc không phân cực, chúng có thể được bảo toàn về mặt cấu trúc và chức năng. Các gốc như prolin, glyxin, và xystein (dạng disulfua) có thể có tác dụng trực tiếp lên cấu trúc ba chiều của mạch chính và thường không thể được thế mà không làm biến dạng cấu trúc.

Sự thay thế axit amin bảo toàn bao gồm sự thay thế đặc hiệu (L. Lehninger, Biochemistry, 2nd edition, pp73-75, Worth Publisher, New York (1975)) và các thay thế thông thường dựa trên sự giống nhau của các mạch bên, như được thể hiện dưới đây:

- (1) nhóm axit amin không phân cực: alanin (sau đây nó sẽ được gọi là "Ala" hoặc đơn giản là "A"), valin (sau đây nó sẽ được gọi là "Val" hoặc đơn giản là "V"), leuxin (sau đây nó sẽ được gọi là "Leu" hoặc đơn giản là "L"), isoleuxin (sau đây nó sẽ được gọi là "Ile" hoặc đơn giản là "I"), prolin (sau đây nó sẽ được gọi là "Pro" hoặc đơn giản là "P"), phenylalanin ("Phe" hoặc đơn giản là "F"), tryptophan (sau đây nó sẽ được gọi là "Trp" hoặc đơn giản là "W"), và methionin (sau đây nó sẽ được gọi là "Met" hoặc đơn giản là "M");
- (2) nhóm axit amin phân cực không mang điện tích: glyxin (sau đây nó sẽ được gọi là "Gly" hoặc đơn giản là "G"), serin (sau đây nó sẽ được gọi là "Ser" hoặc đơn giản là "S"), threonin (sau đây nó sẽ được gọi là "Thr" hoặc đơn giản là "T"), xystein (sau đây nó sẽ được gọi là "Cys" hoặc đơn giản là "C"), tyrosin (sau đây nó sẽ được gọi là "Tyr" hoặc đơn giản là "Y"), asparagin (sau đây nó sẽ được gọi là "Asn" hoặc đơn giản là "N"), và glutamin (sau đây nó sẽ được gọi là "Gln" hoặc đơn giản là "Q");
- (3) nhóm axit amin có tính axit: axit aspartic (sau đây nó sẽ được gọi là "Asp" hoặc đơn giản là "D") và axit glutamic (sau đây nó sẽ được gọi là "Glu" hoặc đơn giản là "E"); và
- (4) nhóm axit amin có tính bazơ: lysin (sau đây nó sẽ được gọi là "Lys" hoặc đơn giản là "K"), arginin (sau đây nó sẽ được gọi là "Arg" hoặc đơn giản là "R"), và histidin (sau đây nó sẽ được gọi là "His" hoặc đơn giản là "H").

Theo sáng chế, axit amin có thể là axit amin khác với axit amin tự nhiên. Các ví dụ của nó có thể bao gồm axit amin được tìm thấy trong các peptit hoặc protein tự nhiên, như selenoxystein, N-formylmethionin, pyrrolidin, axit pyroglutamic, xystin, hydroxyprolin, hydroxylysin, thyroxin, O-phosphoserin, desmosin, β -alanin, sarcosin, ornithin, creatin, axit γ aminobutyric, opin, theanin, axit tricolominic, axit kainic, axit domoic, và axit

acromelic, và axit amin khác không được tìm thấy trong thế giới tự nhiên, như axit amin được bảo vệ đầu tận cùng N bao gồm norleuxin, Ac-axit amin, Boc-axit amin, Fmoc-axit amin, Trt-axit amin, và Z-axit amin, axit amin được bảo vệ đầu tận cùng C bao gồm axit amin t-butyl este, benzyl este, xyclohexyl este, và florenyl este, diamin, ω axit amin, β axit amin, γ axit amin, các dẫn xuất Tic của axit amin, và axit aminophosphonic. Tuy nhiên, không giới hạn ở các axit amin này, và axit amin khác với 20 "axit amin tự nhiên" nêu trên sẽ được gọi chung là "axit amin không tự nhiên" theo sáng chế để thuận tiện cho việc mô tả.

2-2. Peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, và peptit ức chế KLK5/KLK14

Peptit theo sáng chế có hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc hoạt tính ức chế KLK5/KLK14.

KLK5, KLK7, và KLK14 được hướng đích bởi peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, và peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế tốt hơn là thu được từ động vật có xương sống, tốt hơn nữa là động vật có vú, còn tốt hơn nữa là động vật linh trưởng, tốt nhất là người. KLK5, KLK7, và KLK14 có thể được tinh chế từ các mô hoặc tế bào, hoặc được điều chế bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này dưới dạng các phương pháp điều chế protein như tái tổ hợp gen, dịch mã in-vitro, và tổng hợp peptit. Trình tự tín hiệu, vùng Fc của globulin miễn dịch, đuôi, chất đánh dấu, và tương tự có thể được liên kết với KLK5, KLK7, và KLK14. Hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, và hoạt tính ức chế KLK5/KLK14 có thể được đánh giá bằng cách sử dụng hoạt tính proteaza của KLK5, KLK5 và KLK7, và KLK5 và KLK14, làm chỉ số. Ví dụ, khi KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14, hoặc đoạn chức năng của nó được để đồng tồn tại với cơ chất và peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế hoặc ứng viên của nó, sự ức chế KLK5, sự ức chế KLK5/KLK7, hoặc sự ức chế KLK5/KLK14 xảy ra khi hoạt tính proteaza của KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14 là bằng hoặc nhỏ hơn 70%, bằng hoặc nhỏ hơn 50%, bằng hoặc nhỏ hơn 30%, bằng hoặc nhỏ hơn 20%, bằng hoặc nhỏ hơn 10%, bằng hoặc nhỏ hơn 5%, bằng hoặc nhỏ hơn 1%, hoặc 0%, so với hoạt tính khi sự có mặt chất đối chứng hoặc khi không có mặt chất ức chế này hoặc ứng viên của nó. Hoạt tính ức chế là bằng hoặc lớn hơn 30%, bằng hoặc lớn hơn 50%, bằng hoặc lớn hơn 70%, bằng hoặc lớn

hơn 80%, bằng hoặc lớn hơn 90%, bằng hoặc lớn hơn 95%, bằng hoặc lớn hơn 99%, hoặc 100% một cách tương ứng. Hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, và hoạt tính ức chế KLK5/KLK14 có thể thay đổi phụ thuộc vào điều kiện phản ứng, loại cơ chất, nồng độ, và tương tự. Điều kiện phản ứng có thể được ví dụ bằng các điều kiện được mô tả trong các ví dụ, nhưng chúng không bị giới hạn ở các ví dụ này. Hoạt tính enzym có thể được đánh giá bằng cách bổ sung peptit cơ chất hoặc protein cơ chất vào KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14 ở nồng độ nhất định và để nó phản ứng trong thời gian nhất định và sau đó phát hiện sự phát huỳnh quang của cơ chất peptit hoặc cơ chất protein bằng SDS-PAGE, phương pháp thấm Western, sắc ký chất lỏng, hoặc tương tự. Để làm chất đệm, dung dịch nước muối đệm phosphat (sau đây nó sẽ được gọi là "PBS"), dung dịch đệm tris (50mM tris, pH 7 đến 8,5, ví dụ, pH 7,5), và tương tự có thể được sử dụng, và muối như NaCl (0 đến 200mM, ví dụ, 200mM), CaCl_2 (0 đến 10mM, ví dụ, 2mM), ZnCl_2 , và Brij-35 có thể được bổ sung vào đó. Tuy nhiên, không giới hạn ở các chất này.

Mỗi hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, và hoạt tính ức chế KLK5/KLK14 có thể được thể hiện bằng hằng số ức chế K_i . Hoạt tính proteaza được xác định bằng cách bổ sung peptit cơ chất vào enzym ở nồng độ nhất định và để nó phản ứng trong thời gian nhất định và sau đó phát hiện sự phát huỳnh quang của peptit cơ chất này. Từ hoạt tính proteaza ở mỗi nồng độ cơ chất, tốc độ phản ứng tối đa $V_{\max}$ và hằng số Michaelis K_m được tính theo công thức Michaelis-Menten (Michaelis L, et al. (2011) *Biochemistry.*, Vol. 50, No. 39, trang 8264-8269). Ngoài ra, hằng số ức chế K_i được tính từ hoạt tính proteaza khi mỗi chất ức chế được bổ sung vào enzym ở nồng độ nhất định theo công thức Morrison (Morrison JF. (1969) *Biochim Biophys Acta.*, Vol. 185, No. 2, trang 269-286). Các ví dụ về chương trình phần mềm được sử dụng cho việc tính này có thể bao gồm GraphPad Prism (GraphPad Software Inc).

Cơ chất proteaza của KLK5, KLK7 và KLK5, hoặc KLK5 và KLK14 là không bị giới hạn cụ thể và có thể là cơ chất nội sinh, cơ chất ngoại sinh, cơ chất tổng hợp, hoặc tương tự. Các ví dụ về cơ chất nội sinh của người của KLK5 có thể bao gồm kininogen hoặc kalistatin có trọng lượng phân tử thấp, collagen, Desmoglein, Desmocollin, và Cathelicidin. Các ví dụ về cơ chất nội sinh của người của KLK7 có thể bao gồm tiền KLK3, fibronectin, và collagen. Các ví dụ về cơ chất nội sinh của người của KLK14 có thể bao

gồm tPA, fibronectin, và collagen. Gelatin thu được bằng cách biến tính bằng nhiệt collagen cũng có thể được sử dụng làm cơ chất. Cơ chất tổng hợp là không bị giới hạn cụ thể, nhưng các ví dụ của nó có thể bao gồm PFR-AMC và Boc-VPR-AMC. Theo sáng chế, mỗi hoạt tính ức chế KLK5 (IC_{50} hoặc K_i) của peptit ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5 của peptit ức chế KLK5/KLK7, và hoạt tính ức chế KLK5 và hoạt tính ức chế KLK14 của peptit ức chế KLK5/KLK14 là bằng hoặc nhỏ hơn $1\mu M$ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là bằng hoặc nhỏ hơn $300nM$, tốt hơn nữa là bằng hoặc nhỏ hơn $100nM$, còn tốt hơn là $30nM$, còn tốt hơn nữa là bằng hoặc nhỏ hơn $10nM$. Hoạt tính ức chế KLK7 của peptit ức chế KLK5/KLK7 tốt hơn là bằng hoặc nhỏ hơn $1000nM$, tốt hơn nữa là bằng hoặc nhỏ hơn $300nM$, còn tốt hơn là $100nM$, còn tốt hơn nữa là bằng hoặc nhỏ hơn $30nM$. Ngoài ra, sự phân loại peptit ức chế KLK5/KLK7 hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 có thể được thực hiện theo mức độ tương đối của hoạt tính ức chế KLK5 và hoạt tính ức chế KLK7 hoặc hoạt tính ức chế KLK14 (mỗi hoạt tính được thể hiện bằng IC_{50} hoặc K_i). Các peptit tốt hơn là được phân loại thành ba nhóm: (i) hoạt tính ức chế KLK5 là nhỏ hơn 0,5 lần hoạt tính ức chế KLK7 hoặc hoạt tính ức chế KLK14; (ii) hoạt tính ức chế KLK5 là lớn hơn 0,5 lần và nhỏ hơn 2 lần hoạt tính ức chế KLK7 hoặc hoạt tính ức chế KLK14; và (iii) hoạt tính ức chế KLK5 bằng hoặc lớn hơn 2 lần hoạt tính ức chế KLK7 hoặc hoạt tính ức chế KLK14, và các peptit mong muốn có thể được chọn từ các nhóm này theo ứng dụng của chúng, như điều trị.

Ngoài ra, peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế tốt hơn là không ức chế hoặc ngăn chặn hoạt tính proteaza khác với KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14 một cách tương ứng, hoặc mức độ ức chế hoặc ngăn chặn đối với các hoạt tính proteaza khác tốt hơn là tương đối yếu. Nói cách khác, hoạt tính ức chế proteaza của peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế tốt hơn là có tính chọn lọc KLK5, tính chọn lọc KLK5/KLK7, hoặc tính chọn lọc KLK5/KLK14 cao. Peptit theo sáng chế tốt hơn là không ức chế hoặc ngăn chặn hoạt tính của các proteaza như KLK1, KLK2, KLK3, KLK4, KLK6, KLK8, KLK9 đến KLK13, KLK15, chymotrypsin, tryptaza, chymaza, plasmin, thrombin, elastaza, matriptaza, protein C, chất hoạt hóa plasminogen mô (tissue plasminogen activator, tPA), chất hoạt hóa urokinaza plasminogen (urokinase plasminogen activator, uPA), và kalikrein huyết thanh, hoặc mức độ ức chế hoặc ngăn chặn đối với

chúng là tương đối yếu. Peptit được ưu tiên này theo sáng chế không có các tác dụng phụ gây bởi việc ức chế hoặc ngăn chặn hoạt tính của các proteaza khác và thích hợp để được sử dụng làm chất điều trị hoặc phòng ngừa đối với các bệnh liên quan đến KLK5 (các bệnh này sẽ được mô tả dưới đây). Ngoài ra, peptit ức chế đặc hiệu KLK5 theo sáng chế tốt hơn là không ức chế hoặc ngăn chặn hoạt tính proteaza của KLK7 và KLK14, hoặc mức độ ức chế hoặc ngăn chặn đối với chúng là tương đối yếu; peptit ức chế đặc hiệu KLK5/KLK7 theo sáng chế tốt hơn là không ức chế hoặc ngăn chặn hoạt tính proteaza của KLK14, hoặc mức độ ức chế hoặc ngăn chặn đối với nó là tương đối yếu; và peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế tốt hơn là không ức chế hoặc ngăn chặn hoạt tính proteaza của KLK7, hoặc mức độ ức chế hoặc ngăn chặn đối với nó là tương đối yếu.

Chất ức chế mà có tính chọn lọc thấp đối với KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14 và ức chế hoạt tính proteaza của các KLK khác ngoài KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14, tức là, các chất ức chế không chọn lọc có thể gây ra các tác dụng phụ khi được sử dụng cho người (Coussens, LM, et al., Science, Vol. 295, No. 5564, trang 2387-2392 (2002); Bissett, D, et al., J.Clin.Oncol., Vol. 23, No. 4, trang 842-849 (2005)). Trong khi đó, các chất ức chế mà có tính chọn lọc cao đối với KLK5, KLK5/KLK7, hoặc KLK5/KLK14, tức là, peptit ức chế đặc hiệu KLK5, peptit ức chế đặc hiệu KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế đặc hiệu KLK5/KLK14 có thể tránh được các tác dụng phụ này như được mô tả ở trên và do đó là thích hợp để được sử dụng để điều trị và phòng ngừa các bệnh liên quan đến KLK5 (các bệnh này sẽ được mô tả dưới đây).

Peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế có thể có tính cạnh tranh trong việc liên kết cơ chất proteaza với KLK5, KLK5 và/hoặc KLK7, hoặc KLK5 và/hoặc KLK14.

Như được mô tả ở trên, KLK5, KLK7, và KLK14 được hướng đích bởi peptit theo sáng chế thu được từ động vật có xương sống, tốt hơn là động vật có vú, tốt hơn nữa là động vật linh trưởng, còn tốt hơn nữa là người nhưng có thể thu được từ động vật có vú không phải người, ví dụ, các động vật gặm nhấm như chuột và chuột nhắt, và động vật linh trưởng như khỉ *Cynomolgus*, khỉ sóc thông thường, và khỉ nâu. Các peptit có hoạt tính ức chế đối với KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14 có nguồn gốc động vật không phải người có thể được sử dụng, ví dụ, để chẩn đoán, xét nghiệm, điều trị, hoặc phòng ngừa

các bệnh liên quan đến KLK5 ở động vật có vú không phải người. Ngoài ra, khi các peptit này còn ức chế KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14 của người, các xét nghiệm được lý và các xét nghiệm được động học sử dụng động vật có vú không phải người này làm mô hình bệnh ở động vật, các xét nghiệm về độ an toàn và các xét nghiệm về độc tính sử dụng chúng làm động vật khỏe mạnh, và tương tự có thể được thực hiện trong việc nghiên cứu phi lâm sàng và phát triển các peptit này dưới dạng chất điều trị hoặc phòng bệnh đối với các bệnh liên quan đến KLK5 (các bệnh này sẽ được mô tả dưới đây).

Ngoài ra, peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, và peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế có các ưu điểm như trọng lượng phân tử thấp, tương đối dễ sản xuất (điều này sẽ được mô tả dưới đây), các đặc tính vật lý tuyệt vời như độ ổn định bảo quản và độ ổn định nhiệt, và có rất nhiều lựa chọn đối với đường sử dụng, phương pháp sử dụng, bào chế, v.v., khi được sử dụng làm dược phẩm (điều này sẽ được mô tả dưới đây), so với các polyme sinh học khác như các kháng thể được sử dụng trong lĩnh vực này dưới dạng dược phẩm và chất chẩn đoán. Ngoài ra, thời gian bán hủy trong máu khi được sử dụng làm dược phẩm có thể được điều chỉnh kéo dài hơn bằng cách áp dụng phương pháp đã biết như bổ sung các polyme sinh học và các polyme để làm tăng trọng lượng phân tử của peptit theo sáng chế. Peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, và peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 10.000, tốt hơn là nhỏ hơn 8000, tốt hơn nữa là khoảng 7000 đến 7200. Ngoài ra, các gốc vòng biến đổi bao gồm Cys15 đến Cys31 trong SEQ ID NO: 61 (Fig.69) hoặc các gốc bao gồm Cys15 đến Cys63 (sau đây, được gọi là "các gốc chứa sáu gốc Cys") có hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc hoạt tính ức chế KLK5/KLK14 cũng được bao gồm trong peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế một cách tương ứng. Các gốc vòng biến đổi có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 2500, tốt hơn là khoảng 1800 đến 2000, và các gốc chứa sáu Cys có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 6000, tốt hơn là khoảng 5300 đến 5500.

Peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế là thể đột biến SPINK2 (sau đây có thể được viết tắt là "thể đột biến SPINK2") trong đó khung chính của SPINK2 ít nhất một phần được duy trì, và tốt hơn là nhận biết một phần peptit, cấu trúc một phần bậc cao hơn, hoặc tương tự của KLK5, KLK5 và KLK7,

hoặc KLK5 và KLK14 hoặc liên kết với chúng (sau đây, tác dụng nhận biết hoặc liên kết này sẽ được gọi chung là "hoạt tính liên kết đích").

Sự liên kết của thể đột biến SPINK2 với KLK5, KLK7, hoặc KLK14 theo sáng chế có thể được đo hoặc xác định bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này như phân tích ELISA, cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface Plasmon Resonance, sau đây được gọi là "SPR"), đo giao thoa theo lớp sinh học (BioLayer Interferometry, sau đây, được gọi là "BLI"), đo nhiệt lượng chuẩn độ đẳng nhiệt (Isothermal Titration Calorimetry, sau đây, được gọi là "ITC"), đếm tế bào theo dòng, và kết tủa miễn dịch.

Các ví dụ về ELISA bao gồm phương pháp phát hiện peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 mà nhận biết và liên kết với KLK5, KLK5/KLK7, hoặc KLK5/KLK14 được cố định trên đĩa. Các kháng thể dùng cho pha rắn mà nhận biết KLK5, KLK5/KLK7, hoặc KLK5/KLK14, hoặc đuôi được dung hợp với KLK5, KLK5/KLK7, hoặc KLK5/KLK14 có thể được sử dụng để cố định KLK5, KLK5/KLK7, hoặc KLK5/KLK14, khác với biotin-streptavidin. Các kháng thể được đánh dấu để phát hiện mà nhận biết peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14, hoặc đuôi được dung hợp với peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 có thể được sử dụng để phát hiện peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14, khác với streptavidin được đánh dấu. Các phương pháp mà có thể được thực hiện để phân tích sinh hóa như HRP, phosphatase kiềm, và FITC có thể được sử dụng để đánh dấu, khác với biotin. Để phát hiện bằng cách sử dụng chất đánh dấu enzym, các cơ chất sinh màu như TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin), BCIP (5-bromo-4-clo-3-indolyl phosphat), p-NPP (p-nitrophenyl phosphat), OPD (o-phenylendiamin), ABTS (axit 3-etylbenzothiazolin-6-sulfonic), và cơ chất phát quang hóa học SuperSignal ELISA Pico (Thermo Fisher Scientific), các cơ chất huỳnh quang như cơ chất peroxidaza sinh huỳnh quang QuantaBlu (R) (Thermo Fisher Scientific), và các cơ chất phát quang hóa học có thể được sử dụng. Bộ đọc đĩa hấp thụ, bộ đọc đĩa huỳnh quang, bộ đọc đĩa phát quang, bộ đếm nhấp nháy chất lỏng RI, và tương tự có thể được sử dụng để đo các tín hiệu phát hiện.

Phương pháp đo bằng cách phân tích SPR có thể là phương pháp bất kỳ trong số: phương pháp cố định peptit đột biến SPINK2 trên chip cảm biến và bổ sung phân tử đích như KLK5 để đo liên kết giữa hai phân tử này; và phương pháp cố định phân tử đích như KLK5 trên chip cảm biến và bổ sung peptit đột biến SPINK2 để đo liên kết giữa hai phân tử này. Phương pháp cố định peptit đột biến là được ưu tiên. Để cố định thể đột biến SPINK2 chứa trong peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó, phương pháp trực tiếp hoặc phương pháp bất giữ có thể được sử dụng. Phương pháp bất giữ là được ưu tiên. Theo phương pháp trực tiếp, tính kỵ nước của thể đột biến SPINK2, các nhóm amino và các nhóm carboxyl của SPINK2, và tương tự có thể được sử dụng để cố định trực tiếp. Theo phương pháp bất giữ, các kháng thể mà nhận biết thể liên hợp hoặc đuôi được dung hợp với thể liên hợp này, protein A, protein G, hoặc tương tự có thể được sử dụng để cố định, khác với biotin-streptavidin. Phân tử đích, như KLK5 được pha loãng bằng cách sử dụng đệm thử nghiệm, được bổ sung vào chip cảm biến mà trên đó thể đột biến SPINK2 được cố định, và tín hiệu SPR được quan sát theo thời gian để thu được các đồ thị cảm biến liên kết. Sau đó, đệm thử nghiệm, không chứa các phân tử đích như KLK5, được bổ sung vào và tín hiệu SPR được quan sát theo thời gian để thu được các đồ thị cảm biến phân ly. ái lực liên kết được phân tích bằng cách sử dụng đồ thị cảm biến thu được, để tính hằng số phân ly K_D . Các thiết bị được sử dụng để phân tích SPR có thể bao gồm BIAcore (R) (GE healthcare), ProteOn (R) (BioRad), SPR-Navi (R) (BioNavisOy), Spreeta (R) (Texas Instruments), SPRi-PlexII (R) (HORIBA, Ltd.), và Autolab SPR (R) (Metrohm). Các thiết bị được sử dụng cho BLI có thể bao gồm Octet (R) (Pall).

Các ví dụ về kết tủa miễn dịch bao gồm phương pháp phát hiện KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14 được nhận biết bởi và liên kết với peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 được cố định trên các hạt. Đối với các hạt này, các hạt từ tính, các hạt agarosa, và tương tự có thể được sử dụng. Để cố định peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14, các kháng thể mà nhận biết peptit này hoặc đuôi được dung hợp với peptit này, protein A, protein G, hoặc tương tự có thể được sử dụng, khác với biotin-streptavidin. Các hạt này được tách bằng nam châm, ly tâm hoặc tương tự, và KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14 được kết tủa cùng với các hạt được phát hiện bằng SDS-PAGE hoặc phương

pháp thấm Western. Để phát hiện KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14, các kháng thể được đánh dấu để phát hiện mà nhận biết đuôi được dung hợp với KLK5, KLK7, hoặc KLK14, hoặc KLK5, KLK7, hoặc KLK14 và tương tự có thể được sử dụng, khác với streptavidin được đánh dấu. Các phương pháp mà có thể được thực hiện để phân tích sinh hóa như HRP, phosphatase kiềm, và FITC có thể được sử dụng để đánh dấu, khác với biotin. Để phát hiện bằng cách sử dụng chất đánh dấu enzym, cơ chất giống như được sử dụng trong ELISA có thể được sử dụng. Để đo các tín hiệu phát hiện, ChemiDoc (R) (BioRad), LuminoGraph (ATTO), và tương tự có thể được sử dụng.

Theo sáng chế, "nhận biết đặc hiệu", tức là, "liên kết đặc hiệu" nghĩa là liên kết không là sự hấp thụ không đặc hiệu. Các ví dụ về tiêu chí để xác định liên kết có là đặc hiệu hay không có thể bao gồm hoạt tính liên kết EC_{50} trong ELISA. Các ví dụ về tiêu chí khác có thể bao gồm hằng số phân ly (sau đây, được gọi là " K_D "). Theo sáng chế, giá trị K_D của peptit ức chế KLK5 đối với KLK5, giá trị K_D của peptit ức chế KLK5/KLK7 đối với KLK5 và KLK7, hoặc giá trị K_D của peptit ức chế KLK5/KLK14 đối với KLK5 và KLK14 là bằng hoặc nhỏ hơn 1×10^{-5} M, bằng hoặc nhỏ hơn 5×10^{-6} M, bằng hoặc nhỏ hơn 2×10^{-6} M, hoặc bằng hoặc nhỏ hơn 1×10^{-6} M, tốt hơn nữa là bằng hoặc nhỏ hơn 5×10^{-7} M, bằng hoặc nhỏ hơn 2×10^{-7} M, hoặc bằng hoặc nhỏ hơn 1×10^{-7} M, còn tốt hơn là bằng hoặc nhỏ hơn 5×10^{-8} M, bằng hoặc nhỏ hơn 2×10^{-8} M, hoặc bằng hoặc nhỏ hơn 1×10^{-8} M, còn tốt hơn nữa là bằng hoặc nhỏ hơn 5×10^{-9} M, bằng hoặc nhỏ hơn 2×10^{-9} M, hoặc bằng hoặc nhỏ hơn 1×10^{-9} M. Các ví dụ về tiêu chí khác có thể bao gồm các kết quả phân tích kết tủa miễn dịch. Trong trường hợp cố định peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 trên các hạt, điều này là được ưu tiên theo sáng chế, và bổ sung KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14 vào đó, sau đó tách các hạt, để phát hiện KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14 được kết tủa cùng với các hạt này, tín hiệu của KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14 được phát hiện.

Thế đột biến SPINK2 dưới dạng peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế có thể có hoạt tính ức chế proteaza, hoạt tính liên kết với đích, các đặc tính, các chức năng, và các đặc điểm khác như được mô tả ở trên, trong khi trình tự axit amin có chiều dài đầy đủ của nó có mức độ giống trình tự cao

với trình tự axit amin của SPINK2 kiểu đại của người. Thể đột biến SPINK2 theo sáng chế có mức độ giống trình tự bằng hoặc lớn hơn 60%, bằng hoặc lớn hơn 70%, bằng hoặc lớn hơn 75%, bằng hoặc lớn hơn 80%, bằng hoặc lớn hơn 85%, bằng hoặc lớn hơn 90%, bằng hoặc lớn hơn 95%, bằng hoặc lớn hơn 98% hoặc bằng hoặc lớn hơn 99%, với trình tự axit amin của SPINK2 của người (SEQ ID NO: 1, Fig.9).

Thuật ngữ "mức độ giống" nghĩa là đặc tính cho biết mức độ giống nhau hoặc mối quan hệ giữa hai trình tự. Mức độ giống (%) của trình tự axit amin được tính bằng cách chia số lượng axit amin hoặc gốc axit amin giống nhau cho tổng số axit amin hoặc gốc axit amin và nhân giá trị bằng số thu được với 100.

Thuật ngữ "khoảng trống" nghĩa là khoảng trống khi đóng thẳng hàng giữa hai hoặc nhiều trình tự do việc xóa và/hoặc bổ sung vào ít nhất một trong số các trình tự này.

Mức độ giống giữa hai trình tự axit amin có trình tự axit amin giống nhau hoàn toàn là 100%, nhưng khi một trong số các trình tự axit amin này được so sánh với trình tự còn lại, và một hoặc nhiều axit amin hoặc gốc axit amin được thế, xóa, hoặc được bổ sung vào, mức độ giống giữa hai trình tự là nhỏ hơn 100%. Các ví dụ về thuật toán hoặc chương trình để xác định mức độ giống giữa hai trình tự khi xem xét khoảng trống có thể bao gồm các kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng các tham số chuẩn, như BLAST (Altschul, et al. Nucleic Acids Res., Vol. 25, trang 3389-3402, 1997), BLAST2 (Altschul, et al., J. Mol. Biol., Vol. 215, trang 403-410, 1990), và Smith-Waterman (Smith, et al., J. Mol. Biol., Vol. 147, trang 195-197, 1981).

Theo sáng chế, thuật ngữ "được đột biến" nghĩa là một hoặc nhiều nucleotit, gốc nucleotit, axit amin, hoặc gốc axit amin đã được thay thế, xóa, hoặc chèn vào trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin, so với phân tử axit nucleic hoặc peptit có trong tự nhiên. Trình tự axit amin của thể đột biến SPINK2 theo sáng chế có một hoặc nhiều axit amin hoặc gốc axit amin được đột biến, so với trình tự axit amin của SPINK2 của người.

Theo một khía cạnh của sáng chế, trình tự axit amin của thể đột biến SPINK2 có thể có: một, hai, ba, bốn, năm, sáu, hoặc bảy axit amin trong số Ser16 đến Gly22 được thay thế bằng các axit amin hoặc gốc axit amin khác; một, hai, ba, bốn, hoặc năm axit amin trong số Pro24 đến Asn28 được thay thế bằng các axit amin hoặc gốc axit amin khác; và một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu trong số Cys15, Cys23, Cys31, Cys42, Cys45 và Cys63

được thay thế bằng các axit amin khác để xóa các liên kết disulfua tự nhiên hoặc tạo ra các liên kết disulfua không tự nhiên, mặc dù chúng tốt hơn là Cys giống như trong kiểu đại để duy trì các liên kết disulfua tự nhiên, trong trình tự axit amin của SPINK2 của người (SEQ ID NO: 1, Fig.9). Trong một số peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 được ưu tiên của thể đột biến SPINK2 của sáng chế, Cys được duy trì ở 6 vị trí giống như trong kiểu đại để giữ được các liên kết disulfua. Theo một số khía cạnh được ưu tiên hơn của các peptit này, mỗi Cys15 đến Cys45, Cys23 đến Cys42, và Cys31 đến Cys63 tạo thành liên kết disulfua.

Khi trình tự axit amin của thể đột biến SPINK2 này được chứa trong peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14, cấu trúc ba chiều được tạo bởi cấu trúc vòng bao gồm Ser16 đến Val30 được chứa trong trình tự axit amin của SPINK2 kiểu đại, cấu trúc gấp nếp β bao gồm sợi β (1) bao gồm Cys31 và Gly32 và sợi β (2) bao gồm Ile57 đến Arg59, và cấu trúc xoắn α bao gồm Glu41 đến Gly51, hoặc cấu trúc vòng, cấu trúc gấp nếp β , và cấu trúc xoắn α tương tự với hoặc ít nhất là tương ứng một phần với cấu trúc nêu trên (các vị trí của nó) tốt hơn là được duy trì, tới mức là hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc hoạt tính ức chế KLK5/KLK14 có thể được tạo ra.

Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo một số khía cạnh của thể đột biến SPINK2 của sáng chế sẽ được mô tả dưới đây. Như được mô tả ở trên, "các gốc axit amin" có thể được biểu diễn đơn giản là "các axit amin" theo sáng chế.

Trong trình tự axit amin (công thức) được nêu trong SEQ ID NO: 61 (Fig.69), X₁ đến X₁₂ là không bị giới hạn cụ thể, miễn là chúng là axit amin bất kỳ sao cho thể đột biến thu được ức chế KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14. Sau đây, các axit amin X₁ đến X₁₂ thích hợp sẽ được mô tả, nhưng các axit amin này có thể bao gồm các axit amin giống như trong trình tự axit amin của kiểu tự nhiên, tức là, SPINK2 kiểu đại của người.

Trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 61 (Fig.69) chứa trong peptit ức chế KLK5, thích hợp là: Xaa16 (X₁) là Ala, Asp, Gly, Gln, Leu, Ser, hoặc Thr; Xaa17 (X₂) là Arg, Glu, Asn, Gln, hoặc Ser; Xaa18 (X₃) là Asp, Gln, Ile, Thr, Trp, hoặc Tyr; Xaa19 (X₄) là Arg, Gly, Met, Gln, hoặc Thr; Xaa20 (X₅) là Asp, Glu, Leu, Lys, Thr, hoặc

Tyr; Xaa21 (X₆) là Glu, Gly, His, Leu, Ser, Gln, hoặc Tyr; Xaa22 (X₇) là Asp, Gly, Gln, Ser, hoặc Tyr; Xaa24 (X₈) là Ala, Asp, Glu, Gly, Asn, Ser, hoặc Thr; Xaa25 (X₉) là Arg hoặc Lys; Xaa26 (X₁₀) là Asp, Glu, Gln, Ser, hoặc Val; Xaa27 (X₁₁) là Phe hoặc Tyr; và Xaa28 (X₁₂) là Asp hoặc Glu.

Trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 61 (Fig.69) chứa trong peptit ức chế KLK5/KLK7, thích hợp là: Xaa16 (X₁) là Gly, Met, hoặc Tyr; Xaa17 (X₂) là Glu, Gln, hoặc Thr; Xaa18 (X₃) là His, Met, hoặc Tyr; Xaa19 (X₄) là Ala, Arg, Lys, hoặc Gln; Xaa20 (X₅) là Gly, Arg, hoặc Ser; Xaa21 (X₆) là Arg, Lys, Gln, hoặc Ser; Xaa22 (X₇) là Gly; Xaa24 (X₈) là His, Thr, hoặc Tyr; Xaa25 (X₉) là His hoặc Tyr; Xaa26 (X₁₀) là Asp, Glu, hoặc His; Xaa27 (X₁₁) là Tyr; và Xaa28 (X₁₂) là Asp hoặc Glu.

Trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 61 (Fig.69) chứa trong peptit ức chế KLK5/KLK14, thích hợp là: Xaa16 (X₁) là Gly, Ser, hoặc Tyr; Xaa17 (X₂) là Asp hoặc Gln; Xaa18 (X₃) là Thr hoặc Val; Xaa19 (X₄) là Thr hoặc Val; Xaa20 (X₅) là Glu hoặc Thr; Xaa21 (X₆) là His hoặc Thr; Xaa22 (X₇) là Tyr; Xaa24 (X₈) là Asn hoặc Ser; Xaa25 (X₉) là Arg; Xaa26 (X₁₀) là Asp hoặc Glu; Xaa27 (X₁₁) là Tyr; và Xaa28 (X₁₂) là Asp.

Xaa16 đến 22 và Xaa24 đến 28 (X₁ đến X₁₂) của kiểu đại lần lượt là Ser, Gln, Tyr, Arg, Leu, Pro, Gly, Pro, Arg, His, Phe, và Asn.

Theo sáng chế, một đến một vài hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 1 đến 5 axit amin có thể được bổ sung thêm vào phía đầu tận cùng N của axit amin thứ nhất. Các ví dụ về việc bổ sung axit amin này có thể tốt hơn là bao gồm bổ sung 1 đến 5 Asp và/hoặc Glu (cả Asp và Glu có thể được bao gồm), tốt hơn nữa là bổ sung 1 đến 5 Asp hoặc bổ sung 1 đến 5 Glu.

Theo sáng chế, peptit được tạo ra bằng cách thay thế, bổ sung vào, và/hoặc xóa một hoặc nhiều axit amin khỏi gốc được bổ sung của sản phẩm cộng đầu tận cùng N và/hoặc đầu tận cùng C của peptit đột biến SPINK2 (sau đây peptit này sẽ được gọi là "peptit gốc") và duy trì một phần hoặc hoàn toàn các hoạt tính của peptit đột biến SPINK2 có thể được gọi là "dẫn xuất của peptit gốc" hoặc "dẫn xuất peptit gốc". "Dẫn xuất" này cũng được bao gồm trong phạm vi "peptit" của sáng chế.

Trình tự axit amin của thể đột biến SPINK2 được bao gồm trong phạm vi của peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế

có thể chứa các axit amin tự nhiên hoặc các axit amin đột biến hoặc các trình tự axit amin trong các gốc khác với X₁ đến X₁₂, tức là, ở các vị trí Pro2 đến Cys15, Cys23, và Pro29 đến Cys63 trong trình tự axit amin của SPINK2 kiểu đại của người (SEQ ID NO: 1, Fig.9). Ví dụ, thể đột biến SPINK2 có thể được đột biến ở một hoặc nhiều vị trí miễn là các đột biến này không ngăn ngừa hoàn toàn hoặc ảnh hưởng đến hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc hoạt tính ức chế KLK5/KLK14, hoặc sự gấp cuộn. Các đột biến này có thể đạt được bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này. Các ví dụ về các đột biến thông thường trong trình tự axit amin có thể bao gồm sự thay thế, xóa hoặc chèn một hoặc nhiều axit amin, và các ví dụ về sự thay thế có thể bao gồm sự thay thế bảo toàn. Theo kết quả của sự thay thế bảo toàn, gốc axit amin được thế bằng gốc axit amin khác có các đặc tính hóa học tương tự không chỉ về độ rộng kênh mà còn về độ phân cực. Các ví dụ về sự thay thế bảo toàn được mô tả ở chỗ khác trong bản mô tả này. Trong khi đó, các gốc khác với X₁ đến X₁₂ có thể cho phép sự thay thế không bảo toàn một hoặc nhiều axit amin, miễn là các thay thế này không ngăn ngừa hoàn toàn hoặc ảnh hưởng đến hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc hoạt tính ức chế KLK5/KLK14, hoặc sự gấp cuộn.

Trong trình tự axit amin của thể đột biến SPINK2 dùng làm peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế, X₁ đến X₁₂ lần lượt tốt hơn là các axit amin X₁ đến X₁₂ trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, và 20 (các hình vẽ Fig.14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, và 28), SEQ ID NO: 22, 24, 26, và 28 (các hình vẽ Fig.30, 32, 34, và 36), và SEQ ID NO: 30 và 32 (các hình vẽ Fig.38 và 40), và các gốc khác với X₁ đến X₁₂ có thể có các axit amin hoặc các trình tự axit amin không ngăn ngừa hoàn toàn hoặc ảnh hưởng đến hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc hoạt tính ức chế KLK5/KLK14, hoặc sự gấp cuộn.

Ngoài ra, các ví dụ về trình tự axit amin của thể đột biến SPINK2 dùng làm peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế có thể bao gồm bất kỳ một trong số các trình tự axit amin (a1) đến (a4), (b1) đến (b4), hoặc (c1) đến (c4) dưới đây:

(a1) trình tự axit amin bao gồm các axit amin ở các vị trí 1 đến 63 trong trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, và 20 (các hình vẽ Fig.14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, và 28);

(a2) trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit mà lai với trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được mô tả trong (a1) trong các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5;

(a3) trình tự axit amin được tạo ra bằng cách thay thế, xóa, bổ sung, và/hoặc chèn 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 hoặc 2, hoặc 1 axit amin trong trình tự axit amin được mô tả trong (a1) và chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5; và

(a4) trình tự axit amin có mức độ giống 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin được mô tả trong (a1) và chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5,

(b1) trình tự axit amin bao gồm các axit amin ở các vị trí 1 đến 63 trong trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 22, 24, 26, và 28 (các hình vẽ Fig.30, 32, 34, và 36);

(b2) trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit mà lai với trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được mô tả trong (b1) trong các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK7;

(b3) trình tự axit amin được tạo ra bằng cách thay thế, xóa, bổ sung, và/hoặc chèn 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 hoặc 2, hoặc 1 axit amin trong trình tự axit amin được mô tả trong (b1) và chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK7; và

(b4) trình tự axit amin có mức độ giống 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin được mô tả trong (b1) và chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc

(c1) trình tự axit amin bao gồm các axit amin ở các vị trí 1 đến 63 trong trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 30 và 32 (các hình vẽ Fig.38 và 40);

(c2) trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit mà lai với trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được mô tả trong (c1) trong các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK14;

(c3) trình tự axit amin được tạo ra bằng cách thay thế, xóa, bổ sung, và/hoặc chèn 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 hoặc 2, hoặc 1 axit amin trong trình tự axit amin được mô tả trong (c1) và chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK14; và

(c4) trình tự axit amin có mức độ giống 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin được mô tả trong (c1) và chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK14.

Các axit amin ở các vị trí 64 và 65 trong SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, và 32 (các hình vẽ Fig.14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, và 40) không là các axit amin tương ứng với axit amin trong SPINK2 kiểu đại của người (SEQ ID NO: 1, Fig.9: bao gồm 63 axit amin) nhưng được bổ sung để biểu hiện peptit theo sáng chế theo một khía cạnh của sáng chế.

Các đột biến có thể được đưa vào peptit theo sáng chế nhằm mục đích cải thiện độ ổn định gấp cuộn, độ ổn định nhiệt, độ ổn định bảo quản, thời gian bán hủy trong máu, độ tan trong nước, hoạt tính sinh học, hoạt tính dược lý, các tác dụng phụ, và tương tự. Ví dụ, các nhóm phản ứng mới như Cys có thể được đưa vào bằng cách đột biến để liên hợp với các chất khác như polyetylen glycol (PEG), hydroxyetyl tinh bột (HES), biotin, peptit, hoặc protein.

Theo sáng chế, peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 có thể được liên kết hoặc được bổ sung vào các gốc khác, và các thể liên hợp này lần lượt được gọi là "thể liên hợp peptit ức chế KLK5", "thể liên hợp peptit ức chế KLK5/KLK7", hoặc "thể liên hợp peptit ức chế KLK5/KLK14". Theo sáng chế, "thể liên hợp" có nghĩa là các phân tử được tạo bởi các gốc khác liên kết với peptit theo sáng chế

hoặc mảnh của nó. "Thể liên hợp" hoặc "sự liên hợp" bao gồm các gốc được liên kết hoặc nối với đầu tận cùng N và/hoặc đầu tận cùng C của peptit theo sáng chế thông qua chất hóa học như chất liên kết ngang, hoặc thông qua chất có hoạt tính hoặc chất tương tự mà thích hợp để liên kết các gốc này với mạch bên axit amin, bằng phương pháp hóa học tổng hợp, hoặc bằng phương pháp thao tác di truyền hoặc tương tự. Ví dụ về "các gốc" có tác dụng cải thiện thời gian bán hủy trong máu có thể bao gồm các phân tử polyalkylen glycol như polyetylen glycol (PEG), hydroxyetyl tinh bột (HES), các phân tử axit béo như axit palmitic, vùng Fc của globulin miễn dịch (ví dụ, vùng Fc của globulin miễn dịch G1 của người: trình tự axit amin của nó được thể hiện trong SEQ ID NO: 87, Fig.95), vùng CH3 của globulin miễn dịch, vùng CH4 của globulin miễn dịch, albumin hoặc mảnh của nó, các peptit liên kết albumin, các protein liên kết albumin như protein G của liên cầu khuẩn, và transferrin. Liên quan đến "các gốc" khác, peptit theo sáng chế có thể được liên kết với "các gốc" này thông qua nhóm liên kết như nhóm liên kết peptit.

Theo một khía cạnh của sáng chế, thể liên hợp này là thể dung hợp của peptit đột biến SPINK2 của sáng chế với vùng Fc của kháng thể hoặc mảnh của nó. Các ví dụ về nguồn gốc của kháng thể có thể bao gồm người và động vật có vú không phải người, bao gồm các động vật gặm nhấm như chuột nhắt, chuột, và thỏ, các động vật có vú khác như bò, lợn, chó, khỉ *Cynomolgus*, khỉ sóc, và khỉ nâu, và chim như gà, tuy nhiên, tốt hơn là nó có nguồn gốc từ người. Các ví dụ về kháng thể này có thể bao gồm IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, và IgE, tốt hơn là IgG1. Tốt hơn nữa nếu, thể liên hợp là thể dung hợp của peptit theo sáng chế với vùng Fc của IgG1 của người hoặc mảnh của nó. Mặc dù thể dung hợp của peptit theo sáng chế với vùng Fc của kháng thể hoặc mảnh của nó có thể được gọi là "thể dung hợp Fc" hoặc "thể liên hợp", tất cả chúng có nghĩa giống nhau.

Các ví dụ về vùng Fc của IgG1 của người có thể bao gồm vùng chứa hoặc bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 87 (Fig.95), nhưng không giới hạn ở vùng này. Vùng Fc của kháng thể có thể là kiểu đại hoặc kiểu đột biến.

Ngoài ra, peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế có thể được liên hợp với dược chất khác, để tạo ra hoặc làm tăng hoạt tính dược lý. Các kỹ thuật và các khía cạnh đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này dưới dạng thể liên hợp kháng thể-dược chất (antibody-drug conjugate,

ADC) trong lĩnh vực kháng thể có thể tạo thành một số khía cạnh của sáng chế bằng cách thay kháng thể bằng peptit theo sáng chế.

Peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế có thể còn chứa một hoặc nhiều gốc lần lượt tạo ra ái lực liên kết, hoạt tính ức chế, hoạt tính đối kháng, và hoạt tính chủ vận với các phân tử đích khác với KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14, hoặc có thể được liên hợp với các gốc này. Các ví dụ về "các gốc" này có thể bao gồm các kháng thể hoặc các mảnh của nó, và các protein có khung chính khác với các kháng thể như thể đột biến SPINK2 hoặc các mảnh của nó. Các kỹ thuật và các khía cạnh đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này như các kháng thể đa giá và các kháng thể hai giá trong lĩnh vực kháng thể nằm trong một số khía cạnh của thể liên hợp theo sáng chế bằng cách thay ít nhất một trong số hai hoặc nhiều "kháng thể" chứa trong đó bằng peptit theo sáng chế.

Peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế, hoặc tiền chất của nó có thể chứa trình tự tín hiệu. Trình tự tín hiệu có mặt ở đầu tận cùng N của polypeptit hoặc tiền chất của nó hoặc được bổ sung vào đó là hữu ích để cung cấp polypeptit này tới khoang cụ thể của tế bào, như chất bào trong trường hợp *Escherichia coli* và lưới nội chất trong trường hợp các tế bào có nhân điển hình. Nhiều trình tự tín hiệu là đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này và có thể được chọn theo các tế bào chủ. Các ví dụ về trình tự tín hiệu để tiết peptit mong muốn vào chất bào của *Escherichia coli* có thể bao gồm OmpA. Phương án chứa trình tự tín hiệu này cũng có thể được bao gồm trong thể liên hợp theo sáng chế theo một khía cạnh.

Ngoài ra, peptit có thể được tinh chế bằng phương pháp sắc ký ái lực bằng cách bổ sung trước đuôi peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế.

Peptit theo sáng chế, ví dụ, có thể chứa biotin, đuôi Strep (R), đuôi Strep II (R), oligohistidin như His6, polyhistidin, các vùng globulin miễn dịch, các protein liên kết maltoza, glutathion-S-transferaza (glutathione-S-transferases, GST), các peptit liên kết calmodulin (calmodulin binding peptide, CBP), các hapten như digoxigenin và dinitrophenol, các đuôi epitop như FLAG (R), đuôi myc, đuôi HA, và tương tự (sau đây, được gọi chung là "các đuôi ái lực") ở đầu tận cùng C của nó. Các sản phẩm cộng đuôi

cũng có thể được bao gồm trong thể liên hợp theo sáng chế theo một số khía cạnh. Thể liên hợp theo sáng chế, nói chung, có thể là peptit (polypeptit).

Peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế có thể chứa các gốc đánh dấu, và có thể được liên hợp đặc hiệu với các gốc đánh dấu như chất đánh dấu enzym, chất đánh dấu phóng xạ, chất đánh dấu có màu, chất đánh dấu huỳnh quang, chất đánh dấu tạo màu, chất đánh dấu phát quang, các hapten, digoxigenin, biotin, các phức chất kim loại, các kim loại, và vàng dạng keo. Khía cạnh chứa các gốc đánh dấu cũng có thể được bao gồm trong thể liên hợp theo sáng chế dưới dạng một số khía cạnh.

Các ví dụ về trình tự axit amin của thể liên hợp peptit ức chế KLK5, thể liên hợp peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc thể liên hợp peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế có thể bao gồm bất kỳ một trong số trình tự axit amin (a1) đến (a4), (b1) đến (b4), hoặc (c1) đến (c4) dưới đây:

(a1) trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, và 96 (các hình vẽ Fig.42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, và 106);

(a2) trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit mà lai với trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được mô tả trong (a1) trong các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5;

(a3) trình tự axit amin được tạo ra bằng cách thay thế, xóa, bổ sung, và/hoặc chèn 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 hoặc 2, hoặc 1 axit amin trong trình tự axit amin được mô tả trong (a1) và chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5; và

(a4) trình tự axit amin có mức độ giống 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin được mô tả trong (a1) và chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5,

(b1) trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 50, 52, 54, và 56 (các hình vẽ Fig.58, 60, 62, và 64);

(b2) trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit mà lai với trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được mô tả trong (b1) trong các

điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK7;

(b3) trình tự axit amin được tạo ra bằng cách thay thế, xóa, bổ sung, và/hoặc chèn 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 hoặc 2, hoặc 1 axit amin trong trình tự axit amin được mô tả trong (b1) và chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK7; và

(b4) trình tự axit amin có mức độ giống 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin được mô tả trong (b1) và chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc

(c1) trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 58 và 60 (các hình vẽ Fig.66 và 68);

(c2) trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit mà lai với trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được mô tả trong (c1) trong các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK14;

(c3) trình tự axit amin được tạo ra bằng cách thay thế, xóa, bổ sung, và/hoặc chèn 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 hoặc 2, hoặc 1 axit amin trong trình tự axit amin được mô tả trong (c1) và chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK14; và

(c4) trình tự axit amin có mức độ giống 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin được mô tả trong (c1) và chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK14.

Peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế (trình tự axit amin của nó) có thể chứa cả axit amin tự nhiên và axit amin không tự nhiên. Axit amin tự nhiên có thể bao gồm cả L-axit amin và D-axit amin.

Peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế có thể tồn tại dưới dạng monome, dime, trime hoặc oligome cao hơn, hoặc multime. Dime, trime hoặc oligome cao hơn, và multime này có thể là hoặc homome bao gồm một loại monome hoặc heterome bao gồm hai hoặc nhiều loại monome khác nhau. Monome có thể khuếch tán nhanh và có khả năng thâm nhập tuyệt vời vào các mô, ví dụ.

Dime, oligome, và multime có thể có các khía cạnh tuyệt vời như ái lực cục bộ hoặc hoạt tính liên kết cao với các phân tử đích, tốc độ phân ly thấp, hoặc hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc hoạt tính ức chế KLK5/KLK14 cao. Ngoài sự dime hóa, oligome hóa, và multime hóa tự phát, sự dime hóa, oligome hóa, và multime hóa có chủ đích có thể cũng đạt được bằng cách đưa vùng jun-fos, khóa kéo leuxin, hoặc tương tự vào peptit theo sáng chế.

Peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế có thể liên kết với một hoặc các phân tử đích hoặc ức chế các hoạt tính của các phân tử đích, ở dạng monome, dime, trime hoặc oligome cao hơn, hoặc multime.

Các ví dụ về dạng của peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế có thể bao gồm các dạng được phân lập (như các chế phẩm và dung dịch sấy khô nhiệt độ thấp), thể liên hợp nêu trên, và các dạng liên kết với các phân tử khác (như các dạng được cố định, liên kết với các phân tử lạ, và các dạng liên kết với các phân tử đích), nhưng không giới hạn ở các ví dụ này, và dạng thích hợp để biểu hiện, tinh chế, sử dụng, bảo quản, hoặc tương tự có thể tùy ý được chọn.

3. Nhận dạng peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, và peptit ức chế KLK5/KLK14

Peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, và peptit ức chế KLK5/KLK14 có thể được nhận dạng bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này, bằng cách sử dụng trình tự axit amin của SPINK2 hoặc trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, và peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế (ví dụ, trình tự axit amin theo mục (a1), (b1), hoặc (c1) nêu trên), trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin này, các phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit này, và tương tự để làm nguyên liệu đầu. Theo một ví dụ thích hợp, việc nhận dạng này có thể được thực hiện từ thư viện thể đột biến SPINK2 của người, bằng cách sử dụng hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc hoạt tính ức chế KLK5/KLK14 tương ứng, làm chỉ số, và ái lực liên kết với KLK5, KLK5/KLK7, hoặc KLK5/KLK14 có thể được kết hợp để sử dụng, tương ứng làm chỉ số.

Ví dụ, các phân tử axit nucleic dùng làm nguyên liệu đầu có thể được đột biến và đưa vào vật chủ vi khuẩn hoặc sinh vật có nhân điển hình thích hợp bằng cách sử dụng

công nghệ ADN tái tổ hợp. Thư viện thể đột biến SPINK2 được biết là kỹ thuật để nhận dạng chất liên kết hoặc chất ức chế của phân tử đích. Ví dụ, nội dung bộc lộ trong công bố đơn quốc tế số WO 2014/024914 cũng được đưa vào trong bản mô tả của sáng chế bằng cách viện dẫn toàn bộ. Sau khi trình tự nucleotit được đột biến được biểu hiện trong vật chủ thích hợp, dòng được tạo ra bằng cách liên kết thể đột biến SPINK2 có đặc tính, hoạt tính, chức năng mong muốn, và tương tự với tính trạng di truyền của nó có thể được tập trung và/hoặc được chọn từ thư viện cần được nhận dạng. Để tập trung và/hoặc chọn dòng, các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng, như phương pháp biểu hiện trên vi khuẩn (Francisco, J. A., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 90, trang 10444-10448), phương pháp biểu hiện trên nấm men (Boder, E. T., et al. (1997) Nat. Biotechnol., Vol. 15, trang 553-557), phương pháp biểu hiện trên tế bào động vật có vú (Ho M, et al. (2009) Methods Mol Biol., Vol. 525, trang 337-352), phương pháp biểu hiện trên thể thực khuẩn (Smith, G. P. (1985) Science., Vol. 228, trang 1315-1317), phương pháp biểu hiện trên riboxom (Mattheakis LC, et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 91, No. 19, trang 9022-9029), phương pháp biểu hiện axit nucleic (Nemoto N, et al. (1997) FEBS Lett., Vol. 414, No. 2, trang 405-408) như biểu hiện mRNA, và phương pháp sàng lọc khuẩn lạc (Pini, A. et al. (2002) Comb. Chem. High Throughput Screen., Vol. 5, trang 503-510). Trình tự nucleotit của thể đột biến SPINK2 chứa trong dòng được chọn và nhận dạng theo cách này được xác định. Bằng cách đó, trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit có thể được xác định là trình tự axit amin của thể đột biến SPINK2, tức là, peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 chứa trong dòng này.

Thể đột biến SPINK2 của sáng chế có thể thu được, ví dụ, bằng cách gây đột biến SPINK2 tự nhiên. "Gây đột biến" có nghĩa là cho phép thay thế hoặc xóa một hoặc nhiều axit amin có mặt ở một số vị trí trong trình tự axit amin bằng các axit amin khác, hoặc chèn axit amin không có mặt trong trình tự axit amin. Việc xóa hoặc chèn này có thể làm thay đổi độ dài của trình tự. Trong thể đột biến SPINK2 của sáng chế, đột biến có thể tốt hơn là xảy ra ở một hoặc nhiều vị trí X₁ đến X₁₂ trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 61 (Fig.69).

Tuy nhiên, phạm vi của thể đột biến còn bao gồm các thể đột biến có axit amin giống như có mặt ở các vị trí cụ thể trong trình tự axit amin tự nhiên, tức là, trình tự axit amin tự nhiên được duy trì ở một hoặc nhiều vị trí X_1 đến X_{12} sau sự đột biến thích hợp này, miễn là ít nhất một axit amin nói chung được đột biến. Tương tự, theo một khía cạnh của sáng chế, phạm vi của thể đột biến còn bao gồm các thể đột biến có axit amin giống như có mặt ở các vị trí cụ thể trong trình tự axit amin tự nhiên, tức là, trình tự axit amin tự nhiên được duy trì ở một hoặc nhiều vị trí trong các gốc khác với X_1 đến X_{12} sau khi đột biến được gây ra ở các vị trí này, miễn là ít nhất một axit amin nói chung được đột biến.

Thuật ngữ "gây đột biến ngẫu nhiên" nghĩa là một hoặc nhiều axit amin khác nhau được đưa vào ở các vị trí cụ thể trong một trình tự bằng cách gây đột biến với xác suất nhất định, nhưng không phải tất cả các khả năng đưa các axit amin vào có thể là giống nhau. Ngoài ra, theo sáng chế, việc bao gồm axit amin xuất hiện tự nhiên (để làm một trong số các axit amin) trong ít nhất hai axit amin khác nhau có thể được ngăn chặn, và phạm vi của "gây đột biến ngẫu nhiên" còn bao gồm trường hợp này.

Liên quan đến phương pháp gây đột biến ngẫu nhiên ở các vị trí cụ thể, các phương pháp chuẩn đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Ví dụ, các đột biến có thể được gây ra ở các vị trí cụ thể trong một trình tự bằng phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction, PCR) bằng cách sử dụng hỗn hợp các oligonucleotit tổng hợp chứa thành phần nucleotit thoái hóa. Ví dụ, sử dụng codon NNK hoặc NNS (N = adenin, guanin, xytosin, hoặc thymine; K = guanin hoặc thymine; S = adenin hoặc xytosin) gây đột biến để đưa codon kết thúc vào ngoài tất cả 20 axit amin tự nhiên, trong khi việc sử dụng codon VVS (V = adenin, guanin, hoặc xytosin) loại trừ khả năng đưa Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, và Val vào và gây đột biến để đưa 12 axit amin tự nhiên còn lại vào. Ngoài ra, việc sử dụng codon NMS (M = adenin hoặc xytosin) loại trừ khả năng đưa Arg, Cys, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, và Val vào và cảm ứng đột biến để đưa 11 axit amin tự nhiên còn lại vào chẳng hạn. Các codon đặc biệt, các codon nhân tạo, hoặc tương tự có thể được sử dụng để gây đột biến để đưa axit amin không tự nhiên vào.

Việc gây đột biến đặc hiệu vị trí cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thông tin cấu trúc chứa cấu trúc bậc cao hơn của đích và/hoặc peptit đối với đích hoặc peptit kiểu đại mà từ đó peptit thu được. Theo sáng chế, đột biến đặc hiệu vị trí có thể được

đưa vào bằng cách sử dụng thông tin cấu trúc chứa thông tin bậc cao hơn đối với đích KLK5, KLK7, hoặc KLK14, và/hoặc thể đột biến SPINK2, SPINK2 kiểu đại hoặc phức chất của hai chất này, đối với KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14. Có thể có các trường hợp mà trong đó mối tương quan có thể được tìm ra giữa hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc hoạt tính ức chế KLK5/KLK14 và thông tin cấu trúc thu được, ví dụ, thông qua việc nhận dạng thể đột biến SPINK2 có hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc hoạt tính ức chế KLK5/KLK14, sau đó thu được các tinh thể KLK5, KLK7, hoặc KLK14 và phức hợp thể đột biến SPINK2 để thực hiện việc phân tích cấu trúc tinh thể tia X, và chỉ rõ epitop trên phân tử KLK5, KLK7, hoặc KLK14 mà thể đột biến SPINK2 liên kết với và paratop trên thể đột biến SPINK2 tương ứng với epitop này dựa trên các kết quả phân tích. Dựa trên mối tương quan cấu trúc-hoạt tính này, việc thể bằng axit amin cụ thể ở các vị trí cụ thể, hoặc việc chèn hoặc xóa axit amin ở các vị trí cụ thể hoặc tương tự được thiết kế, để cho hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc hoạt tính ức chế KLK5/KLK14 có thể được khẳng định trên thực tế.

Ngoài ra, các đột biến có thể được gây ra, ví dụ, bằng cách sử dụng đơn vị thành phần nucleotit làm thay đổi tính đặc hiệu của cặp bazơ, như inosin.

Ngoài ra, các đột biến có thể được gây ra ở các vị trí ngẫu nhiên, ví dụ, bằng phương pháp PCR dễ mắc lỗi bằng cách sử dụng ADN polymeraza có tỷ lệ lỗi cao mà không có chức năng sửa lỗi, như Taq ADN polymeraza, hoặc gây đột biến hóa học, và tương tự.

Peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 có thể được tập trung và/hoặc được chọn từ các thư viện thích hợp, như thư viện thể thực khuẩn và thư viện khuẩn lạc, đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này đối với phương pháp sàng lọc tương ứng bằng cách sử dụng sự biểu hiện trên vi khuẩn, biểu hiện trên nấm men, biểu hiện trên tế bào động vật có vú, biểu hiện trên thể thực khuẩn, biểu hiện trên riboxom, biểu hiện trên axit nucleic, sàng lọc khuẩn lạc, hoặc tương tự. Bằng cách sử dụng các vector và các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này mà thích hợp đối với các thư viện tương ứng, như phagemit đối với thư viện thể thực khuẩn và cosmit đối với sàng lọc khuẩn lạc trong các thư viện này, việc xây dựng các thư viện có thể đạt được. Các vector có thể là các virus gây nhiễm các tế bào chưa có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình hoặc các vector virus. Các vector tái tổ hợp này có thể được

điều chế bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này như thao tác di truyền.

Biểu hiện trên vi khuẩn, ví dụ, là kỹ thuật dung hợp protein mong muốn với một phần của lipoprotein (Lpp) màng ngoài của *Escherichia coli* và protein màng ngoài OmpA để trình diện protein mong muốn trên bề mặt của *Escherichia coli*. Nhóm ADN thu được bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của protein được đưa vào các vectơ thích hợp để biểu hiện trên vi khuẩn để biến nạp các tế bào vi khuẩn bằng các vectơ này. Do đó, thư viện trình diện nhóm protein được đột biến ngẫu nhiên có thể thu được trên bề mặt của các tế bào vi khuẩn được biến nạp (Francisco, J. A., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 90, trang 10444-10448).

Biểu hiện trên nấm men là kỹ thuật dung hợp protein mong muốn với protein như α -agglutinin trên vỏ ngoài của bề mặt của tế bào nấm men để trình diện nó trên bề mặt nấm men. α -agglutinin chứa vùng kỵ nước đầu tận cùng C, vùng này được cho là tín hiệu gắn neo glycosylphosphatidylinositol (GPI), trình tự tín hiệu, vùng hoạt tính, vùng thành tế bào, và tương tự, và protein mong muốn có thể được biểu hiện trên bề mặt của tế bào nấm men bằng cách thao tác chúng. Nhóm ADN thu được bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của protein được đưa vào các vectơ thích hợp để biểu hiện trên nấm men để biến nạp các tế bào nấm men bằng các vectơ này. Do đó, thư viện trình diện nhóm protein được đột biến ngẫu nhiên có thể thu được trên bề mặt của các tế bào nấm men được biến nạp (Ueda, M. & Tanaka, A., Biotechnol. Adv., Vol. 18, trang từ 121, Công bố năm 2000; Ueda, M. & Tanaka, A., J. Biosci. Bioeng., Vol. 90, trang từ 125, Công bố năm 2000).

Biểu hiện trên tế bào động vật là, ví dụ, kỹ thuật dung hợp protein mong muốn với vùng xuyên màng của protein màng, điển hình là thụ thể yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc tiểu cầu (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR) để trình diện protein mong muốn trên bề mặt của tế bào động vật có vú, như HEK293 và tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (Chinese hamster ovary, CHO). Nhóm ADN thu được bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của protein được đưa vào các vectơ thích hợp để biểu hiện trên tế bào động vật để chuyển nhiễm tế bào động vật bằng các vectơ này. Do đó, thư viện trình diện nhóm protein được đột biến ngẫu nhiên có thể thu được

trên bề mặt của tế bào động vật được chuyển nhiễm (Ho M, et al. (2009) *Methods Mol Biol.*, Vol. 525, trang 337-352).

Thư viện mong muốn được trình diện trên các tế bào như nấm men, vi khuẩn, và tế bào động vật có thể được ủ với sự có mặt của các phân tử đích hoặc được cho tiếp xúc với các phân tử đích. Ví dụ, sau khi thư viện chứa tế bào và KLK5, KLK7, hoặc KLK14 được biến đổi bằng biotin hoặc tương tự được ủ trong thời gian nhất định, chất mang như các hạt từ tính được bổ sung vào đó, tế bào được tách ra khỏi chất mang, và sau đó chất mang được rửa để loại bỏ chất hấp thụ không đặc hiệu và chất liên kết. Do đó, nhóm tế bào trình diện peptit liên kết với chất mang (hoặc KLK5, KLK7, hoặc KLK14 liên kết với chất mang), cụm peptit, hoặc cụm peptit tập trung có thể được thu hồi. Tương tự, nhóm tế bào trình diện peptit liên kết với chất mang (hoặc KLK5, KLK7, hoặc KLK14 liên kết với chất mang) hoặc KLK5, KLK7, hoặc KLK14, cụm peptit, hoặc cụm peptit tập trung có thể được thu hồi bằng cách tách tế bào bằng từ tính (magnetic cell separation, MACS) sau khi bổ sung các hạt từ tính hoặc FACS sau khi nhuộm tế bào bằng cách sử dụng kháng thể kháng KLK5, kháng thể kháng KLK7, hoặc kháng thể kháng KLK14. Các vị trí hấp phụ và/hoặc các vị trí liên kết không đặc hiệu có thể được xử lý khóa, ví dụ, và bước khóa có thể được đưa vào đây miễn là đây là phương pháp thích hợp. Vector biểu hiện peptit, cụm peptit, hoặc cụm peptit tập trung thu được theo cách này được thu hồi, và trình tự nucleotit của polynucleotit được chèn vào vector được xác định, để cho trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit có thể được xác định. Ngoài ra, cụm peptit liên kết với các phân tử đích có thể được tập trung ở mức độ cao hơn bằng cách đưa lại vector vào tế bào chủ và lặp lại thao tác nêu trên theo chu trình một đến vài lần.

Trong trường hợp biểu hiện trên thể thực khuẩn, phagemit là, ví dụ, plasmit vi khuẩn chứa nguồn gốc sao chép thứ hai thu được từ thể thực khuẩn sợi đơn khác với nguồn gốc của sao chép plasmit. Tế bào chứa phagemit có thể sao chép phagemit này thông qua chế độ sao chép sợi đơn bằng cách gây bội nhiễm bằng M13 hoặc thể thực khuẩn hỗ trợ tương tự. Tức là, ADN phagemit sợi đơn được đóng gói trong các hạt gây nhiễm được bao bằng protein vỏ của thể thực khuẩn. Do đó, ADN phagemit có thể được tạo ra trong vi khuẩn được gây nhiễm dưới dạng ADN plasmit sợi kép được tạo vòng, và phagemit có thể được tạo ra dưới dạng các hạt giống thể thực khuẩn từ dịch nổi bề mặt nuôi cấy của tế bào bội

nhiễm. Chính các hạt này có thể được tái tạo dưới dạng plasmit bằng cách tiêm các hạt giống thể thực khuẩn vào vi khuẩn có F-pilus để gây nhiễm vi khuẩn bằng ADN này.

Gen dung hợp chứa polynucleotit có trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của peptit thử nghiệm và gen protein vỏ của thể thực khuẩn được chèn vào phagemit để gây nhiễm vi khuẩn, và các tế bào này được nuôi cấy. Do đó, peptit có thể được biểu hiện hoặc được trình diện (nghĩa giống như được thể hiện) trên vi khuẩn hoặc các hạt giống thể thực khuẩn hoặc có thể được tạo ra dưới dạng protein dung hợp với protein vỏ trong các hạt phago hoặc dịch nổi bề mặt nuôi cấy của vi khuẩn.

Ví dụ, peptit này có thể được tạo ra trong dịch nổi bề mặt nuôi cấy *Escherichia coli* dưới dạng protein dung hợp chứa peptit và protein vỏ bằng cách chèn gen dung hợp chứa polynucleotit và gen protein vỏ của thể thực khuẩn gpIII vào phagemit để gây bội nhiễm *Escherichia coli* bằng M13 hoặc phago hỗ trợ tương tự.

Trong trường hợp sử dụng các vector vòng hoặc không vòng khác nhau như vector của virus thay cho phagemit, peptit có trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit của polynucleotit được chèn vào vector này có thể được biểu hiện hoặc được trình diện trên tế bào trong đó vector được đưa vào hoặc trên các hạt giống virus, hoặc có thể được tạo ra trong dịch nổi bề mặt nuôi cấy của tế bào theo các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này.

Thư viện biểu hiện peptit thu được này có thể được ủ với sự có mặt của các phân tử đích hoặc được cho tiếp xúc với các phân tử đích. Ví dụ, chất mang mà KLK5, KLK5 và/hoặc KLK7, hoặc KLK5 và/hoặc KLK14 được cố định được ủ trong thời gian nhất định cùng với pha di động chứa thư viện, sau đó pha di động được tách ra khỏi chất mang, và sau đó chất mang được rửa để loại bỏ chất hấp thụ không đặc hiệu và chất liên kết. Do đó, peptit liên kết với chất mang (hoặc KLK5, KLK5 và/hoặc KLK7, hoặc KLK5 và/hoặc KLK14 liên kết với chất mang), cụm peptit, hoặc cụm peptit tập trung có thể được thu hồi bằng cách rửa giải. Quá trình rửa giải này có thể được thực hiện theo cách không chọn lọc dưới nồng độ ion tương đối cao, độ pH thấp, và điều kiện biến tính vừa phải, với sự có mặt của muối gây xáo trộn, và tương tự, hoặc có thể được thực hiện chọn lọc bằng cách bổ sung các phân tử đích hòa tan như KLK5, KLK7, và KLK14, các kháng thể mà liên kết với các phân tử đích, các phối tử tự nhiên, các cơ chất, và tương tự để cho phép hỗn hợp này cạnh

tranh với các phân tử đích được cố định. Các vị trí hấp phụ không đặc hiệu và/hoặc các vị trí liên kết có thể được, ví dụ, xử lý khóa, và bước xử lý khóa có thể được đưa vào miễn là đây là phương pháp thích hợp.

Vectơ biểu hiện peptit, cụm peptit, hoặc cụm peptit tập trung thu được theo cách này được thu hồi, và trình tự nucleotit của polynucleotit được chèn vào vectơ được xác định, để cho trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit có thể được xác định. Ngoài ra, cụm peptit liên kết với các phân tử đích có thể được tập trung ở mức độ cao hơn bằng cách đưa lại vectơ này vào tế bào chủ và lặp lại thao tác nêu trên theo chu trình một đến vài lần.

Biểu hiện trên riboxom là kỹ thuật tổng hợp protein mong muốn và mARN tương ứng với nó, và phân tử liên kết với ribosom trong ống thử nghiệm, ví dụ, bằng cách sử dụng mARN mã hóa protein mong muốn không có codon kết thúc và hệ thống tổng hợp protein không có tế bào. Thư viện trình diện nhóm protein được đột biến ngẫu nhiên trên ribosom có thể thu được, bằng cách sử dụng nhóm mARN thu được bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của protein và hệ thống tổng hợp protein không chứa tế bào (Mattheakis LC, et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 91, No. 19, trang 9022-9029).

Biểu hiện trên axit nucleic còn được gọi là biểu hiện mARN và là kỹ thuật tổng hợp protein mong muốn, mARN mã hóa protein, và phân tử liên kết với ribosom, ví dụ, bằng cách sử dụng nhóm liên kết như puromyxin có cấu trúc tương tự với đầu 3' của tyrosyl tARN. Do kỹ thuật này sử dụng hệ thống tổng hợp protein không chứa tế bào thay cho các tế bào sống, việc tổng hợp trong ống thử nghiệm là có thể thực hiện. Thư viện trình diện nhóm protein được đột biến ngẫu nhiên trên ribosom có thể thu được, bằng cách sử dụng nhóm mARN thu được bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của protein, nhóm liên kết như puromyxin, và hệ thống tổng hợp protein không chứa tế bào (Nemoto N, et al. (1997) FEBS Lett., Vol. 414, No. 2, trang 405-408).

Thư viện thu được thông qua hệ thống tổng hợp không chứa tế bào như biểu hiện trên riboxom hoặc biểu hiện trên axit nucleic và biểu hiện peptit có thể được ủ với sự có mặt của các phân tử đích hoặc được cho tiếp xúc với các phân tử đích. Ví dụ, chất mang mà KLK5, KLK5 và/hoặc KLK7, hoặc KLK5 và/hoặc KLK14 được cố định được ủ trong

thời gian nhất định cùng với pha di động chứa thư viện, sau đó pha di động được tách ra khỏi chất mang, và sau đó chất mang được rửa để loại bỏ chất hấp thụ không đặc hiệu và chất liên kết. Do đó, peptit liên kết với chất mang (hoặc KLK5, KLK5 và/hoặc KLK7, hoặc KLK5 và/hoặc KLK14 liên kết với chất mang), cụm peptit, hoặc cụm peptit tập trung có thể được thu hồi bằng cách rửa giải. Quá trình rửa giải có thể được thực hiện theo cách không chọn lọc trong điều kiện nồng độ ion tương đối cao, độ pH thấp, và điều kiện biến tính vừa phải, với sự có mặt của muối gây xáo trộn, và tương tự, hoặc có thể được thực hiện chọn lọc bằng cách bổ sung các phân tử đích tan như KLK5, KLK7, và KLK14, các kháng thể mà liên kết với các phân tử đích, các phối tử tự nhiên, các cơ chất, và tương tự để cho phép hỗn hợp này cạnh tranh với các phân tử đích được cố định. Các vị trí hấp phụ không đặc hiệu và/hoặc các vị trí liên kết có thể, ví dụ, được xử lý khóa, và bước xử lý khóa có thể được đưa vào miễn là đây là phương pháp thích hợp.

Các axit nucleic biểu hiện peptit, cụm peptit, hoặc cụm peptit tập trung thu được theo cách này được thu hồi, và trình tự nucleotit được xác định sau khi phiên mã ngược thành cADN trong trường hợp mARN, để cho trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit có thể được xác định. Ngoài ra, cụm peptit liên kết với các phân tử đích có thể được tập trung ở mức độ cao hơn bằng cách phiên mã mARN từ các axit nucleic được thu hồi theo cách này và lặp lại thao tác nêu trên theo chu trình một đến vài lần.

Peptit hoặc cụm peptit có thể được tinh chế hiệu quả bằng cách liên hợp trước đuôi ái lực với peptit, cụm peptit, hoặc cụm peptit tập trung. Ví dụ, peptit có thể được rửa giải bằng cách liên hợp trước cơ chất của proteaza dưới dạng cụm peptit đuôi và sau đó phân cắt nó thông qua hoạt tính proteaza.

Dựa trên thông tin trình tự thu được và các chức năng hoặc tương tự của peptit, các đột biến khác được gây ra trong dòng hoặc thư viện thu được, để cho các peptit có các chức năng (ví dụ, hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc hoạt tính ức chế KLK5/KLK14), các đặc tính vật lý (như độ ổn định nhiệt và độ ổn định bảo quản), các đặc tính dược động học (như sự phân bố và thời gian bán hủy trong máu), và tương tự được cải thiện có thể thu được từ thư viện mà đột biến này đã được đưa vào.

Peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 có thể được nhận dạng bằng xác định xem peptit thu được có hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc hoạt tính ức chế KLK5/KLK14 tương ứng hay không.

Ngoài ra, peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 có thể tốt hơn là duy trì cấu trúc ba chiều được tạo bởi cấu trúc vòng bao gồm Ser16 đến Val30 được chứa trong trình tự axit amin của SPINK2 kiểu đại, cấu trúc gấp nếp β bao gồm sợi β (1) bao gồm Cys31 và Gly32 và sợi β (2) bao gồm Ile57 đến Arg59, và cấu trúc xoắn α bao gồm Glu41 đến Gly51, hoặc cấu trúc vòng, cấu trúc gấp nếp β , và cấu trúc xoắn α tương tự với hoặc ít nhất tương ứng một phần với cấu trúc nêu trên (các vị trí của nó), tới mức là hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc hoạt tính ức chế KLK5/KLK14 có thể được tạo ra. Cũng có thể nhận dạng peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 thích hợp hơn bằng cách sử dụng cấu trúc ba chiều này (toàn bộ cấu trúc hoặc một phần cấu trúc) làm một phần của chỉ số.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 bằng cách sử dụng thư viện thể đột biến SPINK2, và các ví dụ của nó có thể bao gồm phương pháp được mô tả trong mục (75) nêu trên. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định hợp chất ức chế KLK5, hợp chất ức chế KLK5/KLK7, hoặc hợp chất ức chế KLK5/KLK14, bằng cách sử dụng các thư viện hợp chất khác nhau. Theo phương pháp này, peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó có thể được sử dụng làm hợp chất tham chiếu, chất đối chứng, hoặc tương tự, và phương pháp này có thể được ví dụ bằng (76) nêu trên. Theo phương pháp này, hợp chất thử nghiệm có thể được xác định là dương tính khi hoạt tính ức chế enzym của hợp chất là tương đương với hoặc mạnh hơn hoạt tính ức chế enzym của hợp chất tham chiếu hoặc đối chứng, trong khi hợp chất này có thể được xác định là âm tính khi hoạt tính ức chế enzym là yếu hơn. Phương pháp liên quan đến sự so sánh này có thể được ví dụ bằng (77) nêu trên. Trong khi đó, peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó có thể được sử dụng làm hợp chất tham chiếu, chất đối chứng, hoặc tương tự, trong thử nghiệm bất kỳ liên quan đến bước đo hoạt tính proteaza của KLK5 và tùy ý KLK7 hoặc KLK14, và phương pháp thử nghiệm này cũng được bao gồm theo sáng chế. Thử nghiệm này là không bị giới hạn cụ

thể và có thể được ví dụ bằng (78) nêu trên. Các ví dụ thích hợp của nó có thể bao gồm phương pháp chẩn đoán, phương pháp thử nghiệm, phương pháp phát hiện, và phương pháp xác định cá thể mà được phẩm cần được sử dụng theo sáng chế (tất cả các phương pháp này sẽ được mô tả dưới đây).

4. Các phân tử axit nucleic mã hóa peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó, vector chứa chúng, tế bào chứa chúng, và phương pháp tạo ra peptit tái tổ hợp hoặc thể liên hợp.

Sáng chế cũng đề xuất polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 (sau đây nó sẽ được gọi là "các phân tử axit nucleic mã hóa peptit ức chế KLK5", "các phân tử axit nucleic mã hóa peptit ức chế KLK5/KLK7", hoặc "các phân tử axit nucleic mã hóa peptit ức chế KLK5/KLK14"), vector tái tổ hợp có gen này được chèn vào, tế bào có gen hoặc vector này được đưa vào (sau đây nó sẽ được gọi là "tế bào chứa các phân tử axit nucleic mã hóa peptit ức chế KLK5", "tế bào chứa các phân tử axit nucleic mã hóa peptit ức chế KLK5/KLK7", hoặc "tế bào chứa các phân tử axit nucleic mã hóa peptit ức chế KLK5/KLK14"), tế bào sản sinh peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 (sau đây nó sẽ được gọi là "tế bào sản sinh peptit ức chế KLK5", "tế bào sản sinh peptit ức chế KLK5/KLK7", hoặc "tế bào sản sinh peptit ức chế KLK5/KLK14").

Các ví dụ thích hợp về các phân tử axit nucleic mã hóa peptit ức chế KLK5, các phân tử axit nucleic mã hóa peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc các phân tử axit nucleic mã hóa peptit ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế có thể bao gồm các phân tử chứa trình tự nucleotit được mô tả trong bất kỳ một trong số mục (a1) đến (a4), (b1) đến (b4), hoặc (c1) đến (c4) dưới đây (sau đây chúng sẽ được gọi lần lượt là "trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5", "trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK7", hoặc "trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK14"), các phân tử bao gồm trình tự nucleotit chứa trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5, trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK14, hoặc các phân tử bao gồm trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5, trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK14:

(a1) trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit 1 đến 189 trong trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin bao gồm các axit amin ở các vị trí 1 đến 63 trong trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, và 20 (các hình vẽ Fig.14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, và 28) hoặc trình tự nucleotit được mô tả trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, và 19 (các hình vẽ Fig.13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, và 27);

(a2) trình tự nucleotit mà lai với trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit được mô tả trong (a1) trong các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5;

(a3) trình tự nucleotit được tạo ra bằng cách thay thế, xóa, bổ sung, và/hoặc chèn 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 hoặc 2, hoặc 1 nucleotit hoặc gốc nucleotit trong trình tự nucleotit được mô tả trong (a1) và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5; và

(a4) trình tự nucleotit có mức độ giống 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit được mô tả trong (a1) và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5:

(b1) trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin bao gồm các axit amin ở các vị trí 1 đến 63 trong trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 22, 24, 26, và 28 (các hình vẽ Fig.30, 32, 34, và 36) hoặc trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit 1 đến 189 trong trình tự nucleotit được mô tả trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 21, 23, 25, và 27 (các hình vẽ Fig.29, 31, 33, và 35);

(b2) trình tự nucleotit mà lai với trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit được mô tả trong (b1) trong các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK7;

(b3) trình tự nucleotit được tạo ra bằng cách thay thế, xóa, bổ sung, và/hoặc chèn 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 hoặc 2, hoặc 1 nucleotit hoặc gốc nucleotit trong trình tự nucleotit được mô tả trong (b1) và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK7; và

(b4) trình tự nucleotit có mức độ giống 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit được mô tả trong (b1) và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK7:

(c1) trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin bao gồm các axit amin ở các vị trí 1 đến 63 trong trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 30 và 32 (các hình vẽ Fig.38 và 40), hoặc trình tự nucleotit bao gồm các nucleotit 1 đến 189 trong trình tự nucleotit được mô tả trong SEQ ID NO: 29 hoặc 31 (Fig.37 hoặc 39);

(c2) trình tự nucleotit mà lai với trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit được mô tả trong (c1) trong các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK14;

(c3) trình tự nucleotit được tạo ra bằng cách thay thế, xóa, bổ sung, và/hoặc chèn 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 hoặc 2, hoặc 1 nucleotit hoặc gốc nucleotit trong trình tự nucleotit được mô tả trong (c1) và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK14; và

(c4) trình tự nucleotit có mức độ giống 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit được mô tả trong (c1) và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit có hoạt tính ức chế KLK5/KLK14.

Peptit đột biến SPINK2 chứa trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit được mô tả trong bất kỳ một trong số (a1) đến (a4), (b1) đến (b4), hoặc (c1) đến (c4) nêu trên hoặc chứa trình tự axit amin ức chế hoạt tính proteaza của KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14, tốt hơn là ức chế đặc hiệu hoạt tính proteaza của nó.

Các nucleotit 190 đến 195 trong SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, và 31 (các hình vẽ Fig.13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, và 39) không là các nucleotit tương ứng với các nucleotit trong trình tự nucleotit mã hóa SPINK2 kiểu dại của người (SEQ ID NO: 1, Fig.9: bao gồm 63 axit amin) nhưng được bổ sung để biểu hiện peptit theo sáng chế theo một khía cạnh của sáng chế.

Tuy nhiên, các phân tử axit nucleic mã hóa peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 không bị giới hạn ở các phân tử được mô tả trong (a1) đến (a4), (b1) đến (b4), hoặc (c1) đến (c4), và các phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin chứa trong thể đột biến SPINK2 có hoạt tính

ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc hoạt tính ức chế KLK5/KLK14, tốt hơn là, có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 61 (Fig.69) đều được bao gồm trong phạm vi của các phân tử axit nucleic mã hóa peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin chứa trong thể liên hợp peptit ức chế KLK5, thể liên hợp peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc thể liên hợp peptit ức chế KLK5/KLK14 (sau đây chúng sẽ được gọi là "các phân tử axit nucleic mã hóa thể liên hợp ức chế KLK5", "các phân tử axit nucleic mã hóa thể liên hợp ức chế KLK5/KLK7", hoặc "các phân tử axit nucleic mã hóa thể liên hợp ức chế KLK5/KLK14" tương ứng), vector tái tổ hợp có gen này được chèn vào, tế bào có gen hoặc vector này được đưa vào (sau đây chúng sẽ được gọi là "tế bào chứa các phân tử axit nucleic mã hóa thể liên hợp ức chế KLK5", "tế bào chứa các phân tử axit nucleic mã hóa thể liên hợp ức chế KLK5/KLK7", hoặc "tế bào chứa các phân tử axit nucleic mã hóa thể liên hợp ức chế KLK5/KLK14"), và tế bào sản sinh thể liên hợp peptit ức chế KLK5, thể liên hợp peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc thể liên hợp peptit ức chế KLK5/KLK14 (sau đây chúng sẽ được gọi là "tế bào sản sinh thể liên hợp ức chế KLK5", "tế bào sản sinh thể liên hợp ức chế KLK5/KLK7", hoặc "tế bào sản sinh thể liên hợp ức chế KLK5/KLK14" tương ứng).

Các ví dụ thích hợp về các phân tử axit nucleic mã hóa thể liên hợp ức chế KLK5, các phân tử axit nucleic mã hóa thể liên hợp ức chế KLK5/KLK7, hoặc các phân tử axit nucleic mã hóa thể liên hợp ức chế KLK5/KLK14 theo sáng chế có thể lần lượt bao gồm các phân tử chứa trình tự nucleotit được mô tả trong bất kỳ một trong số mục (a1) đến (a4), (b1) đến (b4), hoặc (c1) đến (c4) dưới đây (sau đây chúng sẽ được gọi là "trình tự nucleotit của thể liên hợp ức chế KLK5", "trình tự nucleotit của thể liên hợp ức chế KLK5/KLK7", hoặc "trình tự nucleotit của thể liên hợp ức chế KLK5/KLK14" tương ứng), các phân tử bao gồm trình tự nucleotit chứa trình tự nucleotit của thể liên hợp ức chế KLK5, trình tự nucleotit của thể liên hợp ức chế KLK5/KLK7, hoặc trình tự nucleotit của thể liên hợp ức chế KLK5/KLK14, hoặc các phân tử bao gồm trình tự nucleotit của thể liên hợp ức chế KLK5, trình tự nucleotit của thể liên hợp ức chế KLK5/KLK7, hoặc trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK14:

(a1) trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, và 96 (các hình vẽ Fig.42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, và 106) hoặc trình tự nucleotit được mô tả trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, và 95 (các hình vẽ Fig.41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, và 105);

(a2) trình tự nucleotit mà lai với trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit được mô tả trong (a1) trong các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit hoặc thể liên hợp có hoạt tính ức chế KLK5;

(a3) trình tự nucleotit được tạo ra bằng cách thay thế, xóa, bổ sung, và/hoặc chèn 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 hoặc 2, hoặc 1 nucleotit hoặc gốc nucleotit trong trình tự nucleotit được mô tả trong (a1) và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit hoặc thể liên hợp có hoạt tính ức chế KLK5; và

(a4) trình tự nucleotit có mức độ giống 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit được mô tả trong (a1) và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit hoặc thể liên hợp có hoạt tính ức chế KLK5:

(b1) trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 50, 52, 54, và 56 (các hình vẽ Fig.58, 60, 62, và 64) hoặc trình tự nucleotit được mô tả trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 49, 51, 53, và 55 (các hình vẽ Fig.57, 59, 61, và 63);

(b2) trình tự nucleotit mà lai với trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit được mô tả trong (b1) trong các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit hoặc thể liên hợp có hoạt tính ức chế KLK5/KLK7;

(b3) trình tự nucleotit được tạo ra bằng cách thay thế, xóa, bổ sung, và/hoặc chèn 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 hoặc 2, hoặc 1 nucleotit hoặc gốc nucleotit trong trình tự nucleotit được mô tả trong (b1) và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit hoặc thể liên hợp có hoạt tính ức chế KLK5/KLK7; và

(b4) trình tự nucleotit có mức độ giống 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit được mô tả trong (b1) và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit hoặc thể liên hợp có hoạt tính ức chế KLK5/KLK7:

(c1) trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được nêu trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 58 và 60 (các hình vẽ Fig.66 và 68) hoặc trình tự nucleotit được mô tả trong SEQ ID NO: 57 hoặc 59 (Fig.65 hoặc 67);

(c2) trình tự nucleotit mà lai với trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit được mô tả trong (c1) trong các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit hoặc thể liên hợp có hoạt tính ức chế KLK5/KLK14;

(c3) trình tự nucleotit được tạo ra bằng cách thay thế, xóa, bổ sung, và/hoặc chèn 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 8, 1 đến 6, 1 đến 5, 1 đến 4, 1 đến 3, 1 hoặc 2, hoặc 1 nucleotit hoặc gốc nucleotit trong trình tự nucleotit được mô tả trong (c1) và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit hoặc thể liên hợp có hoạt tính ức chế KLK5/KLK14; và

(c4) trình tự nucleotit có mức độ giống 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit được mô tả trong mục (c1) và mã hóa trình tự axit amin chứa trong peptit hoặc thể liên hợp có hoạt tính ức chế KLK5/KLK14.

Peptit đột biến SPINK2 chứa trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit được mô tả trong bất kỳ một trong số mục (a1) đến (a4), (b1) đến (b4), hoặc (c1) đến (c4) nêu trên hoặc chứa trình tự axit amin ức chế hoạt tính proteaza của KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14, tốt hơn là ức chế đặc hiệu hoạt tính proteaza của nó.

Tuy nhiên, các phân tử axit nucleic mã hóa peptit ức chế KLK5, peptit ức chế KLK5/KLK7, hoặc peptit ức chế KLK5/KLK14 không bị giới hạn ở các phân tử được mô tả trong mục (a1) đến (a4), (b1) đến (b4), hoặc (c1) đến (c4), và các phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin chứa trong thể liên hợp chứa trình tự axit amin chứa trong thể đột biến SPINK2 có hoạt tính ức chế KLK5, hoạt tính ức chế KLK5/KLK7, hoặc hoạt tính ức chế KLK5/KLK14, tốt hơn là, có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 61 (Fig.69) đều được bao gồm trong phạm vi của các phân tử axit nucleic mã hóa thể liên hợp ức chế KLK5, các phân tử axit nucleic mã hóa thể liên hợp ức chế KLK5/KLK7, hoặc các phân tử axit nucleic mã hóa thể liên hợp ức chế KLK5/KLK14.

Để thiết kế trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin, một hoặc nhiều codon tương ứng với các axit amin tương ứng có thể được sử dụng. Do đó, trình tự bazơ mã hóa một trình tự axit amin của peptit có thể có nhiều thay đổi. Khi chọn các codon này, các codon

có thể được chọn thích hợp tương ứng với việc sử dụng codon của tế bào chủ để biểu hiện, mà polynucleotit chứa trình tự nucleotit hoặc vector chứa nó cần được đưa vào, hoặc tần suất hoặc tỷ lệ sử dụng của nhiều codon có thể được điều chỉnh thích hợp. Ví dụ, trong trường hợp sử dụng *Escherichia coli* làm tế bào chủ, trình tự nucleotit có thể được thiết kế bằng cách sử dụng codon thường được sử dụng trong *Escherichia coli*.

Các phân tử axit nucleic mã hóa peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó có thể được liên kết chức năng với một hoặc nhiều trình tự điều hòa. Thuật ngữ "được liên kết chức năng" có nghĩa là làm cho các phân tử axit nucleic đã liên kết được biểu hiện hoặc làm cho trình tự nucleotit chứa trong các phân tử này được biểu hiện. Trình tự điều hòa này chứa các thành phần trình tự bao gồm thông tin về sự điều hòa phiên mã và/hoặc sự điều hòa dịch mã. Trình tự điều hòa thay đổi phụ thuộc vào loài nhưng nói chung chứa trình tự khởi đầu và trình tự không mã hóa đầu 5' tham gia vào sự khởi đầu phiên mã và dịch mã như hộp -35/-10 của tế bào chứa có nhân điển hình, trình tự Shine-Dalgarno, hộp TATA của tế bào có nhân điển hình, trình tự CAAT, và trình tự tạo mũ đầu 5'. Trình tự này có thể bao gồm thành phần tăng cường và/hoặc thành phần kìm hãm, và trình tự tín hiệu có thể dịch mã, trình tự dẫn đầu, và tương tự để cung cấp peptit tự nhiên hoặc trưởng thành cho khoang cụ thể bên trong hoặc bên ngoài tế bào chủ. Ngoài ra, trình tự điều hòa này có thể bao gồm trình tự không mã hóa đầu 3', và trình tự này có thể bao gồm các thành phần tham gia vào sự kết thúc phiên mã, polyadenyl hóa, hoặc tương tự. Tuy nhiên, khi một trình tự liên quan đến sự kết thúc phiên mã không hoạt động đủ trong tế bào chủ cụ thể, trình tự này có thể được thay thế bằng trình tự thích hợp với tế bào.

Các ví dụ về trình tự khởi đầu có thể bao gồm trình tự khởi đầu tet, trình tự khởi đầu lacUV5, và trình tự khởi đầu T7 đối với các tế bào chứa có nhân điển hình, và trình tự khởi đầu SV40 và trình tự khởi đầu CMV đối với các tế bào có nhân điển hình.

Các phân tử axit nucleic mã hóa peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó có thể được phân lập hoặc chứa trong vector hoặc các phương tiện tạo dòng khác (sau đây chúng sẽ được gọi đơn giản là "vector" như plasmit, phagemit, thể thực khuẩn, baculovirus, và cosmit), hoặc nhiễm sắc thể, nhưng không giới hạn ở các dạng này. Vector này có thể chứa trình tự sao chép và trình tự điều khiển mà thích hợp đối với tế bào chủ để được sử dụng để biểu hiện, và gen đánh dấu chọn lọc để tạo ra kiểu hình có thể chọn tế bào mà các phân

từ axit nucleic đã được đưa vào đó bằng cách biến nạp hoặc tương tự, ngoài trình tự điều hòa.

Các phân tử axit nucleic mã hóa peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó, và vector chứa trình tự nucleotit của peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó có thể được đưa vào bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này, như biến nạp vào tế bào chủ có thể biểu hiện peptit, thể liên hợp, hoặc trình tự nucleotit này. Tế bào chủ có các phân tử axit nucleic hoặc vector được đưa vào đó có thể được nuôi cấy trong điều kiện thích hợp để biểu hiện peptit hoặc trình tự nucleotit. Tế bào chủ có thể là hoặc chưa có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình. Các ví dụ về tế bào chưa có nhân điển hình có thể bao gồm *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis*, và các ví dụ về tế bào có nhân điển hình có thể bao gồm nấm men như *Saccharomyces cerevisiae* và *Pichia pastoris*, các tế bào côn trùng như SF9 và High5, và các tế bào động vật như tế bào HeLa, tế bào CHO, tế bào COS, và NS0. Peptit theo sáng chế mà được biểu hiện có thể được cải biến sau dịch mã mong muốn bằng cách sử dụng tế bào có nhân điển hình hoặc tương tự làm tế bào chủ. Các ví dụ về cải biến sau dịch mã có thể bao gồm bổ sung các nhóm chức như mạch đường, bổ sung peptit hoặc protein, biến đổi các đặc tính hóa học của axit amin, và tương tự. Ngoài ra, các cải biến mong muốn có thể được áp dụng theo cách nhân tạo cho peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó. Các peptit hoặc thể liên hợp được cải biến này cũng được bao gồm trong phạm vi của "peptit" hoặc "thể liên hợp" theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra peptit hoặc thể liên hợp. Phương pháp này bao gồm bước 1 nuôi cấy tế bào chứa các phân tử axit nucleic mã hóa peptit ức chế KLK5 (hoặc thể liên hợp ức chế KLK5) hoặc tế bào sản sinh peptit ức chế KLK5 (hoặc thể liên hợp ức chế KLK5), tế bào chứa các phân tử axit nucleic mã hóa peptit ức chế KLK5/KLK7 (hoặc thể liên hợp ức chế KLK5/KLK7) hoặc tế bào sản sinh peptit ức chế KLK5/KLK7 (hoặc thể liên hợp ức chế KLK5/KLK7), hoặc tế bào chứa các phân tử axit nucleic mã hóa peptit ức chế KLK5/KLK14 (hoặc thể liên hợp ức chế KLK5/KLK14) hoặc tế bào sản sinh peptit ức chế KLK5/KLK14 (hoặc thể liên hợp ức chế KLK5/KLK14), và/hoặc bước 2 thu hồi thể đột biến SPINK2 từ dịch nuôi cấy thu được trong bước 1. Các thao tác đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này như phân đoạn, sắc ký, và tinh chế có thể được áp dụng cho bước 2. Ví dụ, tinh chế bằng phương pháp sắc ký ái lực bằng cách sử dụng

kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh liên kết của nó, mà sẽ được mô tả dưới đây, có thể được áp dụng cho nó.

Theo một số khía cạnh của sáng chế, peptit hoặc peptit được bao gồm trong thể liên hợp có các liên kết nội phân tử disulfua. Có thể tốt hơn nếu cung cấp peptit có liên kết disulfua nội phân tử cho khoang tế bào có môi trường oxy hóa khử dạng oxy hóa bằng cách sử dụng trình tự tín hiệu hoặc tương tự. Môi trường oxy hóa này có thể được tạo ra bằng chất bào của vi khuẩn gram âm như *Escherichia coli*, môi trường ngoại bào của vi khuẩn gram dương, lumen của lưới nội chất của tế bào có nhân điển hình, hoặc tương tự, và sự tạo thành liên kết disulfua của cấu trúc có thể được thúc đẩy trong môi trường này. Ngoài ra, cũng có thể tạo ra peptit có liên kết disulfua nội phân tử trong chất tế bào của tế bào chủ như *Escherichia coli*. Trong trường hợp này, peptit có thể được tạo ra trực tiếp ở trạng thái tan và gấp cuộn hoặc có thể được thu hồi ở dạng thể vùi và sau đó được hoàn nguyên *in vitro*. Ngoài ra, cũng có thể chọn tế bào chủ có môi trường oxy hóa nội bào để tạo ra peptit có liên kết disulfua nội phân tử trong chất tế bào của nó. Trong khi đó, khi peptit không có liên kết disulfua nội phân tử, peptit này có thể được tạo ra trong khoang tế bào có môi trường oxy hóa khử dạng khử, như chất tế bào của vi khuẩn gram âm.

Peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó (gốc peptit chứa trong đó) có thể được tạo ra bằng các phương pháp khác đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này, như phương pháp tổng hợp peptit pha rắn của Merrifield và các đồng tác giả, và phương pháp tổng hợp hóa học được ví dụ bằng phương pháp tổng hợp peptit hóa học tổng hợp hữu cơ bằng cách sử dụng t-butoxycarbonyl (Boc), 9-florenylmetoxycarbonyl (Fmoc), hoặc tương tự, và dịch mã *in-vitro*.

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể liên kết với peptit theo sáng chế hoặc peptit chứa trong thể liên hợp, và mảnh liên kết của nó. Kháng thể này có thể là hoặc kháng thể đa dòng hoặc kháng thể đơn dòng, và kháng thể đơn dòng là không bị giới hạn cụ thể, miễn là kháng thể này là globulin miễn dịch hoặc dẫn xuất của nó. Đoạn liên kết của kháng thể là không bị giới hạn, miễn là nó có hoạt tính liên kết kháng nguyên, tức là, hoạt tính liên kết với peptit. Cả hai hoặc một trong số các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ hoặc các mảnh của nó, các chuỗi không có vùng hằng định hoặc vùng Fc, và thể liên hợp với các protein hoặc các chất đánh dấu khác cũng được bao gồm trong đó. Kháng thể và mảnh

liên kết của nó có thể được điều chế bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực này và có thể dùng để tinh chế peptit bằng cách sắc ký ái lực, phát hiện peptit trong các thử nghiệm lâm sàng, chẩn đoán, hoặc tương tự liên quan đến dược phẩm chứa peptit này hoặc việc sử dụng của nó, thử nghiệm miễn dịch, và tương tự. Kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh liên kết của nó có thể được tinh chế bằng phương pháp sắc ký ái lực bằng cách sử dụng peptit theo sáng chế mà kháng thể hoặc mảnh này liên kết với.

5. Dược phẩm

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó.

Dược phẩm chứa peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó là hữu ích để điều trị và/hoặc phòng ngừa các bệnh khác nhau được gây ra hoặc làm trầm trọng thêm bởi KLK5 (sau đây nó sẽ được gọi là "các bệnh liên quan đến KLK5" hoặc "các bệnh có liên quan KLK5") và trong đó việc ngăn chặn sự gây ra hoặc làm trầm trọng thêm này, việc hồi phục, duy trì hoặc cải thiện triệu chứng, tránh các bệnh thứ phát, hoặc tương tự là có thể đạt được bằng cách ức chế hoặc ngăn chặn sự biểu hiện hoặc các chức năng của KLK5. Các ví dụ về các bệnh liên quan đến KLK5 có thể bao gồm hội chứng Netherton (Furio, L., et al. (2015) PLoS. Genet., Vol. 11, p. e1005389), bệnh viêm da dị ứng (Fortugno, P., et al. (2012) Hum. Mol. Genet., Vol. 21, trang 4187-4200), bệnh trứng cá đỏ (Yamasaki, K., et al. (2007) Nat. Med., Vol. 13, trang 975-980), tổn thương da do UV (Nin, M., et al. (2009) J. Dermatol. Sci., Vol. 54, trang 17-24), bệnh vẩy nến (Komatsu, N., et al. (2007) Br. J. Dermatol., Vol. 156, trang 875-883), bệnh hen (Grunberg, M., et al. (2018) Eur. J. Immunol., Vol. 48, trang 1592-1594), tổn thương tủy sống (Radulovic, M., et al. (2013) J. Neuropathol. Exp. Neurol., Vol. 72, trang 1072-1089), bệnh ung thư (như bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư biểu mô bàng quang, bệnh ung thư kết trực tràng, bệnh caxinom tế bào vảy trong miệng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư vùng đầu và cổ, u melanin, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, và u thần kinh đệm) (Emami, N., et al. (2007) Mol. Oncol., Vol. 1, trang 269-287), và bệnh thực quản Barrett (cơ sở dữ liệu biểu hiện gen Omnibus, dựa trên mã số lưu trữ #GSE13083), nhưng không giới hạn ở các ví dụ này.

KLK5 được cho là yếu tố chính trong sự phát triển của các triệu chứng trên da tương tự hội chứng Netherton. KLK5 là một proteaza tự hoạt hóa và còn tham gia vào sự hoạt hóa KLK7 và KLK14. Trong khi đó, trong lớp sừng của các bệnh nhân bị hội chứng

Netherton và chuột nhắt của mô hình hội chứng Netherton, hoạt tính proteaza như trypsin và chymotrypsin được quan sát, và đã gợi ý rằng họ kalikrein nằm xuôi dòng, như KLK7 và KLK14, có liên quan đến hoạt tính proteaza trong lớp sừng, ngoài KLK5. Đã cho rằng có thể có các trường hợp trong đó các triệu chứng trên da giống hội chứng Netherton có thể được ngăn chặn mạnh hơn bằng cách ức chế KLK7 hoặc KLK14 ngoài KLK5. 70 hoặc nhiều hơn 70 ví dụ về các đột biến trong SPINK5 có liên quan đến hội chứng Netherton được nêu trong cơ sở dữ liệu đột biến gen người (Human Gen Mutation Database, HGMD) và được thông báo là có liên quan đến mức độ nặng của hội chứng Netherton. Các đột biến ở các exon 1 đến 9 của SPINK5 có liên quan đến bệnh lý nặng hơn của hội chứng Netherton. Việc được phẩm chứa peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó có cần được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa hội chứng Netherton hay không có thể được xác định bằng cách nghiên cứu các đột biến trong SPINK5.

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa lượng hữu hiệu điều trị hoặc phòng bệnh của peptit hoặc thể liên hợp theo sáng chế và chất pha loãng, chất mang, chất hòa tan, chất nhũ hóa, chất bảo quản, và/hoặc chất phụ trợ được dụng.

Thuật ngữ "lượng hữu hiệu điều trị hoặc phòng bệnh" nghĩa là lượng tạo ra tác dụng điều trị hoặc phòng bệnh đối với bệnh, dạng sử dụng, hoặc đường sử dụng cụ thể, và có nghĩa giống như "lượng hiệu quả về mặt dược lý".

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa các chất để làm thay đổi, duy trì, hoặc giữ được độ pH, áp suất thẩm thấu, độ nhớt, độ trong suốt, màu sắc, độ đẳng trương, độ vô trùng, hoặc độ ổn định, độ tan, khả năng giải phóng kéo dài, khả năng hấp thụ, khả năng thấm, dạng liều, nồng độ, các đặc tính, hình dạng, v.v., của chế phẩm hoặc peptit, thể liên hợp, hoặc tương tự chứa trong chế phẩm (sau đây chúng sẽ được gọi là "nguyên liệu dược phẩm"). Các nguyên liệu dược phẩm này là không bị giới hạn cụ thể, miễn là chúng là các nguyên liệu chấp nhận được về mặt dược lý. Ví dụ, không có độc tính hoặc độc tính thấp là đặc tính mà tốt hơn là nguyên liệu dược phẩm cần có.

Các ví dụ về nguyên liệu dược phẩm có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các nguyên liệu sau: axit amin như glyxin, alanin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin, chất kháng vi khuẩn, chất chống oxy hóa như axit ascorbic, natri sulfat, hoặc natri bisulfit, chất đệm như chất đệm phosphat, xitrat, hoặc borat, natri bicarbonat, hoặc

dung dịch axit tris-clohydric (Tris-HCl), chất độn như manitol và glyxin, chất tạo chelat như axit etylendiamintetraaxetic (EDTA), các chất tạo phức như cafein, polyvinyl pyrrolidin, β -xyclodextrin, hoặc hydroxypropyl- β -xyclodextrin, các chất độn như glucoza, manozo, hoặc dextrin, monosacarit, disacarit, các hydrat cacbon khác như glucoza, manozo, hoặc dextrin, chất màu, chất điều vị, chất pha loãng, chất nhũ hóa, các polyme ưa nước như polyvinyl pyrrolidin, chất bảo quản như polypeptit có trọng lượng phân tử thấp, các ion đổi tạo muối, benzalkoni clorua, axit benzoic, axit salixylic, thimerosal, rượu phenetylic, metylparaben, propylparaben, clohexidin, axit sorbic, hoặc hydro peroxit, các dung môi như glyxerin, propylen glycol, hoặc polyetylen glycol (PEG), các rượu đường như manitol hoặc sorbitol, các chất tạo hỗn dịch, polysorbat như sorbitan este, polysorbat 20, hoặc polysorbat 80, chất hoạt động bề mặt như triton, trometamin, lexitin, hoặc cholesterol, chất làm tăng độ ổn định như sucroza hoặc sorbitol, chất làm tăng tính đàn hồi như natri clorua, kali clorua, manitol, hoặc sorbitol, chất vận chuyển, chất pha loãng, tá dược, và/hoặc chất phụ trợ được dùng.

Lượng của các nguyên liệu được phẩm này cần được bổ sung vào nằm trong khoảng từ 0,001 đến 1000 lần, tốt hơn là 0,01 đến 100 lần, tốt hơn nữa là 0,1 đến 10 lần, trọng lượng của peptit theo sáng chế hoặc peptit chứa trong thể liên hợp.

Liposom chứa peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp và được phẩm chứa dạng được cải biến được tạo ra bằng cách liên kết peptit này với liposom cũng được bao gồm trong được phẩm theo sáng chế.

Các tá dược hoặc chất mang là không bị giới hạn cụ thể miễn là chúng là chất lỏng hoặc chất rắn thường dùng để sử dụng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa, như nước có thể tiêm, nước muối, dịch não tủy nhân tạo, và các chế phẩm khác. Các ví dụ về nước muối có thể bao gồm nước muối trung tính và nước muối chứa albumin huyết thanh.

Các ví dụ về chất đệm có thể bao gồm chất đệm Tris được điều chỉnh để đưa độ pH cuối của được phẩm đến giá trị nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,5, chất đệm axetat được điều chỉnh để đưa độ pH cuối của nó đến giá trị nằm trong khoảng từ 4,0 đến 5,5, chất đệm xitrat được điều chỉnh để đưa độ pH cuối của nó đến giá trị nằm trong khoảng từ 5,0 đến 8,0, và chất đệm histidin được điều chỉnh để đưa độ pH cuối của nó đến giá trị nằm trong khoảng từ 5,0 đến 8,0.

Dược phẩm theo sáng chế là chất rắn, chất lỏng, hỗn dịch, hoặc tương tự. Ví dụ khác về dược phẩm theo sáng chế có thể bao gồm chế phẩm sấy khô nhiệt độ thấp. Chế phẩm sấy khô nhiệt độ thấp này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng tá dược như sucroza.

Đường sử dụng của dược phẩm theo sáng chế có thể là bất kỳ trong số thuốc nhỏ mắt, sử dụng qua đường ruột, sử dụng khu trú, và sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Các ví dụ của nó có thể bao gồm thuốc nhỏ mắt cho kết mạc, sử dụng trong dịch kính, sử dụng trong tĩnh mạch, sử dụng trong động mạch, sử dụng trong cơ, sử dụng trong chân bì, sử dụng dưới da, sử dụng trong màng bụng, sử dụng qua chân bì, sử dụng trong xương, và sử dụng trong khớp.

Thành phần của dược phẩm có thể được xác định phụ thuộc vào phương pháp sử dụng, hoạt tính ức chế của peptit theo sáng chế hoặc peptit chứa trong thể liên hợp với KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14, ái lực liên kết, hoặc tương tự. Hoạt tính ức chế càng mạnh (giá trị IC_{50} hoặc giá trị K_i càng nhỏ) hoặc ái lực đối với đích peptit ức chế theo sáng chế càng cao (giá trị K_D càng nhỏ), thì hiệu quả có thể được tạo ra với liều thấp hơn.

Liều của peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó là không bị giới hạn, miễn là liều này là lượng hiệu quả về mặt dược lý, và có thể được xác định một cách thích hợp phụ thuộc vào loài của cá thể, loại bệnh, triệu chứng, giới tính, tuổi, bệnh mạn tính, hoạt tính ức chế đối với đích peptit, ái lực liên kết, và các yếu tố khác, nhưng peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó thường được sử dụng ở liều nằm trong khoảng từ 0,01 đến 1000 mg/kg, tốt hơn là 0,1 đến 100 mg/kg, một lần, hai lần, hoặc nhiều lần trong một ngày trong thời gian 1 đến 180 ngày.

Các ví dụ về dạng của dược phẩm có thể bao gồm thuốc tiêm (bao gồm chế phẩm sấy khô nhiệt độ thấp và thuốc nhỏ giọt), thuốc đạn, chế phẩm hấp thụ qua đường trong mũi, chế phẩm hấp thụ qua chân bì, chế phẩm dùng dưới lưỡi, viên nang, viên nén, pomat, hạt, khí dung, viên tròn, bột, hỗn dịch, nhũ tương, thuốc nhỏ mắt, và chế phẩm cấy sinh học.

Dược phẩm chứa peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó làm thành phần hoạt tính có thể được sử dụng đồng thời hoặc riêng rẽ với các dược chất khác. Ví dụ, dược phẩm chứa peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó làm thành phần hoạt tính có thể được

sử dụng sau khi sử dụng các dược chất khác, các dược chất khác có thể được sử dụng sau khi sử dụng dược phẩm này, hoặc dược phẩm này có thể được sử dụng đồng thời với các dược chất khác. Trong trường hợp sử dụng đồng thời, peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó và các dược chất khác có thể được chứa trong hoặc một chế phẩm duy nhất hoặc các chế phẩm riêng biệt (nhiều chế phẩm).

Một, hai, ba, hoặc nhiều dược chất khác này có thể được sử dụng hoặc được nhận. Việc sử dụng này được gọi chung là "sử dụng kết hợp các dược chất khác" với dược phẩm theo sáng chế hoặc "việc kết hợp với các dược chất khác" của dược phẩm theo sáng chế. Dược phẩm theo sáng chế chứa các dược chất khác ngoài peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó hoặc được sử dụng kết hợp với các liệu pháp khác cũng được bao gồm trong sáng chế theo một khía cạnh của "việc sử dụng kết hợp các dược chất khác" hoặc "việc kết hợp với các dược chất khác".

Các ví dụ của chúng đối với hội chứng Netherton có thể bao gồm chất làm ẩm, dược chất steroid, và chất kháng vi khuẩn. Các ví dụ của chúng đối với bệnh viêm da dị ứng có thể bao gồm dược chất steroid, chất ức chế canxineurin, chất ức chế PDE4, dược chất ức chế miễn dịch, chất ức chế IL-4/IL-13, và quang trị liệu. Các ví dụ của chúng đối với bệnh trứng cá đỏ có thể bao gồm doxyxycilin, minoxycilin, axit azelaic, và brimonidin. Các ví dụ của chúng đối với bệnh vẩy nến có thể bao gồm chất ức chế $\text{TNF}\alpha$, chất ức chế IL-12/23, chất ức chế IL-17, chất ức chế PDE4, chất chống chuyển hóa, chất ức chế canxineurin, fumarat este, chế phẩm retinoit, dược chất steroid, chất tương tự vitamin D3, và quang trị liệu. Các ví dụ của chúng đối với bệnh hen có thể bao gồm dược chất steroid và chất chủ vận β_2 . Các ví dụ của chúng đối với bệnh ung thư như bệnh ung thư tử cung, bệnh ung thư biểu mô bàng quang, bệnh ung thư kết trực tràng, bệnh caxinom tế bào vảy trong miệng, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư vùng đầu và cổ, u melanin, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, và u thần kinh đệm có thể bao gồm các chất kháng ung thư khác nhau.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh liên quan đến KLK5, phương pháp này bao gồm bước sử dụng peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó, sử dụng peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó để bào chế dược phẩm để điều trị hoặc phòng ngừa các bệnh này, và sử dụng peptit hoặc thể liên hợp này để điều trị và

phòng ngừa các bệnh này. Kit để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh chứa peptit hoặc thể liên hợp này cũng được bao gồm trong sáng chế.

Ngoài ra, dược phẩm chứa polynucleotit chứa trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin của peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó, vector chứa polynucleotit này, tế bào chứa polynucleotit hoặc vector này, hoặc tế bào biểu hiện peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó cũng được đề xuất. Ví dụ, polynucleotit và vector này có thể được sử dụng cho liệu pháp gen đối với các bệnh liên quan đến KLK5, và các tế bào có thể được sử dụng cho liệu pháp tế bào đối với các bệnh liên quan đến KLK5 tương ứng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết. Ngoài ra, các tế bào dùng cho liệu pháp tế bào có thể được tạo ra, ví dụ, bằng cách đưa polynucleotit hoặc vector vào các tế bào tự ghép hoặc các tế bào dị ghép (cùng loại tế bào). Polynucleotit và vector này cũng được bao gồm trong sáng chế dưới dạng chế phẩm để điều chế chất điều trị tế bào. Tuy nhiên, khía cạnh của dược phẩm chứa polynucleotit, vector, tế bào này, hoặc tương tự theo sáng chế là không bị giới hạn ở nội dung nêu trên.

Mô hình động vật có thể được sử dụng làm phương tiện để đánh giá hiệu quả điều trị, đối với các bệnh liên quan đến KLK5, của peptit hoặc thể liên hợp của nó chứa trong dược phẩm theo sáng chế dưới dạng thành phần hoạt tính. Các ví dụ về mô hình hội chứng Netherton có đột biến trong gen SPINK5 là gen gây ra hội chứng Netherton có thể bao gồm chuột nhắt thiếu gen SPINK5 (Descargues, P., et al. (2004) Nat. Genet., Vol. 37, trang 56-65), chuột nhắt bất hoạt có điều kiện gen SPINK5 (Petrova, E., et al. (2019) oral presentation in the 8th International Symposium on Kallikreins and Kallikrein-Related Peptidases: Abstract Book, p. 28), và chuột nhắt Crusty2 (cơ sở dữ liệu Mutagenetix), nhưng không giới hạn ở các ví dụ này.

6. Chế phẩm chẩn đoán

Chế phẩm để xét nghiệm hoặc chẩn đoán chứa peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó (sau đây chúng sẽ được gọi chung là "chế phẩm chẩn đoán") được đề xuất.

Chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế là hữu ích để xét nghiệm hoặc chẩn đoán các bệnh liên quan đến KLK5, sự biểu hiện KLK5, sự biểu hiện KLK7, sự biểu hiện KLK14, hoặc tương tự. Theo sáng chế, các ví dụ về việc xét nghiệm hoặc chẩn đoán này bao gồm xác định hoặc đo nguy cơ mắc bệnh, xác định bệnh tật, xác định mức độ tiến triển hoặc

trầm trọng thêm, đo hoặc xác định hiệu quả của việc điều trị bằng thuốc bằng dược phẩm chứa peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó, đo hoặc xác định hiệu quả của việc điều trị khác với việc điều trị bằng thuốc, đo nguy cơ tái phát, và xác định tái phát. Tuy nhiên, không giới hạn ở các ví dụ này, miễn là chúng là các xét nghiệm hoặc chẩn đoán.

Chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế là hữu ích để xác định cá thể mà peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó, chế phẩm chứa chúng, hoặc dược phẩm chứa chúng cần được sử dụng.

Chế phẩm chẩn đoán này có thể chứa chất đệm pH, chất điều chỉnh áp suất thẩm thấu, muối, chất ổn định, chất bảo quản, chất hiện hình, chất làm nhạy, chất ức chế kết tập, và tương tự.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp xét nghiệm hoặc chẩn đoán các bệnh liên quan đến KLK5, sử dụng peptit theo sáng chế để điều chế chế phẩm chẩn đoán các bệnh này, và sử dụng peptit theo sáng chế để xét nghiệm hoặc chẩn đoán các bệnh này. Kit xét nghiệm hoặc chẩn đoán chứa peptit theo sáng chế cũng được bao gồm trong sáng chế.

Liên quan đến phương pháp xét nghiệm hoặc chẩn đoán bằng cách sử dụng peptit theo sáng chế, ELISA kiểu kẹp giữa (sandwich) là mong muốn, nhưng các phương pháp phát hiện như ELISA hoặc RIA thông thường, đốm miễn dịch liên kết với enzym (Enzym-Linked ImmunoSpot, ELISPOT), phương pháp thấm điểm, phương pháp Ouchterlony, điện di miễn dịch ngược dòng (Counterimmunoelectrophoresis, CIE), thử nghiệm miễn dịch phát quang hóa học (Chemiluminescent immuno assay, CLIA), và đếm tế bào theo dòng (Flow Cytometry, FCM) có thể được sử dụng. Để phát hiện, các kháng thể hoặc các mảnh liên kết của chúng, hoặc các chất được đánh dấu bằng peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó được sử dụng. Để đánh dấu, các phương pháp đánh dấu có thể được sử dụng để phân tích sinh hóa như đánh dấu bằng các chất huỳnh quang như HRP, phosphatase kiềm, và FITC, chất đồng vị phóng xạ, hoặc tương tự có thể được sử dụng, ngoài biotin. Để phát hiện bằng cách sử dụng chất đánh dấu enzym, các cơ chất phát quang hóa học có thể được sử dụng, ngoài các cơ chất sinh màu như TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin), BCIP (5-bromo-4-clo-3-indolyl phosphat), p-NPP (p-nitrophenyl phosphat), OPD (o-phenylendiamin), ABTS (axit 3-etylbenzothiazolin-6-sulfonic), và cơ chất phát quang hóa học SuperSignal ELISA Pico (Thermo Fisher Scientific), và các cơ

chất huỳnh quang như cơ chất peroxidaza sinh huỳnh quang QuantaBlu (R) (Thermo Fisher Scientific). Các mẫu được lấy từ người hoặc động vật có vú không phải người cũng như các mẫu được xử lý nhân tạo như protein tái tổ hợp có thể được thực hiện thử nghiệm này. Các ví dụ về các mẫu thử nghiệm được lấy từ các sinh vật riêng lẻ có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, máu, dịch bao hoạt dịch, dịch cổ trướng, hạch lympho, dịch não tủy, dịch rửa phế quản-phế nang, nước bọt, đờm rãi, dịch nổi bề mặt của dịch đồng nhất mô, và các lát cắt mô.

Kit xét nghiệm hoặc chẩn đoán ELISA kiểu kẹp giữa chứa peptit theo sáng chế có thể chứa chất phản ứng tạo màu, chất đệm để pha loãng, protein cho pha rắn, protein để phát hiện, dung dịch rửa, hoặc tương tự cũng như các dụng dịch chuẩn protein chứa peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó. Để làm phương pháp xác định lượng protein liên kết với kháng nguyên, phương pháp hấp thụ, phương pháp huỳnh quang, phương pháp phát quang, phương pháp đồng vị phóng xạ (Radioisotope, RI), hoặc tương tự được áp dụng thích hợp, và để đo lường, bộ đọc đĩa hấp thụ, bộ đọc đĩa huỳnh quang, bộ đọc đĩa phát quang, bộ đếm nhấp nháy chất lỏng RI, hoặc tương tự tốt hơn là được sử dụng.

Ngoài ra, các xét nghiệm hoặc chẩn đoán này có thể được thực hiện bằng các phương pháp sử dụng sự kết tủa miễn dịch.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất phương pháp phát hiện hoặc xác định KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14 trong mẫu xét nghiệm. Chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế có thể được sử dụng cho phương pháp phát hiện hoặc xác định này. KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14 trong mẫu thử nghiệm có thể được phát hiện bằng cách cho peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó tiếp xúc với mẫu thử nghiệm (bước 1) và sau đó xác định lượng KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14 liên kết với peptit hoặc thể liên hợp này (bước 2). Các ví dụ về bước 1 có thể bao gồm cố định vùng Fc của globulin miễn dịch được liên hợp với peptit theo sáng chế trên các hạt từ tính thông qua protein G và bổ sung mẫu thử nghiệm vào đó, và các ví dụ về bước 2 có thể bao gồm tách các hạt từ tính và phân tích các protein tan được kết tủa cùng với các hạt này bằng phương pháp SDS-PAGE hoặc thấm Western để phát hiện KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14. Các mẫu được xử lý nhân tạo như protein tái tổ hợp có thể được thực hiện việc xác định này, ngoài các mẫu được lấy từ người hoặc động vật không phải người. Các ví dụ về các

mẫu thử nghiệm được lấy từ các sinh vật riêng lẻ có thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, máu, dịch bao hoạt dịch, dịch cổ trướng, hạch lympho, dịch não tủy, dịch rửa phế quản-phế nang, nước bọt, đờm rãi, dịch nổi bề mặt của dịch đồng nhất mô, và các lát cắt mô.

Việc phát hiện KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14 có thể được thực hiện không chỉ *in vitro* mà còn *in vivo*. Trong trường hợp chẩn đoán hình ảnh, peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó được đánh dấu bằng chất đồng vị phóng xạ hoặc chất phát quang được dùng có thể được sử dụng. Các ví dụ về bước 1 có thể bao gồm sử dụng peptit được đánh dấu hoặc thể liên hợp của nó cho đối tượng thử nghiệm, và các ví dụ về bước 2 có thể bao gồm chụp ảnh bằng cách sử dụng kỹ thuật chẩn đoán hình ảnh như PET/CT và xác định hoặc kiểm tra sự có mặt của KLK5, KLK5 và/hoặc KLK7, hoặc KLK5 và/hoặc KLK14.

Peptit hoặc thể liên hợp của nó chứa trong chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế liên kết với KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14, và tốt hơn là có hoạt tính liên kết đặc hiệu KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14.

Phương pháp xác định cá thể mà được phẩm theo sáng chế cần được sử dụng cũng được bao gồm trong sáng chế. Theo phương pháp xác định này, KLK5, KLK5 và/hoặc KLK7, hoặc KLK5 và/hoặc KLK14 trong mẫu được lấy từ cá thể được xác định, và cá thể có thể được xác định là dương tính khi KLK5, KLK5 và/hoặc KLK7, hoặc KLK5 và/hoặc KLK14 được phát hiện trong mẫu, hoặc KLK5, KLK5 và/hoặc KLK7, hoặc KLK5 và/hoặc KLK14 được phát hiện với lượng lớn hơn lượng của KLK5, KLK5 và/hoặc KLK7, hoặc KLK5 và/hoặc KLK14 được phát hiện trong mẫu khác được lấy từ cá thể khỏe mạnh. Đối với phương pháp này, chế phẩm chẩn đoán theo sáng chế có thể được sử dụng.

Ngoài ra, theo một khía cạnh thích hợp của phương pháp xác định này, cá thể bị hoặc có nguy cơ bị các bệnh liên quan đến KLK5.

Ngoài ra, theo một khía cạnh, được phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cho cá thể được xác định là dương tính trong phương pháp xác định này.

7. Phương pháp tách KLK5, KLK5 và KLK7, hoặc KLK5 và KLK14

Peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó tốt hơn là có hoạt tính liên kết đặc hiệu với KLK5, KLK5 và/hoặc KLK7, hoặc KLK5 và/hoặc KLK14. Do đó, KLK5, KLK5 và/hoặc KLK7, hoặc KLK5 và/hoặc KLK14 có thể được tách đặc hiệu ra khỏi mẫu mà

trong đó KLK5, KLK5 và/hoặc KLK7, hoặc KLK5 và/hoặc KLK14 được trộn với các KLK khác, bằng cách sử dụng peptit theo sáng chế hoặc thể liên hợp của nó. Sự giải phóng KLK5, KLK5 và/hoặc KLK7, hoặc KLK5 và/hoặc KLK14 ra khỏi peptit hoặc thể liên hợp có thể được thực hiện theo cách không chọn lọc, ví dụ, trong điều kiện nồng độ ion tương đối cao, độ pH thấp, điều kiện biến tính vừa phải, với sự có mặt của muối gây xáo trộn, hoặc tương tự, nhưng tốt hơn là được thực hiện trong phạm vi mà trong đó hoạt tính proteaza của KLK5, KLK5 và/hoặc KLK7, hoặc KLK5 và/hoặc KLK14 không bị suy giảm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Trong các ví dụ sau đây, một số khía cạnh của sáng chế sẽ được mô tả cụ thể hơn. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Trong các ví dụ sau đây, các thao tác liên quan đến thao tác di truyền được thực hiện theo các phương pháp được mô tả trong "Molecular Cloning" (Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, công bố năm 1982 hoặc công bố năm 1989) và các phương pháp khác được mô tả trong sổ tay thử nghiệm được sử dụng bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực này, hoặc theo hướng dẫn của các sản phẩm có bán trên thị trường trong các trường hợp mà trong đó các chất phản ứng hoặc kit có bán trên thị trường được sử dụng, nếu không được chỉ rõ theo cách khác.

Ví dụ 1. Điều chế peptit ức chế KLK5

(1-1) Tạo ra vector biểu hiện peptit ức chế KLK5

Bằng cách sử dụng trình tự nucleotit của mỗi peptit ức chế (SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, hoặc 31) và trình tự nucleotit của SPINK2 làm khuôn, các đoạn peptit ức chế được khuếch đại bằng PCR ((ở 94°C trong 15 giây, ở 60°C trong 30 giây, và ở 68°C trong 20 giây) × 30 chu trình) bằng cách sử dụng các đoạn mồi sau đây và KOD-plus-(TOYOBO).

Đoạn mồi 1: 5'-

AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG-3' (SEQ ID NO: 62, Fig.70)

Đoạn mồi 2: 5'-AAACTCGAGTTAGCCGCCGCACGGACCATTTGCGAATAA-3' (SEQ ID NO: 63, Fig.71)

Các đoạn được khuếch đại này được điện di trên gel agarosa, và sau đó các đoạn ADN mong muốn được cắt, để điều chế ADN bằng cách sử dụng kit tách chiết gel QIAquick Gel (QIAGEN). Các đoạn ADN thu được và pET 32a (Novagen) được xử lý bằng cách sử dụng các enzym giới hạn BamHI (NEB) và XhoI (NEB) ở 37°C trong thời gian 1 giờ hoặc lâu hơn, và sau khi sắc ký trên gel agarosa, các đoạn ADN mong muốn được cắt, sau đó tinh chế bằng cách sử dụng kit tinh chế PCR QIAquick (QIAGEN). Bằng cách sử dụng hệ thống nối ADN nhanh LigaFast (Promega), mỗi đoạn đã tinh chế được cho phản ứng ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút để thực hiện phản ứng nối. Dung dịch nối được bổ sung vào *Escherichia coli* JM109 (TOYOBO), để yên trên nước đá trong 30 phút, sau đó xử lý nhiệt ở 42°C trong 45 giây, để yên tiếp trên nước đá trong 5 phút, cấy vào đĩa 2YT chứa 0,1 mg/ml ampicilin, và sau đó nuôi cấy tĩnh ở 37°C qua đêm, để biến nạp *Escherichia coli*. Ngày tiếp theo, *Escherichia coli* đã biến nạp được cấy vào môi trường canh Terrific (Invitrogen) chứa 0,1 mg/ml ampicilin và nuôi cấy ở 37°C qua đêm. Sau đó, ADN plasmit được thu hồi bằng cách sử dụng kit Miniprep QIAprep 96 Turbo (Qiagen) (sau đây thao tác này sẽ được gọi là "xử lý bằng miniprep"), và việc phân tích trình tự được thực hiện để tạo ra vector peptit ức chế pET 32a_Kex2_KLK5.

(1-2) Điều chế peptit ức chế KLK5

Escherichia coli Origami B (DE3) (Novagen) được biến nạp bằng vector được tạo ra trong mục (1-1) và nuôi cấy ở 37°C bằng cách sử dụng môi trường 2YT chứa 0,1 mg/ml ampicilin. Sau đó, IPTG (có nồng độ cuối 1mM) được bổ sung vào đó, sau đó nuôi cấy ở 16°C qua đêm. Ngày tiếp theo, sau khi thu hồi các tế bào bằng cách ly tâm (3000g, 20 phút, và 4°C), dịch phân giải được điều chế bằng cách sử dụng hỗn hợp BugBuster Master (Novagen), và protein đích dung hợp đuôi His được tinh chế bằng cách sử dụng nhựa ái lực kim loại TALON (Clontech). Sau đó, đuôi thioredoxin được phân cắt khỏi protein mong muốn bằng cách sử dụng Kex2 (*Saccharomyces cerevisiae*: mã số lưu giữ CAA96143) và được tinh chế bằng cách sử dụng TALON. Ngoài ra, phương pháp sắc ký lọc gel (Superdex75 10/300 GL) hoặc sắc ký đảo pha (YMC-Pack ODS-AM) được áp dụng, để điều chế 14 loại peptit ức chế KLK5. Trình tự axit amin của các dẫn xuất này được thể hiện trong SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, và 32 (các hình vẽ Fig.14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, và 40).

Đoạn mồi 10: 5'-CGTCATCTTTATAATCGCCCTTGTCGCGCATGGTCTCCTCGAT-
3' (SEQ ID NO: 71, Fig.79)

77

XbaI (NEB) và PmeI (NEB). Thao tác này được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong mục (1-1).

(2-2) Biểu hiện và tinh chế KLK5 của người, tiền KLK7 của người, tiền KLK14 của người, tiền KLK7 của chuột nhắt, và tiền KLK14 của chuột nhắt

Mỗi vector biểu hiện được tạo ra trong mục (2-1) được chuyển nhiễm vào các tế bào Expi293F (Thermo Fisher Scientific) bằng cách sử dụng PEI MAX 40000 (Polysciences), và dịch nổi bề mặt nuôi cấy được thu hồi sau 3 ngày nuôi cấy tế bào. Protein dung hợp đuôi His mong muốn được thu hồi từ dịch nổi bề mặt nuôi cấy bằng cách sử dụng HisTrap excel (GE healthcare), và chất đệm được thay thế bằng PBS bằng cách sử dụng Amicon UltramMWL 10.000 (Merck KGaA Millipore), để tinh chế KLK5, tiền KLK7 của người, tiền KLK14 của người, tiền KLK7 của chuột nhắt, và tiền KLK14 của chuột nhắt tương ứng.

(2-3) Điều chế KLK5 của người, KLK7 của người, KLK14 của người, KLK5 của chuột nhắt, KLK7 của chuột nhắt, và KLK14 của chuột nhắt

200 µg/ml tiền KLK7 hoặc KLK14 được điều chế bằng cách sử dụng đệm hoạt hóa KLK (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 10mM CaCl₂, 0,05% (trọng lượng) Brij-35, pH 7,5), được bổ sung lượng bằng nhau của 20 µg/ml thermolysin, sau đó phản ứng trong thời gian nhất định ở 37°C. Sau đó, lượng bằng nhau của 100mM EDTA được trộn vào trong đó để điều chế KLK7 của người được hoạt hóa, KLK14 của người được hoạt hóa, KLK7 của chuột nhắt được hoạt hóa, và KLK14 của chuột nhắt được hoạt hóa.

Ngoài ra, 200 µg/ml KLK5 của chuột nhắt (R&D Systems, Inc., 7236-SE) và 2 µg/ml KLK5 của người được điều chế bằng cách sử dụng dung dịch đệm hoạt hóa (50mM Tris-HCl, 0,005% (trọng lượng) Brij-35, pH 8,0) được trộn với lượng bằng nhau, sau đó phản ứng ở 37°C trong 24 giờ, để điều chế KLK5 của chuột nhắt được hoạt hóa.

Ví dụ 3. Đánh giá peptit ức chế KLK5

(3-1) Đánh giá hoạt tính ức chế của peptit ức chế KLK5 đối với KLK5 của chuột nhắt/người, KLK7 của chuột nhắt/người, và KLK14 của chuột nhắt/người

Cơ chất peptit được hòa tan trong DMSO đến 10mM và được pha loãng bằng dung dịch đệm thử nghiệm (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 8,0) để sử dụng. 25µl mỗi trong số KLK5 của chuột nhắt/người, KLK7 của chuột nhắt/người, hoặc KLK14 của chuột

nhất/người và peptit ức chế đã pha loãng bằng dung dịch đệm thử nghiệm được trộn vào, sau đó phản ứng ở 37°C trong 20 phút. Sau đó, 50µl cơ chất đã pha loãng bằng dung dịch đệm thử nghiệm được bổ sung vào đó, và tín hiệu huỳnh quang được đo bằng cách sử dụng Enspire (PerkinElmer). Các hỗn hợp của enzym và cơ chất được sử dụng là như sau. Mỗi peptit ức chế có nồng độ cuối 0,098 đến 1000nM, và đĩa màu đen PROTEOSAVE (R) SS96F (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) được sử dụng để phản ứng và đo.

Đánh giá hoạt tính ức chế KLK5 của người: hKLK5 có nồng độ cuối 10nM, cơ chất peptit Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc.) có nồng độ cuối 100µM, và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế KLK7 của người: hKLK7 có nồng độ cuối 1 µg/ml, cơ chất peptit Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys (Dnp)-NH₂ (R&D Systems, Inc., Fig.85, và trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 77) có nồng độ cuối 20µM, và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 320nm/phát xạ ở 405nm

Đánh giá hoạt tính ức chế KLK14 của người: hKLK14 có nồng độ cuối 0,2 µg/ml, cơ chất peptit Boc-Val-Pro-Arg-AMC có nồng độ cuối 100µM (R&D Systems, Inc.), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế KLK5 của chuột nhắt: KLK5 của chuột nhắt có nồng độ cuối 0,25 µg/ml, cơ chất peptit Boc-Val-Pro-Arg-AMC có nồng độ cuối 100µM (R&D Systems, Inc.), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế KLK7 của chuột nhắt: KLK7 của chuột nhắt có nồng độ cuối 0,5 µg/ml, cơ chất peptit Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys (Dnp)-NH₂ có nồng độ cuối 7µM (R&D Systems, Inc., Fig.85, và trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 77), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 320nm/phát xạ ở 405nm

Đánh giá hoạt tính ức chế KLK14 của chuột nhắt: KLK14 của chuột nhắt có nồng độ cuối 0,1 µg/ml, cơ chất peptit Boc-Val-Pro-Arg-AMC có nồng độ cuối 100µM (R&D Systems, Inc.), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Theo kết quả tính tỷ lệ phân hủy của peptit cơ chất bởi mỗi peptit ức chế ở mỗi nồng độ và tính nồng độ ức chế 50% (IC₅₀) bằng cách sử dụng GraphPad Prism (phiên bản 5.0; GraphPad Software Inc.) với tỷ lệ phân hủy của peptit ức chế này ở nồng độ 0nM được

cho là 100%, đã phát hiện được rằng tất cả các peptit ức chế có tác dụng ức chế hoạt tính enzym KLK5 của người ở các nồng độ thấp (bảng 1, Fig.2). Một số peptit ức chế có tác dụng ức chế hoạt tính enzym KLK7 của người hoặc KLK14 của người ở các nồng độ thấp, và một số peptit ức chế có hoạt tính ức chế yếu đối với các proteaza này (bảng 1). Các peptit ức chế còn có hoạt tính giống nhau đối với KLK5, KLK7, hoặc KLK14 của chuột nhắt (bảng 2). Giá trị trung bình của ba thử nghiệm độc lập được sử dụng để tính giá trị IC_{50} .

Bảng 1

Hoạt tính ức chế của mỗi peptit ức chế KLK5 đối với KLK5 của người, KLK7 của người, hoặc KLK14 của người

ID	$IC_{50}(nM)$ đối với hKLK5	$IC_{50}(nM)$ đối với hKLK7	$IC_{50}(nM)$ đối với hKLK14
K51028	$6,1 \pm 0,5$	249 ± 25	>1000
K50032	$7,1 \pm 0,4$	>1000	>1000
K50055	$6,7 \pm 0,2$	>1000	>1000
K51069	$6,8 \pm 0,4$	>1000	72 ± 23
K51072	$7,0 \pm 0,2$	>1000	434 ± 18
K50015	$6,8 \pm 0,3$	>1000	17 ± 1
K50016	$6,9 \pm 1,1$	>1000	>1000
K51034	$6,4 \pm 0,3$	>1000	>1000
K50062	$7,5 \pm 0,7$	>1000	499 ± 27
K51090	$4,5 \pm 0,3$	>1000	>1000
K50098	$8,3 \pm 0,9$	>1000	268 ± 31
K51005	$5,8 \pm 2,1$	$17 \pm 0,2$	>1000
K50031	$5,4 \pm 0,1$	$13 \pm 0,3$	>1000
K51057	12 ± 1	$24 \pm 0,7$	>1000

Bảng 2

Hoạt tính ức chế của mỗi peptit ức chế KLK5 đối với KLK5 của chuột nhắt, KLK7 của chuột nhắt, hoặc KLK14 của chuột nhắt

ID	IC ₅₀ (nM) đối với mKLK5	IC ₅₀ (nM) đối với mKLK7	IC ₅₀ (nM) đối với mKLK14
K51028	<0,5	77	>1000
K50032	127	>1000	>1000
K50055	<0,5	>1000	>1000
K51069	<0,5	181	40
K51072	2	512	>1000
K50015	<0,5	248	108
K50016	15	>1000	>1000
K51034	54	>1000	>1000
K50062	10	>1000	>1000
K51090	2	658	>1000
K50098	14	>1000	547
K51005	48	23	214
K50031	40	4	244
K51057	149	27	437

(3-2) Đánh giá khả năng phản ứng chéo của peptit ức chế KLK5

Tính đặc hiệu đối với các proteaza khác được đánh giá bằng cách sử dụng sự phân hủy peptit cơ chất làm chỉ số. Như trong phương pháp được mô tả trong (3-1), 25μl mỗi proteaza và mẫu đã pha loãng bằng dung dịch đệm thử nghiệm được trộn (tối nồng độ cuối của mẫu bằng 1μM), sau đó phản ứng ở 37°C trong 20 phút. Sau đó, 50μl cơ chất đã pha loãng bằng dung dịch đệm thử nghiệm được bổ sung vào đó, và tín hiệu huỳnh quang được đo bằng cách sử dụng Enspire (PerkinElmer). Dung dịch đệm thử nghiệm (50mM Tris, 150mM NaCl, pH 8,0) được sử dụng để đánh giá hoạt tính proteaza, và đĩa màu đen PROTEOSAVE (R) SS96F (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) được sử dụng để phản ứng và đo. Các hỗn hợp của proteaza và cơ chất được sử dụng để đánh giá tính đặc hiệu là như sau.

Đánh giá hoạt tính ức chế trypsin của bò: trypsin (Pierce; 20233) có nồng độ cuối 5nM và peptit cơ chất Boc-Val-Pro-Arg-AMC có nồng độ cuối 100μM (R&D Systems, Inc., ES011), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế trypsin của người: trypsin có nồng độ cuối 1nM (Sigma-Aldrich Co. LLC, T6424) và peptit cơ chất Boc-Val-Pro-Arg-AMC có nồng độ cuối

100 μ M (R&D Systems, Inc., ES011), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế α -chymotrypsin của bò: chymotrypsin có nồng độ cuối 10nM (Worthington Biochemical Corporation; LS001434) và peptit cơ chất Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA có nồng độ cuối 100 μ M (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3120-v, Fig.86, và trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 78), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế chymotrypsin của người: chymotrypsin có nồng độ cuối 10nM (Sigma-Aldrich Co. LLC, C8946), peptit cơ chất Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA có nồng độ cuối 10 μ M (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3120-v, Fig.86, và trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 78), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế tryptaza của người: tryptaza có nồng độ cuối 1nM (Sigma-Aldrich Co. LLC, T7063) và peptit cơ chất Boc-Phe-Ser-Arg-MCA có nồng độ cuối 100 μ M (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3107-v), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế chymaza của người: chymaza có nồng độ cuối 100nM (Sigma-Aldrich Co. LLC, C8118) và peptit cơ chất Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA có nồng độ cuối 100 μ M (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3120-v, Fig.86, và trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 78), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế plasmin của người: plasmin có nồng độ cuối 50nM (Sigma-Aldrich Co. LLC, P1867) và peptit cơ chất Boc-Val-Leu-Lys-MCA có nồng độ cuối 100 μ M (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3104-v), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế thrombin của người: thrombin có nồng độ cuối 1nM (Sigma-Aldrich Co. LLC, T6884) và peptit cơ chất Boc-Val-Pro-Arg-AMC có nồng độ cuối 100 μ M (R&D Systems, Inc., ES011), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Hoạt tính ức chế elastaza bạch cầu trung tính của người: elastaza bạch cầu trung tính có nồng độ cuối 0,00001 U/ μ L (Enzo Life Sciences) và cơ chất peptit Suc (OMe)-Ala-Ala-Pro-Val-MCA có nồng độ cuối 100 μ M (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3153-v, Fig.87, và trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 79), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế matriptaza của người: matriptaza có nồng độ cuối 1nM (R&D Systems, Inc., 3946-SE) và peptit cơ chất Boc-Gln-Ala-Arg-AMC có nồng độ cuối 100 μ M (R&D Systems, Inc., ES014), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế protein C của người: protein C có nồng độ cuối 100nM (Sigma-Aldrich Co. LLC, P2200) và peptit cơ chất Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA có nồng độ cuối 100 μ M (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3112-v, Fig.88, và trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 80) tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế tPA của người: tPA có nồng độ cuối 10nM (Sigma-Aldrich Co. LLC, T0831) và peptit cơ chất Pyr-Gly-Arg-MCA có nồng độ cuối 100 μ M (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3145-v), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế uPA của người: uPA có nồng độ cuối 2nM (Sigma-Aldrich Co. LLC, U0633) và peptit cơ chất Pyr-Gly-Arg-MCA có nồng độ cuối 100 μ M (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3145-v), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế kalikrein huyết tương của người: kalikrein huyết tương có nồng độ cuối 0,125 μ g/ml (R&D Systems, Inc., 2497-SE) và peptit cơ chất Z-Phe-Arg-MCA có nồng độ cuối 100 μ M (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3095-v), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế KLK1 của người: KLK1 có nồng độ cuối 0,1 μ g/ml (R&D Systems, Inc., 2337-SE) và peptit cơ chất Pro-Phe-Arg-MCA có nồng độ cuối 100 μ M (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3096-v), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế KLK2 của người: KLK2 có nồng độ cuối 2 µg/ml (R&D Systems, Inc., 4104-SE) và peptit cơ chất Pro-Phe-Arg-MCA có nồng độ cuối 100µM (PEPTIT INSTITUTE, INC., 3096-v), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế KLK4 của người: KLK4 có nồng độ cuối 1 µg/ml (R&D Systems, Inc., 1719-SE) và peptit cơ chất Boc-Val-Pro-Arg-AMC có nồng độ cuối 100µM (R&D Systems, Inc., ES011), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế KLK7 của người: KLK7 có nồng độ cuối 1 µg/ml, peptit cơ chất Mca-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys (Dnp)-NH₂ có nồng độ cuối 20µM (R&D Systems, Inc., Fig.85, và trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 77), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 320nm/phát xạ ở 405nm

Đánh giá hoạt tính ức chế KLK8 của người: KLK8 có nồng độ cuối 5nM (UniProt: O60259, được điều chế bởi các tác giả sáng chế) và peptit cơ chất Boc-Val-Pro-Arg-AMC có nồng độ cuối 100µM (R&D Systems, Inc., ES011), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế KLK12 của người: KLK12 có nồng độ cuối 0,1 µg/ml (R&D Systems, Inc., 3095-SE) và peptit cơ chất Boc-Val-Pro-Arg-AMC có nồng độ cuối 100µM (R&D Systems, Inc., ES011), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế KLK13 của người: KLK13 có nồng độ cuối 0,5 µg/ml (R&D Systems, Inc., 2625-SE) và peptit cơ chất Boc-Val-Pro-Arg-AMC có nồng độ cuối 100µM (R&D Systems, Inc., ES011), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Đánh giá hoạt tính ức chế KLK14 của người: hKLK14 có nồng độ cuối 0,2 µg/ml, peptit cơ chất Boc-Val-Pro-Arg-AMC có nồng độ cuối 100µM (R&D Systems, Inc.), và tín hiệu huỳnh quang có bước sóng kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm

Theo cách giống như trong mục (3-1), khả năng phản ứng chéo của mỗi peptit ức chế KLK5 với các proteaza khác với KLK5 được đánh giá khi sử dụng sự phân hủy của cơ chất peptit làm chỉ số. Một số peptit ức chế có khả năng phản ứng chéo yếu với

chymotrypsin có nồng độ cuối của peptit ức chế bằng $1\mu\text{M}$ (trong đó giá trị IC_{50} là nhỏ hơn $1\mu\text{M}$), nhưng phần lớn các peptit ức chế không có hoạt tính ức chế đối với proteaza bất kỳ khác với KLKn ($n = 1, 2, 4, 5, 7, 8, 12$, hoặc 14) (Fig.3). Trong khi đó, một số peptit ức chế có hoạt tính ức chế với KLK4 hoặc KLK12 có nồng độ cuối của peptit ức chế bằng $1\mu\text{M}$ (trong đó giá trị IC_{50} là nhỏ hơn $1\mu\text{M}$), nhưng nhiều peptit ức chế không có hoạt tính ức chế proteaza đối với KLKn trừ KLK5, KLK7, và KLK14, và do đó đã phát hiện được rằng các peptit ức chế này có tính đặc hiệu cao.

(3-3) Đánh giá hoạt tính liên kết KLK5 của peptit ức chế KLK5

Để đo ái lực liên kết của các peptit ức chế KLK5, phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt được thực hiện bằng cách sử dụng BIAcore T 200 (GE healthcare). Sợi ADN bổ sung của thể liên hợp streptavidin được bắt giữ bằng cách lai trên chip cảm biến CAP (GE healthcare) mà trên đó sợi đơn ADN được cố định. Tiếp theo, KLK5 biotinyl hóa bằng cách sử dụng EZ-Link NHS-PEG4-Biotin (Thermo Fisher Scientific) được bắt giữ ở tốc độ dòng $10\mu\text{l/phút}$ để cố định khoảng 10 RU. Sau đó, peptit ức chế KLK5, được pha loãng theo dãy 2 lần bằng HBS-EP ($0,625$ đến 10nM), được bổ sung vào đó dưới dạng chất phân tích ở tốc độ dòng $30\mu\text{l/phút}$. Trong chương trình phần mềm đánh giá BIAcore T 200 (phiên bản 2.0), k_{on} và k_{off} được tính bằng cách phân tích sử dụng động học một chu trình trong mô hình liên kết Langmuir đơn giản một-một. Hằng số phân ly K_D được tính là tỷ lệ $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. Ngoài ra, nhiều peptit ức chế KLK5 được đo bằng cách tái sinh chip cảm biến CAP bằng cách sử dụng dung dịch đệm tái sinh đi kèm với kit Biotin CAPture (GE healthcare) và bắt giữ nhiều lần KLK5 biotinyl hóa.

Tất cả 14 loại peptit ức chế KLK5 được đo có các giá trị K_D thấp hơn 1nM , cho thấy rằng hoạt tính liên kết của chúng là rất mạnh (bảng 3A).

Bảng 3A

Hoạt tính liên kết KLK5 của mỗi peptit ức chế KLK5

ID	K _{on} (1/M.giây)	K _{off} (1/giây)	K _D (M)
K51028	$1,5 \times 10^6$	$2,0 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-11}$
K50032	$2,0 \times 10^6$	$2,7 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-10}$
K50055	$9,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-11}$
K51069	$9,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-12}$
K51072	$8,4 \times 10^5$	$2,2 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^{-11}$
K50015	$9,4 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-12}$
K50016	$7,0 \times 10^6$	$2,9 \times 10^{-4}$	$4,2 \times 10^{-11}$
K51034	$5,2 \times 10^5$	$3,5 \times 10^{-5}$	$6,8 \times 10^{-11}$
K50062	$1,2 \times 10^6$	$2,9 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-12}$
K51090	$2,1 \times 10^6$	$5,7 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-11}$
K50098	$1,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-11}$
K51005	$3,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{-3}$	$3,4 \times 10^{-10}$
K50031	$8,2 \times 10^5$	$5,0 \times 10^{-5}$	$6,1 \times 10^{-11}$
K51057	$6,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-10}$

(3-4) Đánh giá hoạt tính liên kết KLK5 của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5

Để đo ái lực liên kết của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 được điều chế trong mục (5-2), sẽ được mô tả dưới đây, phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt được thực hiện bằng cách sử dụng BIAcore T 200 (GE healthcare).

Thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 được bắt giữ ở tốc độ dòng 20 μ l/phút bằng chip cảm biến CM5 (GE healthcare) mà trên đó kháng thể kháng IgG của người (Fc) được cố định để cố định khoảng 30 đến 50 RU. Sau đó, KLK5, được pha loãng theo dãy 2 lần bằng HBS-EP (0,625 đến 10nM), được bổ sung vào đó dưới dạng chất phân tích ở tốc độ dòng 30 μ l/phút. Trong chương trình phần mềm đánh giá BIAcore T 200 (phiên bản 2.0), k_{on} và k_{off} được tính bằng cách phân tích bằng cách sử dụng động học một chu kỳ theo mô hình liên kết Langmuir đơn giản một-một. Hằng số phân ly K_D được tính là tỷ lệ k_{off}/k_{on} . Ngoài ra, hoạt tính liên kết của KLK5 với nhiều thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 được xác định bằng cách tái sinh chip cảm biến CM5 mà trên đó kháng thể kháng IgG của người (Fc) được cố định bằng cách sử dụng dung dịch đệm tái sinh đi kèm với kit bắt giữ kháng thể của người (GE healthcare) và bắt giữ nhiều lần thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5.

Tất cả 14 loại thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 được đo có giá trị K_D thấp hơn 1nM, cho thấy rằng hoạt tính liên kết của chúng là rất mạnh (bảng 3B).

Bảng 3B

Hoạt tính liên kết KLK5 của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5

ID	Kon (1/M.giây)	Koff (1/giây)	K _D (M)
D3-K51028-Fc	$5,39 \times 10^5$	$1,81 \times 10^{-6}$	$3,35 \times 10^{-12}$
D3-K50032dN-Fc	$1,08 \times 10^6$	$5,69 \times 10^{-6}$	$5,25 \times 10^{-12}$
D3-K50055-Fc	$5,49 \times 10^5$	$2,32 \times 10^{-6}$	$4,22 \times 10^{-12}$
D3-K51069dN-Fc	$7,14 \times 10^5$	$2,81 \times 10^{-6}$	$3,93 \times 10^{-12}$
D3-K51072-Fc	$2,25 \times 10^5$	$1,68 \times 10^{-6}$	$7,48 \times 10^{-12}$
D3-K50015-Fc	$1,04 \times 10^6$	$3,52 \times 10^{-6}$	$3,38 \times 10^{-12}$
D3-K50016dN-Fc	$7,18 \times 10^5$	$5,60 \times 10^{-6}$	$7,81 \times 10^{-12}$
D3-K51034-Fc	$2,83 \times 10^5$	$2,93 \times 10^{-6}$	$1,03 \times 10^{-11}$
D3-K50062-Fc	$5,66 \times 10^5$	$6,52 \times 10^{-6}$	$1,15 \times 10^{-11}$
D3-K51090-Fc	$7,00 \times 10^5$	$7,86 \times 10^{-6}$	$1,12 \times 10^{-11}$
D3-K50098dN-Fc	$9,22 \times 10^5$	$<1,62 \times 10^{-6}$	$<1,76 \times 10^{-12}$
D3-K51005-Fc	$1,47 \times 10^5$	$1,96 \times 10^{-5}$	$1,33 \times 10^{-10}$
D3-K50031-Fc	$8,81 \times 10^4$	$<1,00 \times 10^{-6}$	$<1,14 \times 10^{-11}$
D3-K51057-Fc	$8,69 \times 10^4$	$1,79 \times 10^{-5}$	$2,06 \times 10^{-10}$

Ví dụ 4. Phân tích peptit ức chế KLK5 bằng cách sử dụng cấu trúc tinh thể tia X

(4-1) Điều chế phức chất peptit ức chế KLK5/KLK5

Theo các phương pháp được mô tả trong mục (1-2) và (2-2), các peptit ức chế KLK5 K51034 và KLK5 có các trình tự axit amin được thể hiện bằng các số SEQ ID được điều chế. Sau khi trộn hai chất này trong điều kiện 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, và pH 8,0, phức chất được phân lập và được tinh chế bằng cách sắc ký lọc gel (Superdex 200 10/300 GL).

(4-2) Phân tích cấu trúc tinh thể tia X

Dung dịch phức chất được điều chế trong mục (4-1) được cô đến 12 mg/ml, sau đó trộn với dung dịch nguồn (0,2M magie clorua hexahydrat, 20% PEG3350) ở tỷ lệ 1:1, và kết tinh bằng phương pháp khuếch tán hơi. Tinh thể lập phương đơn thu được được ngâm trong dung dịch nguồn chứa 20% glyxerol và sau đó được làm đông lạnh trong nitơ lỏng. Tinh thể đã đông lạnh được chiếu tia X trong dòng lạnh để thu được ảnh nhiễu xạ (Hypixel

6000HE/MicroMax007). Việc lập thang dữ liệu với độ phân giải tối đa 1,7 Å đã thu được bằng cách phân tích sử dụng CrysAlisPro. Pha được xác định bằng phương pháp thay thế phân tử bằng cách chỉ sử dụng KLK5 (PDB ID: 2PSX) và chỉ sử dụng SPINK2 (PDB ID: 2JXD) làm khuôn. Sau khi tinh chỉnh cấu trúc, các tinh thể phức KLK5/peptit K51034 được xác định ở độ phân giải 1,8 Å. Mỗi một phân tử trong số KLK5 và SPINK2 được chứa trong một ô đơn vị. Đối với phân tử SPINK2, mô hình phân tử riêng phần chứa vị trí tương tác với KLK5 được tạo ra dựa trên thông tin trình tự và mật độ electron được quan sát. Đã khẳng định được rằng peptit ức chế KLK5 K51034 được liên kết với vùng chứa vị trí hoạt tính của enzym KLK5 (Fig.4).

Ví dụ 5. Điều chế thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5

(5-1) Tạo ra vector biểu hiện thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5

Bằng cách sử dụng trình tự nucleotit của mỗi peptit ức chế (SEQ ID NO: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, hoặc 31) làm khuôn, các đoạn peptit ức chế được khuếch đại bằng PCR ((ở 94°C trong 15 giây, ở 60°C trong 30 giây, và ở 68°C trong 20 giây) × 30 chu trình) bằng cách sử dụng các đoạn mồi sau đây và KOD-plus-(TOYOBO).

Đoạn mồi 16: 5'-

AGATGGGTGTTGTCTGATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTC-3' (SEQ ID NO: 81, Fig.89)

Đoạn mồi 17: 5'-GCAGGGGCCATTCCGGAT-3' (SEQ ID NO: 82, Fig.90)

Đoạn B được khuếch đại bằng PCR ((ở 94°C trong 15 giây, ở 60°C trong 30 giây, và ở 68°C trong 10 giây) × 30 chu trình) bằng cách sử dụng các đoạn mồi sau đây và KOD-plus-(TOYOBO).

Đoạn mồi 18: 5'-

AAAATCTAGAGCCGCCACCATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCT-3' (SEQ ID NO: 83, Fig.91)

Đoạn mồi 19: 5'-

AGACAACACCCATCTAGGAGCGGCCACCAGCAGCAGAAAGAACC-3' (SEQ ID NO: 84, Fig.92)

Bằng cách sử dụng vùng Fc của IgG1 của người (SEQ ID NO: 87) làm khuôn, đoạn C chứa vùng Fc của IgG1 của người được khuếch đại bằng PCR ((ở 94°C trong 15 giây, ở

60°C trong 30 giây, ở 68°C trong 30 giây) × 30 chu trình) bằng cách sử dụng các đoạn mồi sau đây và KOD-plus-(TOYOBO).

Đoạn mồi 20: 5'-ATCCGGAATGGCCCCTGCGAACCCAAGAGCTGCGAC-3' (SEQ ID NO: 85, Fig.93)

Đoạn mồi 21: 5'-AAAAGTTTAAACTCATTTGCCGGGGCTCAG-3' (SEQ ID NO: 86, Fig.94)

Các đoạn ADN mong muốn được khuếch đại bằng PCR chồng nhau bằng cách sử dụng các đoạn peptit ức chế được khuếch đại ở trên, đoạn B, đoạn C, đoạn mồi 18, đoạn mồi 21, và KOD-plus-(TOYOBO).

Ngoài ra, vector biểu hiện của tế bào động vật có vú, pCMA_KLK5 thể dung hợp Fc peptit ức chế, được tạo ra bằng cách tạo dòng nhờ sử dụng các enzym giới hạn XbaI (NEB) và PmeI (NEB). Thao tác này được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong mục (1-1).

(5-2) Điều chế thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5

Vector biểu hiện được tạo ra trong mục (5-1) được chuyển nhiễm vào các tế bào Expi293F (Thermo Fisher Scientific) bằng cách sử dụng PEI MAX 40000 (Polysciences), và dịch nổi bề mặt nuôi cấy được thu hồi sau 6 ngày nuôi cấy tế bào. Thể dung hợp Fc mong muốn được thu hồi từ dịch nổi bề mặt nuôi cấy bằng cách sử dụng MabSelect SuRe (GE healthcare), và chất đệm được thay thế bằng PBS bằng cách sử dụng Amicon UltramWL 10000 (Merck KGaA Millipore), để điều chế thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5. Từ mỗi dòng có trình tự glycosyl hóa trong peptit ức chế KLK5, trình tự glycosyl hóa được loại bỏ bằng cách thay thế một gốc, và "dN" được bổ sung vào đó để làm ID cho biết dạng được loại nhóm glycosyl. Việc cải biến trình tự glycosyl hóa này không hề ảnh hưởng đến hoạt tính như hoạt tính ức chế KLK5 hoặc khả năng phản ứng chéo.

(5-3) Tạo ra vector biểu hiện thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D1-K50055-Fc

Bằng cách sử dụng trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K50055 (SEQ ID NO: 7) làm khuôn, các đoạn peptit ức chế được khuếch đại bằng PCR ((ở 94°C trong 15 giây, ở 60°C trong 30 giây, và ở 68°C trong 20 giây) × 30 chu trình) bằng cách sử dụng các đoạn mồi sau đây và KOD-plus-(TOYOBO).

Đoạn mồi 22: 5'-AGATGGGTGTTGTCTGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTC-3'
(SEQ ID NO: 94, Fig.104)

Đoạn mồi 17: 5'-GCAGGGGCCATTCCGGAT-3' (SEQ ID NO: 82, Fig.90)

Các đoạn ADN mong muốn được khuếch đại bằng PCR chồng nhau bằng cách sử dụng các đoạn peptit ức chế được khuếch đại ở trên và đoạn B, đoạn C, đoạn mồi 18, và đoạn mồi 21, chúng được khuếch đại trong mục (5-1), và KOD-plus-(TOYOBO).

Ngoài ra, vector biểu hiện của tế bào động vật có vú, thể dung hợp Fc peptit ức chế pCMA_KLK5, được tạo ra bằng cách tạo dòng bằng cách sử dụng các enzym giới hạn XbaI (NEB) và PmeI (NEB). Thao tác này được thực hiện theo phương pháp được mô tả trong mục (1-1).

(5-4) Điều chế thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D1-K50055-Fc

Vector biểu hiện được tạo ra trong mục (5-3) được chuyển nhiễm vào các tế bào Expi293F (Thermo Fisher Scientific) bằng cách sử dụng PEI MAX 40000 (Polysciences), và dịch nổi bề mặt nuôi cấy được thu hồi sau 6 ngày nuôi cấy tế bào. Thể dung hợp Fc mong muốn được thu hồi từ dịch nổi bề mặt nuôi cấy bằng cách sử dụng MabSelect SuRe (GE healthcare), và chất đệm được thay thế bằng PBS bằng cách sử dụng Amicon UltramWL 10000 (Merck KGaA Millipore), để điều chế thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D1-K50055-Fc.

Ví dụ 6. Đánh giá thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5

(6-1) Đánh giá hoạt tính ức chế KLK5 của chuột nhắt/người, KLK7 của chuột nhắt/người, và KLK14 của chuột nhắt/người của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5

Theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 3-1, hoạt tính ức chế của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 đối với KLK5 của chuột nhắt/người, KLK7 của chuột nhắt/người, và KLK14 của chuột nhắt/người được đánh giá. Theo kết quả tính tỷ lệ phân hủy của cơ chất peptit bởi mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế ở mỗi nồng độ và tính nồng độ ức chế 50% (IC₅₀) bằng cách sử dụng GraphPad Prism (phiên bản 5.0; GraphPad Software Inc.) với tỷ lệ phân hủy của thể dung hợp Fc peptit ức chế ở nồng độ 0nM được cho là 100%, đã phát hiện được rằng tất cả các thể dung hợp Fc peptit ức chế có tác dụng ức chế hoạt tính enzym KLK5 của người ở các nồng độ thấp (bảng 4, Fig.5, và Fig.107). Một số thể dung hợp Fc peptit ức chế có tác dụng ức chế hoạt tính enzym KLK7 của người

hoặc KLK14 của người ở các nồng độ thấp, và một số thể dung hợp Fc peptit ức chế có hoạt tính ức chế yếu đối với các proteaza này. Thể dung hợp Fc peptit ức chế còn có hoạt tính tương tự đối với KLK5, KLK7, hoặc KLK14 của chuột nhắt (bảng 5). Giá trị trung bình của ba thử nghiệm độc lập được sử dụng để tính giá trị IC_{50} .

Bảng 4

Hoạt tính ức chế của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 đối với KLK5 của người, KLK7 của người, hoặc KLK14 của người

ID	IC_{50} (nM) đối với hKLK5	IC_{50} (nM) đối với hKLK7	IC_{50} (nM) đối với hKLK14
D3-K51028-Fc	4,5±0,1	220±10	>1000
D3-K50032dN-Fc	3,9±0,3	>1000	>1000
D3-K50055-Fc	3,7±0,1	>1000	340±120
D3-K51069dN-Fc	4,5±0,4	>1000	42±11
D3-K51072-Fc	4,5±0,3	>1000	260±60
D3-K50015-Fc	3,1±0,2	>1000	4,5±1,3
D3-K50016dN-Fc	4,3±0,7	>1000	>1000
D3-K51034-Fc	5,7±0,8	>1000	960±320
D3-K50062-Fc	4,3±0,1	>1000	190±50
D3-K51090-Fc	4,6±0,5	>1000	350±30
D3-K50098dN-Fc	4,3±0,3	>1000	210±60
D3-K51005-Fc	8,6±1,4	28±3	>1000
D3-K50031-Fc	9,5±0,4	9,3±1,3	>1000
D3-K51057-Fc	12±1	18±1	>1000
D1-K50055-Fc	5,8±0,6	>1000	>1000

Bảng 5

Hoạt tính ức chế của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 đối với KLK5 của chuột nhắt, KLK7 của chuột nhắt, hoặc KLK14 của chuột nhắt

ID	IC ₅₀ (nM) đối với mKLK5	IC ₅₀ (nM) đối với mKLK7	IC ₅₀ (nM) đối với mKLK14
D3-K51028-Fc	16	110	>1000
D3-K50032dN-Fc	26	>1000	>1000
D3-K50055-Fc	6,8	>1000	>1000
D3-K51069dN-Fc	6,8	410	24
D3-K51072-Fc	50	>1000	>1000
D3-K50015-Fc	4,4	340	48
D3-K50016dN-Fc	35	>1000	>1000
D3-K51034-Fc	39	>1000	>1000
D3-K50062-Fc	5,4	>1000	>1000
D3-K51090-Fc	5,1	730	510
D3-K50098dN-Fc	6,8	>1,000	350
D3-K51005-Fc	330	37	240
D3-K50031-Fc	270	6,3	300
D3-K51057-Fc	600	24	380
D1-K50055-Fc	6,3	>1000	>1000

(6-2) Đánh giá khả năng phản ứng chéo của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5

Giống như các kết quả trong mục (3-2), một số thể dung hợp Fc peptit ức chế có khả năng phản ứng chéo yếu với trypsin, chymotrypsin, và plasmin của bò có nồng độ cuối của peptit ức chế bằng 1 μ M (trong đó giá trị IC₅₀ là nhỏ hơn 1 μ M), nhưng phần lớn các peptit ức chế không có hoạt tính ức chế với proteaza bất kỳ khác với các KLK (Fig.6). Một số thể dung hợp Fc peptit ức chế có hoạt tính ức chế với KLK4 hoặc KLK12 có nồng độ cuối 1 μ M (trong đó giá trị IC₅₀ là nhỏ hơn 1 μ M), nhưng nhiều thể dung hợp Fc peptit ức chế không có hoạt tính ức chế proteaza đối với các KLK trừ KLK7 hoặc KLK14. Do đó, đã phát hiện được rằng thể dung hợp Fc peptit ức chế có tính đặc hiệu cao giống như các peptit ức chế.

(6-3) Đánh giá hoạt tính ức chế KLK5 của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 bằng cách sử dụng cơ chất peptit (tính hằng số ức chế K_i)

Hoạt tính ức chế của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 đối với KLK5 của người được đánh giá, và hằng số ức chế K_i được tính. Peptit cơ chất Boc-Val-Pro-Arg-AMC (R&D Systems, Inc., ES011) được hòa tan trong DMSO đến 10mM và được pha loãng

bằng dung dịch đệm thử nghiệm (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 8,0) để sử dụng ở nồng độ cuối 25 đến 200 μ M. 25 μ l mỗi chất trong số KLK5 của người và thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 được pha loãng bằng dung dịch đệm thử nghiệm được trộn vào, sau đó phản ứng ở 37°C trong 20 phút. Sau đó, 50 μ l cơ chất được pha loãng bằng dung dịch đệm thử nghiệm được bổ sung vào đó, và tín hiệu huỳnh quang (kích thích ở 380nm/phát xạ ở 460nm) được đo bằng cách sử dụng Enspire. KLK5 của người có nồng độ cuối 10nM, thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 có nồng độ cuối 0,5 đến 25nM, và đĩa màu đen PROTEOSAVE (R) SS96F (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) được sử dụng để phản ứng và đo.

Tỷ lệ phân hủy của cơ chất peptit bởi mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế ở mỗi nồng độ được tính, và hoạt tính ức chế KLK5 của người của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế được đánh giá, với tỷ lệ phân hủy của thể dung hợp Fc peptit ức chế ở nồng độ 0nM được cho là 100% (Fig.102). Bằng cách sử dụng GraphPad Prism (phiên bản 5.0; GraphPad Software Inc.), tốc độ phản ứng tối đa V_{max} và hằng số Michaelis K_m được tính theo công thức Michaelis-Menten ở nồng độ enzym 10nM. Ngoài ra, theo kết quả của tính hằng số ức chế K_i ở nồng độ cơ chất 100 μ M bằng cách sử dụng GraphPad Prism theo công thức Morrison, đã phát hiện được rằng tất cả các thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 có tác dụng ức chế hoạt tính enzym KLK5 của người ở các nồng độ thấp (bảng 6). Giá trị trung bình của ba thử nghiệm độc lập được sử dụng để tính giá trị K_i .

Bảng 6

Hằng số ức chế KLK5 của người K_i của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5

ID	K_i (pM)
D3-K50032dN-Fc	440 $\pm$ 10
D3-K50055-Fc	190 $\pm$ 60
D3-K51072-Fc	360 $\pm$ 70
D3-K50016dN-Fc	360 $\pm$ 40

(6-4) Đánh giá hoạt tính ức chế KLK5 của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 bằng cách sử dụng cơ chất protein

Bằng cách sử dụng Desmoglein1 của người và Desmocollin1 của người làm các cơ chất protein, hoạt tính ức chế KLK5 của mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 được đánh giá. KLK5 của người và mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 (D3-K50032dN-

Fc, D3-K50055-Fc, D3-K51072-Fc, hoặc D3-K50016dN-Fc) được pha loãng bằng dung dịch đệm thử nghiệm được trộn vào, sau đó phản ứng ở 37°C trong 1 giờ. Tiếp theo, mỗi cơ chất protein được pha loãng bằng dung dịch đệm thử nghiệm được bổ sung vào đó, sau đó phản ứng ở 37°C trong 4 giờ. Sau đó, dung dịch đệm mẫu SDS chứa chất khử được bổ sung vào đó, và phản ứng enzym được ngừng bằng cách xử lý ở 99°C trong 5 phút. Sau đó, sự phân hủy cơ chất protein được đánh giá bằng cách sử dụng SDS-PAGE (điều kiện khử) và phân tích thấm Western. Các hỗn hợp của cơ chất và enzym, thể dung hợp Fc peptit ức chế, và kháng thể để phân tích thấm Western là như sau.

Đánh giá bằng cách sử dụng Desmoglein1 của người: hKLK5 có nồng độ cuối 1µM, thể dung hợp Fc peptit ức chế có nồng độ cuối 0,001 đến 10µM, protein thể khảm Desmoglein-1 Fc tái tổ hợp của người có nồng độ cuối 1µM (R&D Systems, Inc.), kháng thể Desmoglein 1 (aa471-499) (LSBio), và mảnh F(ab')₂ của lừa kháng IgG của thỏ, liên kết với HRP (GE healthcare)

Đánh giá bằng cách sử dụng Desmocollin1 của người: hKLK5 có nồng độ cuối 0,2 µM, thể dung hợp Fc peptit ức chế có nồng độ cuối 0,0002 đến 2µM, protein Desmocollin-1 tái tổ hợp của người có đuôi His đầu tận cùng C có nồng độ cuối 2µM (R&D Systems, Inc.), và Penta His HRP Conjugate (QIAGEN)

Desmoglein1 của người và Desmocollin1 của người không bị phân hủy khi không có mặt KLK5 của người nhưng bị phân hủy hoàn toàn với sự có mặt của KLK5 của người. Theo kết quả đánh giá KLK5 của người được ủ trước với mỗi thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5, đã phát hiện được rằng mỗi trong số các thể dung hợp Fc peptit ức chế có tác dụng ức chế hoạt tính phân hủy Desmoglein1 của người và Desmocollin1 của người của enzym KLK5 của người. Trong điều kiện mà trong đó nồng độ KLK5 của người và nồng độ thể dung hợp Fc peptit ức chế là giống nhau, sự phân hủy Desmoglein1 của người và Desmocollin1 của người bị ức chế hoàn toàn (Fig.103).

Ví dụ 7. Tác dụng của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 đối với việc ức chế sự tăng mức độ mất nước qua biểu bì (transepidermal water loss, TEWL) ở mô hình hội chứng Netherton ở chuột nhắt

(7-1) Chuột nhắt của mô hình hội chứng Netherton

Chuột nhắt Crusty2 có đột biến trong SPINK5 là gen gây ra hội chứng Netherton được biết là chuột nhắt của mô hình hội chứng Netherton, và chuột nhắt đồng hợp tử Crusty2 (+/+) có các triệu chứng trên da (cơ sở dữ liệu Mutagenetix).

(7-2) Tác dụng của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 đối với việc ức chế sự tăng TEWL ở chuột nhắt của mô hình hội chứng Netherton

Chuột nhắt Crusty2 (+/-) và chuột nhắt Crusty2 (+/+) được lai bằng cách thụ tinh nhân tạo, và thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D1-K50055-Fc được tạo ra trong mục (5-4) được đánh giá bằng cách sử dụng chuột nhắt con thu được (chuột nhắt Crusty2 (+/-) hoặc Crusty2 (+/+)). Từ 0 hoặc 1 ngày sau khi sinh, PBS hoặc 100 mg/kg D1-K50055-Fc được sử dụng dưới da cách ngày trong 4 tuần. Chỉ ở lần sử dụng đầu tiên, lượng gấp 3 lần của D1-K50055-Fc được sử dụng làm liều tải. Bằng cách sử dụng VAPO SCAN (AS-VT100RS, Asahi Techno Lab. Ltd.), TEWL trên da của lưng hoặc hông chuột nhắt được đo ở thời điểm 2 và 4 tuần sau khi sử dụng (Fig.7). Số lượng chuột Crusty2 (+/-) là 9 con, và số lượng chuột Crusty2 (+/+) là 12 con trong mỗi trong số nhóm sử dụng PBS và nhóm sử dụng D1-K50055-Fc.

Sự tăng có ý nghĩa thống kê của TEWL được quan sát ở chuột nhắt Crusty2 (+/+) so với chuột nhắt Crusty2 (+/-) và là đáng kể hơn ở chuột nhắt 4 tuần tuổi so với chuột nhắt 2 tuần tuổi. Sau 4 tuần từ khi sử dụng, sự giảm có ý nghĩa thống kê của TEWL được quan sát ở cả phần lưng và phần hông bị bệnh nặng hơn trong nhóm sử dụng D1-K50055-Fc so với nhóm sử dụng PBS. Từ điều nêu trên, đã phát hiện được rằng sự tăng TEWL gây bởi sự đột biến trong SPINK5 được quan sát ở chuột nhắt, và D1-K50055-Fc có tác dụng ức chế. Ngoài ra, đã chứng tỏ là các peptit theo sáng chế và thể liên hợp của chúng, bao gồm D1-K50055-Fc, là hữu ích để làm giảm các triệu chứng trên da của hội chứng Netherton.

Khả năng áp dụng trong công nghiệp

Peptit và thể liên hợp được đề xuất bởi sáng chế, và được phẩm chứa chúng có thể dùng để điều trị các bệnh khác nhau.

Văn bản không chứa danh mục trình tự

SEQ ID NO: 1: Trình tự axit amin của SPINK2 của người (Fig.9)

SEQ ID NO: 2: Trình tự axit amin của KLK5 của người (Fig.10)

SEQ ID NO: 3: Trình tự axit amin của KLK7 của người (Fig.11)

- SEQ ID NO: 4: Trình tự axit amin của KLK14 của người (Fig.12)
- SEQ ID NO: 5: Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K50032 (Fig.13)
- SEQ ID NO: 6: Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K50032 (Fig.14)
- SEQ ID NO: 7: Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K50055 (Fig.15)
- SEQ ID NO: 8: Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K50055 (Fig.16)
- SEQ ID NO: 9: Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K51072 (Fig.17)
- SEQ ID NO: 10: Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K51072 (Fig.18)
- SEQ ID NO: 11: Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K50016 (Fig.19)
- SEQ ID NO: 12: Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K50016 (Fig.20)
- SEQ ID NO: 13: Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K51034 (Fig.21)
- SEQ ID NO: 14: Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K51034 (Fig.22)
- SEQ ID NO: 15: Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K50062 (Fig.23)
- SEQ ID NO: 16: Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K50062 (Fig.24)
- SEQ ID NO: 17: Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K51090 (Fig.25)
- SEQ ID NO: 18: Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K51090 (Fig.26)
- SEQ ID NO: 19: Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K50098 (Fig.27)
- SEQ ID NO: 20: Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K50098 (Fig.28)
- SEQ ID NO: 21: Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51028 (Fig.29)
- SEQ ID NO: 22: Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51028 (Fig.30)
- SEQ ID NO: 23: Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51005 (Fig.31)
- SEQ ID NO: 24: Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51005 (Fig.32)
- SEQ ID NO: 25: Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK7 K50031 (Fig.33)
- SEQ ID NO: 26: Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK7 K50031 (Fig.34)
- SEQ ID NO: 27: Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51057 (Fig.35)
- SEQ ID NO: 28: Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51057 (Fig.36)
- SEQ ID NO: 29: Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK14 K51069 (Fig.37)
- SEQ ID NO: 30: Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK14 K51069 (Fig.38)
- SEQ ID NO: 31: Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK14 K50015 (Fig.39)
- SEQ ID NO: 32: Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK14 K50015 (Fig.40)

SEQ ID NO: 33: Trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50032dN-Fc (Fig.41)

SEQ ID NO: 34: Trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50032dN-Fc (Fig.42)

SEQ ID NO: 35: Trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50055-Fc (Fig.43)

SEQ ID NO: 36: Trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50055-Fc (Fig.44)

SEQ ID NO: 37: Trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51072-Fc (Fig.45)

SEQ ID NO: 38: Trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51072-Fc (Fig.46)

SEQ ID NO: 39: Trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50016dN-Fc (Fig.47)

SEQ ID NO: 40: Trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50016dN-Fc (Fig.48)

SEQ ID NO: 41: Trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51034-Fc (Fig.49)

SEQ ID NO: 42: Trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51034-Fc (Fig.50)

SEQ ID NO: 43: Trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50062-Fc (Fig.51)

SEQ ID NO: 44: Trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50062-Fc (Fig.52)

SEQ ID NO: 45: Trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51090-Fc (Fig.53)

SEQ ID NO: 46: Trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51090-Fc (Fig.54)

SEQ ID NO: 47: Trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50098dN-Fc (Fig.55)

SEQ ID NO: 48: Trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50098dN-Fc (Fig.56)

SEQ ID NO: 49: Trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K51028-Fc (Fig.57)

SEQ ID NO: 50: Trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K51028-Fc (Fig.58)

SEQ ID NO: 51: Trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K51005-Fc (Fig.59)

SEQ ID NO: 52: Trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K51005-Fc (Fig.60)

SEQ ID NO: 53: Trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K50031-Fc (Fig.61)

SEQ ID NO: 54: Trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K50031-Fc (Fig.62)

SEQ ID NO: 55: Trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K51057-Fc (Fig.63)

SEQ ID NO: 56: Trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K51057-Fc (Fig.64)

SEQ ID NO: 57: Trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK14 D3-K51069dN-Fc (Fig.65)

SEQ ID NO: 58: Trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK14 D3-K51069dN-Fc (Fig.66)

SEQ ID NO: 59: Trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK14 D3-K50015-Fc (Fig.67)

SEQ ID NO: 60: Trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK14 D3-K50015-Fc (Fig.68)

SEQ ID NO: 61: Công thức của peptit đột biến SPINK2 (Fig.69)

SEQ ID NO: 62: Trình tự nucleotit của đoạn môi 1 (Fig.70)

SEQ ID NO: 63: Trình tự nucleotit của đoạn môi 2 (Fig.71)

SEQ ID NO: 64: Trình tự nucleotit của đoạn môi 3 (Fig.72)

- SEQ ID NO: 65: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 4 (Fig.73)
- SEQ ID NO: 66: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 5 (Fig.74)
- SEQ ID NO: 67: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 6 (Fig.75)
- SEQ ID NO: 68: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 7 (Fig.76)
- SEQ ID NO: 69: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 8 (Fig.77)
- SEQ ID NO: 70: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 9 (Fig.78)
- SEQ ID NO: 71: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 10 (Fig.79)
- SEQ ID NO: 72: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 11 (Fig.80)
- SEQ ID NO: 73: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 12 (Fig.81)
- SEQ ID NO: 74: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 13 (Fig.82)
- SEQ ID NO: 75: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 14 (Fig.83)
- SEQ ID NO: 76: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 15 (Fig.84)
- SEQ ID NO: 77: Trình tự axit amin trong peptit cơ chất KLK7 (Fig.85)
- SEQ ID NO: 78: Trình tự axit amin trong peptit cơ chất α -chymotrypsin của bò (Fig.86)
- SEQ ID NO: 79: Trình tự axit amin trong peptit cơ chất elastaza bạch cầu trung tính (Fig.87)
- SEQ ID NO: 80: Trình tự axit amin trong peptit cơ chất protein C của người (Fig.88)
- SEQ ID NO: 81: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 16 (Fig.89)
- SEQ ID NO: 82: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 17 (Fig.90)
- SEQ ID NO: 83: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 18 (Fig.91)
- SEQ ID NO: 84: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 19 (Fig.92)
- SEQ ID NO: 85: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 20 (Fig.93)
- SEQ ID NO: 86: Trình tự nucleotit của đoạn mồi 21 (Fig.94)
- SEQ ID NO: 87: Trình tự axit amin của Fc của IgG1 của người (Fig.95)
- SEQ ID NO: 88: Trình tự axit amin của D8 của SPINK5 của người (Fig.96)
- SEQ ID NO: 89: Trình tự axit amin của D9 của SPINK5 của người (Fig.97)
- SEQ ID NO: 90: Trình tự axit amin của SPINK9 của người (Fig.98)
- SEQ ID NO: 91: Trình tự axit amin của KLK5 của chuột nhắt (Fig.99)
- SEQ ID NO: 92: Trình tự axit amin của KLK7 của chuột nhắt (Fig.100)
- SEQ ID NO: 93: Trình tự axit amin của KLK14 của chuột nhắt (Fig.101)

SEQ ID NO: 94: Trình tự nucleotit của đoạn môi 22 (Fig.104)

SEQ ID NO: 95: Trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D1-K50055-Fc (Fig.105)

SEQ ID NO: 96: Trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5 D1-K50055-Fc (Fig.106)

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Peptit biến thể SPINK2 chứa trình tự axit amin theo (i) hoặc (ii) dưới đây, mà ức chế chọn lọc hoạt tính proteaza thuộc dạng hoạt tính KLK5 của người:
 - (i) trình tự axit amin được thể hiện bởi bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, và 20 (các hình vẽ Fig.14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, và 28);
 - (ii) trình tự axit amin bao gồm axit amin số 4 đến 66 của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 34, 40 và 48 (các hình vẽ Fig.42, 48 và 56).
2. Peptit theo điểm 1, trong đó peptit này có ba liên kết disulfua và có cấu trúc ba chiều khác biệt ở chỗ bao gồm cấu trúc vòng, cấu trúc xoắn α , và cấu trúc gấp nếp β .
3. Polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được chứa trong peptit theo điểm 1 hoặc 2.
4. Vector chứa polynucleotit theo điểm 3.
5. Tế bào chứa polynucleotit theo điểm 3 hoặc vector theo điểm 4 hoặc tạo ra peptit theo điểm 1 hoặc 2.
6. Phương pháp tạo ra peptit đột biến SPINK2 bao gồm các bước (i) và (ii) dưới đây, trong đó peptit đột biến SPINK2 ức chế hoạt tính proteaza thuộc KLK5 hoạt tính:
 - (i) nuôi cấy tế bào theo điểm 5;
 - (ii) phục hồi peptit đột biến SPINK2 từ dịch nuôi cấy.
7. Phương pháp sản xuất peptit đột biến SPINK2 mà ức chế hoạt tính proteaza thuộc KLK5 hoạt tính bao gồm bước điều chế peptit theo điểm 1 hoặc 2 bằng cách tổng hợp hóa học hoặc dịch mã in vitro.
8. Peptit biến thể SPINK2 thu được bằng phương pháp theo điểm 6 hoặc 7.
9. Thể liên hợp bao gồm một hoặc nhiều gốc tùy ý được liên kết với peptit thứ nhất theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2 và 8.
10. Thể liên hợp theo điểm 9, trong đó một gốc tùy ý bao gồm peptit thứ hai không phải là biến thể SPINK2.

11. Thể liên hợp theo điểm 10, trong đó peptit thứ hai nằm ở phía đầu tận cùng amino của peptit thứ nhất.
12. Thể liên hợp theo điểm 10, trong đó peptit thứ hai nằm ở phía đầu tận cùng carboxyl của peptit thứ nhất.
13. Thể liên hợp theo điểm 12, trong đó peptit thứ hai là kháng thể hoặc mảnh của nó và bao gồm một hoặc nhiều vùng Fc.
14. Thể liên hợp theo điểm 13, trong đó vùng Fc là vùng Fc của globulin miễn dịch của người hoặc mảnh của nó.
15. Thể liên hợp theo điểm 13 hoặc 14, trong đó vùng Fc là vùng Fc của IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, và/hoặc IgE hoặc mảnh của nó.
16. Thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 15, trong đó vùng Fc là vùng Fc của IgG1 của người hoặc mảnh của nó.
17. Thể liên hợp theo điểm 16, trong đó vùng Fc của IgG1 của người bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 87 (Fig.95).
18. Thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 13 đến 15, trong đó vùng Fc là kiểu đại hoặc mẫu đột biến.
19. Thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 18, trong đó một đến một số axit aspartic và/hoặc axit glutamic được bổ sung vào đầu tận cùng amino.
20. Thể liên hợp bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 và 96 (các hình vẽ Fig.42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56 và 106), trong đó thể liên hợp này ức chế chọn lọc hoạt tính proteaza của KLK5 của người theo điểm bất kỳ trong số các điểm 9, 10 và từ 12 đến 19.
21. Thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 9, 10 và từ 12 đến 20, trong đó peptit thứ nhất và peptit thứ hai được liên kết thông qua nhóm liên kết.
22. Thể liên hợp theo điểm 21, trong đó nhóm liên kết là peptit thứ ba không là peptit thứ nhất hoặc peptit thứ hai.

23. Phương pháp tạo ra thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 9, 10 và từ 12 đến 22, bao gồm các bước (i) và (ii) dưới đây:

(i) nuôi cấy polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin được chứa trong thể liên hợp hoặc tế bào chứa vector mà polynucleotit được chèn vào;

(ii) phục hồi thể liên hợp peptit đột biến SPINK2 từ dịch nuôi cấy.

24. Phương pháp tạo ra thể liên hợp peptit đột biến SPINK2 theo điểm bất kỳ trong số các điểm 9, 10 và từ 12 đến 22 hoặc phương pháp tạo ra thể liên hợp bao gồm bước điều chế thể liên hợp peptit đột biến SPINK2 hoặc gốc peptit được chứa trong thể liên hợp này bằng cách tổng hợp hóa học hoặc dịch mã *in-vitro*.

25. Thể liên hợp peptit biến thể SPINK2 thu được bằng phương pháp theo điểm 23 hoặc 24.

26. Chế phẩm chứa peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2 và 8, polynucleotit theo điểm 3, vector theo điểm 4, tế bào theo điểm 5 và/hoặc thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 9, 10, từ 12 đến 22 và 25.

27. Dược phẩm chứa peptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1, 2 và 8, polynucleotit theo điểm, vector theo điểm 4, tế bào theo điểm 5, và/hoặc thể liên hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 9, 10, từ 12 đến 22 và 25.

28. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 6, 7, 23 và 24, bao gồm bước tinh chế ái lực bằng cách sử dụng kháng thể đặc biệt liên kết với peptit theo điểm 1 hoặc mảnh liên kết của nó.

29. Thể liên hợp chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 34 (Fig.42).

30. Thể liên hợp chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 36 (Fig.44).

31. Thể liên hợp chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 38 (Fig.46).

32. Thể liên hợp chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 40 (Fig.48).

33. Thể liên hợp chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 42 (Fig.50).

34. Thể liên hợp chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 44 (Fig.52).

35. Thể liên hợp chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 46 (Fig.54).

36. Thể liên hợp chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 48 (Fig.56).
37. Thể liên hợp chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 96 (Fig.106).
38. Dược phẩm chứa thể liên hợp theo điểm 29.
39. Dược phẩm chứa thể liên hợp theo điểm 30.
40. Dược phẩm chứa thể liên hợp theo điểm 31.
41. Dược phẩm chứa thể liên hợp theo điểm 32.
42. Dược phẩm chứa thể liên hợp theo điểm 33.
43. Dược phẩm chứa thể liên hợp theo điểm 34.
44. Dược phẩm chứa thể liên hợp theo điểm 35.
45. Dược phẩm chứa thể liên hợp theo điểm 36.
46. Dược phẩm chứa thể liên hợp theo điểm 37.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED
- <120> Peptit ức chế KLK5, phương pháp tạo ra peptit và dược phẩm chứa peptit
- <130> FP1933
- <150> JP2018-209729
- <151> 2018-11-07
- <160> 97
- <170> PatentIn phiên bản 3.5
- <210> 1
- <211> 63
- <212> PRT
- <213> Người hiện đại
- <400> 1

Asp Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ser
1 5 10 15

Gln Tyr Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg His Phe Asn Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys
50 55 60

- <210> 2
- <211> 227
- <212> PRT
- <213> Người hiện đại

<400> 2

Ile Ile Asn Gly Ser Asp Cys Asp Met His Thr Gln Pro Trp Gln Ala
1 5 10 15

Ala Leu Leu Leu Arg Pro Asn Gln Leu Tyr Cys Gly Ala Val Leu Val
20 25 30

His Pro Gln Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg Lys Lys Val Phe
35 40 45

Arg Val Arg Leu Gly His Tyr Ser Leu Ser Pro Val Tyr Glu Ser Gly
50 55 60

Gln Gln Met Phe Gln Gly Val Lys Ser Ile Pro His Pro Gly Tyr Ser
65 70 75 80

His Pro Gly His Ser Asn Asp Leu Met Leu Ile Lys Leu Asn Arg Arg
85 90 95

Ile Arg Pro Thr Lys Asp Val Arg Pro Ile Asn Val Ser Ser His Cys
100 105 110

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

Ser Pro Gln Val His Phe Pro Lys Val Leu Gln Cys Leu Asn Ile Ser
130 135 140

Val Leu Ser Gln Lys Arg Cys Glu Asp Ala Tyr Pro Arg Gln Ile Asp
145 150 155 160

Asp Thr Met Phe Cys Ala Gly Asp Lys Ala Gly Arg Asp Ser Cys Gln
165 170 175

Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Ser Leu Gln Gly Leu
180 185 190

Val Ser Trp Gly Asp Tyr Pro Cys Ala Arg Pro Asn Arg Pro Gly Val
195 200 205

Tyr Thr Asn Leu Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Gln Glu Thr Ile Gln
210 215 220

Ala Asn Ser
225

<210> 3
<211> 224
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 3

Ile Ile Asp Gly Ala Pro Cys Ala Arg Gly Ser His Pro Trp Gln Val
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Ser Gly Asn Gln Leu His Cys Gly Gly Val Leu Val Asn
 20 25 30

Glu Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys Met Asn Glu Tyr Thr
 35 40 45

Val His Leu Gly Ser Asp Thr Leu Gly Asp Arg Arg Ala Gln Arg Ile
 50 55 60

Lys Ala Ser Lys Ser Phe Arg His Pro Gly Tyr Ser Thr Gln Thr His
 65 70 75 80

Val Asn Asp Leu Met Leu Val Lys Leu Asn Ser Gln Ala Arg Leu Ser
 85 90 95

Ser Met Val Lys Lys Val Arg Leu Pro Ser Arg Cys Glu Pro Pro Gly
 100 105 110

Thr Thr Cys Thr Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Thr Ser Pro Asp Val
 115 120 125

Thr Phe Pro Ser Asp Leu Met Cys Val Asp Val Lys Leu Ile Ser Pro
 130 135 140

Gln Asp Cys Thr Lys Val Tyr Lys Asp Leu Leu Glu Asn Ser Met Leu
 145 150 155 160

Cys Ala Gly Ile Pro Asp Ser Lys Lys Asn Ala Cys Asn Gly Asp Ser
 165 170 175

Gly Gly Pro Leu Val Cys Arg Gly Thr Leu Gln Gly Leu Val Ser Trp
 180 185 190

Gly Thr Phe Pro Cys Gly Gln Pro Asn Asp Pro Gly Val Tyr Thr Gln
 195 200 205

Val Cys Lys Phe Thr Lys Trp Ile Asn Asp Thr Met Lys Lys His Arg
 210 215 220

<210> 4
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 4

Ile Ile Gly Gly His Thr Cys Thr Arg Ser Ser Gln Pro Trp Gln Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Ala Gly Pro Arg Arg Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ala Leu
 20 25 30

Leu Ser Gly Gln Trp Val Ile Thr Ala Ala His Cys Gly Arg Pro Ile
 35 40 45

Leu Gln Val Ala Leu Gly Lys His Asn Leu Arg Arg Trp Glu Ala Thr
 50 55 60

Gln Gln Val Leu Arg Val Val Arg Gln Val Thr His Pro Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Ser Arg Thr His Asp Asn Asp Leu Met Leu Leu Gln Leu Gln Gln Pro
 85 90 95

Ala Arg Ile Gly Arg Ala Val Arg Pro Ile Glu Val Thr Gln Ala Cys
 100 105 110

Ala Ser Pro Gly Thr Ser Cys Arg Val Ser Gly Trp Gly Thr Ile Ser
 115 120 125

Ser Pro Ile Ala Arg Tyr Pro Ala Ser Leu Gln Cys Val Asn Ile Asn
 130 135 140

Ile Ser Pro Asp Glu Val Cys Gln Lys Ala Tyr Pro Arg Thr Ile Thr
 145 150 155 160

Pro Gly Met Val Cys Ala Gly Val Pro Gln Gly Gly Lys Asp Ser Cys
 165 170 175

Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Arg Gly Gln Leu Gln Gly
 180 185 190

Leu Val Ser Trp Gly Met Glu Arg Cys Ala Leu Pro Gly Tyr Pro Gly
 195 200 205

Val Tyr Thr Asn Leu Cys Lys Tyr Arg Ser Trp Ile Glu Glu Thr Met
 210 215 220

Arg Asp Lys
 225

<210> 5
 <211> 198
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chất liên kết

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(198)

<400> 5
 ggc ccg cag ttt ggt ctg ttt agc aaa tat cgt acc ccg aat tgt ctg 48
 Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Leu
 1 5 10 15
 aac tgg act gac cat cag tgt gaa cgt gac tac gac ccg gtt tgt ggt 96
 Asn Trp Thr Asp His Gln Cys Glu Arg Asp Tyr Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30
 agc gat atg agc acc tat gca aat gaa tgt acc ctg tgc atg aaa att 144
 Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45
 cgt gaa ggt ggc cat aat att aaa att att cgc aat ggt ccg tgc ggc 192
 Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
 50 55 60
 ggc taa 198
 Gly
 65

<210> 6
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 6

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Leu
1 5 10 15

Asn Trp Thr Asp His Gln Cys Glu Arg Asp Tyr Asp Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly
65

<210> 7
<211> 198
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(198)

<400> 7
ggc ccg cag ttt ggt ctg ttt agc aaa tat cgt acc ccg aat tgt gct 48
Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ala
1 5 10 15
aac act atg aaa cag gac tgt act cgt gaa tac gac ccg gtt tgt ggt 96
Asn Thr Met Lys Gln Asp Cys Thr Arg Glu Tyr Asp Pro Val Cys Gly
20 25 30
agc gat atg agc acc tat gca aat gaa tgt acc ctg tgc atg aaa att 144
Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45
cgt gaa ggt ggc cat aat att aaa att att cgc aat ggt ccg tgc ggc 192
Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60
ggc taa 198
Gly
65

<210> 8
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ala
 1 5 10 15

Asn Thr Met Lys Gln Asp Cys Thr Arg Glu Tyr Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
 50 55 60

Gly
 65

<210> 9
 <211> 198
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chất liên kết

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(198)

<400> 9

ggc ccg cag ttt ggt ctg ttt agc aaa tat cgt acc ccg aat tgt cag 48
 Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Gln
 1 5 10 15

gaa gac atg act gaa tac tgt gct cgt gac ttc gac ccg gtt tgt ggt 96
 Glu Asp Met Thr Glu Tyr Cys Ala Arg Asp Phe Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30

agc gat atg agc acc tat gca aat gaa tgt acc ctg tgc atg aaa att 144
 Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45

cgt gaa ggt ggc cat aat att aaa att att cgc aat ggt ccg tgc ggc 192
 Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
 50 55 60

ggc taa 198
 Gly
 65

<210> 10
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 10

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Gln
 1 5 10 15

Glu Asp Met Thr Glu Tyr Cys Ala Arg Asp Phe Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
 50 55 60

Gly
 65

<210> 11
 <211> 198
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chất liên kết

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(198)

<400> 11 48
 ggc ccg cag ttt ggt ctg ttt agc aaa tat cgt acc ccg aat tgt tct
 Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ser
 1 5 10 15

cag tgg cag tac tct tct tgt gac cgt gtt tac gac ccg gtt tgt ggt 96
Gln Trp Gln Tyr Ser Ser Cys Asp Arg Val Tyr Asp Pro Val Cys Gly
20 25 30

agc gat atg agc acc tat gca aat gaa tgt acc ctg tgc atg aaa att 144
Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

cgt gaa ggt ggc cat aat att aaa att att cgc aat ggt ccg tgc ggc 192
Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

ggc taa 198
Gly
65

<210> 12
<211> 65
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ser
1 5 10 15

Gln Trp Gln Tyr Ser Ser Cys Asp Arg Val Tyr Asp Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly
65

<210> 13
<211> 198
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(198)

<400> 13

```

ggc ccg cag ttt ggt ctg ttt agc aaa tat cgt acc ccg aat tgt ggt      48
Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Gly
1          5          10          15

```

```

cgt tac act act ggt ggt tgt aac aaa gaa tac gaa ccg gtt tgt ggt      96
Arg Tyr Thr Thr Gly Gly Cys Asn Lys Glu Tyr Glu Pro Val Cys Gly
          20          25          30

```

```

agc gat atg agc acc tat gca aat gaa tgt acc ctg tgc atg aaa att      144
Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
          35          40          45

```

```

cgt gaa ggt ggc cat aat att aaa att att cgc aat ggt ccg tgc ggc      192
Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
          50          55          60

```

```

ggc taa
Gly
65      198

```

<210> 14

<211> 65

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 14

```

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Gly
1          5          10          15

```

```

Arg Tyr Thr Thr Gly Gly Cys Asn Lys Glu Tyr Glu Pro Val Cys Gly
          20          25          30

```

```

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
          35          40          45

```

```

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
          50          55          60

```

```

Gly
65

```

<210> 15
 <211> 198
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chất liên kết

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(198)

<400> 15
 ggc ccg cag ttt ggt ctg ttt agc aaa tat cgt acc ccg aat tgt cag 48
 Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Gln
 1 5 10 15
 cag tac cgt gaa ctg ggt tgt ggt cgt cag tac gac ccg gtt tgt ggt 96
 Gln Tyr Arg Glu Leu Gly Cys Gly Arg Gln Tyr Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30
 agc gat atg agc acc tat gca aat gaa tgt acc ctg tgc atg aaa att 144
 Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45
 cgt gaa ggt ggc cat aat att aaa att att cgc aat ggt ccg tgc ggc 192
 Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
 50 55 60
 ggc taa 198
 Gly
 65

<210> 16
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 16
 Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Gln
 1 5 10 15
 Gln Tyr Arg Glu Leu Gly Cys Gly Arg Gln Tyr Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30
 Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
 50 55 60

Gly
 65

<210> 17
 <211> 198
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chất liên kết

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(198)

<400> 17
 ggc ccg caa ttt ggt ctg ttt agc aaa tat cgt acc ccg aat tgt gac 48
 Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Asp
 1 5 10 15

gaa atc ggt aaa tac ggt tgt ggt cgt tct tac gac ccg gtt tgt ggt 96
 Glu Ile Gly Lys Tyr Gly Cys Gly Arg Ser Tyr Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30

agc gat atg agc acc tat gca aat gaa tgt acc ctg tgc atg aaa att 144
 Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45

cgt gaa ggt ggc cat aat att aaa att att cgc aat ggt ccg tgc ggc 192
 Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
 50 55 60

ggc taa 198
 Gly
 65

<210> 18
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 18

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Asp
1 5 10 15

Glu Ile Gly Lys Tyr Gly Cys Gly Arg Ser Tyr Asp Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly
65

<210> 19
<211> 198
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(198)

<400> 19
ggc ccg cag ttt ggt ctg ttt agc aaa tat cgt acc ccg aat tgt act 48
Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Thr
1 5 10 15
tct cag act ctg ggt tct tgt tct cgt gaa tac gac ccg gtt tgt ggt 96
Ser Gln Thr Leu Gly Ser Cys Ser Arg Glu Tyr Asp Pro Val Cys Gly
20 25 30
agc gat atg agc acc tat gca aat gaa tgt acc ctg tgc atg aaa att 144
Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45
cgt gaa ggt ggc cat aat att aaa att att cgc aat ggt ccg tgc ggc 192
Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60
ggc taa 198
Gly
65

<210> 20

<211> 65
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 20

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Thr
 1 5 10 15

Ser Gln Thr Leu Gly Ser Cys Ser Arg Glu Tyr Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
 50 55 60

Gly
 65

<210> 21
 <211> 198
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chất liên kết

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(198)

<400> 21

ggc ccg cag ttt ggt ctg ttt agc aaa tat cgt acc ccg aat tgt tac 48
 Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Tyr
 1 5 10 15

cag tac cgt tct aaa ggt tgt act cat gaa tac gac ccg gtt tgt ggt 96
 Gln Tyr Arg Ser Lys Gly Cys Thr His Glu Tyr Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30

agc gat atg agc acc tat gca aat gaa tgt acc ctg tgc atg aaa att 144
 Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45

cgt gaa ggt ggc cat aat att aaa att att cgc aat ggt ccg tgc ggc 192

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
 50 55 60

ggc taa
 Gly
 65

198

<210> 22
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 22

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Tyr
 1 5 10 15

Gln Tyr Arg Ser Lys Gly Cys Thr His Glu Tyr Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
 50 55 60

Gly
 65

<210> 23
 <211> 198
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chất liên kết

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(198)

<400> 23

ggc ccg cag ttt ggt ctg ttt agc aaa tat cgt acc ccg aat tgt atg
 Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Met
 1 5 10 15

48

cag cat gct cgt cag ggt tgt cat tac gac tac gac ccg gtt tgt ggt 96
Gln His Ala Arg Gln Gly Cys His Tyr Asp Tyr Asp Pro Val Cys Gly
20 25 30

agc gat atg agc acc tat gca aat gaa tgt acc ctg tgc atg aaa att 144
Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

cgt gaa ggt ggc cat aat att aaa att att cgc aat ggt ccg tgc ggc 192
Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

ggc taa 198
Gly
65

<210> 24
<211> 65
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 24

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Met
1 5 10 15

Gln His Ala Arg Gln Gly Cys His Tyr Asp Tyr Asp Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly
65

<210> 25
<211> 198
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(198)

<400> 25

```

ggc ccg cag ttt ggt ctg ttt agc aaa tat cgt acc ccg aat tgt ggt      48
Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Gly
1           5           10           15

```

```

gaa tac aaa ggt cgt ggt tgt tac tac cat tac gac ccg gtt tgt ggt      96
Glu Tyr Lys Gly Arg Gly Cys Tyr Tyr His Tyr Asp Pro Val Cys Gly
                20           25           30

```

```

agc gat atg agc acc tat gca aat gaa tgt acc ctg tgc atg aaa att      144
Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
                35           40           45

```

```

cgt gaa ggt ggc cat aat att aaa att att cgc aat ggt ccg tgc ggc      192
Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
    50           55           60

```

```

ggc taa
Gly
65

```

<210> 26

<211> 65

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 26

```

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Gly
1           5           10           15

```

```

Glu Tyr Lys Gly Arg Gly Cys Tyr Tyr His Tyr Asp Pro Val Cys Gly
                20           25           30

```

```

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
                35           40           45

```

```

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
    50           55           60

```

```

Gly
65

```

<210> 27
 <211> 198
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chất liên kết

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(198)

<400> 27
 ggc ccg cag ttt ggt ctg ttt agc aaa tat cgt acc ccg aat tgt ggt 48
 Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Gly
 1 5 10 15
 act atg cag ggt tct ggt tgt act tac cat tac gaa ccg gtt tgt ggt 96
 Thr Met Gln Gly Ser Gly Cys Thr Tyr His Tyr Glu Pro Val Cys Gly
 20 25 30
 agc gat atg agc acc tat gca aat gaa tgt acc ctg tgc atg aaa att 144
 Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45
 cgt gaa ggt ggc cat aat att aaa att att cgc aat ggt ccg tgc ggc 192
 Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
 50 55 60
 ggc taa 198
 Gly
 65

<210> 28
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 28
 Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Gly
 1 5 10 15
 Thr Met Gln Gly Ser Gly Cys Thr Tyr His Tyr Glu Pro Val Cys Gly
 20 25 30
 Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
 50 55 60

Gly
 65

<210> 29
 <211> 198
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chất liên kết

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(198)

<400> 29
 ggc ccg cag ttt ggt ctg ttt agc aaa tat cgt acc ccg aat tgt tct 48
 Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ser
 1 5 10 15

cag gtt gtt gaa act tac tgt aac cgt gac tac gac ccg gtt tgt ggt 96
 Gln Val Val Glu Thr Tyr Cys Asn Arg Asp Tyr Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30

agc gat atg agc acc tat gca aat gaa tgt acc ctg tgc atg aaa att 144
 Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45

cgt gaa ggt ggc cat aat att aaa att att cgc aat ggt ccg tgc ggc 192
 Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
 50 55 60

ggc taa 198
 Gly
 65

<210> 30
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 30

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ser
 1 5 10 15

Gln Val Val Glu Thr Tyr Cys Asn Arg Asp Tyr Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
 50 55 60

Gly
 65

<210> 31
 <211> 198
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chất liên kết

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(198)

<400> 31
 ggc ccg cag ttt ggt ctg ttt agc aaa tat cgt acc ccg aat tgt tac 48
 Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Tyr
 1 5 10 15
 gac act act act cat tac tgt tct cgt gaa tac gac ccg gtt tgt ggt 96
 Asp Thr Thr Thr His Tyr Cys Ser Arg Glu Tyr Asp Pro Val Cys Gly
 20 25 30
 agc gat atg agc acc tat gca aat gaa tgt acc ctg tgc atg aaa att 144
 Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45
 cgt gaa ggt ggc cat aat att aaa att att cgc aat ggt ccg tgc ggc 192
 Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
 50 55 60
 ggc taa 198
 Gly
 65

<210> 32
 <211> 65
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 32

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Tyr
1 5 10 15

Asp Thr Thr Thr His Tyr Cys Ser Arg Glu Tyr Asp Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly
65

<210> 33

<211> 897

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chất liên kết

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(897)

<400> 33

gat gac gac ggc cct cag ttc ggc ctg ttc agc aag tac aga acc cct 48
Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
1 5 10 15

aac tgc ctg cag tgg act gac cat cag tgt gaa cgt gac tac gac cct 96
Asn Cys Leu Gln Trp Thr Asp His Gln Cys Glu Arg Asp Tyr Asp Pro
20 25 30

gtg tgc ggc agc gac atg agc acc tac gcc aat gag tgc acc ctg tgc 144
Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
35 40 45

atg aag atc aga gaa ggc ggc cac aac atc aag atc atc cgg aat ggc 192
Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
50 55 60

ccc tgc gaa ccc aag agc tgc gac aag acc cac acc tgt ccc cct tgt	240
Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	
65 70 75 80	
cct gcc ccc gaa ctg ctg gga gga cct agc gtg ttc ctg ttc ccc cca	288
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	
85 90 95	
aag ccc aag gac acc ctg atg atc agc cgg acc ccc gaa gtg acc tgc	336
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	
100 105 110	
gtg gtg gtg gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg aag ttc aat tgg	384
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	
115 120 125	
tac gtg gac ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc aag cct aga gag	432
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
130 135 140	
gaa cag tac aac tcc acc tac cgg gtg gtg tct gtg ctg aca gtg ctg	480
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	
145 150 155 160	
cat cag gac tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac	528
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	
165 170 175	
aag gcc ctg cct gcc ccc atc gag aaa acc atc agc aag gcc aag ggc	576
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
180 185 190	
cag ccc cgc gaa ccc cag gtg tac aca ctg ccc cct agc cgg gaa gag	624
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu	
195 200 205	
atg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg aaa ggc ttc tac	672
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	
210 215 220	
ccc agc gac att gcc gtg gaa tgg gag agc aac ggc cag ccc gag aac	720
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	
225 230 235 240	
aac tac aag acc acc ccc cct gtg ctg gac agc gac ggc tca ttc ttc	768
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
245 250 255	
ctg tac agc aag ctg acc gtg gac aag agc cgg tgg cag cag ggc aac	816
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	
260 265 270	
gtg ttc agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc	864
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	
275 280 285	

cag aag tcc ctg agc ctg agc ccc ggc aaa tga
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

897

<210> 34
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 34

Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15

Asn Cys Leu Gln Trp Thr Asp His Gln Cys Glu Arg Asp Tyr Asp Pro
 20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 65 70 75 80

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 85 90 95

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 100 105 110

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 115 120 125

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 130 135 140

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
165 170 175

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
180 185 190

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
195 200 205

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
225 230 235 240

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
245 250 255

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
260 265 270

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290 295

<210> 35
<211> 897
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(897)

<400> 35
gat gac gac ggc cct cag ttc ggc ctg ttc agc aag tac aga acc cct 48
Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
1 5 10 15

aac tgc gct aac act atg aaa cag gac tgt act cgt gaa tac gac cct 96
Asn Cys Ala Asn Thr Met Lys Gln Asp Cys Thr Arg Glu Tyr Asp Pro
20 25 30

gtg tgc ggc agc gac atg agc acc tac gcc aat gag tgc acc ctg tgc	144
Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys	
35 40 45	
atg aag atc aga gaa ggc ggc cac aac atc aag atc atc cgg aat ggc	192
Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly	
50 55 60	
ccc tgc gaa ccc aag agc tgc gac aag acc cac acc tgt ccc cct tgt	240
Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	
65 70 75 80	
cct gcc ccc gaa ctg ctg gga gga cct agc gtg ttc ctg ttc ccc cca	288
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	
85 90 95	
aag ccc aag gac acc ctg atg atc agc cgg acc ccc gaa gtg acc tgc	336
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	
100 105 110	
gtg gtg gtg gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg aag ttc aat tgg	384
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	
115 120 125	
tac gtg gac ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc aag cct aga gag	432
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
130 135 140	
gaa cag tac aac tcc acc tac cgg gtg gtg tct gtg ctg aca gtg ctg	480
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	
145 150 155 160	
cat cag gac tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac	528
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	
165 170 175	
aag gcc ctg cct gcc ccc atc gag aaa acc atc agc aag gcc aag ggc	576
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
180 185 190	
cag ccc cgc gaa ccc cag gtg tac aca ctg ccc cct agc cgg gaa gag	624
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu	
195 200 205	
atg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg aaa ggc ttc tac	672
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	
210 215 220	
ccc agc gac att gcc gtg gaa tgg gag agc aac ggc cag ccc gag aac	720
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	
225 230 235 240	
aac tac aag acc acc ccc cct gtg ctg gac agc gac ggc tca ttc ttc	768
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
245 250 255	

ctg tac agc aag ctg acc gtg gac aag agc cgg tgg cag cag ggc aac 816
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 260 265 270

gtg ttc agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc 864
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 275 280 285

cag aag tcc ctg agc ctg agc ccc ggc aaa tga 897
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

<210> 36
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 36

Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15

Asn Cys Ala Asn Thr Met Lys Gln Asp Cys Thr Arg Glu Tyr Asp Pro
 20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 65 70 75 80

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 85 90 95

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 100 105 110

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 115 120 125

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
130 135 140

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
165 170 175

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
180 185 190

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
195 200 205

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
225 230 235 240

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
245 250 255

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
260 265 270

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290 295

<210> 37
<211> 897
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(897)

<400> 37
 gat gac gac ggc cct cag ttc ggc ctg ttc agc aag tac aga acc cct 48
 Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15

aac tgc cag gaa gac atg act gaa tac tgt gct cgt gac ttc gac cct 96
 Asn Cys Gln Glu Asp Met Thr Glu Tyr Cys Ala Arg Asp Phe Asp Pro
 20 25 30

gtg tgc ggc agc gac atg agc acc tac gcc aat gag tgc acc ctg tgc 144
 Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

atg aag atc aga gaa ggc ggc cac aac atc aag atc atc cgg aat ggc 192
 Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

ccc tgc gaa ccc aag agc tgc gac aag acc cac acc tgt ccc cct tgt 240
 Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 65 70 75 80

cct gcc ccc gaa ctg ctg gga gga cct agc gtg ttc ctg ttc ccc cca 288
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 85 90 95

aag ccc aag gac acc ctg atg atc agc cgg acc ccc gaa gtg acc tgc 336
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 100 105 110

gtg gtg gtg gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg aag ttc aat tgg 384
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 115 120 125

tac gtg gac ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc aag cct aga gag 432
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 130 135 140

gaa cag tac aac tcc acc tac cgg gtg gtg tct gtg ctg aca gtg ctg 480
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 145 150 155 160

cat cag gac tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac 528
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 165 170 175

aag gcc ctg cct gcc ccc atc gag aaa acc atc agc aag gcc aag ggc 576
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 180 185 190

cag ccc cgc gaa ccc cag gtg tac aca ctg ccc cct agc cgg gaa gag 624
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 195 200 205

atg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg aaa ggc ttc tac 672
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 210 215 220

ccc agc gac att gcc gtg gaa tgg gag agc aac ggc cag ccc gag aac 720
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 225 230 235 240
 aac tac aag acc acc ccc cct gtg ctg gac agc gac ggc tca ttc ttc 768
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 245 250 255
 ctg tac agc aag ctg acc gtg gac aag agc cgg tgg cag cag ggc aac 816
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 260 265 270
 gtg ttc agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc 864
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 275 280 285
 cag aag tcc ctg agc ctg agc ccc ggc aaa tga 897
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

<210> 38
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 38

Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15

Asn Cys Gln Glu Asp Met Thr Glu Tyr Cys Ala Arg Asp Phe Asp Pro
 20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 65 70 75 80

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 85 90 95

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 100 105 110

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 115 120 125

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 130 135 140

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 165 170 175

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 180 185 190

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 195 200 205

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 225 230 235 240

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 245 250 255

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 260 265 270

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

<210> 39
 <211> 897
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chất liên kết

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(897)

<400> 39

gat	gac	gac	ggc	cct	cag	ttc	ggc	ctg	ttc	agc	aag	tac	aga	acc	cct	48
Asp	Asp	Asp	Gly	Pro	Gln	Phe	Gly	Leu	Phe	Ser	Lys	Tyr	Arg	Thr	Pro	
1			5					10						15		

aac	tgc	ggc	cag	tgg	cag	tac	tct	tct	tgt	gac	cgt	gtt	tac	gac	cct	96
Asn	Cys	Gly	Gln	Trp	Gln	Tyr	Ser	Ser	Cys	Asp	Arg	Val	Tyr	Asp	Pro	
		20					25					30				

gtg	tgc	ggc	agc	gac	atg	agc	acc	tac	gcc	aat	gag	tgc	acc	ctg	tgc	144
Val	Cys	Gly	Ser	Asp	Met	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asn	Glu	Cys	Thr	Leu	Cys	
		35					40					45				

atg	aag	atc	aga	gaa	ggc	ggc	cac	aac	atc	aag	atc	atc	cgg	aat	ggc	192
Met	Lys	Ile	Arg	Glu	Gly	Gly	His	Asn	Ile	Lys	Ile	Ile	Arg	Asn	Gly	
	50					55					60					

ccc	tgc	gaa	ccc	aag	agc	tgc	gac	aag	acc	cac	acc	tgt	ccc	cct	tgt	240
Pro	Cys	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
65				70					75					80		

cct	gcc	ccc	gaa	ctg	ctg	gga	gga	cct	agc	gtg	ttc	ctg	ttc	ccc	cca	288
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
			85					90						95		

aag	ccc	aag	gac	acc	ctg	atg	atc	agc	cgg	acc	ccc	gaa	gtg	acc	tgc	336
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
			100				105						110			

gtg	gtg	gtg	gat	gtg	tcc	cac	gag	gac	cct	gaa	gtg	aag	ttc	aat	tgg	384
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
		115					120					125				

tac	gtg	gac	ggc	gtg	gaa	gtg	cac	aac	gcc	aag	acc	aag	cct	aga	gag	432
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
	130					135					140					

gaa	cag	tac	aac	tcc	acc	tac	cgg	gtg	gtg	tct	gtg	ctg	aca	gtg	ctg	480
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
145				150					155					160		

cat	cag	gac	tgg	ctg	aac	ggc	aaa	gag	tac	aag	tgc	aag	gtg	tcc	aac	528
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
			165				170						175			

aag	gcc	ctg	cct	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	agc	aag	gcc	aag	ggc	576
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
			180				185						190			

cag ccc cgc gaa ccc cag gtg tac aca ctg ccc cct agc cgg gaa gag 624
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 195 200 205
 atg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg aaa ggc ttc tac 672
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 210 215 220
 ccc agc gac att gcc gtg gaa tgg gag agc aac ggc cag ccc gag aac 720
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 225 230 235 240
 aac tac aag acc acc ccc cct gtg ctg gac agc gac ggc tca ttc ttc 768
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 245 250 255
 ctg tac agc aag ctg acc gtg gac aag agc cgg tgg cag cag ggc aac 816
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 260 265 270
 gtg ttc agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc 864
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 275 280 285
 cag aag tcc ctg agc ctg agc ccc ggc aaa tga 897
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

<210> 40
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 40

Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15

Asn Cys Gly Gln Trp Gln Tyr Ser Ser Cys Asp Arg Val Tyr Asp Pro
 20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
65 70 75 80

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
85 90 95

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
100 105 110

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
115 120 125

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
130 135 140

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
165 170 175

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
180 185 190

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
195 200 205

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
225 230 235 240

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
245 250 255

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
260 265 270

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290 295

<210> 41
<211> 897
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(897)

<400> 41
gat gac gac ggc cct cag ttc ggc ctg ttc agc aag tac aga acc cct 48
Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
1 5 10 15

aac tgc ggt cgt tac act act ggt ggt tgt aac aaa gaa tac gaa cct 96
Asn Cys Gly Arg Tyr Thr Thr Gly Gly Cys Asn Lys Glu Tyr Glu Pro
20 25 30

gtg tgc ggc agc gac atg agc acc tac gcc aat gag tgc acc ctg tgc 144
Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
35 40 45

atg aag atc aga gaa ggc ggc cac aac atc aag atc atc cgg aat ggc 192
Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
50 55 60

ccc tgc gaa ccc aag agc tgc gac aag acc cac acc tgt ccc cct tgt 240
Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
65 70 75 80

cct gcc ccc gaa ctg ctg gga gga cct agc gtg ttc ctg ttc ccc cca 288
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
85 90 95

aag ccc aag gac acc ctg atg atc agc cgg acc ccc gaa gtg acc tgc 336
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
100 105 110

gtg gtg gtg gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg aag ttc aat tgg 384
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
115 120 125

tac gtg gac ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc aag cct aga gag 432
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
130 135 140

gaa cag tac aac tcc acc tac cgg gtg gtg tct gtg ctg aca gtg ctg 480
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

145	150	155	160	
cat cag gac tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac				528
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	165	170	175	
aag gcc ctg cct gcc ccc atc gag aaa acc atc agc aag gcc aag ggc				576
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	180	185	190	
cag ccc cgc gaa ccc cag gtg tac aca ctg ccc cct agc cgg gaa gag				624
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu	195	200	205	
atg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg aaa ggc ttc tac				672
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	210	215	220	
ccc agc gac att gcc gtg gaa tgg gag agc aac ggc cag ccc gag aac				720
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	225	230	235	240
aac tac aag acc acc ccc cct gtg ctg gac agc gac ggc tca ttc ttc				768
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	245	250	255	
ctg tac agc aag ctg acc gtg gac aag agc cgg tgg cag cag ggc aac				816
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	260	265	270	
gtg ttc agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc				864
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	275	280	285	
cag aag tcc ctg agc ctg agc ccc ggc aaa tga				897
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	290	295		

<210> 42
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 42

Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
1 5 10 15

Asn Cys Gly Arg Tyr Thr Thr Gly Gly Cys Asn Lys Glu Tyr Glu Pro
20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 65 70 75 80

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 85 90 95

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 100 105 110

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 115 120 125

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 130 135 140

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 165 170 175

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 180 185 190

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 195 200 205

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 225 230 235 240

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 245 250 255

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
260 265 270

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290 295

<210> 43
<211> 897
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(897)

<400> 43
gat gac gac ggc cct cag ttc ggc ctg ttc agc aag tac aga acc cct 48
Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
1 5 10 15
aac tgc cag cag tac cgt gaa ctg ggt tgt ggt cgt cag tac gac cct 96
Asn Cys Gln Gln Tyr Arg Glu Leu Gly Cys Gly Arg Gln Tyr Asp Pro
20 25 30
gtg tgc ggc agc gac atg agc acc tac gcc aat gag tgc acc ctg tgc 144
Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
35 40 45
atg aag atc aga gaa ggc ggc cac aac atc aag atc atc cgg aat ggc 192
Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
50 55 60
ccc tgc gaa ccc aag agc tgc gac aag acc cac acc tgt ccc cct tgt 240
Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
65 70 75 80
cct gcc ccc gaa ctg ctg gga gga cct agc gtg ttc ctg ttc ccc cca 288
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
85 90 95
aag ccc aag gac acc ctg atg atc agc cgg acc ccc gaa gtg acc tgc 336
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
100 105 110
gtg gtg gtg gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg aag ttc aat tgg 384

Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
		115					120					125				
tac	gtg	gac	ggc	gtg	gaa	gtg	cac	aac	gcc	aag	acc	aag	cct	aga	gag	432
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
	130					135					140					
gaa	cag	tac	aac	tcc	acc	tac	cgg	gtg	gtg	tct	gtg	ctg	aca	gtg	ctg	480
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
145					150					155					160	
cat	cag	gac	tgg	ctg	aac	ggc	aaa	gag	tac	aag	tgc	aag	gtg	tcc	aac	528
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
				165					170					175		
aag	gcc	ctg	cct	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	agc	aag	gcc	aag	ggc	576
Lys	Ala	Leu		Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
			180					185					190			
cag	ccc	cgc	gaa	ccc	cag	gtg	tac	aca	ctg	ccc	cct	agc	cgg	gaa	gag	624
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
		195					200					205				
atg	acc	aag	aac	cag	gtg	tcc	ctg	acc	tgt	ctc	gtg	aaa	ggc	ttc	tac	672
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
	210					215					220					
ccc	agc	gac	att	gcc	gtg	gaa	tgg	gag	agc	aac	ggc	cag	ccc	gag	aac	720
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
225					230					235					240	
aac	tac	aag	acc	acc	ccc	cct	gtg	ctg	gac	agc	gac	ggc	tca	ttc	ttc	768
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
				245					250					255		
ctg	tac	agc	aag	ctg	acc	gtg	gac	aag	agc	cgg	tgg	cag	cag	ggc	aac	816
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
			260					265					270			
gtg	ttc	agc	tgc	agc	gtg	atg	cac	gag	gcc	ctg	cac	aac	cac	tac	acc	864
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
		275					280					285				
cag	aag	tcc	ctg	agc	ctg	agc	ccc	ggc	aaa	tga						897
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
	290					295										

<210> 44
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 44

Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15

Asn Cys Gln Gln Tyr Arg Glu Leu Gly Cys Gly Arg Gln Tyr Asp Pro
 20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 65 70 75 80

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 85 90 95

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 100 105 110

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 115 120 125

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 130 135 140

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 165 170 175

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 180 185 190

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 195 200 205

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
225 230 235 240

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
245 250 255

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
260 265 270

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290 295

<210> 45
<211> 897
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(897)

<400> 45
gat gac gac ggc cct cag ttc ggc ctg ttc agc aag tac aga acc cct 48
Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
1 5 10 15
aac tgc gac gaa atc ggt aaa tac ggt tgt ggt cgt tct tac gac cct 96
Asn Cys Asp Glu Ile Gly Lys Tyr Gly Cys Gly Arg Ser Tyr Asp Pro
20 25 30
gtg tgc ggc agc gac atg agc acc tac gcc aat gag tgc acc ctg tgc 144
Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
35 40 45
atg aag atc aga gaa ggc ggc cac aac atc aag atc atc cgg aat ggc 192
Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
50 55 60
ccc tgc gaa ccc aag agc tgc gac aag acc cac acc tgt ccc cct tgt 240
Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
65 70 75 80

cct gcc ccc gaa ctg ctg gga gga cct agc gtg ttc ctg ttc ccc cca	288
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	
85 90 95	
aag ccc aag gac acc ctg atg atc agc cgg acc ccc gaa gtg acc tgc	336
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	
100 105 110	
gtg gtg gtg gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg aag ttc aat tgg	384
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	
115 120 125	
tac gtg gac ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc aag cct aga gag	432
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
130 135 140	
gaa cag tac aac tcc acc tac cgg gtg gtg tct gtg ctg aca gtg ctg	480
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	
145 150 155 160	
cat cag gac tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac	528
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	
165 170 175	
aag gcc ctg cct gcc ccc atc gag aaa acc atc agc aag gcc aag ggc	576
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
180 185 190	
cag ccc cgc gaa ccc cag gtg tac aca ctg ccc cct agc cgg gaa gag	624
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu	
195 200 205	
atg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg aaa ggc ttc tac	672
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	
210 215 220	
ccc agc gac att gcc gtg gaa tgg gag agc aac ggc cag ccc gag aac	720
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	
225 230 235 240	
aac tac aag acc acc ccc cct gtg ctg gac agc gac ggc tca ttc ttc	768
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
245 250 255	
ctg tac agc aag ctg acc gtg gac aag agc cgg tgg cag cag ggc aac	816
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	
260 265 270	
gtg ttc agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc	864
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	
275 280 285	
cag aag tcc ctg agc ctg agc ccc ggc aaa tga	897
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
290 295	

<210> 46
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 46

Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15

Asn Cys Asp Glu Ile Gly Lys Tyr Gly Cys Gly Arg Ser Tyr Asp Pro
 20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 65 70 75 80

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 85 90 95

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 100 105 110

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 115 120 125

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 130 135 140

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 165 170 175

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 180 185 190

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
195 200 205

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
225 230 235 240

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
245 250 255

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
260 265 270

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290 295

<210> 47
<211> 897
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(897)

<400> 47
gat gac gac ggc cct cag ttc ggc ctg ttc agc aag tac aga acc cct 48
Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
1 5 10 15

aac tgc ggc tct cag act ctg ggt tct tgt tct cgt gaa tac gac cct 96
Asn Cys Gly Ser Gln Thr Leu Gly Ser Cys Ser Arg Glu Tyr Asp Pro
20 25 30

gtg tgc ggc agc gac atg agc acc tac gcc aat gag tgc acc ctg tgc 144
Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
35 40 45

atg aag atc aga gaa ggc ggc cac aac atc aag atc atc cgg aat ggc Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly 50 55 60	192
ccc tgc gaa ccc aag agc tgc gac aag acc cac acc tgt ccc cct tgt Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys 65 70 75 80	240
cct gcc ccc gaa ctg ctg gga gga cct agc gtg ttc ctg ttc ccc cca Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro 85 90 95	288
aag ccc aag gac acc ctg atg atc agc cgg acc ccc gaa gtg acc tgc Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys 100 105 110	336
gtg gtg gtg gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg aag ttc aat tgg Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp 115 120 125	384
tac gtg gac ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc aag cct aga gag Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 130 135 140	432
gaa cag tac aac tcc acc tac cgg gtg gtg tct gtg ctg aca gtg ctg Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 145 150 155 160	480
cat cag gac tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 165 170 175	528
aag gcc ctg cct gcc ccc atc gag aaa acc atc agc aag gcc aag ggc Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 180 185 190	576
cag ccc cgc gaa ccc cag gtg tac aca ctg ccc cct agc cgg gaa gag Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu 195 200 205	624
atg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg aaa ggc ttc tac Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 210 215 220	672
ccc agc gac att gcc gtg gaa tgg gag agc aac ggc cag ccc gag aac Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn 225 230 235 240	720
aac tac aag acc acc ccc cct gtg ctg gac agc gac ggc tca ttc ttc Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe 245 250 255	768
ctg tac agc aag ctg acc gtg gac aag agc cgg tgg cag cag ggc aac Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn 260 265 270	816

gtg ttc agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc 864
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 275 280 285

cag aag tcc ctg agc ctg agc ccc ggc aaa tga 897
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

<210> 48
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 48

Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15

Asn Cys Gly Ser Gln Thr Leu Gly Ser Cys Ser Arg Glu Tyr Asp Pro
 20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 65 70 75 80

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 85 90 95

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 100 105 110

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 115 120 125

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 130 135 140

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
165 170 175

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
180 185 190

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
195 200 205

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
225 230 235 240

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
245 250 255

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
260 265 270

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290 295

<210> 49
<211> 897
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(897)

<400> 49
gat gac gac ggc cct cag ttc ggc ctg ttc agc aag tac aga acc cct
Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
1 5 10 15

48

aac tgc tac cag tac aga agc aag ggc tgc acc cac gag tac gat cct Asn Cys Tyr Gln Tyr Arg Ser Lys Gly Cys Thr His Glu Tyr Asp Pro 20 25 30	96
gtg tgc ggc agc gac atg agc acc tac gcc aat gag tgc acc ctg tgc Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys 35 40 45	144
atg aag atc aga gaa ggc ggc cac aac atc aag atc atc cgg aat ggc Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly 50 55 60	192
ccc tgc gaa ccc aag agc tgc gac aag acc cac acc tgt ccc cct tgt Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys 65 70 75 80	240
cct gcc ccc gaa ctg ctg gga gga cct agc gtg ttc ctg ttc ccc cca Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro 85 90 95	288
aag ccc aag gac acc ctg atg atc agc cgg acc ccc gaa gtg acc tgc Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys 100 105 110	336
gtg gtg gtg gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg aag ttc aat tgg Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp 115 120 125	384
tac gtg gac ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc aag cct aga gag Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 130 135 140	432
gaa cag tac aac tcc acc tac cgg gtg gtg tct gtg ctg aca gtg ctg Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 145 150 155 160	480
cat cag gac tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 165 170 175	528
aag gcc ctg cct gcc ccc atc gag aaa acc atc agc aag gcc aag ggc Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 180 185 190	576
cag ccc cgc gaa ccc cag gtg tac aca ctg ccc cct agc cgg gaa gag Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu 195 200 205	624
atg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg aaa ggc ttc tac Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 210 215 220	672
ccc agc gac att gcc gtg gaa tgg gag agc aac ggc cag ccc gag aac Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn 225 230 235 240	720

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
130 135 140

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
165 170 175

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
180 185 190

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
195 200 205

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
225 230 235 240

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
245 250 255

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
260 265 270

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290 295

<210> 51
<211> 897
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(897)

<400> 51

gat gac gac ggc cct cag ttc ggc ctg ttc agc aag tac aga acc cct 48
 Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15

aac tgc atg cag cat gct cgt cag ggt tgt cat tac gac tac gac cct 96
 Asn Cys Met Gln His Ala Arg Gln Gly Cys His Tyr Asp Tyr Asp Pro
 20 25 30

gtg tgc ggc agc gac atg agc acc tac gcc aat gag tgc acc ctg tgc 144
 Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

atg aag atc aga gaa ggc ggc cac aac atc aag atc atc cgg aat ggc 192
 Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

ccc tgc gaa ccc aag agc tgc gac aag acc cac acc tgt ccc cct tgt 240
 Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 65 70 75 80

cct gcc ccc gaa ctg ctg gga gga cct agc gtg ttc ctg ttc ccc cca 288
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 85 90 95

aag ccc aag gac acc ctg atg atc agc cgg acc ccc gaa gtg acc tgc 336
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 100 105 110

gtg gtg gtg gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg aag ttc aat tgg 384
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 115 120 125

tac gtg gac ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc aag cct aga gag 432
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 130 135 140

gaa cag tac aac tcc acc tac cgg gtg gtg tct gtg ctg aca gtg ctg 480
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 145 150 155 160

cat cag gac tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac 528
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 165 170 175

aag gcc ctg cct gcc ccc atc gag aaa acc atc agc aag gcc aag ggc 576
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 180 185 190

cag ccc cgc gaa ccc cag gtg tac aca ctg ccc cct agc cgg gaa gag 624
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 195 200 205

atg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg aaa ggc ttc tac 672
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 210 215 220
 ccc agc gac att gcc gtg gaa tgg gag agc aac ggc cag ccc gag aac 720
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 225 230 235 240
 aac tac aag acc acc ccc cct gtg ctg gac agc gac ggc tca ttc ttc 768
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 245 250 255
 ctg tac agc aag ctg acc gtg gac aag agc cgg tgg cag cag ggc aac 816
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 260 265 270
 gtg ttc agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc 864
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 275 280 285
 cag aag tcc ctg agc ctg agc ccc ggc aaa tga 897
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

<210> 52
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 52

Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15

Asn Cys Met Gln His Ala Arg Gln Gly Cys His Tyr Asp Tyr Asp Pro
 20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 65 70 75 80

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 85 90 95

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 100 105 110

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 115 120 125

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 130 135 140

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 165 170 175

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 180 185 190

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 195 200 205

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 225 230 235 240

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 245 250 255

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 260 265 270

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

<210> 53
 <211> 897

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> chất liên kết

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(897)

<400> 53
 gat gac gac ggc cct cag ttc ggc ctg ttc agc aag tac aga acc cct 48
 Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15
 aac tgc ggt gaa tac aaa ggt cgt ggt tgt tac tac cat tac gac cct 96
 Asn Cys Gly Glu Tyr Lys Gly Arg Gly Cys Tyr Tyr His Tyr Asp Pro
 20 25 30
 gtg tgc ggc agc gac atg agc acc tac gcc aat gag tgc acc ctg tgc 144
 Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45
 atg aag atc aga gaa ggc ggc cac aac atc aag atc atc cgg aat ggc 192
 Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60
 ccc tgc gaa ccc aag agc tgc gac aag acc cac acc tgt ccc cct tgt 240
 Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 65 70 75 80
 cct gcc ccc gaa ctg ctg gga gga cct agc gtg ttc ctg ttc ccc cca 288
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 85 90 95
 aag ccc aag gac acc ctg atg atc agc cgg acc ccc gaa gtg acc tgc 336
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 100 105 110
 gtg gtg gtg gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg aag ttc aat tgg 384
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 115 120 125
 tac gtg gac ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc aag cct aga gag 432
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 130 135 140
 gaa cag tac aac tcc acc tac cgg gtg gtg tct gtg ctg aca gtg ctg 480
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 145 150 155 160
 cat cag gac tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac 528
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 165 170 175

aag gcc ctg cct gcc ccc atc gag aaa acc atc agc aag gcc aag ggc 576
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 180 185 190
 cag ccc cgc gaa ccc cag gtg tac aca ctg ccc cct agc cgg gaa gag 624
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 195 200 205
 atg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg aaa ggc ttc tac 672
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 210 215 220
 ccc agc gac att gcc gtg gaa tgg gag agc aac ggc cag ccc gag aac 720
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 225 230 235 240
 aac tac aag acc acc ccc cct gtg ctg gac agc gac ggc tca ttc ttc 768
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 245 250 255
 ctg tac agc aag ctg acc gtg gac aag agc cgg tgg cag cag ggc aac 816
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 260 265 270
 gtg ttc agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc 864
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 275 280 285
 cag aag tcc ctg agc ctg agc ccc ggc aaa tga 897
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

<210> 54
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 54

Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15

Asn Cys Gly Glu Tyr Lys Gly Arg Gly Cys Tyr Tyr His Tyr Asp Pro
 20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
65 70 75 80

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
85 90 95

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
100 105 110

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
115 120 125

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
130 135 140

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
165 170 175

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
180 185 190

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
195 200 205

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
225 230 235 240

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
245 250 255

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
260 265 270

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290 295

<210> 55
<211> 897
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(897)

<400> 55
gat gac gac ggc cct cag ttc ggc ctg ttc agc aag tac aga acc cct 48
Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
1 5 10 15

aac tgc ggt act atg cag ggt tct ggt tgt act tac cat tac gaa cct 96
Asn Cys Gly Thr Met Gln Gly Ser Gly Cys Thr Tyr His Tyr Glu Pro
20 25 30

gtg tgc ggc agc gac atg agc acc tac gcc aat gag tgc acc ctg tgc 144
Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
35 40 45

atg aag atc aga gaa ggc ggc cac aac atc aag atc atc cgg aat ggc 192
Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
50 55 60

ccc tgc gaa ccc aag agc tgc gac aag acc cac acc tgt ccc cct tgt 240
Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
65 70 75 80

cct gcc ccc gaa ctg ctg gga gga cct agc gtg ttc ctg ttc ccc cca 288
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
85 90 95

aag ccc aag gac acc ctg atg atc agc cgg acc ccc gaa gtg acc tgc 336
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
100 105 110

gtg gtg gtg gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg aag ttc aat tgg 384
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
115 120 125

tac gtg gac ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc aag cct aga gag 432
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
130 135 140

gaa cag tac aac tcc acc tac cgg gtg gtg tct gtg ctg aca gtg ctg 480
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 145 150 155 160
 cat cag gac tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac 528
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 165 170 175
 aag gcc ctg cct gcc ccc atc gag aaa acc atc agc aag gcc aag ggc 576
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 180 185 190
 cag ccc cgc gaa ccc cag gtg tac aca ctg ccc cct agc cgg gaa gag 624
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 195 200 205
 atg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg aaa ggc ttc tac 672
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 210 215 220
 ccc agc gac att gcc gtg gaa tgg gag agc aac ggc cag ccc gag aac 720
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 225 230 235 240
 aac tac aag acc acc ccc cct gtg ctg gac agc gac ggc tca ttc ttc 768
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 245 250 255
 ctg tac agc aag ctg acc gtg gac aag agc cgg tgg cag cag ggc aac 816
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 260 265 270
 gtg ttc agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc 864
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 275 280 285
 cag aag tcc ctg agc ctg agc ccc ggc aaa tga 897
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

<210> 56

<211> 298

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 56

Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15

Asn Cys Gly Thr Met Gln Gly Ser Gly Cys Thr Tyr His Tyr Glu Pro
 20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 65 70 75 80

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 85 90 95

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 100 105 110

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 115 120 125

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 130 135 140

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 165 170 175

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 180 185 190

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 195 200 205

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 225 230 235 240

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 245 250 255

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
260 265 270

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290 295

<210> 57
<211> 897
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(897)

<400> 57
gat gac gac ggc cct cag ttc ggc ctg ttc agc aag tac aga acc cct 48
Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
1 5 10 15
aac tgc ggc cag gtt gtt gaa act tac tgt aac cgt gac tac gac cct 96
Asn Cys Gly Gln Val Val Glu Thr Tyr Cys Asn Arg Asp Tyr Asp Pro
20 25 30
gtg tgc ggc agc gac atg agc acc tac gcc aat gag tgc acc ctg tgc 144
Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
35 40 45
atg aag atc aga gaa ggc ggc cac aac atc aag atc atc cgg aat ggc 192
Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
50 55 60
ccc tgc gaa ccc aag agc tgc gac aag acc cac acc tgt ccc cct tgt 240
Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
65 70 75 80
cct gcc ccc gaa ctg ctg gga gga cct agc gtg ttc ctg ttc ccc cca 288
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
85 90 95
aag ccc aag gac acc ctg atg atc agc cgg acc ccc gaa gtg acc tgc 336
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
100 105 110

gtg gtg gtg gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg aag ttc aat tgg Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp 115 120 125	384
tac gtg gac ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc aag cct aga gag Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 130 135 140	432
gaa cag tac aac tcc acc tac cgg gtg gtg tct gtg ctg aca gtg ctg Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 145 150 155 160	480
cat cag gac tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 165 170 175	528
aag gcc ctg cct gcc ccc atc gag aaa acc atc agc aag gcc aag ggc Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 180 185 190	576
cag ccc cgc gaa ccc cag gtg tac aca ctg ccc cct agc cgg gaa gag Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu 195 200 205	624
atg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg aaa ggc ttc tac Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 210 215 220	672
ccc agc gac att gcc gtg gaa tgg gag agc aac ggc cag ccc gag aac Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn 225 230 235 240	720
aac tac aag acc acc ccc cct gtg ctg gac agc gac ggc tca ttc ttc Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe 245 250 255	768
ctg tac agc aag ctg acc gtg gac aag agc cgg tgg cag cag ggc aac Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn 260 265 270	816
gtg ttc agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 275 280 285	864
cag aag tcc ctg agc ctg agc ccc ggc aaa tga Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 290 295	897

<210> 58
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 58

Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15

Asn Cys Gly Gln Val Val Glu Thr Tyr Cys Asn Arg Asp Tyr Asp Pro
 20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 65 70 75 80

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 85 90 95

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 100 105 110

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 115 120 125

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 130 135 140

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 165 170 175

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 180 185 190

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 195 200 205

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
225 230 235 240

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
245 250 255

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
260 265 270

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290 295

<210> 59
<211> 897
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> chất liên kết

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(897)

<400> 59
gat gac gac ggc cct cag ttc ggc ctg ttc agc aag tac aga acc cct 48
Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
1 5 10 15

aac tgc tac gac act act act cat tac tgt tct cgt gaa tac gac cct 96
Asn Cys Tyr Asp Thr Thr Thr His Tyr Cys Ser Arg Glu Tyr Asp Pro
20 25 30

gtg tgc ggc agc gac atg agc acc tac gcc aat gag tgc acc ctg tgc 144
Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
35 40 45

atg aag atc aga gaa ggc ggc cac aac atc aag atc atc cgg aat ggc 192
Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
50 55 60

ccc tgc gaa ccc aag agc tgc gac aag acc cac acc tgt ccc cct tgt 240
Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
65 70 75 80

cct gcc ccc gaa ctg ctg gga gga cct agc gtg ttc ctg ttc ccc cca	288
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	
85 90 95	
aag ccc aag gac acc ctg atg atc agc cgg acc ccc gaa gtg acc tgc	336
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	
100 105 110	
gtg gtg gtg gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg aag ttc aat tgg	384
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	
115 120 125	
tac gtg gac ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc aag cct aga gag	432
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
130 135 140	
gaa cag tac aac tcc acc tac cgg gtg gtg tct gtg ctg aca gtg ctg	480
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	
145 150 155 160	
cat cag gac tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac	528
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	
165 170 175	
aag gcc ctg cct gcc ccc atc gag aaa acc atc agc aag gcc aag ggc	576
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
180 185 190	
cag ccc cgc gaa ccc cag gtg tac aca ctg ccc cct agc cgg gaa gag	624
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu	
195 200 205	
atg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg aaa ggc ttc tac	672
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	
210 215 220	
ccc agc gac att gcc gtg gaa tgg gag agc aac ggc cag ccc gag aac	720
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	
225 230 235 240	
aac tac aag acc acc ccc cct gtg ctg gac agc gac ggc tca ttc ttc	768
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
245 250 255	
ctg tac agc aag ctg acc gtg gac aag agc cgg tgg cag cag ggc aac	816
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	
260 265 270	
gtg ttc agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc	864
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	
275 280 285	
cag aag tcc ctg agc ctg agc ccc ggc aaa tga	897
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
290 295	

<210> 60
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 60

Asp Asp Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro
 1 5 10 15

Asn Cys Tyr Asp Thr Thr Thr His Tyr Cys Ser Arg Glu Tyr Asp Pro
 20 25 30

Val Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys
 35 40 45

Met Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly
 50 55 60

Pro Cys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 65 70 75 80

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 85 90 95

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 100 105 110

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 115 120 125

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 130 135 140

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 145 150 155 160

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 165 170 175

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 180 185 190

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
195 200 205

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
210 215 220

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
225 230 235 240

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
245 250 255

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
260 265 270

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
275 280 285

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
290 295

<210> 61
<211> 63
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> công thức

<220>
<221> VÙNG
<222> (16)..(22)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<220>
<221> VÙNG
<222> (24)..(28)
<223> Xaa là axit amin bất kỳ

<400> 61

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
 35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys
 50 55 60

<210> 62
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi

<400> 62
 aaaaggatcc ctggacaaac gtggcccgca gtttggctctg ttttag 45

<210> 63
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 63
 aaaactcgag ttagccgccg cacggaccat tgcgaataa 39

<210> 64
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 64
 ggcgattata aagatgacga tgataaacac catcaccacc atc 43

<210> 65
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 65
 gtttaaactc aatgatggtg gtgatggtgt ttatcatcgt cat 43

<210> 66
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 66
aaaatctaga gccgccacca tggccacagc tagaccccct 40

<210> 67
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 67
cgtcaccttt ataatcgccg ctgttggcct ggatggtttc ctg 43

<210> 68
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 68
aaaatctaga gccgccacca tggccagatc tctgctgctg ccc 43

<210> 69
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi

<400> 69
cgtcaccttt ataatcgccc cgggtgtttct tcatggtgtc gtt 43

<210> 70
<211> 43
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 70

aaaatctaga gccgccacca tggtcctcct cctcaccgcc ctc

43

<210> 71

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 71

cgatcatcttt ataatcgccc ttgtcgcgca tggctcctc gat

43

<210> 72

<211> 34

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 72

aaaagttaa actcaatgat ggtggtgatg gtgt

34

<210> 73

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 73

aaaatctaga gccgccacca tgggagtgtg gctgctgagc ctg

43

<210> 74

<211> 58

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 74

aaaagttaa actcaatgat ggtggtgatg gtgccggtgg gtcttcatgg tttccatg

58

<210> 75

<211> 43

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 75
 aaaatctaga gccgccacca tgtttctgct gctgatcatc ctg 43

<210> 76
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 76
 aaaagttaa actcaatgat ggtggtgatg gtggttgctc tgcattgtcc gctgaa 56

<210> 77
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cơ chất

<220>
 <221> PEPTIT
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa là Nva

<400> 77

Arg Pro Lys Pro Val Glu Xaa Trp Arg Lys
 1 5 10

<210> 78
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cơ chất

<400> 78

Leu Leu Val Tyr
 1

<210> 79
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cơ chất

<400> 79

Ala Ala Pro Val
 1

<210> 80
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cơ chất

<400> 80

Leu Ser Thr Arg
 1

<210> 81
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 81
 agatgggtgt tgtctgatga cgacggccct cagttcggcc tgttc

45

<210> 82
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi

<400> 82
 gcaggggcca ttccggat

18

<210> 83
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 83

aaaatctaga gccgccacca tgaagcacct gtggttcttt ctgctgct

48

<210> 84

<211> 44

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 84

agacaacacc catctaggag cggccaccag cagcagaaaag aacc

44

<210> 85

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 85

atccggaatg gccctgcga acccaagagc tgcgac

36

<210> 86

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 86

aaaagtttaa actcatttgc cggggctcag

30

<210> 87

<211> 232

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 87

Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
1				5					10				15		

Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
			20					25					30		

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

<210> 88

<211> 62

<212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 88

Glu Ala Ala Lys Glu Ile Cys Ser Glu Phe Arg Asp Gln Val Arg Asn
 1 5 10 15

Gly Thr Leu Ile Cys Thr Arg Glu His Asn Pro Val Arg Gly Pro Asp
 20 25 30

Gly Lys Met His Gly Asn Lys Cys Ala Met Cys Ala Ser Val Phe Lys
 35 40 45

Leu Glu Glu Glu Glu Lys Lys Asn Asp Lys Glu Glu Lys Gly
 50 55 60

<210> 89
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 89

Glu Ala Val Gln Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg His Tyr Val Arg Asn
 1 5 10 15

Gly Arg Leu Pro Cys Thr Arg Glu Asn Asp Pro Ile Glu Gly Leu Asp
 20 25 30

Gly Lys Ile His Gly Asn Thr Cys Ser Met Cys Glu Ala Phe Phe Gln
 35 40 45

Gln Glu Ala Lys Glu Lys Glu Arg Ala Glu Pro Arg Ala Lys
 50 55 60

<210> 90
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 90

Ile Glu Cys Ala Lys Gln Thr Lys Gln Met Val Asp Cys Ser His Tyr
 1 5 10 15

Lys Lys Leu Pro Pro Gly Gln Gln Arg Phe Cys His His Met Tyr Asp
 20 25 30

Pro Ile Cys Gly Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Lys Asn Asp Cys Phe Phe
 35 40 45

Cys Ser Lys Val Lys Lys Thr Asp Gly Thr Leu Lys Phe Val His Phe
 50 55 60

Gly Lys Cys
 65

<210> 91
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 91

Arg Ile Val Asn Gly Ser Asp Cys Gln Lys Asp Ala Gln Pro Trp Gln
 1 5 10 15

Gly Ala Leu Leu Leu Gly Pro Asn Lys Leu Tyr Cys Gly Ala Val Leu
 20 25 30

Ile Ser Pro Gln Trp Leu Leu Thr Ala Ala His Cys Arg Lys Pro Val
 35 40 45

Phe Arg Ile Arg Leu Gly His His Ser Met Ser Pro Val Tyr Glu Ser
 50 55 60

Gly Gln Gln Met Phe Gln Gly Ile Lys Ser Ile Pro His Pro Gly Tyr
 65 70 75 80

Ser His Pro Gly His Ser Asn Asp Leu Met Leu Ile Lys Met Asn Arg
 85 90 95

Lys Ile Arg Asp Ser His Ser Val Lys Pro Val Glu Ile Ala Cys Asp
 100 105 110

Cys Ala Thr Glu Gly Thr Arg Cys Met Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr
 115 120 125

Ser Ser Ser His Asn Asn Phe Pro Lys Val Leu Gln Cys Leu Asn Ile
 130 135 140

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

Asp Lys Thr Met Phe Cys Ala Gly Asp Glu Glu Gly Arg Asp Ser Cys
165 170 175

Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn Gly Lys Leu Gln Gly
180 185 190

Leu Val Ser Trp Gly Asp Phe Pro Cys Ala Gln Arg Asn Arg Pro Gly
195 200 205

Val Tyr Thr Asn Leu Cys Glu Phe Val Lys Trp Ile Lys Asp Thr Met
210 215 220

Asn Ser Asn
225

<210> 92
<211> 225
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 92

Arg Ile Ile Asp Gly Tyr Lys Cys Lys Glu Gly Ser His Pro Trp Gln
1 5 10 15

Val Ala Leu Leu Lys Gly Asn Gln Leu His Cys Gly Gly Val Leu Val
20 25 30

Asp Lys Tyr Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys Met Gly Gln Tyr
35 40 45

Gln Val Gln Leu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Asp Gln Ser Ala Gln Lys
50 55 60

Ile Lys Ala Thr Lys Ser Phe Arg His Pro Gly Tyr Ser Thr Lys Thr
65 70 75 80

His Val Asn Asp Ile Met Leu Val Arg Leu Asp Glu Pro Val Lys Met
85 90 95

Ser Ser Lys Val Glu Ala Val Gln Leu Pro Glu His Cys Glu Pro Pro
 100 105 110

Gly Thr Ser Cys Thr Val Ser Gly Trp Gly Thr Thr Thr Ser Pro Asp
 115 120 125

Val Thr Phe Pro Ser Asp Leu Met Cys Ser Asp Val Lys Leu Ile Ser
 130 135 140

Ser Arg Glu Cys Lys Lys Val Tyr Lys Asp Leu Leu Gly Lys Thr Met
 145 150 155 160

Leu Cys Ala Gly Ile Pro Asp Ser Lys Thr Asn Thr Cys Asn Gly Asp
 165 170 175

Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Asp Thr Leu Gln Gly Leu Val Ser
 180 185 190

Trp Gly Thr Tyr Pro Cys Gly Gln Pro Asn Asp Pro Gly Val Tyr Thr
 195 200 205

Gln Val Cys Lys Tyr Lys Arg Trp Val Met Glu Thr Met Lys Thr His
 210 215 220

Arg
 225

<210> 93
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 93

Ile Ile Gly Gly Tyr Arg Cys Val Arg Asn Ser Gln Pro Trp Gln Val
 1 5 10 15

Ala Leu Gln Ala Gly Pro Gly His Arg Phe Leu Cys Gly Gly Val Leu
 20 25 30

Leu Ser Asp Gln Trp Val Ile Thr Ala Ala His Cys Ala Arg Pro Ile
 35 40 45

Leu His Val Ala Leu Gly Lys His Asn Ile Arg Arg Trp Glu Ala Thr
 50 55 60

Gln Gln Val Val Arg Val Ala Arg Gln Val Pro His Pro Gln Tyr Gln
65 70 75 80

Pro Gln Ala His Asp Asn Asp Leu Met Leu Leu Lys Leu Gln Lys Lys
85 90 95

Val Arg Leu Gly Arg Ala Val Lys Thr Ile Ser Val Ala Ser Ser Cys
100 105 110

Ala Ser Pro Gly Thr Pro Cys Arg Val Ser Gly Trp Gly Thr Ile Ala
115 120 125

Ser Pro Ile Ala Arg Tyr Pro Thr Ala Leu Gln Cys Val Asn Val Asn
130 135 140

Ile Met Ser Glu Gln Ala Cys His Arg Ala Tyr Pro Gly Ile Ile Thr
145 150 155 160

Ser Gly Met Val Cys Ala Gly Val Pro Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys
165 170 175

Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Gly Gly Gln Leu Gln Gly
180 185 190

Leu Val Ser Trp Gly Met Glu Arg Cys Ala Met Pro Gly Tyr Pro Gly
195 200 205

Val Tyr Ala Asn Leu Cys Asn Tyr His Ser Trp Ile Gln Arg Thr Met
210 215 220

Gln Ser Asn
225

<210> 94
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mồi

<400> 94
agatgggtgt tgtctgacgg ccctcagttc ggcctgttc

<210> 95
 <211> 891
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dung hợp

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(891)

<400> 95
 gac ggc cct cag ttc ggc ctg ttc agc aag tac aga acc cct aac tgc 48
 Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys
 1 5 10 15
 gct aac act atg aaa cag gac tgt act cgt gaa tac gac cct gtg tgc 96
 Ala Asn Thr Met Lys Gln Asp Cys Thr Arg Glu Tyr Asp Pro Val Cys
 20 25 30
 ggc agc gac atg agc acc tac gcc aat gag tgc acc ctg tgc atg aag 144
 Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys
 35 40 45
 atc aga gaa ggc ggc cac aac atc aag atc atc cgg aat ggc ccc tgc 192
 Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys
 50 55 60
 gaa ccc aag agc tgc gac aag acc cac acc tgt ccc cct tgt cct gcc 240
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 65 70 75 80
 ccc gaa ctg ctg gga gga cct agc gtg ttc ctg ttc ccc cca aag ccc 288
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 85 90 95
 aag gac acc ctg atg atc agc cgg acc ccc gaa gtg acc tgc gtg gtg 336
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 100 105 110
 gtg gat gtg tcc cac gag gac cct gaa gtg aag ttc aat tgg tac gtg 384
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 115 120 125
 gac ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc aag cct aga gag gaa cag 432
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 130 135 140
 tac aac tcc acc tac cgg gtg gtg tct gtg ctg aca gtg ctg cat cag 480
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 145 150 155 160

gac tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc aac aag gcc 528
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 165 170 175

ctg cct gcc ccc atc gag aaa acc atc agc aag gcc aag ggc cag ccc 576
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 180 185 190

cgc gaa ccc cag gtg tac aca ctg ccc cct agc cgg gaa gag atg acc 624
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 195 200 205

aag aac cag gtg tcc ctg acc tgt ctc gtg aaa ggc ttc tac ccc agc 672
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 210 215 220

gac att gcc gtg gaa tgg gag agc aac ggc cag ccc gag aac aac tac 720
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 225 230 235 240

aag acc acc ccc cct gtg ctg gac agc gac ggc tca ttc ttc ctg tac 768
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 245 250 255

agc aag ctg acc gtg gac aag agc cgg tgg cag cag ggc aac gtg ttc 816
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 260 265 270

agc tgc agc gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac acc cag aag 864
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 275 280 285

tcc ctg agc ctg agc ccc ggc aaa tga 891
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

<210> 96

<211> 296

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 96

Asp Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys
 1 5 10 15

Ala Asn Thr Met Lys Gln Asp Cys Thr Arg Glu Tyr Asp Pro Val Cys
 20 25 30

Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys
 35 40 45

Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys
50 55 60

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
65 70 75 80

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
85 90 95

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
100 105 110

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
115 120 125

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
130 135 140

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
145 150 155 160

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
165 170 175

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
180 185 190

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
195 200 205

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
210 215 220

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
225 230 235 240

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
245 250 255

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
260 265 270

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 275 280 285

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295

<210> 97

<211> 62

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 97

Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ser Gln
 1 5 10 15

Tyr Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg His Phe Asn Pro Val Cys Gly Ser
 20 25 30

Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile Arg
 35 40 45

Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys
 50 55 60

hCLK5	1	IIINGSDCDMHTQPMQAALLLRPNQ-LYCGAVLVHPQMLLTAACHCRKKVFRVRLGHSYLS	59
hCLK7	1	IIDGAPCARGSHPMQVALL-SGNQ-LHCGGVLVNERMVLTAACHKMNEYTVHLGSDTLG-	57
hCLK14	1	IIIGGHTCTRSSQPMQAALLAGPRRRFLCGGALLSGQMVITAAHCGRPILQVALGKHNLR-	59
hCLK5	60	VYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGTSNDLMLIKLNNRRIRPTKDVRPINVSSHCP	119
hCLK7	58	--DRRAQRIKASKSFRHPGYSTQTHVNDLMLVKLNSQARLSSMVKKVRLPSRCEPPGTT	115
hCLK14	60	RWEATQQVLRVVRQVTHPNNYNSRTHDNDLMLLQLQQPARIGRAVRPIEVTQACASPGTSC	119
hCLK5	120	LVSGWGTTKSPQVHFPKVLQCLNISVLSQKRCEDAVPRQIDDTMFCAGDKAGR-DSCQGD	178
hCLK7	116	TVSGWGTTTSPDVTFPSDLMCVDVKLISPQDCTKVYKDLENSMLCAGIPDSKKNACNGD	175
hCLK14	120	RVSGWGTTISSPIARYPASLQCVNINISPDDEVCCQKAVPRTITPGMVCAGVPQGGKDS	179
hCLK5	179	SGGPVVCNGSLQGLVSMGDPYPCARNRPGVVTNLCKFTKWIQETIQANS	227
hCLK7	176	SGGPLVCRGTLQGLVSMGTFPCGQPNDPGVYTQVCKFTKWIINDTMKKHR	224
hCLK14	180	SGGPLVCRGQLQGLVSMGMERCALPGYPGVYTNLCKYRSWIIEETMRDK-	227

Fig. 1

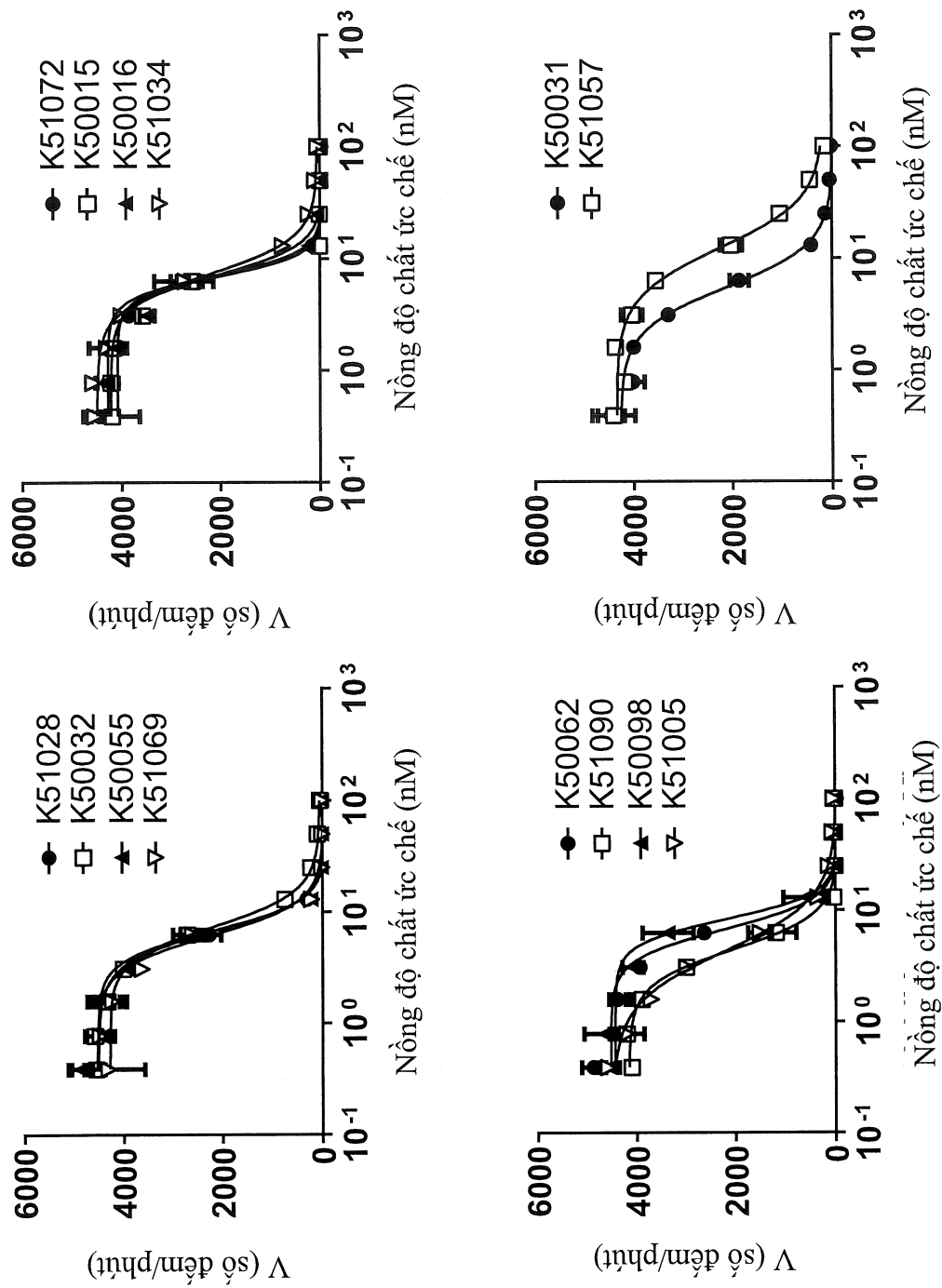


Fig. 2

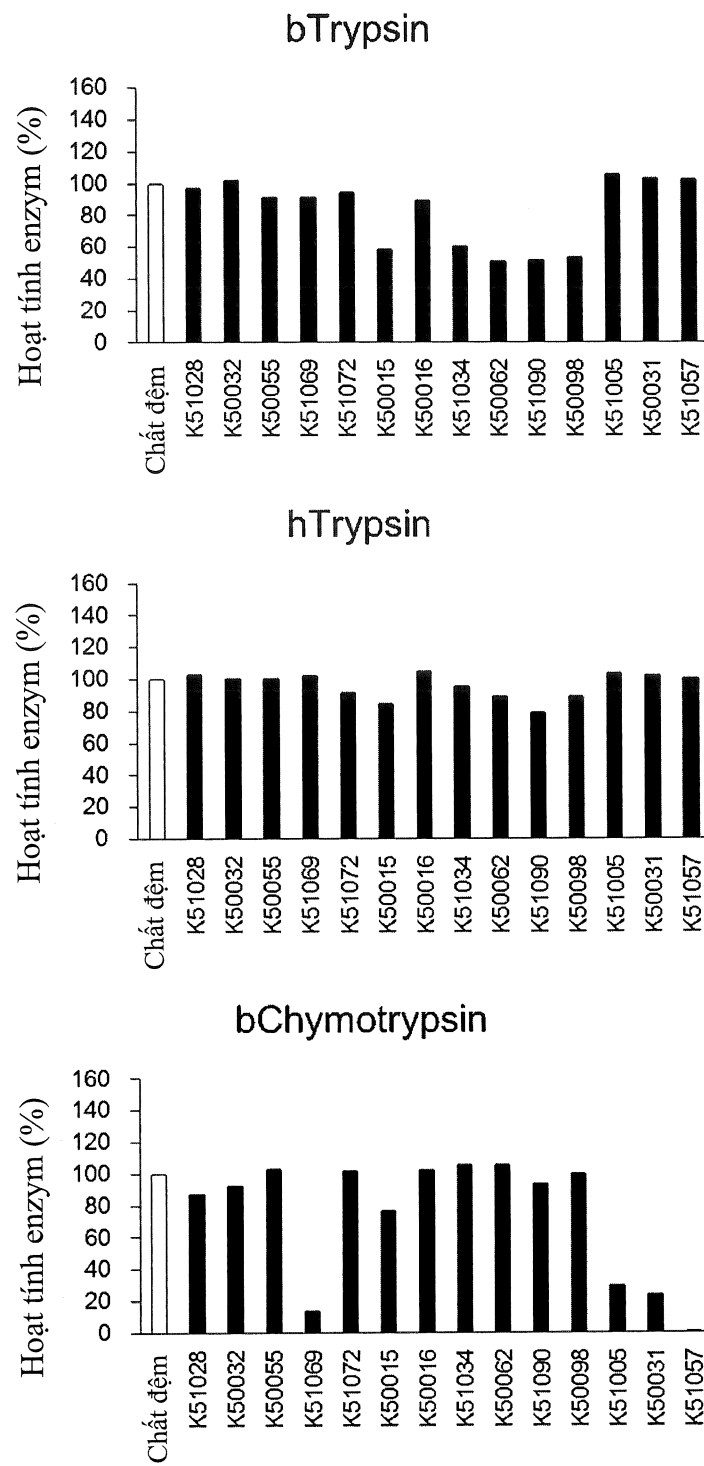


Fig. 3 (A)

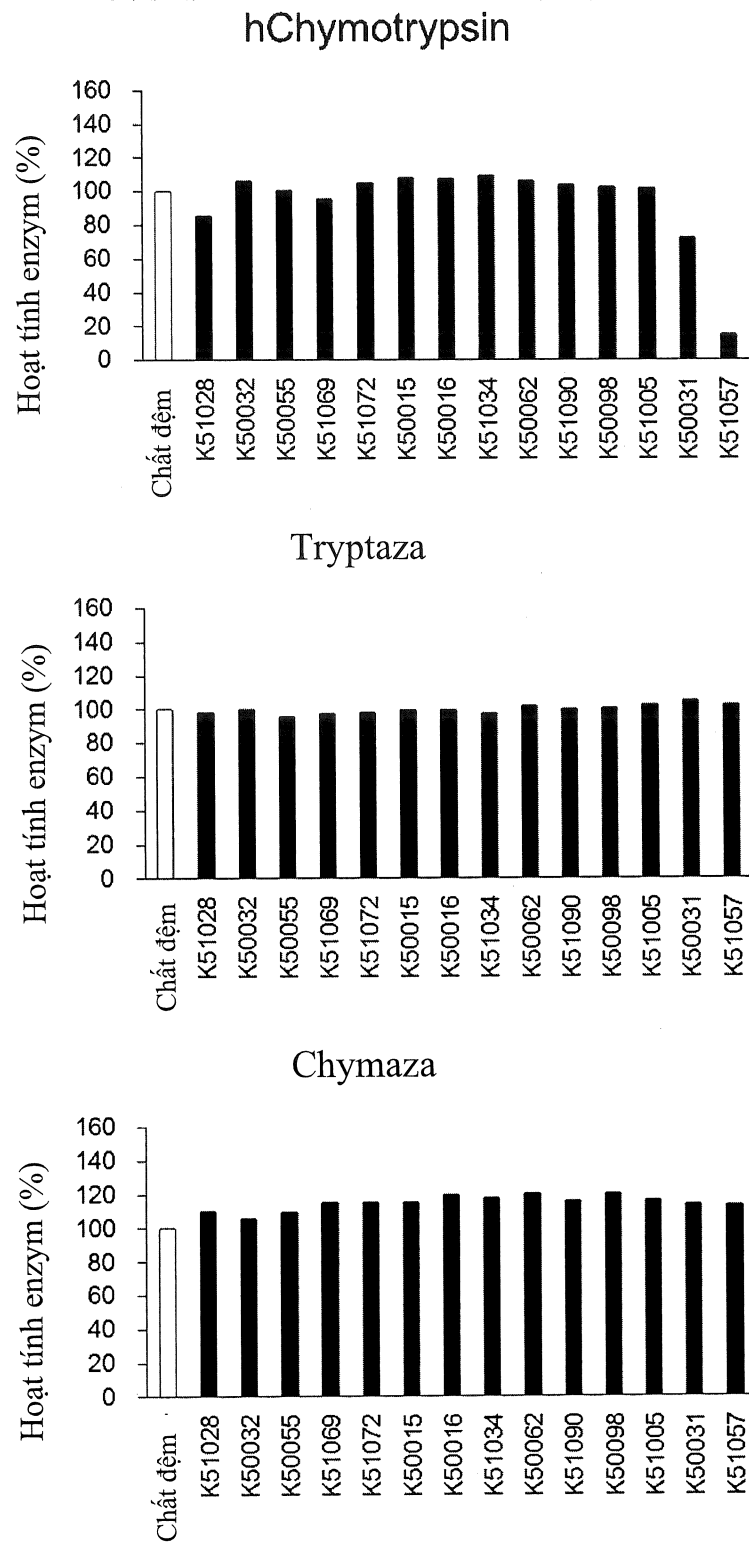


Fig. 3 (B)

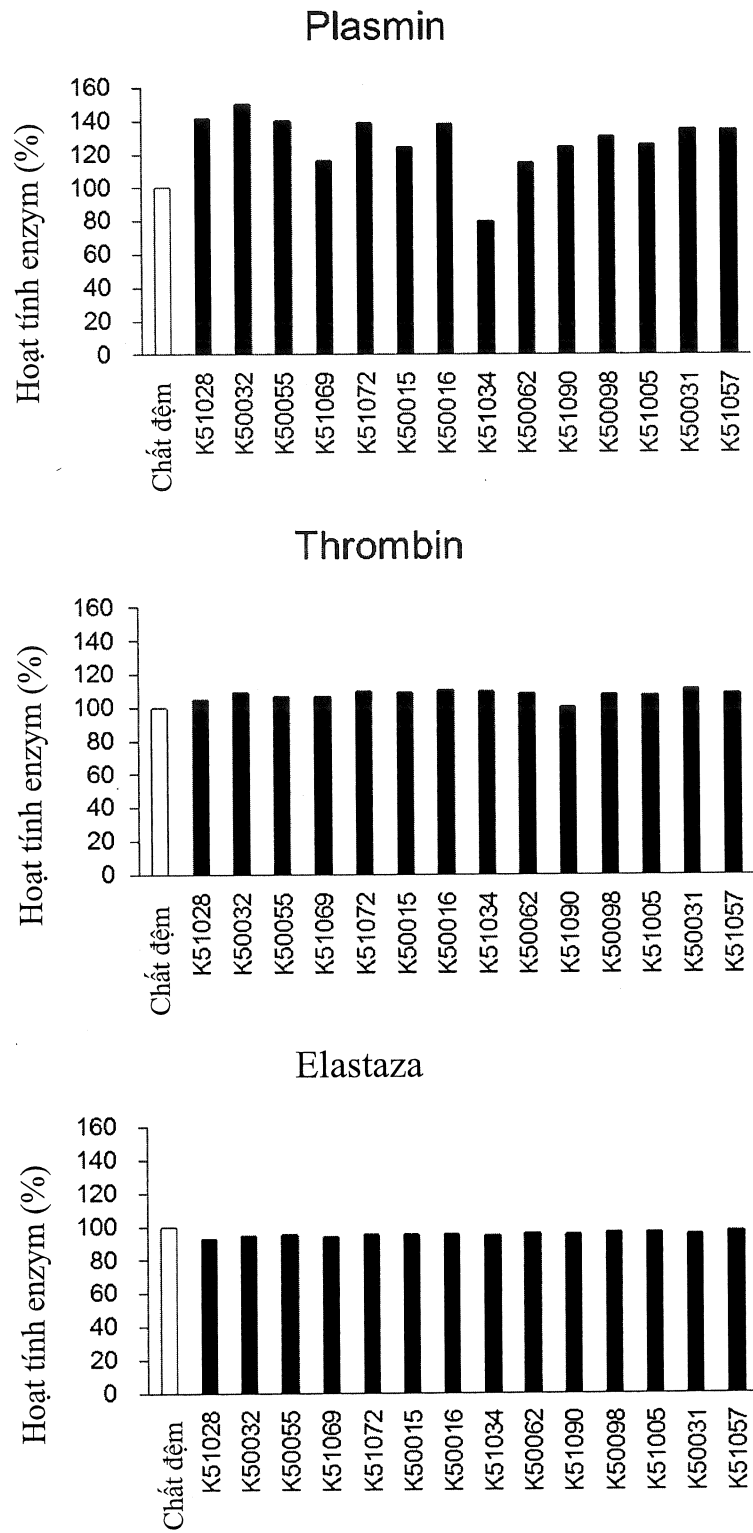


Fig. 3 (C)

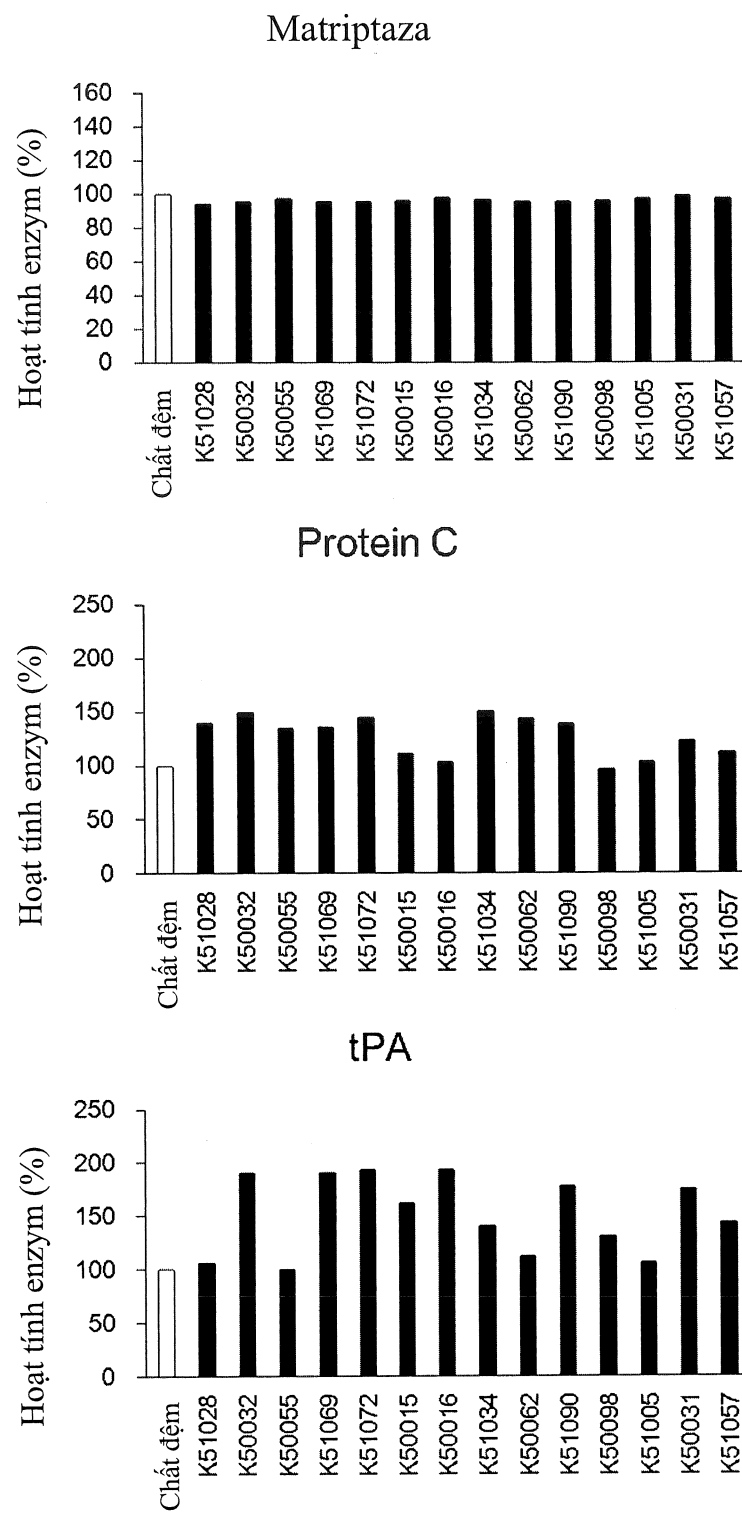


Fig. 3 (D)

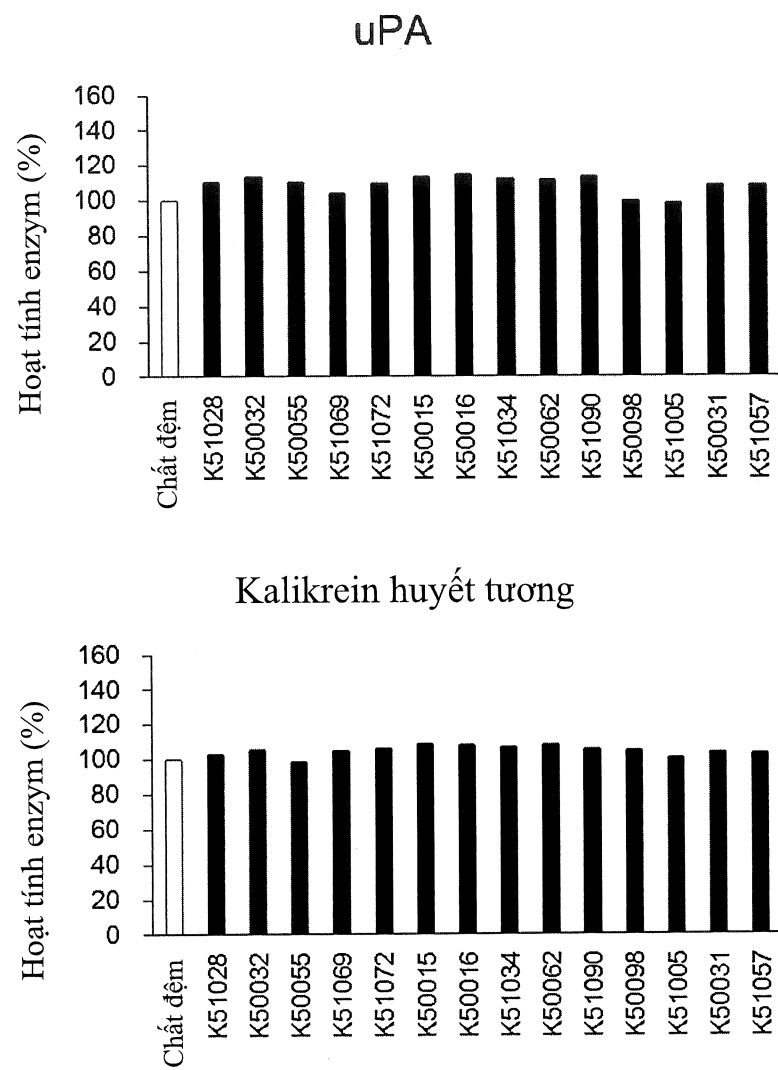


Fig. 3 (E)

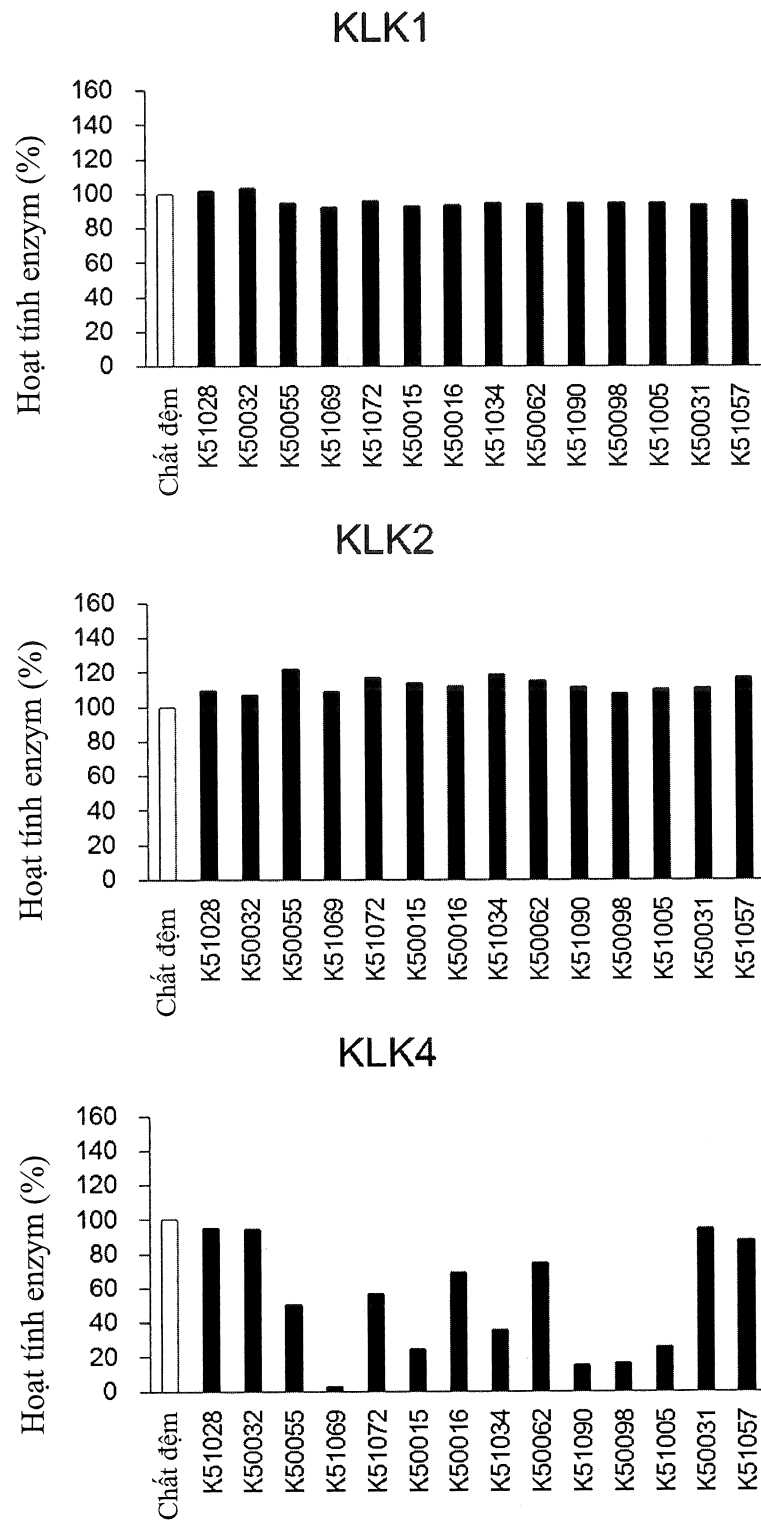


Fig. 3 (F)

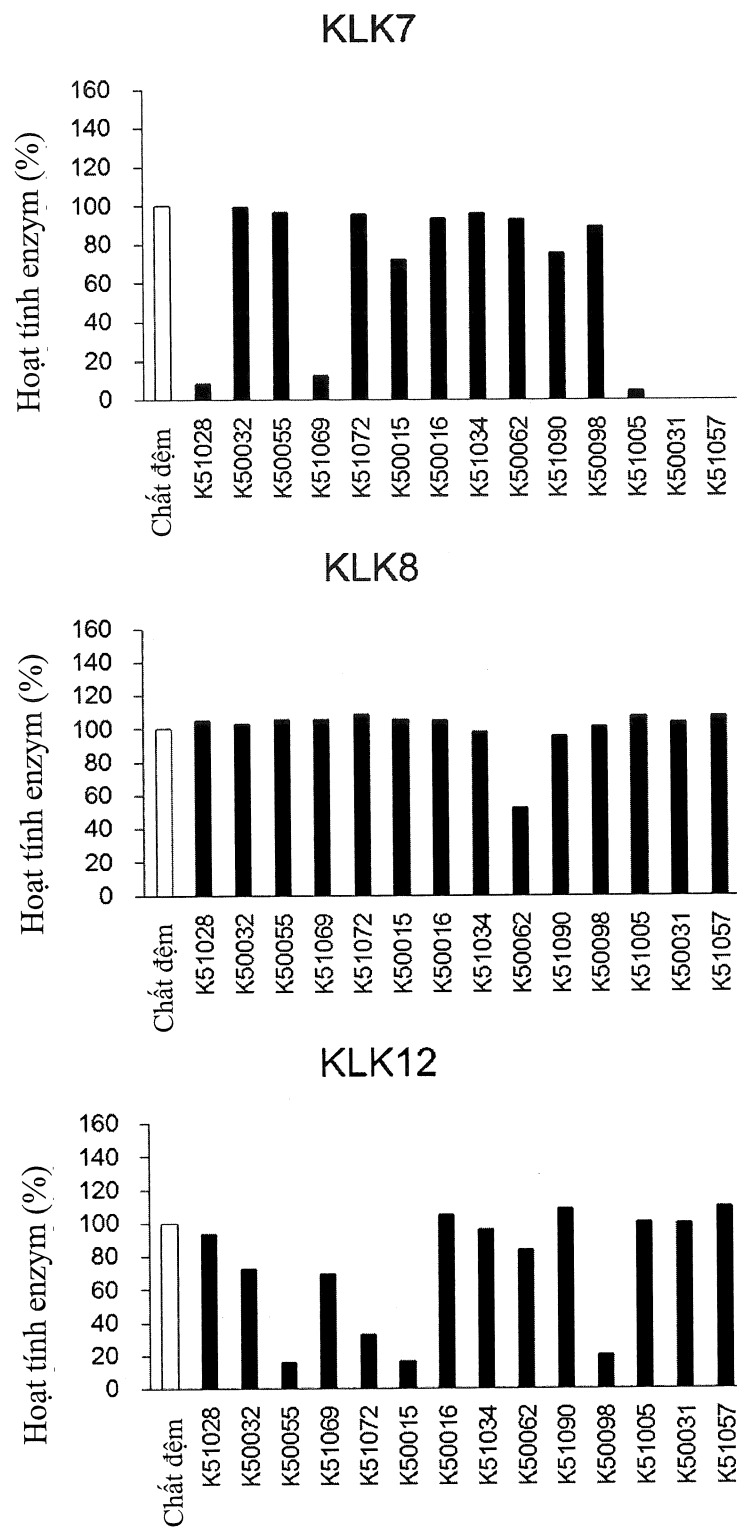


Fig. 3 (G)

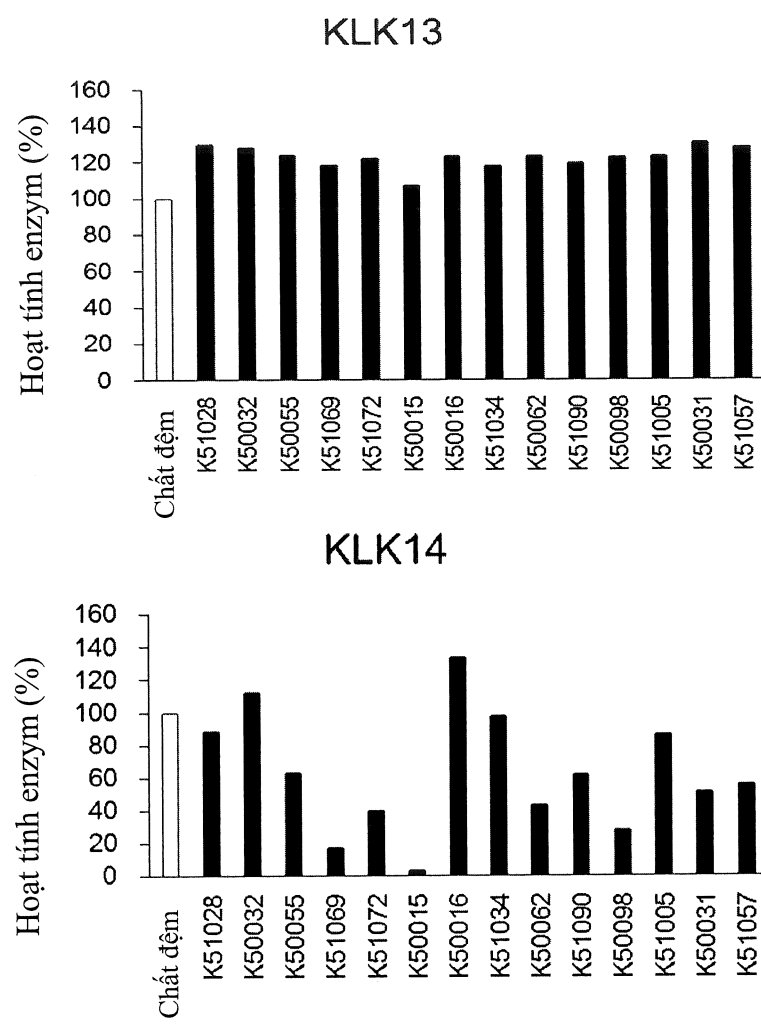


Fig. 3 (H)

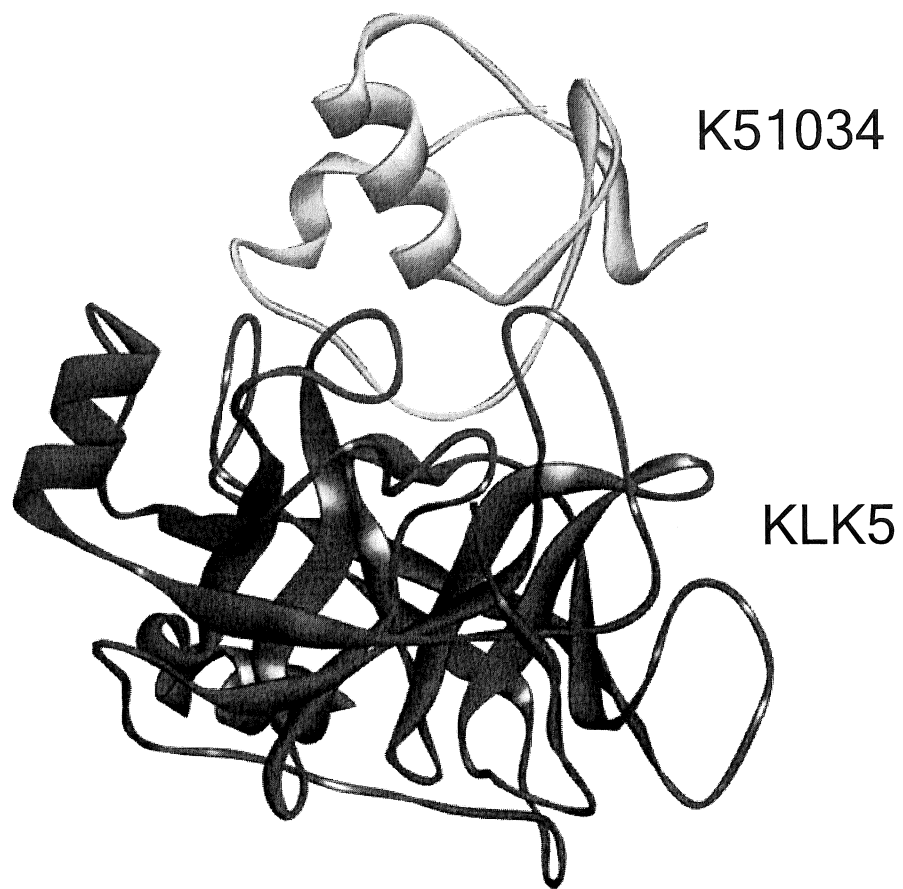


Fig. 4

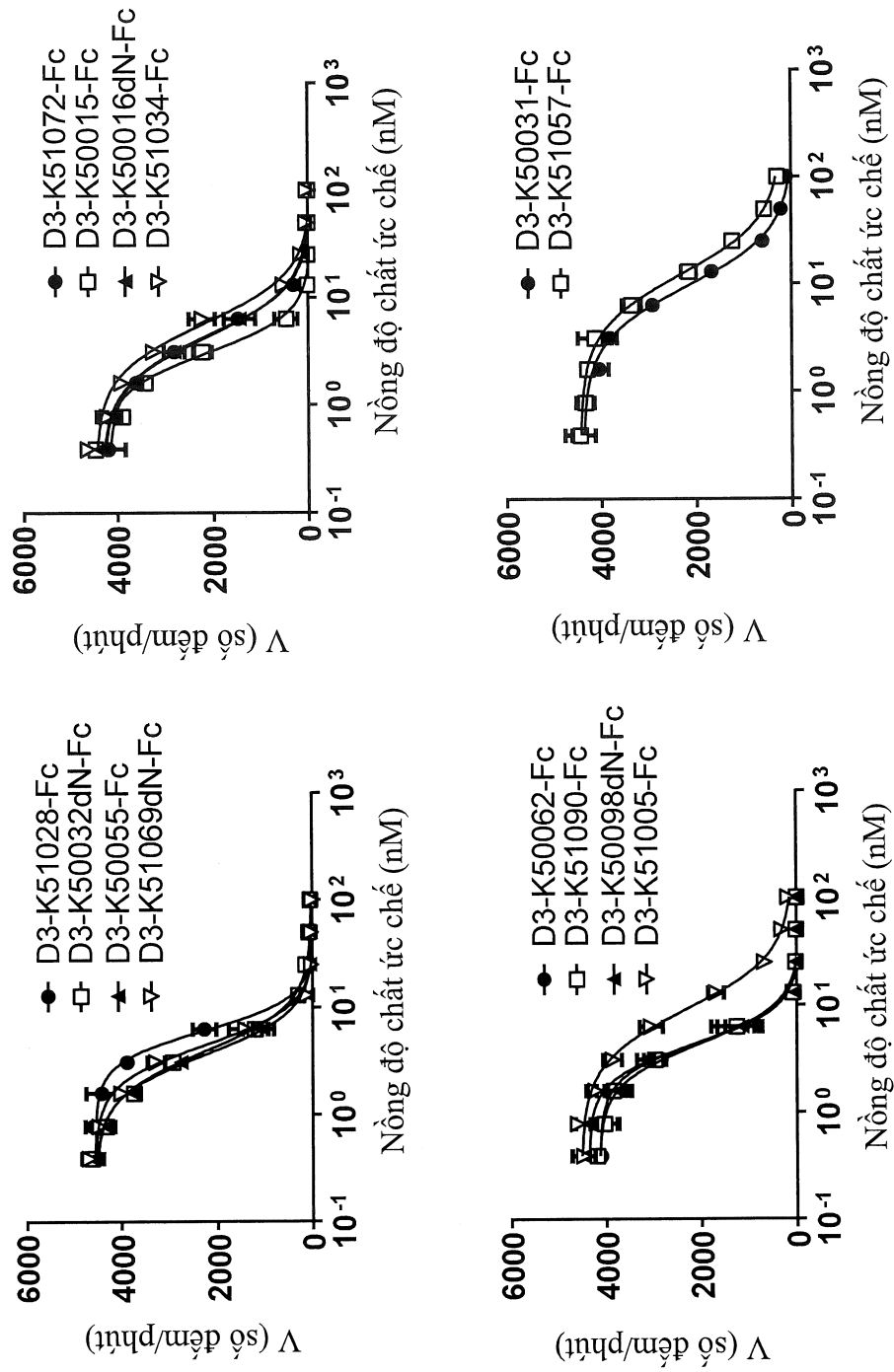


Fig. 5

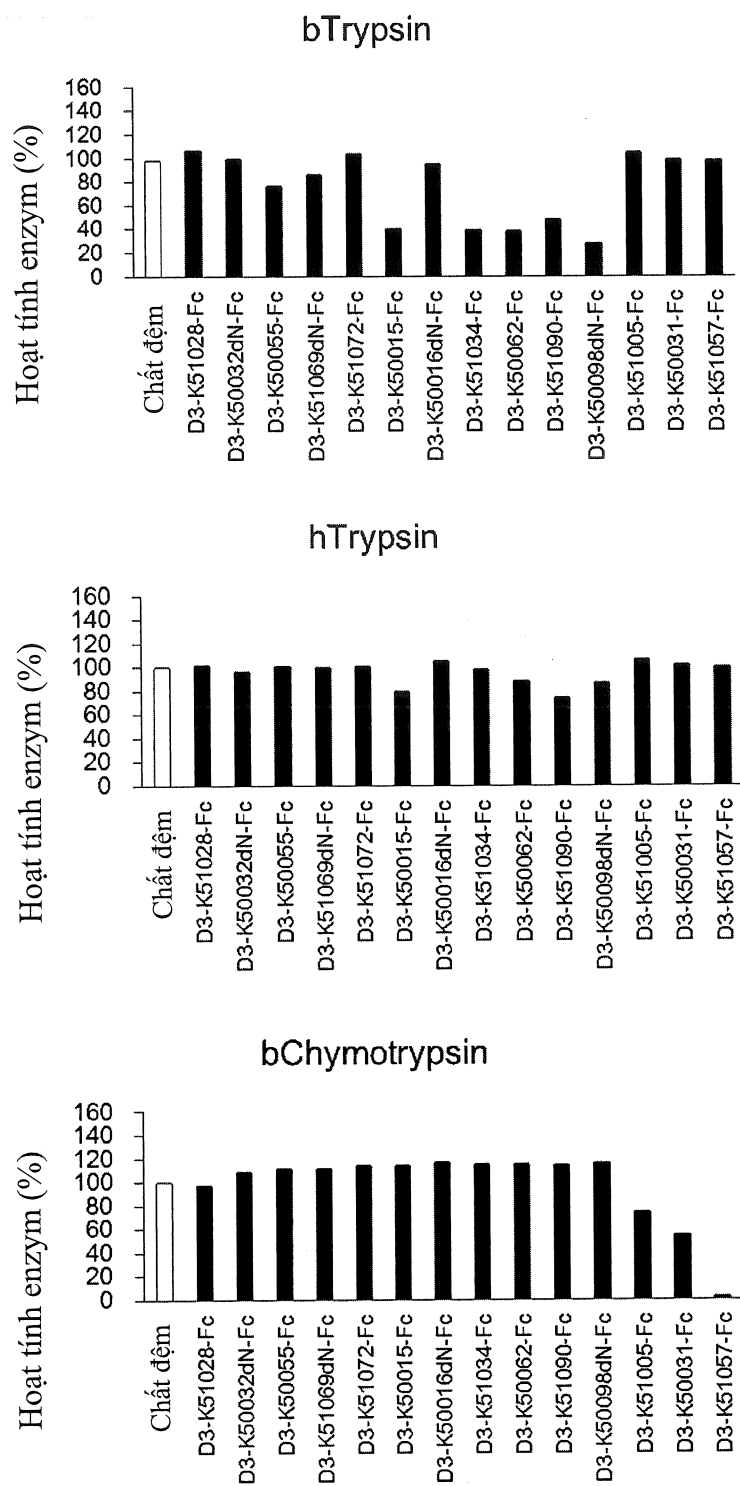


Fig. 6 (A)

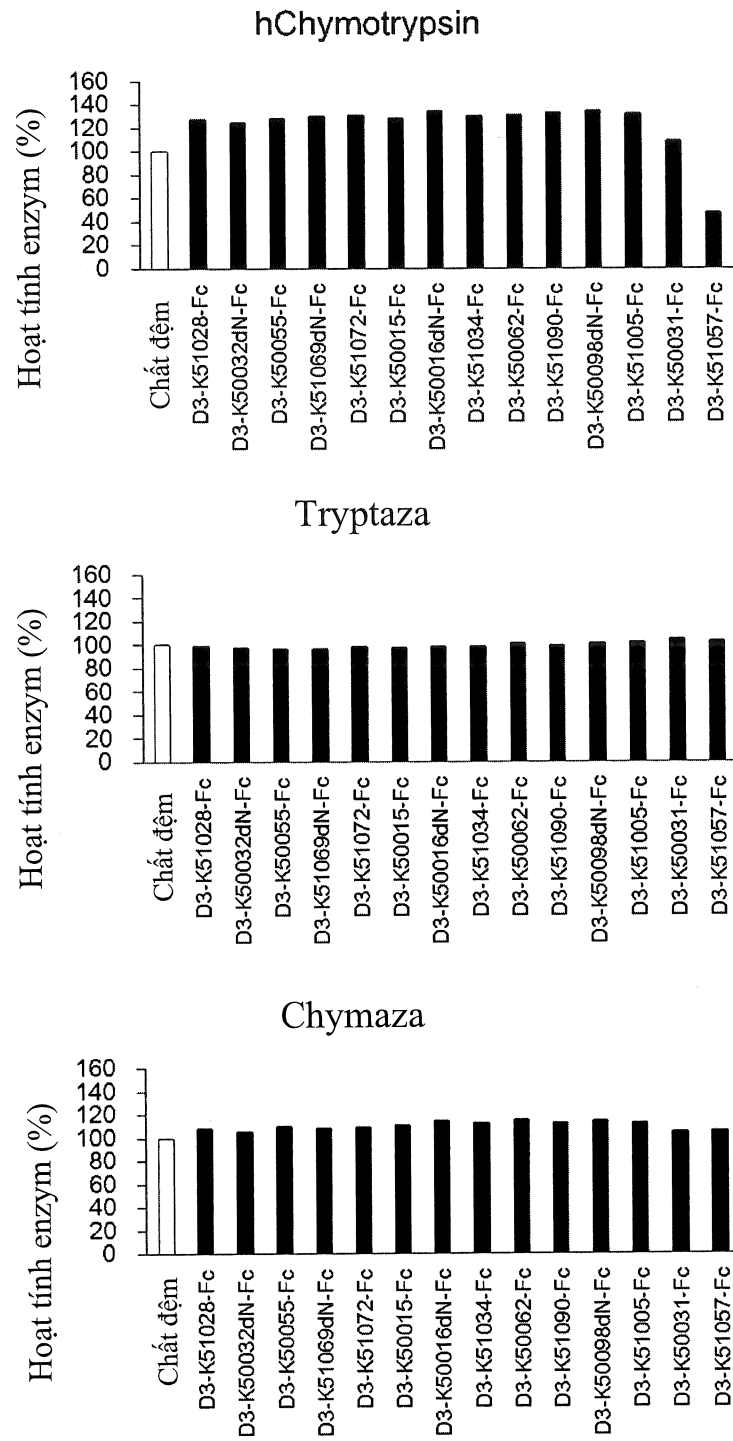


Fig. 6 (B)

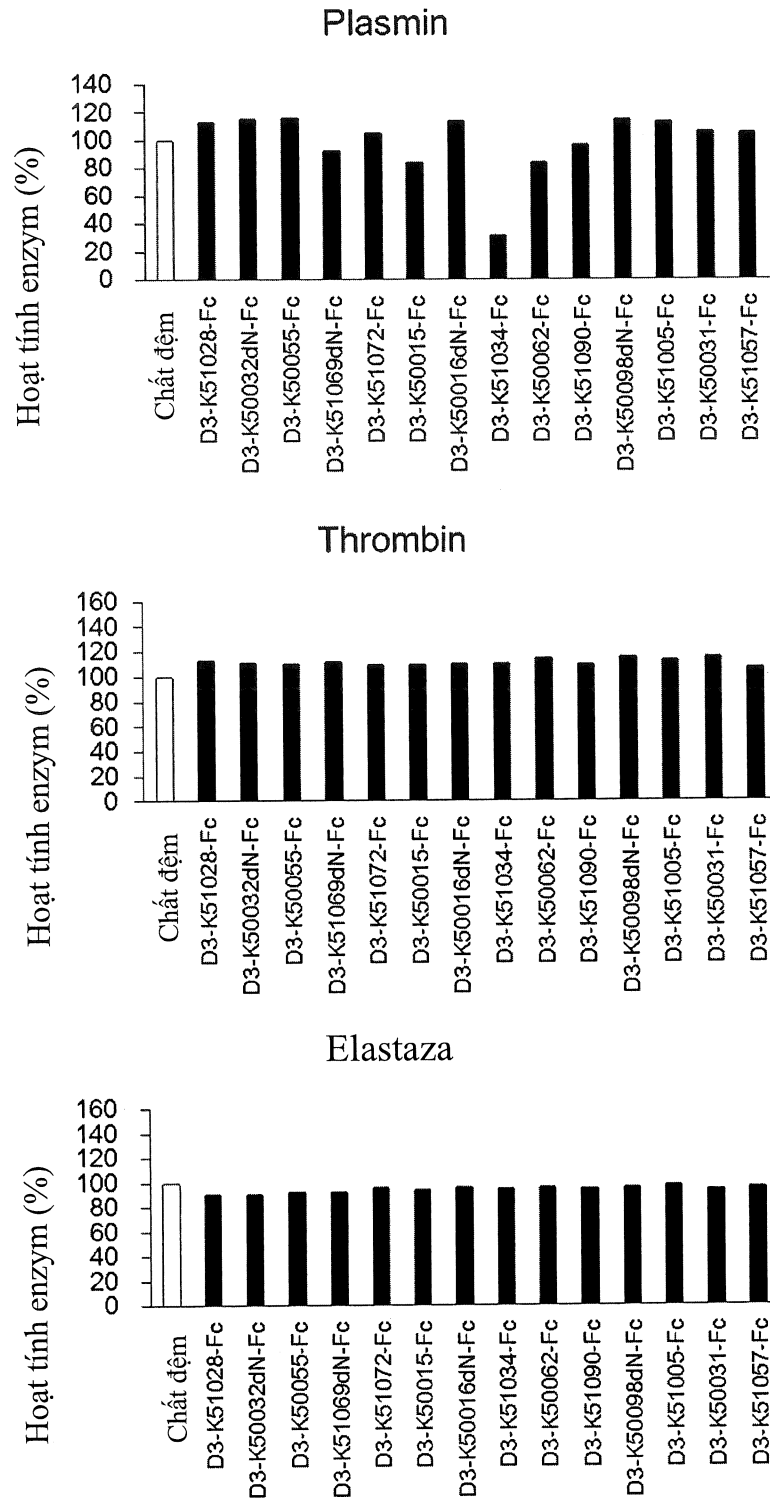


Fig. 6 (C)

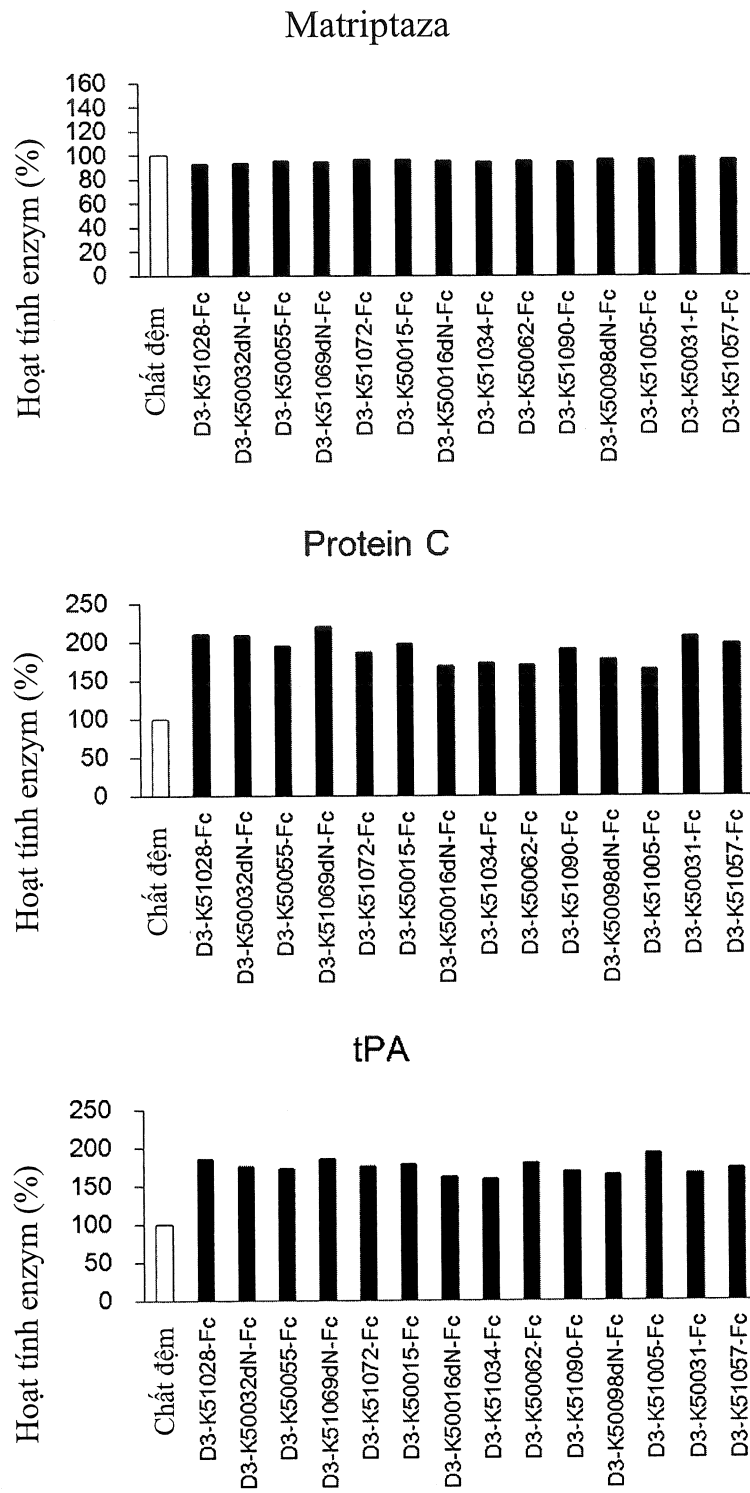


Fig. 6 (D)

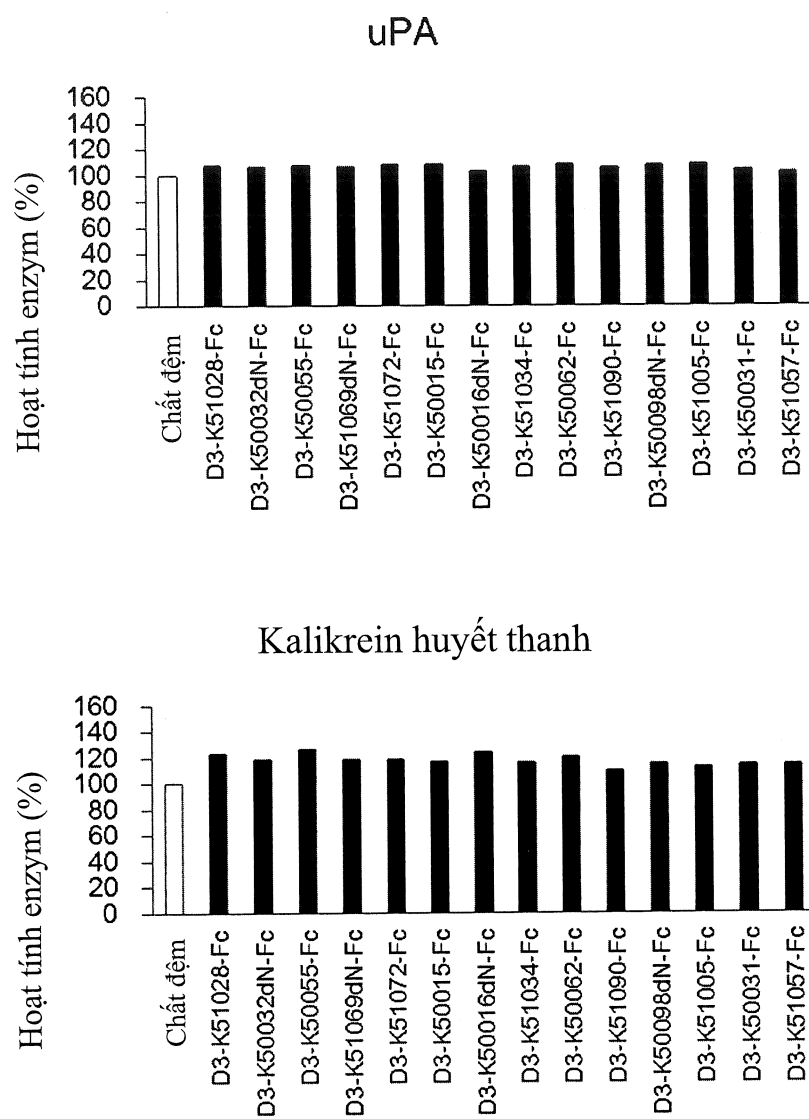


Fig. 6 (E)

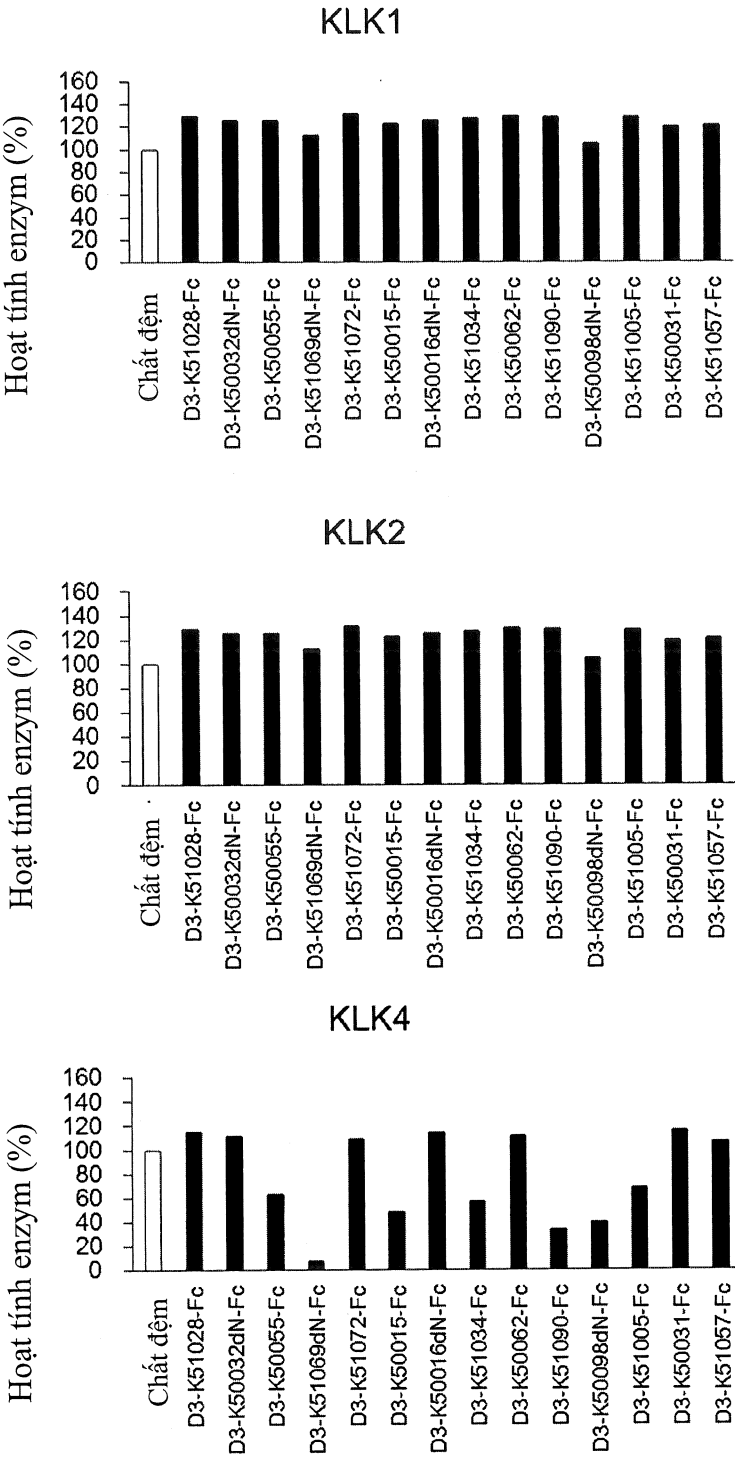


Fig. 6 (F)

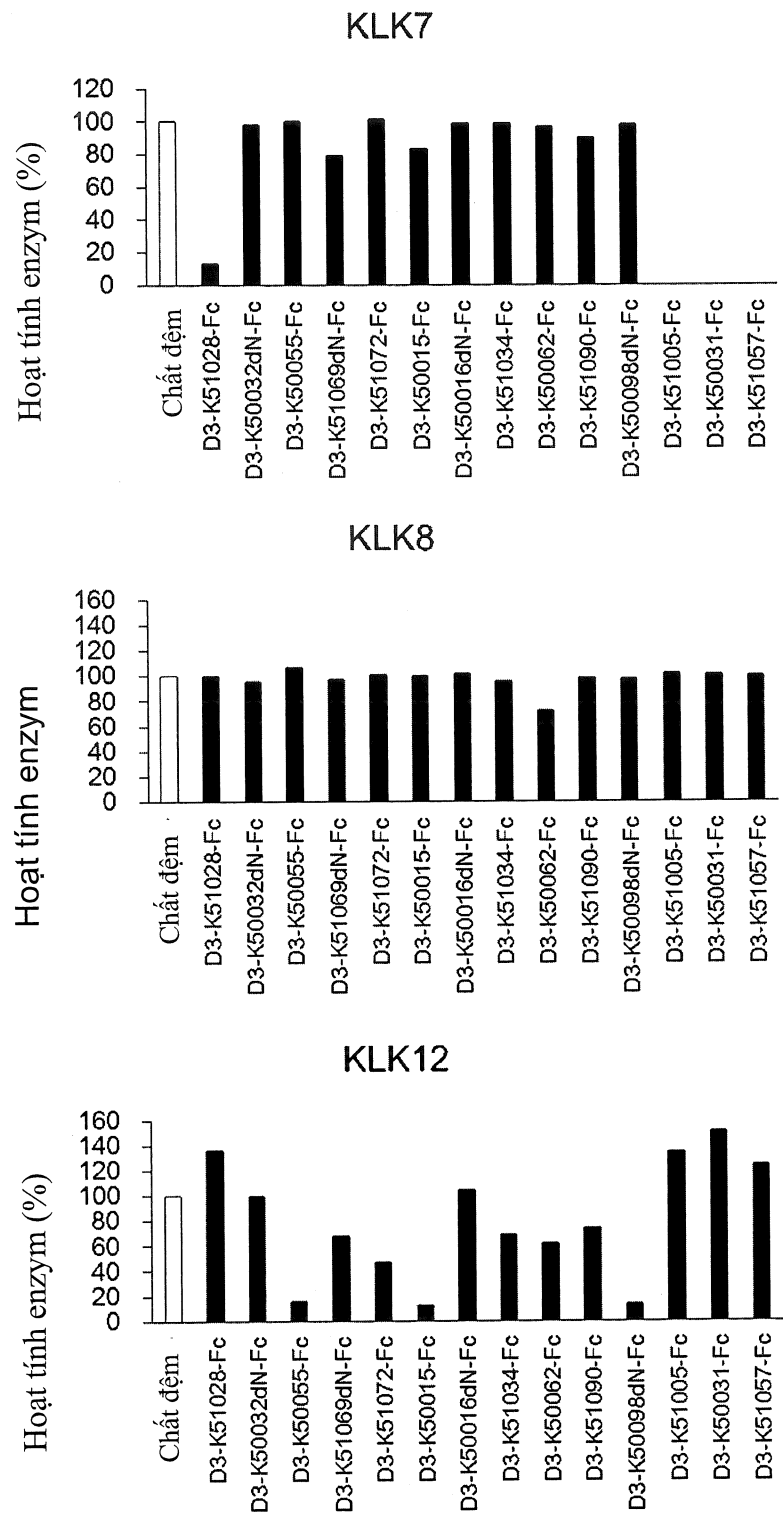


Fig. 6 (G)

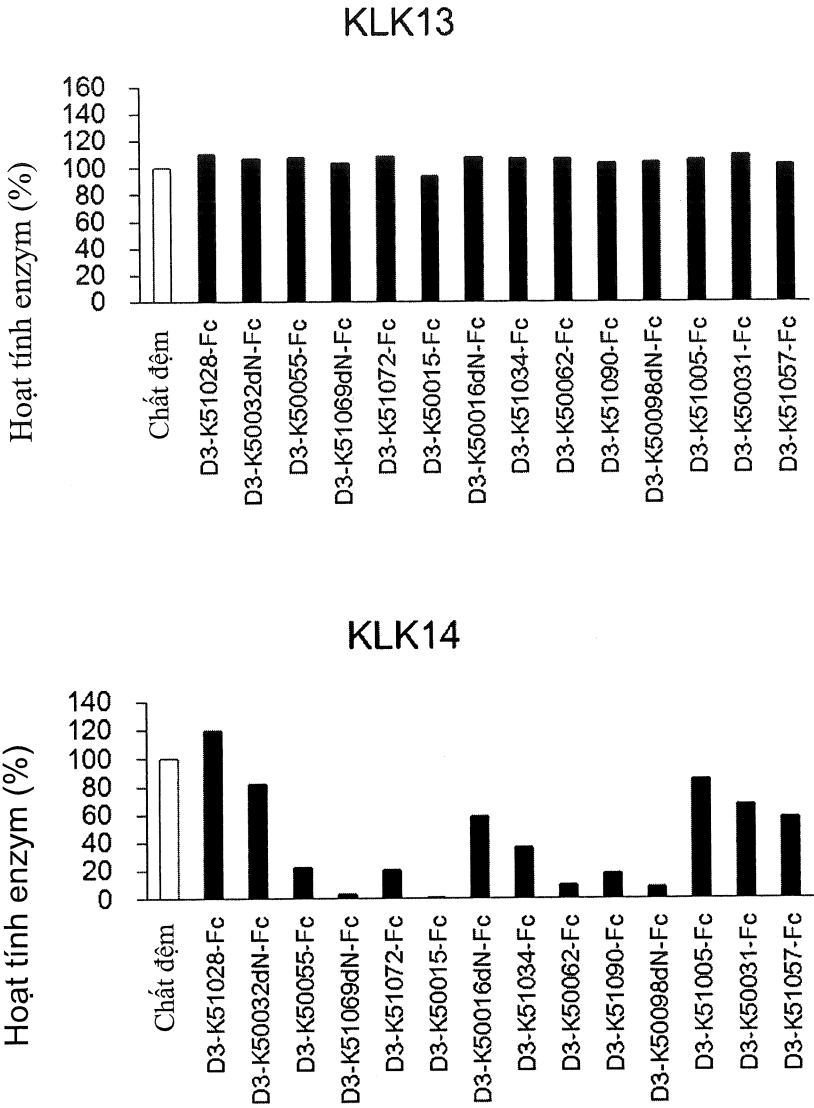


Fig. 6 (H)

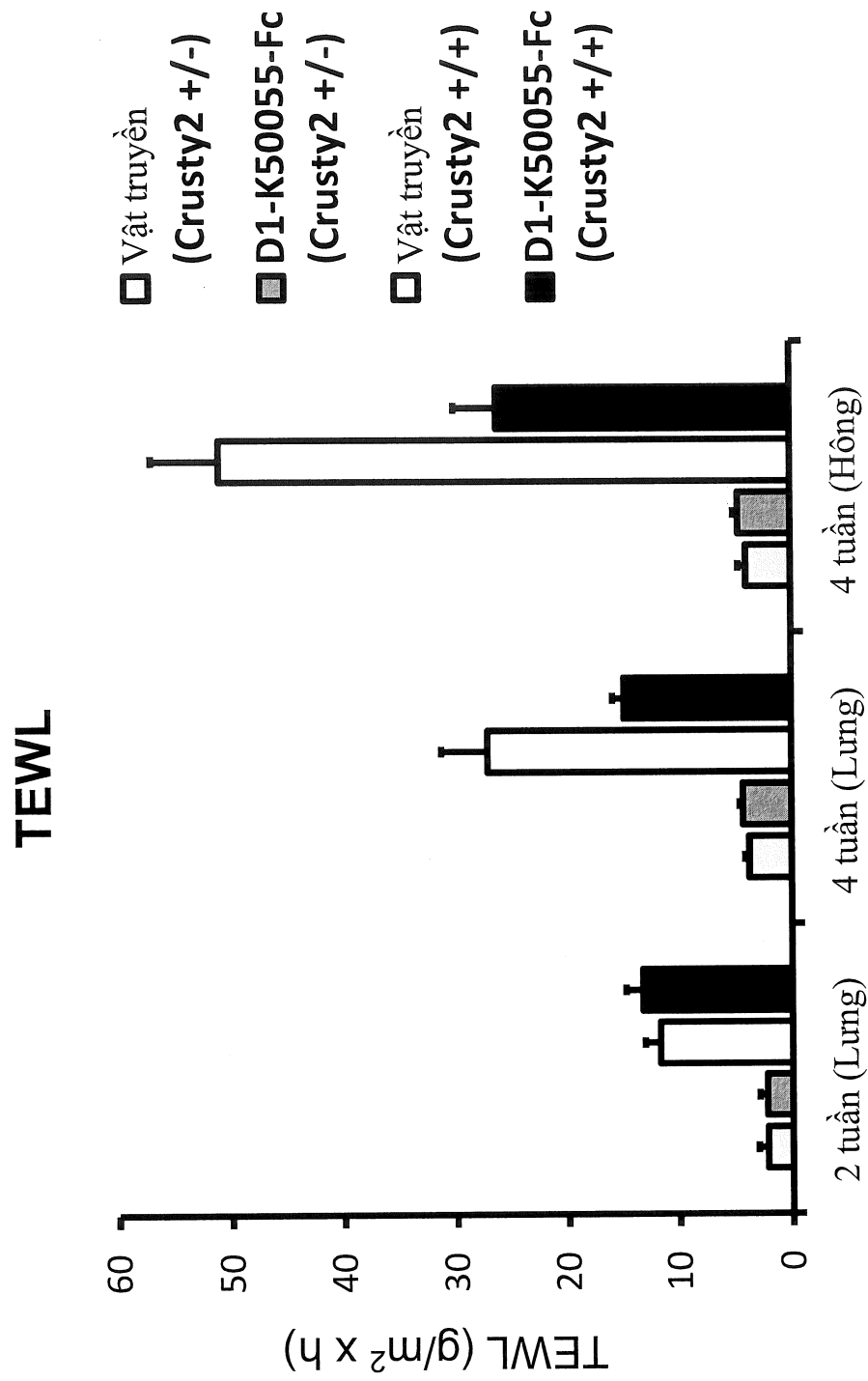


Fig. 7

SPINK2 của người	1	PQFGLFSKYRTP-NCSQYR--LPG----	53
hSP5 D8_E490-G551	1	-----EAAKEI--CSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKMHGNCAMCASVFKLEEE	52
hSP5 D9_E561-K622	1	-----EAVQEL--CSEYRHYVRNGRLPCTRENDPIEGLDGKIHGNTCSMCEAFFQQA	52
hSPINK9	1	--IECAKQTKQMVDCSHYKKLPPGQQRFCHHMYDPICGSDGKTYKNDCFFCSKVKKTDGT	58
SPINK2 của người	54	IKIIRNGPC-	62
hSP5 D8_E490-G551	53	EKKNDKEEK	62
hSP5 D9_E561-K622	53	EKERAEPRAK	62
hSPINK9	59	LKFVHFGKC-	67

Fig. 8

[Fig.9]

Trình tự axit amin của SPINK2 của người

DPQFGLFSKYRTPNCSQYRLPGCPRHFNVPVCGSDMSTYANECTLCMKIRE
GGHNIKIIRNGPC (SEQ ID NO: 1)

[Fig.10]

Trình tự axit amin của KLK5 của người

IINGSDCDMHTQPWQAALLLRPNQLYCGAVLVHPQWLLTAAHCRKKVFRV
RLGHYSLSPVYESGQQMFQGVKSIPHPGYSHPGHSNDLMLIKLNRIRPTK
DVRPINVSSHCP SAGTKCLVSGWGTTKSPQVHF PKVLQCLNISVLSQKRCE
DAYPRQIDDTMFCAGDKAGRDSCQGD SGGPVVCNGSLQGLVSWGDYPC
ARPNRPGVYTNLCKFTKWIQETIQANS (SEQ ID NO: 2)

[Fig.11]

Trình tự axit amin của KLK7 của người

IIDGAPCARGSHPWQVALLSGNQLHCGGVLVNERWVLTAAHCKMNEYTVH
LGSDTLGDRRAQRIKASKSFRHPGYSTQTHVNDLMLVKLNSQARLSSMVK
KVRLPSRCEPPGTTCTVSGWGTTTSPDVTFPSDLMCVDVKLISPQDCTKVY
KDLENSMLCAGIPDSKKNACNGDSGGPLVCRGTLQGLVSWGTFPCGQP
NDPGVYTQVCKFTKWINDTMKKHR (SEQ ID NO: 3)

[Fig.12]

Trình tự axit amin của KLK14 của người

IIGGHTCTRSSQPWQAALLAGPRRRFLCGGALLSGQWVITAAHCGRPILQV
ALGKHNLRRWEATQQVLRVVRQVTHPNYNSRTHDNDLMLLQLQQPARIGR
AVRPIEVTQACASPGTSCRVSGWGTISSPIARYPASLQCVNINISPDEVQK
AYPRTITPGMVCAGVPQGGKDSCQGDSSGGLVCRGQLQGLVSWGMERC
ALPGYPGVYTNLCKYRSWIEETMRDK (SEQ ID NO: 4)

[Fig.13]

Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K50032

GGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTCTGA
ACTGGACTGACCATCAGTGTGAACGTGACTACGACCCGGTTTGTGGTA
GCGATATGAGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAAAATTG
TGAAGGTGGCCATAATATTAATAATTATTCGCAATGGTCCGTGCGGCGGC
TAA (SEQ ID NO: 5)

[Fig.14]

Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K50032

GPQFGLFSKYRTPNCLNWDHQCERDYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIR
EGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ ID NO: 6)

[Fig.15]

Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K50055

GGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTGCTA
ACACTATGAAACAGGACTGTACTCGTGAATACGACCCGGTTTGTGGTAG
CGATATGAGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAAAATTCGT
GAAGGTGGCCATAATATTAATAATTATTCGCAATGGTCCGTGCGGCGGCT
AA (SEQ ID NO: 7)

[Fig.16]

Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K50055

GPQFGLFSKYRTPNCANTMKQDCTREYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIRE
GGHNIKIIRNGPCGG (SEQ ID NO: 8)

[Fig.17]

Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K51072

GGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTCAGG
AAGACATGACTGAATACTGTGCTCGTGAATTCGACCCGGTTTGTGGTAG
CGATATGAGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAAAATTCGT
GAAGGTGGCCATAATATTAATAATTATTCGCAATGGTCCGTGCGGCGGCT
AA (SEQ ID NO: 9)

[Fig.18]

Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K51072

GPQFGLFSKYRTPNCQEDMTEYCARDPFCGSDMSTYANECTLCMKIRE
GGHNIKIIRNGPCGG (SEQ ID NO: 10)

[Fig.19]

Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K50016

GGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTTCTC
AGTGGCAGTACTCTTCTTGACCGTGTTTACGACCCGGTTTGTGGTAG
CGATATGAGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAAAATTCGT
GAAGGTGGCCATAATATTAATAATTATTCGCAATGGTCCGTGCGGCGGCT
AA (SEQ ID NO: 11)

[Fig.20]

Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K50016

GPQFGLFSKYRTPNCSQWQYSSCDRVYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIR
EGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ ID NO: 12)

[Fig.21]

Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K51034

GGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTGGTC
GTTACACTACTGGTGGTTGTAACAAAGAATACGAACCGGTTTGTGGTAG
CGATATGAGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAAAATTCGT
GAAGGTGGCCATAATATTAATAATTATTCGCAATGGTCCGTGCGGCGGCT
AA (SEQ ID NO: 13)

[Fig.22]

Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K51034

GPQFGLFSKYRTPNCGRYTTGGCNKEYEPVCGSDMSTYANECTLCMKIRE
GGHNIKIIRNGPCGG (SEQ ID NO: 14)

[Fig.23]

Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K50062

GGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTCAGC
AGTACCGTGAACTGGGTTGTGGTCGTCAGTACGACCCGGTTTGTGGTA
GCGATATGAGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAAAATTCG
TGAAGGTGGCCATAATATTAATAATTATTCGCAATGGTCCGTGCGGCGGC
TAA (SEQ ID NO: 15)

[Fig.24]

Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K50062

GPQFGLFSKYRTPNCQQYRELGCGRQYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIR
EGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ ID NO: 16)

[Fig.25]

Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K51090

GGCCCGCAATTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTGACG
AAATCGGTAAATACGGTTGTGGTCGTTCTTACGACCCGGTTTGTGGTAG
CGATATGAGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAAAATTCGT
GAAGGTGGCCATAATATTAATAATTATTCGCAATGGTCCGTGCGGCGGCT
AA (SEQ ID NO: 17)

[Fig.26]

Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K51090

GPQFGLFSKYRTPNCDEIGKYGCGRSYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIRE
GGHNIKIIRNGPCGG (SEQ ID NO: 18)

[Fig.27]

Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5 K50098

GGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTACTT
CTCAGACTCTGGGTTCTTGTTCCTCGTGAATACGACCCGGTTTGTGGTAG
CGATATGAGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAAAATTCGT
GAAGGTGGCCATAATATTAATAATTATTCGCAATGGTCCGTGCGGCGGCT
AA (SEQ ID NO: 19)

[Fig.28]

Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5 K50098

GPQFGLFSKYRTPNCTSQTLGSCSREYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIRE
GGHNIKIIRNGPCGG (SEQ ID NO: 20)

[Fig.29]

Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51028

GGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTTACC
AGTACCGTTCTAAAGGTTGTACTCATGAATACGACCCGGTTTGTGGTAG
CGATATGAGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAAAATTCGT
GAAGGTGGCCATAATATTAATAATTATTCGCAATGGTCCGTGCGGCGGCT
AA (SEQ ID NO: 21)

[Fig.30]

Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51028

GPQFGLFSKYRTPNCYQYRSKGCTHEYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIRE
GGHNIKIIRNGPCGG (SEQ ID NO: 22)

[Fig.31]

Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51005

GGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTATGC
AGCATGCTCGTCAGGGTTGTCATTACGACTACGACCCGGTTTGTGGTAG
CGATATGAGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAAAATTCGT
GAAGGTGGCCATAATATTAATAATTATTCGCAATGGTCCGTGCGGCGGCT
AA (SEQ ID NO: 23)

[Fig.32]

Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51005

GPQFGLFSKYRTPNCMQHARQGCHYDYPVCGSDMSTYANECTLCMKIR
EGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ ID NO: 24)

[Fig.33]

Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK7 K50031

GGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTGGTG
AATACAAAGGTCGTGGTTGTTACTACCATTACGACCCGGTTTGTGGTAG
CGATATGAGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAAAATTCGT
GAAGGTGGCCATAATATTAATAATTATTCGCAATGGTCCGTGCGGCGGCT
AA (SEQ ID NO: 25)

[Fig.34]

Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK7 K50031

GPQFGLFSKYRTPNCGEYKGRGCYYHYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIR
EGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ ID NO: 26)

[Fig.35]

Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51057

GGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTGGTA
CTATGCAGGGTTCTGGTTGTACTTACCATTACGAACCGGTTTGTGGTAG
CGATATGAGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAAAATTCGT
GAAGGTGGCCATAATATTAATAATTATTCGCAATGGTCCGTGCGGCGGCT
AA (SEQ ID NO: 27)

[Fig.36]

Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51057

GPQFGLFSKYRTPNCGTMQSGSCTYHYEPVCGSDMSTYANECTLCMKIR
EGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ ID NO: 28)

[Fig.37]

Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK14 K51069

GGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTTCTC
AGGTTGTTGAACTTACTGTAACCGTGACTACGACCCGGTTTGTGGTAG
CGATATGAGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAAAATTCGT
GAAGGTGGCCATAATATTAATAATTATTCGCAATGGTCCGTGCGGCGGCT
AA (SEQ ID NO: 29)

[Fig.38]

Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK7 K51069

GPQFGLFSKYRTPNCSQVVETVCNRDYPVCGSDMSTYANECTLCMKIRE
GGHNIKIIRNGPCGG (SEQ ID NO: 30)

[Fig.39]

Trình tự nucleotit của peptit ức chế KLK5/KLK14 K50015

GGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGTTACG
ACACTACTACTCATTACTGTTCTCGTGAATACGACCCGGTTTGTGGTAG
CGATATGAGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAAAATTCGT
GAAGGTGGCCATAATATTAATAATTATTCGCAATGGTCCGTGCGGCGGCT
AA (SEQ ID NO: 31)

[Fig.40]

Trình tự axit amin của peptit ức chế KLK5/KLK14 K50015

GPQFGLFSKYRTPNCYDTTTHYCSREYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIRE
GGHNIKIIRNGPCGG (SEQ ID NO: 32)

[Fig.41]

Trình tự nucleotit của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3- K50032dN-Fc

GATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTTCAGCAAGTACAGAACCCCT
AACTGCCTGCAGTGGACTGACCATCAGTGTGAACGTGACTACGACCCT
GTGTGCGGCAGCGACATGAGCACCTACGCCAATGAGTGCACCCTGTGC
ATGAAGATCAGAGAAGGCGGCCACAACATCAAGATCATCCGGAATGGC
CCCTGCGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGT
CCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCCTGTTCCCCCA
AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGC
GTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGG
TACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG
GAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTG
CATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC
CAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGA
GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA
CAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT
CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA
ACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA
CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAATGA (SEQ ID NO: 33)

[Fig.42]

Trình tự axit amin của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50032dN-Fc

DDDGPQFGLFSKYRTPNCLQWTDHQCERDYDPVCGSDMSTYANECTLCM
KIREGGHNIKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 34)

[Fig.43]

Trình tự nucleotit của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50055-Fc

GATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTCAAGTACAGAACCCCT
AACTGCGCTAACACTATGAAACAGGACTGTACTCGTGAATACGACCCTG
TGTGCGGCAGCGACATGAGCACCTACGCCAATGAGTGCACCCTGTGCA
TGAAGATCAGAGAAGGCGGCCACAACATCAAGATCATCCGGAATGGCC
CCTGCGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTC
CTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCAA
AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGACCCCGAAGTGACCTGCG
TGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG
GAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTG
CATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC
CAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGA
GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA
CAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT
CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA
ACGTGTTCACTGTCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA
CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAATGA (SEQ ID NO: 35)

[Fig.44]

Trình tự axit amin của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50055-Fc

DDGPGQFGLFSKYRTPNCANTMKQDCTREYDPVCGSDMSTYANECTLCM
KIREGGHNIKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 36)

[Fig.45]

Trình tự nucleotit của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51072-Fc

GATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTCAAGTACAGAACCCCT
AACTGCCAGGAAGACATGACTGAATACTGTGCTCGTGACTTCGACCCTG
TGTGCGGCAGCGACATGAGCACCTACGCCAATGAGTGCACCCTGTGCA
TGAAGATCAGAGAAGGCGGCCACAACATCAAGATCATCCGGAATGGCC
CCTGCGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTC
CTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCAA
AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGACCCCCGAAGTGACCTGCG
TGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG
GAACAGTACAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTG
CATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC
CAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGA
GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA
CAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT
CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA
ACGTGTTCAAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA
CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAATGA (SEQ ID NO: 37)

[Fig.46]

Trình tự axit amin của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51072-Fc

DDDGPQFGLFSKYRTPNCQEDMTEYCARDPFCGSDMSTYANECTLCM
KIREGGHNIKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 38)

[Fig.47]

Trình tự nucleotit của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50016dN-Fc

GATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTCAAGTACAGAACCCCT
AACTGCGGCCAGTGGCAGTACTCTTCTTGACCGTGTTTACGACCCTG
TGTGCGGCAGCGACATGAGCACCTACGCCAATGAGTGCACCCTGTGCA
TGAAGATCAGAGAAGGCGGCCACAACATCAAGATCATCCGGAATGGCC
CCTGCGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTC
CTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCAA
AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAAGTGACCTGCG
TGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG
GAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTG
CATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC
CAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGA
GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA
CAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT
CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA
ACGTGTTCAAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA
CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAATGA (SEQ ID NO: 39)

[Fig.48]

Trình tự axit amin của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50016dN-Fc

DDDGPQFGLFSKYRTPNCGQWQYSSCDRVYDPVCGSDMSTYANECTLC
MKIREGGHNIKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 40)

[Fig.49]

Trình tự nucleotit của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51034-Fc

GATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTCAAGTACAGAACCCCT
AACTGCGGTCGTTACTACTGGTGGTTGTAACAAAGAATACGAACCTG
TGTGCGGCAGCGACATGAGCACCTACGCCAATGAGTGCACCCTGTGCA
TGAAGATCAGAGAAGGCGGCCACAACATCAAGATCATCCGGAATGGCC
CCTGCGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTC
CTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCAA
AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAAGTGACCTGCG
TGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG
GAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTG
CATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC
CAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGA
GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA
CAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT
CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA
ACGTGTTCAAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA
CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAATGA (SEQ ID NO: 41)

[Fig.50]

Trình tự axit amin của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51034-Fc

DDGPGQFGLFSKYRTPNCGRYTTGGCNKEYEPVCGSDMSTYANECTLCM
KIREGGHNIKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 42)

[Fig.51]

Trình tự nucleotit của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50062-Fc

GATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTTCAGCAAGTACAGAACCCCT
AACTGCCAGCAGTACCGTGAAGTGGGTTGTGGTCGTCAGTACGACCCT
GTGTGCGGCAGCGACATGAGCACCTACGCCAATGAGTGCACCCTGTGC
ATGAAGATCAGAGAAGGCGGCCACAACATCAAGATCATCCGGAATGGC
CCCTGCGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGT
CCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTCCCCCA
AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAAGTGACCTGC
GTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGG
TACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG
GAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTG
CATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC
CAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGA
GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA
CAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT
CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA
ACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA
CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAATGA (SEQ ID NO: 43)

[Fig.52]

Trình tự axit amin của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50062-Fc

DDGPGQFGLFSKYRTPNCQQYRELGCGRQYDPVCGSDMSTYANECTLCM
KIREGGHNIKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 44)

[Fig.53]

Trình tự nucleotit của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51090-Fc

GATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTTCAGCAAGTACAGAACCCCT
AACTGCGACGAAATCGGTAAATACGGTTGTGGTCGTTCTTACGACCCTG
TGTGCGGCAGCGACATGAGCACCTACGCCAATGAGTGCACCCTGTGCA
TGAAGATCAGAGAAGGCGGCCACAACATCAAGATCATCCGGAATGGCC
CCTGCGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTC
CTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCAA
AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAAGTGACCTGCG
TGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG
GAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTG
CATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC
CAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGA
GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA
CAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT
CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA
ACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA
CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAATGA (SEQ ID NO: 45)

[Fig.54]

Trình tự axit amin của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K51090-Fc

DDDGPQFGLFSKYRTPNCDEIGKYGCGRSYDPVCGSDMSTYANECTLCM
KIREGGHNIKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 46)

[Fig.55]

Trình tự nucleotit của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50098dN-Fc

GATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTTCAGCAAGTACAGAACCCCT
AACTGCGGCTCTCAGACTCTGGGTCTTGTTCCTCGTGAATACGACCCTG
TGTGCGGCAGCGACATGAGCACCTACGCCAATGAGTGCACCCTGTGCA
TGAAGATCAGAGAAGGCGGCCACAACATCAAGATCATCCGGAATGGCC
CCTGCGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTC
CTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCAA
AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAAGTGACCTGCG
TGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG
GAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTG
CATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC
CAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGA
GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA
CAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT
CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA
ACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA
CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAATGA (SEQ ID NO: 47)

[Fig.56]

Trình tự axit amin của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D3-K50098-Fc

DDGPGQFGLFSKYRTPNCGSQTLGSCSREYDPVCGSDMSTYANECTLCM
KIREGGHNIKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 48)

[Fig.57]

Trình tự nucleotit của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7
D3-K51028-Fc

GATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTTCAGCAAGTACAGAACCCCT
AACTGCTACCAGTACAGAAGCAAGGGCTGCACCCACGAGTACGATCCT
GTGTGCGGCAGCGACATGAGCACCTACGCCAATGAGTGCACCCTGTGC
ATGAAGATCAGAGAAGGCGGCCACAACATCAAGATCATCCGGAATGGC
CCCTGCGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGT
CCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCA
AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGC
GTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGG
TACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG
GAACAGTACAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTG
CATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC
CAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGA
GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA
CAACTACAAGACCAACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT
CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA
ACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA
CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAATGA (SEQ ID NO: 49)

[Fig.58]

Trình tự axit amin của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7
D3-K51028-Fc

DDGPGQFGLFSKYRTPNCYQYRSKGCTHEYDPVCGSDMSTYANECTLCM
KIREGGHNIKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 50)

[Fig.59]

Trình tự nucleotit của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K51005-Fc

GATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTTCAGCAAGTACAGAACCCCT
AACTGCATGCAGCATGCTCGTCAGGGTTGTCATTACGACTACGACCCTG
TGTGCGGCAGCGACATGAGCACCTACGCCAATGAGTGCACCCTGTGCA
TGAAGATCAGAGAAGGCGGCCACAACATCAAGATCATCCGGAATGGCC
CCTGCGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTC
CTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCAA
AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAAGTGACCTGCG
TGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG
GAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTG
CATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC
CAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGA
GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA
CAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT
CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA
ACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA
CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAATGA (SEQ ID NO: 51)

[Fig.60]

Trình tự axit amin của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7
D3-K51005-Fc

DDDGPQFGLFSKYRTPNCMQHARQGCHYDYPVCGSDMSTYANECTLC
MKIREGGHNIKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 52)

[Fig.61]

Trình tự nucleotit của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K50031-Fc

GATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTTCAGCAAGTACAGAACCCCT
AACTGCGGTGAATACAAAGGTCGTGGTTGTTACTACCATTACGACCCTG
TGTGCGGCAGCGACATGAGCACCTACGCCAATGAGTGCACCCTGTGCA
TGAAGATCAGAGAAGGCGGCCACAACATCAAGATCATCCGGAATGGCC
CCTGCGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTC
CTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCAA
AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAAGTGACCTGCG
TGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG
GAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTG
CATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC
CAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGA
GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA
CAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT
CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA
ACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA
CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAATGA (SEQ ID NO: 53)

[Fig.62]

Trình tự axit amin của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7
D3-K50031-Fc

DDDGPQFGLFSKYRTPNCGEYKGRGCYYHYDPVCGSDMSTYANECTLCM
KIREGGHNIKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 54)

[Fig.63]

Trình tự nucleotit của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K51057-Fc

GATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTCAAGTACAGAACCCCT
AACTGCGGTACTATGCAGGGTTCTGGTTGTAATTACGAACCTG
TGTGCGGCAGCGACATGAGCACCTACGCCAATGAGTGCACCCTGTGCA
TGAAGATCAGAGAAGGCGGCCACAACATCAAGATCATCCGGAATGGCC
CCTGCGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTC
CTGCCCCCGAAGTGTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCAA
AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGACCCCGAAGTGACCTGCG
TGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG
GAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTG
CATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC
CAGCCCCGCGAACCCCAAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGA
GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA
CAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT
CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA
ACGTGTTCAAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA
CCCAGAAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAATGA (SEQ ID NO: 55)

[Fig.64]

Trình tự axit amin của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK7 D3-K51057-Fc

DDGPGFGLFSKYRTPNCGTMQSGCTYHYEPVCGSDMSTYANECTLCM
KIREGGHNIKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 56)

[Fig.65]

Trình tự nucleotit của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK14
D3-K51069dN-Fc

GATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTCAGCAAGTACAGAACCCCT
AACTGCGGCCAGGTTGTTGAACTTACTGTAACCGTGACTACGACCCTG
TGTGCGGCAGCGACATGAGCACCTACGCCAATGAGTGCACCCTGTGCA
TGAAGATCAGAGAAGGCGGCCACAACATCAAGATCATCCGGAATGGCC
CCTGCGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTC
CTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCAA
AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCG
TGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGT
ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG
GAACAGTACAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTG
CATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC
CAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGA
GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA
CAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT
CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA
ACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA
CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAATGA (SEQ ID NO: 57)

[Fig.66]

Trình tự axit amin của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK14
D3-K51069dN-Fc

DDDGPQFGLFSKYRTPNCGQVVETVCNRDYPVCGSDMSTYANECTLCM
KIREGGHNIKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 58)

[Fig.67]

Trình tự nucleotit của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK14
D3-K50015-Fc

GATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTGAGCAAGTACAGAACCCCT
AACTGCTACGACACTACTACTATTACTGTTCTCGTGAATACGACCCTGT
GTGCGGCAGCGACATGAGCACCTACGCCAATGAGTGCACCCTGTGCAT
GAAGATCAGAGAAGGCGGCCACAACATCAAGATCATCCGGAATGGCCC
CTGCGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTCC
TGCCCCCGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCAAA
GCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGT
GGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTA
CGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGG
AACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGC
ATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACA
AGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCC
AGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACC
CCAGCGACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAAC
AACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTC
CTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAA
CGTGTTGAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC
CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAATGA (SEQ ID NO: 59)

[Fig.68]

Trình tự axit amin của thể dung hợp Fc peptit ức chế KLK5/KLK14
D3-K50015-Fc

DDGPGQFGLFSKYRTPNCYDTTTHYCSREYDPVCGSDMSTYANECTLCM
KIREGGHNIKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 60)

[Fig.69]

Công thức của peptit đột biến SPINK2

GPQFGLFSKYRTPNCX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇CX₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂PVCGSDMSTYANE
CTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC (SEQ ID NO: 61)

[Fig.70]

Trình tự nucleotit của đoạn mồi 1

AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG (SEQ
ID NO: 62)

[Fig.71]

Trình tự nucleotit của đoạn mồi 2

AAACTCGAGTTAGCCGCCGCACGGACCATTGCGAATAA (SEQ ID NO:
63)

[Fig.77]

Trình tự nucleotit của đoạn mồi 8

CGTCATCTTTATAATCGCCCCGGTGTTCCTTCATGGTGTGCGTT (SEQ ID
NO: 69)

[Fig.78]

Trình tự nucleotit của đoạn mồi 9

AAAATCTAGAGCCGCCACCATGTTCTCCTCCTCACCGCCCTC (SEQ ID
NO: 70)

[Fig.79]

Trình tự nucleotit của đoạn mồi 10

CGTCATCTTTATAATCGCCCTTGTCGCGCATGGTCTCCTCGAT (SEQ ID
NO: 71)

[Fig.80]

Trình tự nucleotit của đoạn mồi 11

AAAAGTTTAAACTCAATGATGGTGGTGGTGGTGT (SEQ ID NO: 72)

[Fig.81]

Trình tự nucleotit của đoạn mồi 12

AAAATCTAGAGCCGCCACCATGGGAGTGTGGCTGCTGAGCCTG (SEQ
ID NO: 73)

AAAAGTTTAAACTCAATGATGGTGGTGGTGGTGCCGGTGGGTCTTCATG
GTTTCCATG (SEQ ID NO: 74)

AAAATCTAGAGCCGCCACCATGTTTCTGCTGCTGATCATCCTG (SEQ ID NO: 75)

AAAAGTTTAAACTCAATGATGGTGGTGGTGGTGGTTGCTCTGCATGGTC
CGCTGAA (SEQ ID NO: 76)

Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys (SEQ ID NO: 77)

Leu-Leu-Val-Tyr (SEQ ID NO: 78)

Ala-Ala-Pro-Val (SEQ ID NO: 79)

[Fig.88]

Trình tự axit amin trong peptit cơ chất protein C

Leu-Ser-Thr-Arg (SEQ ID NO: 80)

[Fig.89]

Trình tự nucleotit của đoạn mồi 16

AGATGGGTGTTGTCTGATGACGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTC (SEQ ID NO: 81)

[Fig.90]

Trình tự nucleotit của đoạn mồi 17

GCAGGGGCCATTCCGGAT (SEQ ID NO: 82)

[Fig.91]

Trình tự nucleotit của đoạn mồi 18

AAAATCTAGAGCCGCCACCATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCT (SEQ ID NO: 83)

[Fig.92]

Trình tự nucleotit của đoạn mồi 19

AGACAACACCCATCTAGGAGCGGCCACCAGCAGCAGAAAGAACC (SEQ ID NO: 84)

[Fig.93]

Trình tự nucleotit của đoạn mồi 20

ATCCGGAATGGCCCCTGCGAACCCAAGAGCTGCGAC (SEQ ID NO: 85)

[Fig.94]

Trình tự nucleotit của đoạn mồi 21

AAAAGTTTAAACTCATTTGCCGGGGCTCAG (SEQ ID NO: 86)

[Fig.95]

Trình tự axit amin của Fc của IgG1 của người

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 87)

[Fig.96]

Trình tự axit amin của D8 của SPINK5 của người (E490-G551)

EAAKEICSEFRDQVRNGTLICTREHNPVRGPDGKMHGNKCAMCASVFKLE
EEEKKNDKEEKG (SEQ ID NO: 88)

[Fig.97]

Trình tự axit amin của D9 của SPINK5 của người (E561-K622)

EAVQELCSEYRHYVRNGRLPCTRENDPIEGLDGKIHGNTCSMCEAFFQQE
AKEKERAEPRAK (SEQ ID NO: 89)

[Fig.98]

Trình tự axit amin của của SPINK9 của người

IECAKQTKQMVDCSHYKKLPPGQQRFCHEHMYDPICGSDGKTYKNDCFFCS
KVKKTDGTLKFVHFGKC (SEQ ID NO: 90)

[Fig.99]

Trình tự axit amin của KLK5 của chuột nhắt

RIVNGSDCQKDAQPWQGALLLGPNKLYCGAVLISPQWLLTAAHCRKPVFRI
RLGHHSMSPVYESGQQMFQGIKSIPHPGYSHPGHSNDLMLIKMNRKIRDS
HSVKPVEIACDCATEGTRCMVSGWGTTSSSHNNFPKVLQCLNITVLSEERC
KNSYPGQIDKTMFCAGDEEGRDSCQGDSGGPVVCNGKLQGLVSWGDFP
CAQRNRPGVYTNLCEFVKWIKDTMNSN (SEQ ID NO: 91)

[Fig.100]

Trình tự axit amin của KLK7 của chuột nhắt

RIIDGYKCKEGSHPWQVALLKGNQLHCGGVLDKYWVLTAHCKMGQYQ
VQLGSDKIGDQSAQKIKATKSFRHPGYSTKTHVNDIMLVRLDEPVKMSSKV
EAVQLPEHCEPPGTSTVSGWGTTTSPDVTFPSDLMCSDVKLISSRECKK
VYKDLLGKTMLCAGIPDSKTNTCNGDSGGPLVCNDTLQGLVSWGTYPGCG
PNDPGVYTQVCKYKRWVMETMKTHR (SEQ ID NO: 92)

[Fig.101]

Trình tự axit amin của KLK14 của chuột nhắt

IIGGYRCVRNSQPWQVALQAGPGHRFLCGGVLLSDQWVITAHCARPILHV
ALGKHNI RRWEATQQVVRVARQVPHYPQYQPAHDNDLMLLKLQKKVRLG
RAVKTISVASSCASPGTPCRVSGWGTTASPIARYPTALQCVNVNIMSEQAC
HRAYPGIITSGMVCAGVPEGGKDSCQGDSGGPLVCGGQLQGLVSWGMER
CAMPGYPGVYANLCNYHSWIQRTMQSN (SEQ ID NO: 93)

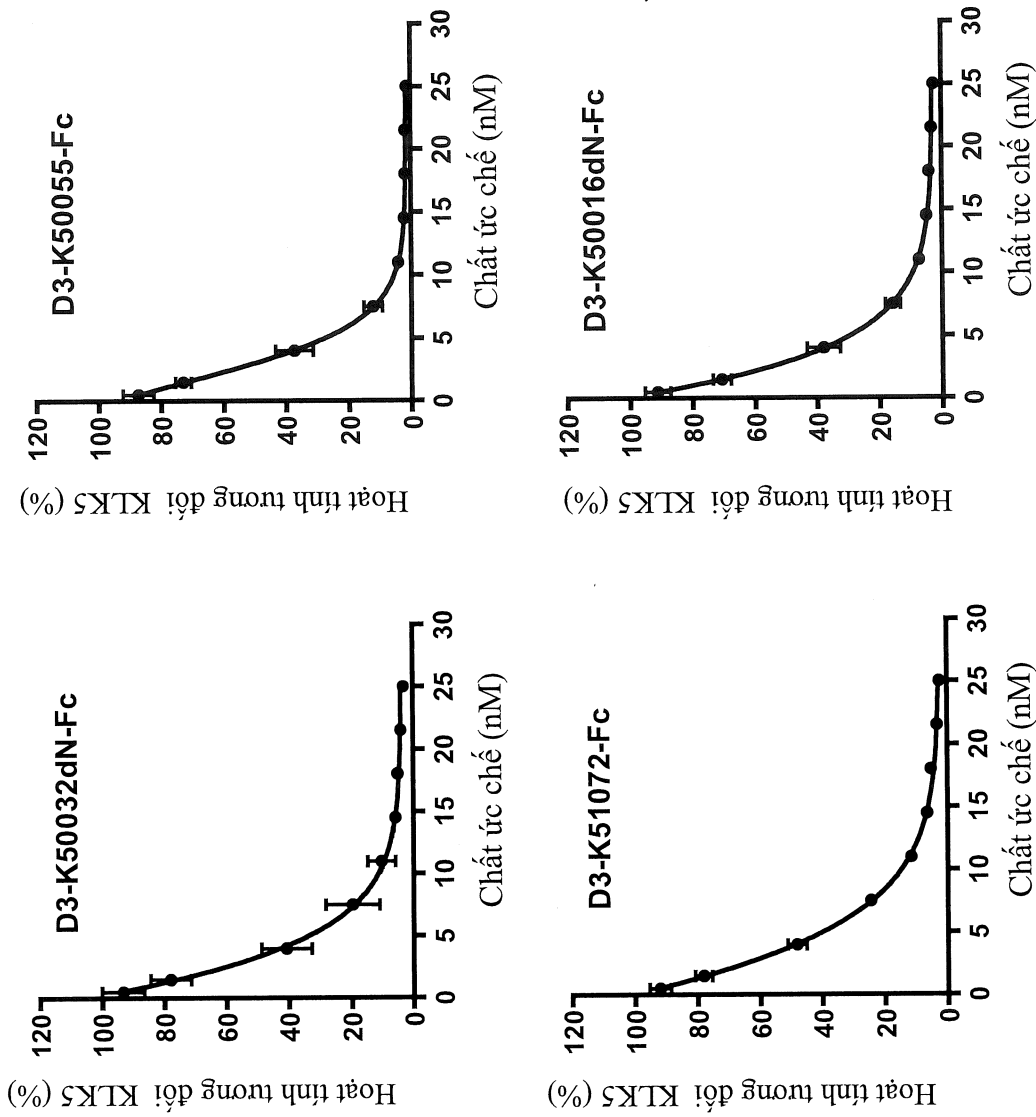


Fig. 102

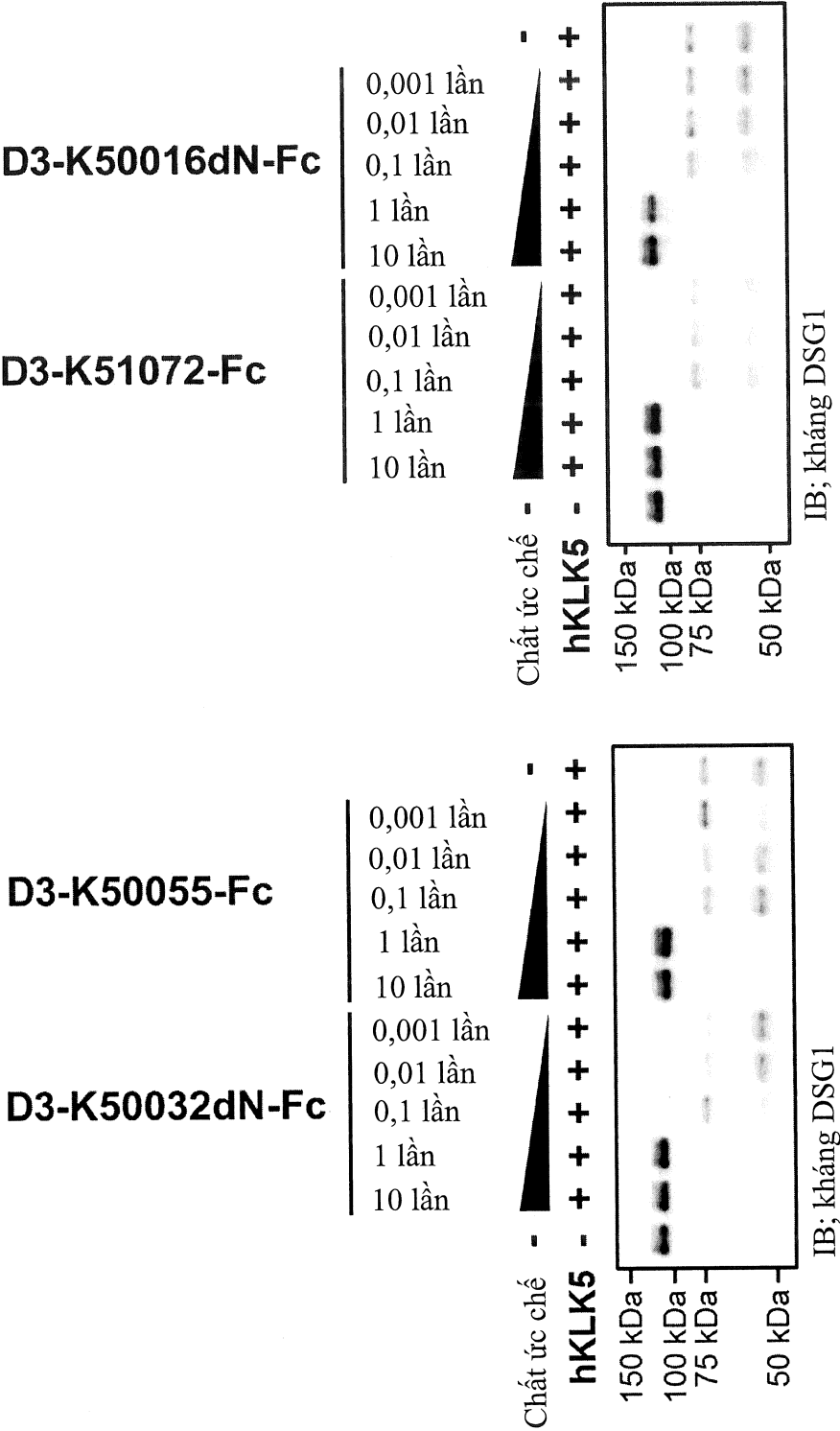


Fig. 103 (A)

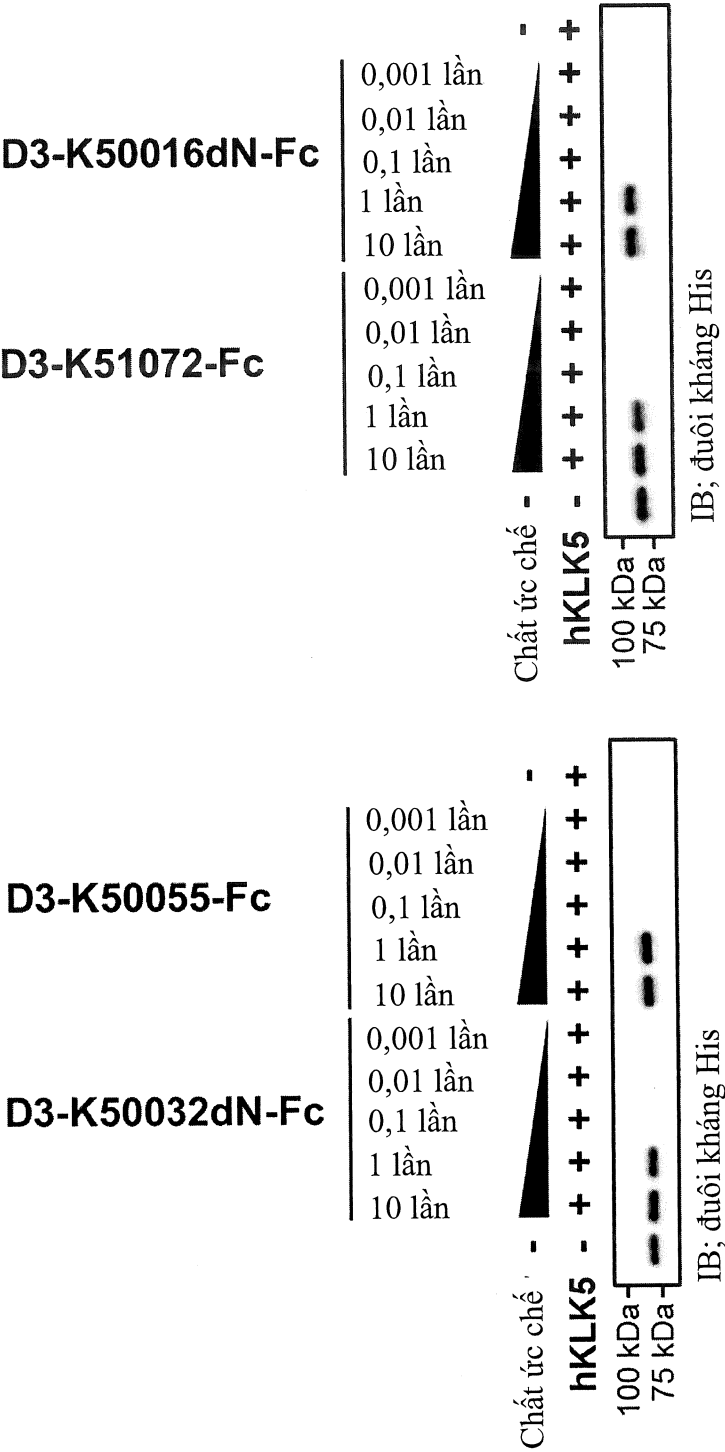


Fig. 103 (B)

[Fig.104]

Trình tự nucleotit của đoạn môi 22

AGATGGGTGTTGTCTGACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTC (SEQ ID NO:
94)

[Fig.105]

Trình tự nucleotit của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D1-K50055-Fc

GACGGCCCTCAGTTCGGCCTGTTCAAGTACAGAACCCCTAACTGC
GCTAACACTATGAAACAGGACTGTACTCGTGAATACGACCCTGTGTGCG
GCAGCGACATGAGCACCTACGCCAATGAGTGCACCCTGTGCATGAAGA
TCAGAGAAGGCGGCCACAACATCAAGATCATCCGGAATGGCCCCTGCG
AACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTCTGCCC
CCGAAGTGTGGGAGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCTGTTCCTGCCC
AGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGG
TGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGT
ACAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCATCAGG
ACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCC
TGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCC
GCGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACCA
AGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCAGCG
ACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACA
AGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACA
GCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC
AGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG
TCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAATGA (SEQ ID NO: 95)

[Fig.106]

Trình tự axit amin của thể liên hợp Fc peptit ức chế KLK5 D1-K50055-Fc

DGPQFGLFSKYRTPNCANTMKQDCTREYDPVCGSDMSTYANECTLCMKIR
EGGHNIKIIRNGPCEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 96)

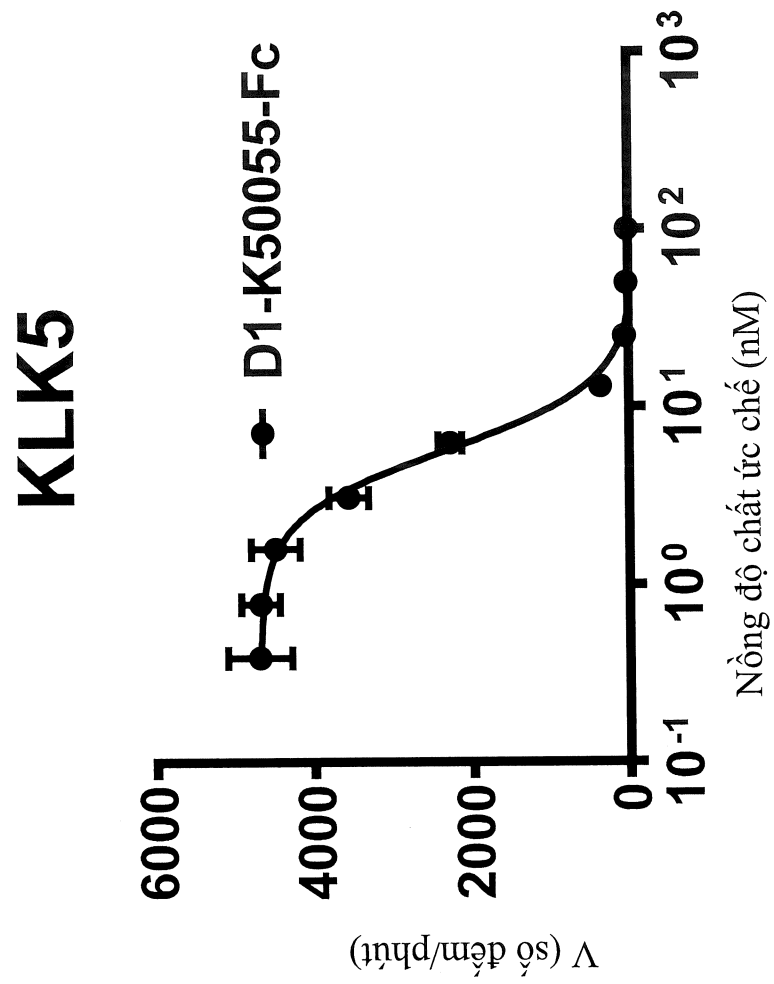


Fig. 107 (A)

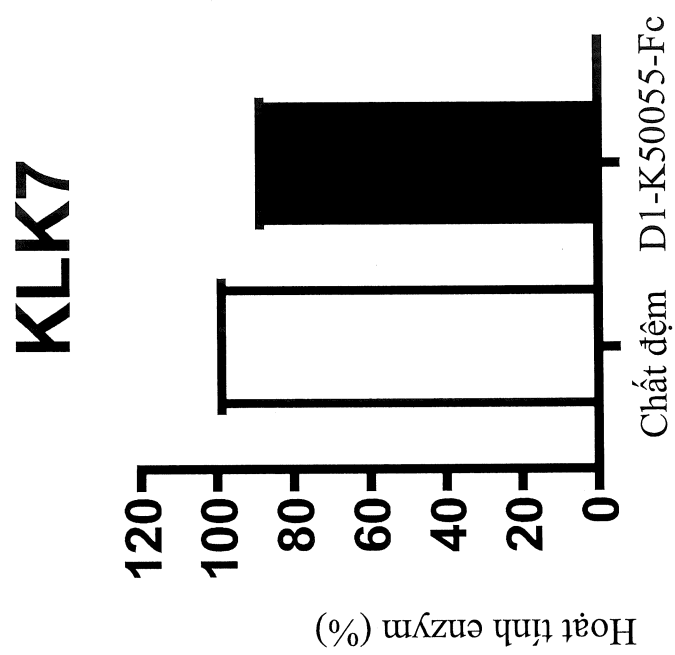


Fig. 107 (B)

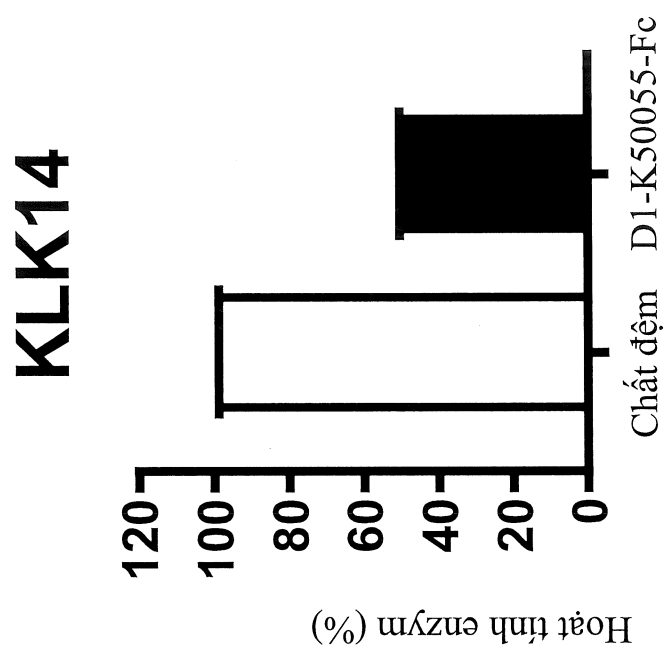


Fig. 107 (C)