(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) **1-0019747**

(51)[7] **C07K 16/28**, 14/72

(13) **B**

(21) 1-2011-01944
(22) 18.12.2009
(86) PCT/US2009/068858 18.12.2009
(87) WO2010/075238 01.07.2010
(30) 61/203,569 23.12.2008 US
61/264,622 25.11.2009 US
(45) 25.09.2018 366
(43) 27.08.2012 293

(73) AMGEN INC. (US)
One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, California 91320-1799, United States of America
(72) BOONE, Thomas C. (US), BRANKOW, David W. (US), GEGG, JR., Colin V. (US), HU, Shaw-Fen Sylvia (US), KING, Chadwick T. (CA), LU, Hsieng Sen (US), SHI, Licheng (US), XU, Cen (US)
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ LIÊN KẾT THỤ THỂ PEPTIT LIÊN QUAN ĐẾN GEN CANXITONIN (CGRP) CỦA NGƯỜI VÀ POLYNUCLEOTIT PHÂN LẬP MÃ HÓA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên mà liên kết với thụ thể CGRP của người (CGRP R). Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic mã hóa protein liên kết kháng nguyên này, vectơ và tế bào mã hóa protein liên kết kháng nguyên này. Protein liên kết kháng nguyên này có thể ức chế sự liên kết của CGRP R với CGRP, và hữu ích để sử dụng trong nhiều rối loạn liên quan đến CGRP R, bao gồm điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh đau nửa đầu.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên mà liên kết với thụ thể CGRP người (CGRP R). Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic mã hóa protein liên kết kháng nguyên này, vectơ và tế bào mã hóa protein liên kết kháng nguyên này. Protein liên kết kháng nguyên này có thể ức chế sự liên kết của CGRP R với CGRP, và hữu ích để sử dụng trong nhiều rối loạn liên quan đến CGRP R, bao gồm điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh đau nửa đầu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đơn này chứa Danh mục trình tự đã được nộp thông qua trang web EFS và được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Bản sao ASCII được tạo ra vào ngày 14 tháng 12 năm 2009, được đặt tên là A1472PCT.txt, và có dung lượng là 312.447 bai (byte).

Siêu họ canxitonin của các peptit bao gồm ít nhất năm thành viên đã biết: canxitonin, amylin, adrenomedulin và hai peptit liên quan đến gen canxitonin ("CGRP") là CGRP1 (còn được gọi là ctCGRP hoặc CGRP) và CGRP2 (còn được gọi là βCGRP). CGRP là neuropeptit hoạt mạch có 37 axit amin, được biểu hiện trong cả hệ thần kinh trung ương và hệ thần kinh ngoại biên, và đã được chứng minh là tác nhân làm giãn mạch công hiệu ở vùng ngoại biên, nơi các nơron chứa CGRP gắn liền với các mạch máu. Tình trạng giãn mạch do CGRP gây ra cũng gắn liền với chứng viêm thần kinh, là một phần của chuỗi sự kiện dẫn đến tình trạng tràn huyết tương ra ngoài mạch và tình trạng giãn mao mạch và có trong chứng đau nửa đầu. Amylin cũng có các vị trí liên kết đặc hiệu trong CNS và được cho là có tác dụng điều tiết quá trình làm rỗng dạ dày và có vai trò trong quá trình chuyển hóa hydrat cacbon. Adrenomedulin là tác nhân làm giãn mạch công hiệu. Adrenomedulin có các thụ thể đặc hiệu trên các tế bào hình sao và ARN thông tin của nó được điều hòa tăng trong các mô CNS bị thiếu máu cục bộ. (Zimmermann, et al., Identification of adrenomedullin receptors in cultured rat astrocytes and in

neuroblastoma glioma hybrid cells (NG108-15), Brain Res., 724:238-245 (1996); Wang et al., Discovery of adrenomedullin in rat ischemic cortex and evidence for its role in exacerbating focal brain ischemic damage, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:11480-11484 (1995)).

Canxitonin liên quan đến việc kiểm soát quá trình chuyển hóa xương và cũng hoạt động trong hệ thần kinh trung ương (CNS). Các hoạt tính sinh học của CGRP bao gồm khả năng điều tiết các khớp thần kinh-cơ, sự trình diện kháng nguyên trong hệ miễn dịch, trương lực mạch và sự dẫn truyền thần kinh cảm giác. (Poyner, D. R., Calcitonin gene-related peptide: multiple actions, multiple receptors, Pharmacol. Ther., 56:23-51 (1992); Muff et al., Calcitonin, calcitonin gene related peptide, adrenomedullin and amylin: homologous peptides, separate receptors and overlapping biological actions, Eur. J. Endocrinol., 133: 17-20 (1995)). Ba peptit kích thích thụ thể canxitonin (CRSP) cũng đã được nhận diện trong một số loài động vật có vú; các CRSP này có thể tạo thành phân họ mới trong họ CGRP. (Katafuchi, T and Minamino, N, Structure and biological properties of three calcitonin receptor-stimulating peptides, novel members of the calcitonin gene-related peptide family, Peptides, 25(11):2039-2045 (2004)).

Các peptit thuộc siêu họ canxitonin hoạt động thông qua các thụ thể bắt cặp với protein G (GPCR) có bảy miền xuyên màng. Thụ thể canxitonin ("CT", "CTR" hay "thụ thể CT") và các thụ thể CGRP là các GPCR typ II ("họ B"), họ này bao gồm các GPCR khác mà nhận biết các peptit điều tiết như secretin, glucagon và polypeptit hoạt mạch của ruột (VIP). Các biến thể ghép nối được xác định đặc điểm rõ ràng nhất của thụ thể canxitonin của người khác nhau tùy thuộc vào sự có mặt (trước đây là CTR_{II+} hoặc CTR1, hiện nay được gọi là $CT_{(b)}$) hoặc sự vắng mặt (biến thể ghép nối chính, trước đây là CTR_{II-} hoặc CTR_2, hiện nay được gọi là $CT_{(a)}$) của 16 axit amin trong vòng nội bào thứ nhất. (Gorn et al., Expression of two human skeletal calcitonin receptor isoforms cloned from a giant cell tumor of bone: the first intracellular domain modulates ligand binding and signal transduction, J. Clin. Invest., 95:2680-2691 (1995); Hay et al., Amylin receptors: molecular composition and pharmacology, Biochem. Soc. Trans., 32:865-867

(2004); Poyner et al., 2002). Sự tồn tại ít nhất hai phân nhóm thụ thể CGRP đã được đề xuất trong nhiều thử nghiệm sinh học *in vivo* và *in vitro* xuất phát từ các mức ái lực chất đối kháng và hiệu lực chất chủ vận khác nhau. (Dennis et al., CGRP8-37, A calcitonin gene-related peptide antagonist revealing calcitonin gene-related peptide receptor heterogeneity in brain and periphery, J. Pharmacol. Exp. Ther., 254:123-128 (1990); Dennis et al., Structure-activity profile of calcitonin gene-related peptide in peripheral and brain tissues. Evidence for multiplicity, J. Pharmacol. Exp. Ther., 251:718-725 (1989); Dumont et al., A potent and selective CGRP2 agonist, [Cys(Et)2,7]hCGRP: comparison in prototypical $CGRP_1$ and CGRP2 in vitro assays, Can. J. Physiol. Pharmacol., 75:671-676 (1997)).

Đã phát hiện được rằng phân nhóm thụ thể CGRP1 là nhạy đối với đoạn chất đối kháng CGRP(8-37). (Chiba et al., Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist human CGRP-(8-37), Am. J. Physiol., 256:E331-E335 (1989); Dennis et al. (1990); Mimeault et al., Comparative affinities and antagonistic potencies of various human calcitonin gene-related peptide fragments on calcitonin gene-related peptide receptors in brain and periphery, J. Pharmacol. Exp. Ther., 258:1084-1090 (1991)). Trái lại, thụ thể $CGRP_2$ là nhạy đối với các chất tương đồng CGRP của người (hCGRP) dạng mạch thẳng, trong đó các gốc xystein ở các vị trí 2 và 7 được dẫn xuất hóa (ví dụ, bằng axetoaminometyl [$Cys(ACM)^{2,7}$] hoặc etylamit [$Cys(Et)^{2,7}$]), nhưng thụ thể $CGRP_2$ thì không nhạy đối với đoạn CGRP(8-37). (Dennis et al. (1989); Dennis et al. (1990); Dumont et al. (1997)).

Tính đặc hiệu phối tử của thụ thể canxitonin và thụ thể tương tự canxitonin ("CL", "CLR" hay "CRLR") phụ thuộc vào sự đồng biểu hiện của các thành viên thuộc họ gồm các protein phụ được gọi là các protein cải biến hoạt tính thụ thể (RAMP). Họ RAMP này bao gồm ba polypeptit (RAMP1, RAMP2 và RAMP3), đóng vai trò làm các chất điều biến thụ thể mà xác định tính đặc hiệu phối tử của các thụ thể đối với các thành viên họ canxitonin. Các RAMP là các protein xuyên màng typ I có độ đồng nhất trình tự axit amin là khoảng 30% và có cấu trúc hình học tôpô được dự đoán chung, với các đầu cuối C

ngắn trong tế bào chất, một miền xuyên màng và các đầu cuối N lớn ngoại bào chịu trách nhiệm về tính đặc hiệu. (McLatchie et al., (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor, Nature, 393:333-339; Fraser et al., (1999) The amino terminus of receptor activity modifying proteins is a critical determinant of glycosylation state and ligand binding of calcitonin receptor-like receptor, Molecular Pharmacology, 55:1054-1059).

Năm 1998, thụ thể $CGRP_1$ được nhận diện là dị đime bao gồm protein phụ có một miền xuyên màng mới, protein cải biến hoạt tính thụ thể 1 (RAMP1), và CRLR. (McLatchie et al., trên đây). Các thử nghiệm liên kết ngang cho thấy thụ thể CGRP chứa dạng sắp xếp theo hệ số tỷ lượng là 1:1 của CRLR và RAMP1 (Hilairet et al. JBC 276, 42182-42190 (2001)), các nghiên cứu gần đây hơn có sử dụng một số phương pháp luận như BRET và BiFC cho thấy rằng phức hệ thụ thể CGRP chức năng có thể bao gồm oligome đồng loại không đối xứng của CRLR và monome của RAMP1 (Heroux et al. JBC 282, 31610-31620 (2007)).

Miền đầu cuối N của CRLR đã được tinh chế đã được chứng minh là liên kết đặc hiệu với ^{125}I-CGRP (Chauhan et al. Biochemistry 44, 782 (2005)), khẳng định sự tương tác trực tiếp và quan trọng giữa CRLR với phối tử CGRP. Cụ thể, Leu 24 và Leu 34 của CRLR được cho là cấu thành vị trí gắn của Phe37 thuộc đầu cuối C của CGRP (Banerjee et al. BMC Pharmacol. 6, 9 (2006)). Ngoài ra, Koller và cộng sự (FEBS Lett. 531, 464-468 (2002)) đã thu được bằng chứng là 18 gốc axit amin thuộc đầu cuối N của CRLR có tham gia vào sự tương tác chọn lọc với CGRP hoặc adrenomedulin, và Ittner và cộng sự (Biochemistry 44, 5749- 5754 (2005)) đã cho biết rằng các gốc axit amin 23- 60 thuộc đầu cuối N của CRLR điều tiết sự kết hợp với RAMP1.

Việc phân tích cấu trúc-chức năng của RAMP1 đã nhận diện các gốc 91–103, các gốc này tương quan với "vòng xoắn 3" (Simms et al. Biophys. J. 91, 662 – 669 (2006)), là các gốc tiềm năng quan trọng trong tương tác với CRLR, và các gốc Trp74 và Phe92 là các gốc tiềm năng tương tác với phối tử CGRP liên quan đến sự liên kết của nó vào phức hệ thụ thể CGRP. Các nghiên cứu liên kết phối tử có sử dụng thể khảm RAMP1 của

người/chuột cống (chuột Rattus) cho thấy rằng vị trí liên kết dành cho các chất ức chế phân tử nhỏ cụ thể của CGRP R (ví dụ, BIBN4096BS) nằm trong vùng bao gồm các axit amin 66–102 của RAMP1 (Mallee et al. JBC 277, 14294 – 14298 (2002)).

CRLR có độ đồng nhất trình tự axit amin toàn phần là 55% với CTR, mặc dù các miền xuyên màng giống gần như là 80%. (McLatchie et al. (1998); Poyner et al., International union of pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin and calcitonin receptors, Pharmacol. Rev., 54:233-246 (2002)).

CRLR đã được chứng minh là có khả năng tạo thụ thể có ái lực cao đối với CGRP khi kết hợp với RAMP1, hoặc có khả năng liên kết ưu tiên adrenomedulin khi kết hợp với RAMP2 hoặc RAMP3. (McLatchie et al. (1998); Sexton et al., Receptor activity modifying proteins, Cellular Signaling, 13:73-83 (2001); Conner et al., Interaction of calcitonin-gene-related peptide with its receptors, Biochemical Society Transactions 30(Part 4): 451-454 (2002)). Tình trạng glycosyl hóa của CRLR gắn liền với đặc điểm dược lý của nó. Các RAMP 1, 2 và 3 vận chuyển CRLR đến màng sinh chất với hiệu quả tương tự, tuy nhiên RAMP1 thể hiện CRLR trong vai trò là glycoprotein hoàn thiện được glycosyl hóa đầu cuối và thụ thể CGRP, trong khi đó RAMP 2 và RAMP 3 thể hiện CRLR trong vai trò là thụ thể adrenomedulin chưa hoàn thiện được glycosyl hóa phần lõi ("AM" hay "AMR" hay "thụ thể AM". (Fraser et al. (1999)). Việc xác định đặc điểm của các thụ thể CRLR/RAMP2 và CRLR/RAMP3 trong các tế bào HEK293T bằng thử nghiệm liên kết phối tử phóng xạ (^{125}I-adrenomedullin trong vai trò là phối tử phóng xạ), thử nghiệm chức năng (đo cAMP), hoặc phân tích sinh hóa (điện di trên gel polyacrylamit-SDS) cho thấy các thụ thể này là không thể phân biệt được, mặc dù RAMP 2 và RAMP 3 chỉ có độ đồng nhất trình tự axit amin là 30%. (Fraser et al. 1999)). Tuy nhiên, đã quan sát thấy các khác biệt trong đặc điểm dược lý của CRLR được biểu hiện bằng RAMP 2 so với RAMP 3. Cả CGRP và CGRP8-37, cũng như adrenomedulin và peptit AM 22-52 có nguồn gốc từ adrenomedulin, đều có hoạt tính đối với dị đime RAMP 3, chứng tỏ rằng phức hệ này có thể hoạt động vừa trong vai trò là CGRP vừa trong vai

trò là thụ thể AM. (Howitt et al., British Journal of Pharmacology, 140:477-486 (2003); Muff et al., Hypertens. Res., 26:S3-S8 (2003)). Sự đồng biểu hiện của CRLR của người với RAMP1 của chuột cống, và ngược lại, đã cho thấy rằng loại RAMP1 đã quyết định các đặc tính dược lý của phức hệ CRLR/RAMP1 đối với một số chất đối kháng thụ thể CGRP phân tử nhỏ được thử nghiệm. (Mallee et al., Receptor Activity-Modifying Protein 1 determines the species selectivity of non-peptide CGRP receptor antagonists, J. Biol. Chem., 277(16):14294-14298 (2002)). Trừ khi kết hợp với RAMP, CRLR không được biết đến là liên kết với bất kỳ phối tử nội sinh nào; hiện tại nó là GPCR duy nhất được cho là hoạt động theo cách này. (Conner et al., A key role for transmembrane prolines in calcitonin receptor-like agonist binding and signaling: implications for family B G-protein-coupled receptors, Molec. Pharmacol., 67(1):20-31 (2005)).

Thụ thể canxitonin (CT) cũng đã được chứng minh là có khả năng tạo ra các phức dị đime với RAMP, các chất này được gọi là các thụ thể amylin ("AMY", "AMY R" hay "thụ thể AMY"). Nhìn chung, các thụ thể CT/RAMP1 (được gọi trong bản mô tả này là "AMY_1" hay "AMY1") có ái lực cao đối với canxitonin, amylin và CGRP của cá hồi và ái lực thấp hơn đối với các canxitonin của động vật có vú. Đối với các thụ thể CT/RAMP2 ("AMY_2" hay "AMY2") và các thụ thể CT/RAMP3 ("AMY_3" hay "AMY3"), về cơ bản đã quan sát thấy mô hình tương tự, mặc dù ái lực đối với CGRP thấp hơn và có thể là không đáng kể ở các mức nồng độ phối tử thích hợp về mặt sinh lý. Kiểu hình thụ thể chính xác phụ thuộc vào loại tế bào và biến thể ghép nối CTR ($CT_{(a)}$ hoặc $CT_{(b)}$), đặc biệt là đối với các thụ thể amylin do RAMP2 sản sinh. Ví dụ, quần thể thuần chủng của các tế bào tương tự tế bào hủy xương đã được báo cáo là biểu hiện RAMP2, CTR và CRLR, nhưng không biểu hiện RAMP1 hoặc RAMP3. (Hay et al. (2004); Christopoulos et al., Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product, Molecular Pharmacology, 56:235-242 (1999); Muff et al., An amylin receptor is revealed following co-transfection of a calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3, Endocrinology, 140:2924-2927 (1999); Sexton et al. (2001); Leuthauser et al., Receptor-activity-modifying protein 1 forms heterodimers with two G-protein-coupled receptors to

define ligand recognition, Biochem. J., 351:347-351 (2000); Tilakaratne et al., Amylin receptor phenotypes derived from human calcitonin receptor/RAMP co-expression exhibit pharmacological differences dependent on receptor isoform and host cell environment, J. Pharmacol. Exp. Ther., 294:61-72 (2000); Nakamura et al., Osteoclast-like cells express receptor activity modifying protein 2: application of laser capture microdissection, J. Molec. Endocrinol., 34:257-261 (2005)).

Bảng 1 dưới đây tóm tắt mối liên quan của các hợp phần thụ thể được thảo luận trên đây.

Bảng 1

Hợp phần thụ thể	CRLR (CL)	CT (thụ thể canxitonin)
RAMP1	Thụ thể CGRP	Thụ thể AMY1
RAMP2	Thụ thể AM1	Thụ thể AMY2
RAMP3	Thụ thể AM2	Thụ thể AMY3

Các chất đối kháng CGRP để sử dụng trong trị liệu đã được đề xuất. Noda và cộng sự đã mô tả CGRP hoặc các dẫn xuất CGRP để sử dụng trong việc ức chế sự kết tụ tiểu cầu và điều trị hoặc phòng ngừa chứng xơ cứng động mạch hoặc chứng huyết khối. (EP 0385712 B1). Liu và cộng sự đã bộc lộ các chất trị liệu có tác dụng điều biến hoạt tính của CTR, bao gồm các peptit được liên hợp với chất dẫn như canxitonin và αCGRP của người. (WO 01/83526 A2; US 2002/0090646 A1). Các chất đối kháng peptit CGRP hoạt mạch và các chất đối kháng peptit CGRP như vậy dùng để ức chế quá trình liên kết CGRP vào các thụ thể CGRP đã được Smith và cộng sự bộc lộ; các chất đối kháng peptit CGRP này đã được chứng minh là có tác dụng ức chế quá trình liên kết CGRP vào các màng động mạch vành và có tác dụng nới lỏng các động mạch vành của lợn đã được điều trị bằng capsaixin. (patent Mỹ số 6,268,474 B1 và patent Mỹ số 6,756,205 B2). Rist và cộng sự đã bộc lộ các chất tương tự peptit có hoạt tính đối kháng thụ thể CGRP và các chất tương tự peptit như vậy để sử dụng trong thuốc dùng để điều trị và phòng ngừa nhiều loại rối loạn. (DE 19732944 A1).

CGRP là tác nhân làm giãn mạch công hiệu mà liên quan đến bệnh lý của một số triệu chứng vận mạch, như tất cả các dạng đau đầu do mạch máu, bao gồm bệnh đau nửa đầu (có hoặc không có hiện tượng thoáng qua) và bệnh đau đầu từng cơn. Durham, N. Engl. J. Med. 350:1073-1075, 2004. Sinh lý bệnh của bệnh đau nửa đầu liên quan đến quá trình hoạt hóa hạch dây thần kinh sinh ba, là nơi CGRP khu trú, và các mức CGRP tăng lên một cách đáng kể trong suốt cơn đau nửa đầu. Điều này lại tăng cường tình trạng giãn mạch máu sọ và chứng viêm thần kinh và sự mẫn cảm. (Doods, H., Curr. Opin. Investig. Drugs, 2:1261-1268 (2001)). Ngoài ra, các mức CGRP trong huyết thanh trong tĩnh mạch ngoài ở cổ tăng lên ở các bệnh nhân trong suốt cơn đau nửa đầu. Goadsby et al., Ann. Neurol. 28:183-7, 1990. Việc dùng ci-CGRP của người trong tĩnh mạch gây ra bệnh đau đầu và bệnh đau nửa đầu ở các bệnh nhân mắc bệnh đau nửa đầu không có hiện tượng thoáng qua, củng cố cho quan điểm rằng CGRP có vai trò là nguyên nhân trong bệnh đau nửa đầu (Lassen et al, Cephalalgia 22:54-61, 2002).

Bệnh đau nửa đầu là tình trạng bệnh thần kinh thông thường phức tạp, được đặc trưng bởi các cơn đau đầu từng đợt trầm trọng và các dấu hiệu đi kèm, các dấu hiệu này có thể bao gồm buồn nôn, nôn, mẫn cảm với ánh sáng, âm thanh hoặc chuyển động. Ở một số bệnh nhân, cơn đau đầu được bắt đầu hoặc đi kèm với hiện tượng thoáng qua. Cơn đau đầu có thể là trầm trọng và cũng có thể là đau một bên ở các bệnh nhân cụ thể. Các cơn đau nửa đầu làm xáo trộn cuộc sống thường ngày. Tại Mỹ và Tây Âu, tình trạng phổ biến chung của những người mắc bệnh đau nửa đầu là 11% tổng dân số (6% nam giới; 15-18% phụ nữ). Ngoài ra, tần suất trung bình của các cơn đau ở một cá thể là 1,5/tháng. Mặc dù có một số phương pháp điều trị sẵn có để làm dịu hoặc làm giảm các triệu chứng, nhưng liệu pháp phòng ngừa được khuyến nghị cho các bệnh nhân bị nhiều hơn 3-4 cơn đau nửa đầu trong mỗi tháng. Goadsby, et al. New Engl. J. Med. 346(4): 257-275, 2002. Một số bệnh nhân mắc bệnh đau nửa đầu đã được điều trị bằng topiramate, một loại thuốc chống co giật có tác dụng phong bế các kênh natri phụ thuộc điện áp và các thụ thể glutamat cụ thể (AMPA-kainat), làm tăng hoạt tính thụ thể GABA-A và phong bế anhydraza cacbonic. Sự thành công tương đối gần đây của các chất chủ vận thụ thể serotonin 5HT-I B/ID và/hoặc các chất chủ vận thụ thể 5HT-1a, như sumatriptan, ở một

số bệnh nhân đã hướng các nhà nghiên cứu đến việc đề xuất nguyên nhân gây hoạt hóa hoặc giải phóng serotonin của rối loạn này. Thật không may là, trong khi một số bệnh nhân đáp ứng tốt với phương pháp điều trị này, số khác lại kháng lại một cách tương đối tác dụng của nó.

Sự liên quan có thể có của CGRP trong bệnh đau nửa đầu là cơ sở cho sự phát triển và thử nghiệm các hợp chất ức chế quá trình giải phóng CGRP (ví dụ, sumatriptan), đối kháng với thụ thể CGRP (ví dụ, dẫn xuất dipeptit BIBN4096BS (Boehringer Ingelheim); CGRP(8-37)), hoặc tương tác với một hoặc nhiều protein gắn liền với thụ thể, như, RAMP1. Brain, S. et al., Trends in Pharmacological Sciences 23:51-53, 2002. Các phân nhóm thụ thể adrenalin alpha-2 và các thụ thể adenosin Al cũng kiểm soát (ức chế) quá trình giải phóng CGRP và hoạt hóa dây thần kinh sinh ba (Goadsby et al., Brain 125:1392- 401, 2002). Mặt khác, việc điều trị bằng các hợp chất mà ức chế đặc hiệu chứng viêm thần kinh (ví dụ, các chất đối kháng thụ thể tachykinin NKI) hoặc việc hoạt hóa dây thần kinh sinh ba (ví dụ, các chất chủ vận thụ thể 5HT10) có vẻ là tương đối không có hiệu quả làm phương pháp điều trị khẩn cấp đối với bệnh đau nửa đầu, dẫn đến câu hỏi là liệu việc ức chế sự giải phóng CGRP có phải là cơ sở của các phương pháp điều trị hữu hiệu chống lại bệnh đau nửa đầu hay không. Arulmani et al., Eur. J. Pharmacol. 500:315-330, 2004.

Mặc dù sinh lý bệnh chính xác của bệnh đau nửa đầu còn chưa được hiểu rõ, nhưng các chất đối kháng CGRP và phân tử aptame nhắm đích CGRP đã được đề xuất để điều trị bệnh đau nửa đầu và các rối loạn khác. (Ví dụ, Olesen et al., Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine, New Engl. J. Med., 350:1104-1110 (2004); Perspective: CGRP-receptor antagonists--a fresh approach to migraine, New Engl. J. Med., 350:1075 (2004); Vater et al., Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: tailored-SELEX, Nuc. Acids Res., 31(21 e130):1-7 (2003); WO 96/03993). Ngoài ra, chất đối kháng CGRP phân tử nhỏ công hiệu đã được chứng minh là có tác dụng làm dịu các cơn đau nửa đầu từ vừa phải đến trầm trọng, bao

gồm cơn đau nửa đầu và các triệu chứng gắn liền với bệnh đau nửa đầu, trong thử nghiệm lâm sàng pha III gần đây (Connor, et al. Efficacy and Safety of telcagepant (MK-0974), a Novel Oral CGRP Receptor Antagonist, for Acute Migraine Attacks. Poster, European Headache and Migraine Trust International Congress, London, Anh, tháng 9, 2008).

CGRP cũng có thể liên quan đến các hội chứng đau mạn tính không phải là bệnh đau nửa đầu. Ở các động vật gặm nhấm, CGRP được đưa vào cơ thể qua đường trong vỏ gây ra tình trạng đau trầm trọng, và mức CGRP tăng cao trong một số mô hình cơn đau. Ngoài ra, các chất đối kháng CGRP phong bế một phần quá trình cảm nhận đau trong bệnh viêm tụy cấp tính ở động vật gặm nhấm (Wick, et al., (2006) Surgery, quyển 139, số phát hành 2, các trang 197-201). Cùng với nhau, các phát hiện này nói lên rằng chất đối kháng thụ thể CGRP công hiệu và chọn lọc có thể là chất trị liệu hữu hiệu để điều trị bệnh đau mạn tính, bao gồm bệnh đau nửa đầu.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể đã được phân lập, các đoạn liên kết kháng nguyên của chúng và các protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập khác mà liên kết CGRP R, cụ thể là CGRP R của động vật linh trưởng, ví dụ, CGRP R của người. Các protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập này có thể ức chế một cách chọn lọc CGRP R của động vật linh trưởng (khi so với thụ thể AM1, AM2, CT hoặc thụ thể amylin của động vật linh trưởng) và có thể liên kết cả hợp phần CRLR và hợp phần RAMP1 của CGRP R. Đã phát hiện được rằng, protein liên kết CGRP R có tác dụng ức chế, cản trở hoặc điều biến ít nhất một trong số các đáp ứng sinh học liên quan đến CGRP R, và như vậy, các protein này hữu ích trong việc làm giảm nhẹ các ảnh hưởng của các bệnh hoặc rối loạn liên quan đến CGRP R. Do đó, sự liên kết của các protein liên kết kháng nguyên cụ thể vào CGRP R có thể có một hoặc nhiều các hoạt tính dưới đây: ức chế, cản trở hoặc điều biến CGRP R, ức chế tình trạng giãn mạch, làm giảm chứng viêm thần kinh, và giảm bớt, giảm nhẹ, điều trị, phòng ngừa hoặc làm giảm các triệu chứng của chứng đau mạn tính hoặc bệnh đau nửa đầu.

Theo một khía cạnh tiêu biểu, các protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập ức chế một cách chọn lọc thụ thể CGRP của người (khi so với thụ thể AM1, AM2 hoặc thụ thể amylin). Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập ức chế một cách chọn lọc thụ thể CGRP của người với tỷ lệ chọn lọc là từ 50 trở lên, từ 75 trở lên, từ 100 trở lên, từ 150 trở lên, từ 200 trở lên, từ 250 trở lên, từ 300 trở lên, từ 400 trở lên, từ 500 trở lên, từ 750 trở lên hoặc từ 1.000 trở lên. Mức ức chế chọn lọc có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm cAMP như được mô tả trong các ví dụ ở đây. Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập liên kết đặc hiệu với cả CRLR của người và RAMP1 của người, và không liên kết đặc hiệu với thụ thể AM1 của người, thụ thể AM2 của người hoặc thụ thể amylin của người (ví dụ, AMY1 hoặc AMY2). Ví dụ, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể liên kết đặc hiệu CGRP R của người với $K_D \leq 1\mu M$, $\leq 100nM$, $\leq 10nM$ hoặc $\leq 5nM$. Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập liên kết đặc hiệu với CGRP R của người với $K_D \leq 100nM$, $\leq 10nM$ hoặc $\leq 5nM$, như được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm liên kết FACS và được phân tích, ví dụ, bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong tài liệu Rathanaswami, et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 334 (2005) 1004–1013. Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có Ki là $\leq 100nM$, $\leq 10nM$, $\leq 1nM$, $\leq 0,5nM$ hoặc $\leq 0,1nm$ trong thử nghiệm cạnh tranh liên kết CGRP. Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có Ki là $\leq 100nM$, $\leq 50nM$, $\leq 20nM$, $\leq 10nM$, $\leq 1nM$, $\leq 0,5nM$ hoặc $\leq 0,1nM$ trong thử nghiệm cạnh tranh liên kết CGRP được đánh dấu phóng xạ ^{125}I vào các màng tế bào biểu hiện CGRP R của người, ví dụ, thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 5 ở đây.

Theo khía cạnh tiêu biểu khác, các protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập cạnh tranh để liên kết CGRP R của người, ví dụ, phần ngoại bào của CGRP R, với kháng thể tham chiếu chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:158-170 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:137-153. Theo một số phương án, sự cạnh tranh liên kết được đánh giá bằng cách sử dụng các thử nghiệm liên kết, ví dụ, bằng cách sử dụng phép phân tích

Biacore, ví dụ, như được mô tả trong ví dụ 7 ở đây. Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập cạnh tranh để liên kết CGRP R của người với kháng thể tham chiếu, kháng thể tham chiếu này chứa (i) vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:161, 163, 164, 166 và 168; và (ii) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số: 140, 143, 146, 148 và 150. Theo các phương án cụ thể, kháng thể tham chiếu chứa (i) chuỗi nặng được xác định bằng trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:32, 34, 35, 37 và 39; và (ii) chuỗi nhẹ được xác định bằng trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số: 15, 18, 21, 23 và 25. Theo các phương án cụ thể hơn, kháng thể tham chiếu chứa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được xác định bằng một trong số các cặp trình tự dưới đây: (i) SEQ ID số: 32 và SEQ ID số: 15; (ii) SEQ ID số: 34 và SEQ ID số: 18; (iii) SEQ ID số: 35 và SEQ ID số: 21; (iv) SEQ ID số: 37 và SEQ ID số: 23; và (v) SEQ ID số: 39 và SEQ ID số: 25. Theo một phương án như vậy, kháng thể tham chiếu chứa chuỗi nặng chứa SEQ ID số: 32 và chuỗi nhẹ chứa SEQ ID số: 15. Theo phương án như vậy khác, kháng thể tham chiếu chứa chuỗi nặng chứa SEQ ID số: 34 và chuỗi nhẹ chứa SEQ ID số: 18. Theo phương án như vậy khác, kháng thể tham chiếu chứa chuỗi nặng chứa SEQ ID số: 35 và chuỗi nhẹ chứa SEQ ID số: 21. Theo phương án như vậy khác, kháng thể tham chiếu chứa chuỗi nặng chứa SEQ ID số: 37 và chuỗi nhẹ chứa SEQ ID số: 23. Theo phương án như vậy khác, kháng thể tham chiếu chứa chuỗi nặng chứa SEQ ID số: 39 và chuỗi nhẹ chứa SEQ ID số: 25.

Theo các phương án cụ thể, các protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập mà cạnh tranh để liên kết với CGRP R của người cũng ức chế một cách chọn lọc thụ thể CGRP của người, ví dụ, với tỷ lệ chọn lọc là từ 100 trở lên, từ 250 trở lên, từ 500 trở lên, từ 750 trở lên, từ 1.000 trở lên, từ 2.500 trở lên, từ 5.000 trở lên hoặc từ 10.000 trở lên, và tính chọn lọc này có thể được xác định, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm cAMP như được mô tả trong các ví dụ ở đây. Theo các phương án có liên quan, các protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập mà cạnh tranh để liên kết với CGRP R của người sẽ liên kết đặc hiệu vào CGRP R của người với K_D ≤1μM, ≤100nM, ≤10nM hoặc ≤5 nM, ví dụ, như được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm liên kết FACS và được phân tích, ví dụ,

bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong tài liệu Rathanaswami, et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 334 (2005) 1004–1013. Theo các phương án có liên quan, các protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập mà cạnh tranh để liên kết với CGRP R của người có Ki là ≤100nM, ≤10nM, ≤1nM, ≤0,5nM hoặc ≤0,1nM trong thử nghiệm cạnh tranh liên kết CGRP, ví dụ, trong thử nghiệm cạnh tranh liên kết CGRP được đánh dấu phóng xạ ^{125}I vào các màng tế bào biểu hiện CGRP R của người, ví dụ, thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 5 ở đây.

Theo phương án bất kỳ trong số các phương án được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập mà cạnh tranh để liên kết với CGRP R của người có thể là, ví dụ, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể tái tổ hợp, kháng thể của người (ví dụ, kháng thể hoàn toàn của người), kháng thể được làm giống như của người, kháng thể thể khảm, kháng thể đa đặc hiệu, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó. Ngoài ra, đoạn kháng thể của protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập mà cạnh tranh để liên kết với CGRP R của người có thể là đoạn Fab, và đoạn Fab', đoạn $F(ab')_2$, đoạn Fv, đoạn Fv chuỗi đơn dạng đime (diabody) hoặc phân tử kháng thể chuỗi đơn; và có thể là, ví dụ, kháng thể đơn dòng của người, ví dụ, kháng thể typ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4. Theo các phương án cụ thể, các protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập mà cạnh tranh để liên kết với CGRP R của người có thể là các protein liên kết kháng nguyên trung hòa.

Theo các khía cạnh tiêu biểu cụ thể, các protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập được mô tả, ví dụ, các kháng thể đã được phân lập hoặc các đoạn của chúng, chứa (A) một hoặc nhiều vùng xác định bổ sung (CDRH) của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm: (i) CDRH1 có SEQ ID số:134; (ii) CDRH2 có SEQ ID số:135; (iii) CDRH3 có SEQ ID số:136; và tùy ý (iv) CDRH nêu trong (i), (ii) và (iii) mà chứa một hoặc nhiều đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin mà tổng cộng không nhiều hơn bốn axit amin; (B) một hoặc nhiều vùng xác định bổ sung (CDRL) của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm: (i) CDRL1 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:107, 111 và 118; (ii) CDRL2 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số: 108, 112 và 119; (iii) CDRL3 được

chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số: 109, 113 và 120; và tùy ý (iv) CDRL nêu trong (i), (ii) và (iii) mà chứa một hoặc nhiều, ví dụ, một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn nữa, đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin mà tổng cộng không nhiều hơn bốn axit amin; hoặc (C) một hoặc nhiều CDRH chuỗi nặng nêu trong (A) và một hoặc nhiều CDRL chuỗi nhẹ nêu trong (B).

Theo một số phương án, các CDRH còn được chọn từ nhóm bao gồm: (i) CDRH1 có SEQ ID số:131; (ii) CDRH2 có SEQ ID số:132; (iii) CDRH3 có SEQ ID số:133; và tùy ý (iv) CDRH nêu trong (i), (ii) và (iii) mà chứa một hoặc nhiều, ví dụ, một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn nữa, đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin mà tổng cộng không nhiều hơn ba axit amin. Theo các phương án có liên quan, các CDRH còn được chọn từ nhóm bao gồm: (i) CDRH1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:76, 88, 100, 121, 125 và 128; (ii) CDRH2 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số: 89, 101, 122, 124, 126 và 129; (iii) CDRH3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số: 78, 90, 102, 123, 127 và 130; và tùy ý (iv) CDRH nêu trong (i), (ii) và (iii) mà chứa một hoặc nhiều, ví dụ, một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn nữa, đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin mà tổng cộng không nhiều hơn hai axit amin. Theo các phương án có liên quan khác, các CDRH còn được chọn từ nhóm bao gồm: (i) CDRH1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số: 73, 76, 79, 82, 85, 88, 92, 97 và 100; (ii) CDRH2 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số: 74, 77, 80, 83, 86, 89, 91, 93, 95, 98, 101 và 129; (iii) CDRH3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số: 75, 78, 81, 84, 87, 90, 96, 99, 102 và 123; và tùy ý (iv) CDRH nêu trong (i), (ii) và (iii) mà chứa một hoặc nhiều, ví dụ, một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn nữa, đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin mà tổng cộng không nhiều hơn hai axit amin.

Theo một số phương án, các CDRL còn được chọn từ nhóm bao gồm: (i) CDRL1 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:107, 111 và 115; (ii) CDRL2 được chọn từ

nhóm bao gồm các SEQ ID số: 108, 112 và 116; (iii) CDRL3 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số: 109, 113 và 117; và tùy ý (iv) CDRL nêu trong (i), (ii) và (iii) mà chứa một hoặc nhiều, ví dụ, một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn nữa, đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo một số phương án, các đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin tổng cộng không nhiều hơn ba axit amin đối với mỗi CDRL. Theo một số phương án, các đột biến thế axit amin, đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin tổng cộng không nhiều hơn hai axit amin đối với mỗi CDRL. Theo các phương án có liên quan, các CDRL còn được chọn từ nhóm bao gồm: (i) CDRL1 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số: 42, 45, 51, 57, 62, 69, 103 và 110; (ii) CDRL2 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số: 43, 52, 55, 58, 63, 70, 104, 108 và 114; (iii) CDRL3 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số: 44, 47, 53, 56, 59, 64, 105 và 106; và tùy ý (iv) CDRL nêu trong (i), (ii) và (iii) mà chứa một hoặc nhiều, ví dụ, một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn nữa, đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin mà tổng cộng không nhiều hơn hai axit amin. Theo các phương án bổ sung có liên quan, các CDRL còn được chọn từ nhóm bao gồm: (i) CDRL1 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số: 42, 45, 48, 51, 54, 57, 62, 65, 66 và 69; (ii) CDRL2 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số: 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 63, 67 và 70; (iii) CDRL3 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số: 44, 47, 50, 53, 56, 59, 64, 68, 71 và 72; và tùy ý (iv) CDRL nêu trong (i), (ii) và (iii) mà chứa một hoặc nhiều, ví dụ, một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn nữa, đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo một phương án, tổng số các đột biến thế axit amin, đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin là không nhiều hơn hai axit amin đối với mỗi CDR. Theo phương án khác, đột biến axit amin là đột biến thế bảo thủ.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa ít nhất một hoặc hai CDRH bất kỳ trong số các CDRH nêu trong (A) trên đây và ít nhất một hoặc hai CDRL bất kỳ trong số các CDRL nêu trong (B) trên đây. Theo phương án khác nữa,

protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (i) ít nhất ba CDRH bất kỳ trong số các CDRH nêu trong (A) trên đây, trong đó ba CDRH này bao gồm CDRH1, CDRH2 và CDRH3, và (ii) ít nhất ba CDRL bất kỳ trong số các CDRL nêu trong (B) trên đây, trong đó ba CDRL này bao gồm CDRL1, CDRL2 và CDRL3. Theo các phương án khác nữa, các protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập được mô tả trên đây chứa trình tự axit amin thứ nhất chứa ít nhất một CDRH và trình tự axit amin thứ hai chứa ít nhất một CDRL. Theo một phương án, trình tự axit amin thứ nhất và trình tự axit amin thứ hai được liên kết cộng hóa trị với nhau.

Theo khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa CDRH1, CDRH2 và CDRH3. Theo một phương án, CDRH1 chứa SEQ ID số:73, CDRH2 chứa SEQ ID số:74 và CDRH3 chứa SEQ ID số:75. Theo phương án khác, CDRH1 chứa SEQ ID số:76, CDRH2 chứa SEQ ID số:77 và CDRH3 chứa SEQ ID số:78. Theo phương án khác, CDRH1 chứa SEQ ID số:79, CDRH2 chứa SEQ ID số:80 và CDRH3 chứa SEQ ID số:81. Theo phương án khác, CDRH1 chứa SEQ ID số:82, CDRH2 chứa SEQ ID số:83 và CDRH3 chứa SEQ ID số:84. Theo phương án khác, CDRH1 chứa SEQ ID số:85, CDRH2 chứa SEQ ID số:86 và CDRH3 chứa SEQ ID số:87. Theo phương án khác, CDRH1 chứa SEQ ID số:88, CDRH2 chứa SEQ ID số:89 và CDRH3 chứa SEQ ID số:90. Theo phương án khác, CDRH1 chứa SEQ ID số:76, CDRH2 chứa SEQ ID số:91 và CDRH3 chứa SEQ ID số:78. Theo phương án khác, CDRH1 chứa SEQ ID số:92, CDRH2 chứa SEQ ID số:93 và CDRH3 chứa SEQ ID số:94. Theo phương án khác, CDRH1 chứa SEQ ID số:76, CDRH2 chứa SEQ ID số:95 và CDRH3 chứa SEQ ID số:78. Theo phương án khác, CDRH1 chứa SEQ ID số:73, CDRH2 chứa SEQ ID số:74 và CDRH3 chứa SEQ ID số:96. Theo phương án khác, CDRH1 chứa SEQ ID số:97, CDRH2 chứa SEQ ID số:98 và CDRH3 chứa SEQ ID số:99. Theo phương án khác, CDRH1 chứa SEQ ID số:100, CDRH2 chứa SEQ ID số:101 và CDRH3 chứa SEQ ID số:102.

Theo khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa trình tự CDRL1, trình tự CDRL2 và trình tự CDRL3. Theo một phương án, CDRL1 chứa SEQ ID

số:42, CDRL2 chứa SEQ ID số:43 và CDRL3 chứa SEQ ID số:44. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:45, CDRL2 chứa SEQ ID số:46 và CDRL3 chứa SEQ ID số:47. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:48, CDRL2 chứa SEQ ID số:49 và CDRL3 chứa SEQ ID số:50. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:51, CDRL2 chứa SEQ ID số:52 và CDRL3 chứa SEQ ID số:53. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:54, CDRL2 chứa SEQ ID số:55 và CDRL3 chứa SEQ ID số:56. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:57, CDRL2 chứa SEQ ID số:58 và CDRL3 chứa SEQ ID số:59. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:60, CDRL2 chứa SEQ ID số:55 và CDRL3 chứa SEQ ID số:56. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:45, CDRL2 chứa SEQ ID số:61 và CDRL3 chứa SEQ ID số:47. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:62, CDRL2 chứa SEQ ID số:63 và CDRL3 chứa SEQ ID số:64. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:65, CDRL2 chứa SEQ ID số:55 và CDRL3 chứa SEQ ID số:56. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:66, CDRL2 chứa SEQ ID số:67 và CDRL3 chứa SEQ ID số:68. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:69, CDRL2 chứa SEQ ID số:70 và CDRL3 chứa SEQ ID số:71. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:69, CDRL2 chứa SEQ ID số:70 và CDRL3 chứa SEQ ID số:72.

Theo khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa trình tự CDRL1, trình tự CDRL2, trình tự CDRL3, trình tự CDRH1, trình tự CDRH2 và trình tự CDRH3. Theo một phương án, CDRL1 chứa SEQ ID số:42, CDRL2 chứa SEQ ID số:43, CDRL3 chứa SEQ ID số:44, CDRH1 chứa SEQ ID số:73, CDRH2 chứa SEQ ID số:74 và CDRH3 chứa SEQ ID số:75. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:45, CDRL2 chứa SEQ ID số:46, CDRL3 chứa SEQ ID số:47, CDRH1 chứa SEQ ID số:76, CDRH2 chứa SEQ ID số:77 và CDRH3 chứa SEQ ID số:78. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:48, CDRL2 chứa SEQ ID số:49, CDRL3 chứa SEQ ID số:50, CDRH1 chứa SEQ ID số:79, CDRH2 chứa SEQ ID số:80 và CDRH3 chứa SEQ ID số:81. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:51, CDRL2 chứa SEQ ID số:52, CDRL3 chứa SEQ ID số:53, CDRH1 chứa SEQ ID số:82, CDRH2 chứa SEQ ID số:83 và CDRH3 chứa SEQ ID số:84. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:54, CDRL2 chứa SEQ ID số:55,

CDRL3 chứa SEQ ID số:56, CDRH1 chứa SEQ ID số:85, CDRH2 chứa SEQ ID số:86 và CDRH3 chứa SEQ ID số:87. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:57, CDRL2 chứa SEQ ID số:58, CDRL3 chứa SEQ ID số:59, CDRH1 chứa SEQ ID số:88, CDRH2 chứa SEQ ID số:89 và CDRH3 chứa SEQ ID số:90. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:60, CDRL2 chứa SEQ ID số:55, CDRL3 chứa SEQ ID số:56, CDRH1 chứa SEQ ID số:85, CDRH2 chứa SEQ ID số:86 và CDRH3 chứa SEQ ID số:87. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:45, CDRL2 chứa SEQ ID số:61, CDRL3 chứa SEQ ID số:47, CDRH1 chứa SEQ ID số:76, CDRH2 chứa SEQ ID số:91 và CDRH3 chứa SEQ ID số:78. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:62, CDRL2 chứa SEQ ID số:63, CDRL3 chứa SEQ ID số:64, CDRH1 chứa SEQ ID số:92, CDRH2 chứa SEQ ID số:93 và CDRH3 chứa SEQ ID số:94. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:45, CDRL2 chứa SEQ ID số:61, CDRL3 chứa SEQ ID số:47, CDRH1 chứa SEQ ID số:76, CDRH2 chứa SEQ ID số:95 và CDRH3 chứa SEQ ID số:78. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:65, CDRL2 chứa SEQ ID số:55, CDRL3 chứa SEQ ID số:56, CDRH1 chứa SEQ ID số:85, CDRH2 chứa SEQ ID số:86 và CDRH3 chứa SEQ ID số:87. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:42, CDRL2 chứa SEQ ID số:43, CDRL3 chứa SEQ ID số:44, CDRH1 chứa SEQ ID số:73, CDRH2 chứa SEQ ID số:74 và CDRH3 chứa SEQ ID số:96. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:66, CDRL2 chứa SEQ ID số:67, CDRL3 chứa SEQ ID số:68, CDRH1 chứa SEQ ID số:97, CDRH2 chứa SEQ ID số:98 và CDRH3 chứa SEQ ID số:99. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:69, CDRL2 chứa SEQ ID số:70, CDRL3 chứa SEQ ID số:71, CDRH1 chứa SEQ ID số:100, CDRH2 chứa SEQ ID số:101 và CDRH3 chứa SEQ ID số:102. Theo phương án khác, CDRL1 chứa SEQ ID số:69, CDRL2 chứa SEQ ID số:70, CDRL3 chứa SEQ ID số:72, CDRH1 chứa SEQ ID số:100, CDRH2 chứa SEQ ID số:101 và CDRH3 chứa SEQ ID số:102.

Theo phương án bất kỳ trong số các phương án xác định trình tự được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể là, ví dụ, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể tái tổ hợp, kháng thể của người (ví dụ, kháng thể hoàn toàn của người), kháng thể được làm giống như của người, kháng thể thể khảm, kháng thể đa đặc hiệu, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó. Ngoài ra, đoạn kháng thể của protein liên kết

kháng nguyên đã được phân lập có thể là đoạn Fab, và đoạn Fab', đoạn $F(ab')_2$, đoạn Fv, đoạn Fv chuỗi đơn dạng đime (diabody) hoặc phân tử kháng thể chuỗi đơn. Ví dụ, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể là kháng thể đơn dòng của người, và có thể là, ví dụ, kháng thể typ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4. Ngoài ra, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể là protein liên kết kháng nguyên trung hòa.

Theo phương án bất kỳ trong số các phương án xác định trình tự được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể liên kết đặc hiệu với cả CRLR của người và RAMP1 của người và không liên kết đặc hiệu với thụ thể AM1, AM2 hoặc thụ thể amylin của người (ví dụ, AMY1), ví dụ, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể liên kết đặc hiệu với CGRP R của người với $K_D \leq 1\mu M$, $\leq 100nM$, $\leq 10nM$ hoặc ≤ 5 nM, ví dụ, như được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm liên kết FACS và được phân tích, ví dụ, bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong tài liệu Rathanaswami, et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 334 (2005) 1004–1013. Theo phương án bất kỳ trong số các phương án xác định trình tự được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể ức chế một cách chọn lọc CGRP R của người, so với thụ thể AM1, AM2 hoặc thụ thể AMY1 của người, ví dụ, với tỷ lệ chọn lọc là từ 100 trở lên, từ 250 trở lên, từ 500 trở lên, từ 750 trở lên, từ 1.000 trở lên, từ 2.500 trở lên, từ 5.000 trở lên hoặc từ 10.000 trở lên, trong đó mức ức chế chọn lọc có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm cAMP như được mô tả trong các ví dụ ở đây. Theo phương án bất kỳ trong số các phương án xác định trình tự được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể có Ki là $\leq 100nM$, $\leq 10nM$, $\leq 1nM$, $\leq 0,5nM$ hoặc $\leq 0,1nM$ trong thử nghiệm cạnh tranh liên kết CGRP, ví dụ, trong thử nghiệm cạnh tranh liên kết CGRP được đánh dấu phóng xạ ^{125}I vào các màng tế bào biểu hiện CGRP R của người, ví dụ, thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 5 ở đây.

Một nhóm phương án khác đề xuất các protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập mà chứa một hoặc tổ hợp của các CDR có các trình tự liên ứng được mô tả dưới đây, và tùy ý, liên kết với CGRP R của người. Các trình tự liên ứng này thu được từ các

trình tự CDR có liên quan về phương diện phát sinh loài. Theo một khía cạnh, các CDR từ các nhóm khác nhau có thể được trộn lẫn và ghép cặp trong protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập cụ thể bất kỳ mà liên kết với CGRP R của người. Theo khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên chứa các CDR chuỗi nặng và CDR chuỗi nhẹ thu được từ cùng một nhóm các dòng kháng thể mà có liên quan về phương diện phát sinh loài. Các trình tự liên ứng CDR tiêu biểu là như sau:

Trình tự liên ứng K1

CDR1 RASQGIRX_1DLG (SEQ ID số:103), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm N và K.

CDR2 X_1ASSLQS (SEQ ID số:104), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm A và G.

CDR3 LQYNX_1X_2PWT (SEQ ID số:105), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm I và S, và X_2 được chọn từ nhóm bao gồm Y và F.

Trình tự liên ứng K4

CDR3 QQYGNSLX_1R (SEQ ID số:106), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm S và C.

Trình tự liên ứng K1,4

CDR1 RASQ$X_1X_2X_3X_4$GX_5LX_6 (SEQ ID số:107), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm S và G, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm V và I, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm S và R, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm S, N và K, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm Y và D, và X_6 được chọn từ nhóm bao gồm T và G.

CDR2 X_1ASS$X_2X_3X_4$ (SEQ ID số:108), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm G và A, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm R và L, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm A và Q, và X_4 được chọn từ nhóm bao gồm T và S.

CDR3 X_1QY$X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ (SEQ ID số:109), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm Q và L, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm G và N, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm N và T,

X_4 được chọn từ nhóm bao gồm S, Y và F, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm L và P, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm C, W và S, và X_7 được chọn từ nhóm bao gồm R và T.

Trình tự liên ứng K3

CDR1 KSSQSLLHSX_1GX_2X_3YLY (SEQ ID số:110), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm D và A, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm R và K, và X_3 được chọn từ nhóm bao gồm N và T.

Trình tự liên ứng K2,3

CDR1 X_1SSQSLLHSX_2GX_3X_4YLX_5 (SEQ ID số:111), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm R và K, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm F, D và A, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm Y, R và K, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm N và T, và X_5 được chọn từ nhóm bao gồm D và Y.

CDR2 X_1X_2SNRX_3S (SEQ ID số:112), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm L và E, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm G và V, và X_3 được chọn từ nhóm bao gồm A và F.

CDR3 MQ$X_1X_2X_3X_4$PX_5T (SEQ ID số:113), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm A và S, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm L và F, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm Q và P, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm T và L, và X_5 được chọn từ nhóm bao gồm F và L.

Trình tự liên ứng Lm3

CDR2 RX_1NQRPS (SEQ ID số:114), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm N và S.

Trình tự liên ứng Lm1,2,3

CDR1 SGSSSNIGX_1NX_2VX_3 (SEQ ID số:115), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm N và S, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm Y và T, và X_3 được chọn từ nhóm bao gồm S, N và Y.

CDR2 X_1X_2NX_3RPS (SEQ ID số:116), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm D, T và R, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm N và S, và X_3 được chọn từ nhóm bao gồm K và Q.

CDR3 $X_1X_2X_3$DX_4X_5LX_6X_7VV (SEQ ID số:117), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm G và A, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm T và A, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm W

và R, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm S và D, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm R và S, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm S và N, và X_7 được chọn từ nhóm bao gồm A và G.

Trình tự liên ứng LmAll

CDR1 $X_1GX_2X_3SX_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ (SEQ ID số:118), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm S và Q, X_2 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là S, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm S và D, X_4 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là N, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm I và L, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm G và R, X_7 được chọn từ nhóm bao gồm N và S, X_8 được chọn từ nhóm bao gồm N và F, X_9 được chọn từ nhóm bao gồm Y và T, X_{10} được chọn từ nhóm bao gồm V và A, và X_{11} được chọn từ nhóm bao gồm S, N và Y.

CDR2 $X_1X_2NX_3RPS$ (SEQ ID số:119), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm D,G, T và R, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm N, K và S, và X_3 được chọn từ nhóm bao gồm K, N và Q.

CDR3 $X_1X_2X_3DX_4X_5X_6X_7X_8X_9V$ (SEQ ID số:120), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm G, N và A, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm T, S và A, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm W và R, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm S và D, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm R và S, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm L và V, X_7 được chọn từ nhóm bao gồm S, Y và N, X_8 được chọn từ nhóm bao gồm A, H và G, và X_9 được chọn từ nhóm bao gồm V và L.

Trình tự liên ứng HC1

CDR1 X_1YYMX_2 (SEQ ID số:121), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm G và D, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm H và Y.

CDR2 $WIX_1PNSGGTNYAQKFQG$ (SEQ ID số:122), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm N và S.

CDR3 $X_1X_2X_3SX_4X_5X_6X_7X_8GX_9X_{10}X_{11}X_{12}YYX_{13}GMDV$ (SEQ ID số:123), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm D và G, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm Q và G, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm M và Y, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm I và G, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm I và Y, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm M và A, X_7 có mặt hoặc không có

mặt, và nếu có mặt, là L, X_8 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là R, X_9 được chọn từ nhóm bao gồm V và L, X_{10} được chọn từ nhóm bao gồm F và Y, X_{11} được chọn từ nhóm bao gồm P và S, X_{12} được chọn từ nhóm bao gồm P và H, và X_{13} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là Y.

Trình tự liên ứng HC2

CDR2 RIKSX_1TDGGTTDYX_2APVKG (SEQ ID số:124), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm K và T, và X_2 được chọn từ nhóm bao gồm T và A.

Trình tự liên ứng HC3

CDR1 X_1YX_2MX_3 (SEQ ID số:125), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm T và S, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm S và A, và X_3 được chọn từ nhóm bao gồm N và S.

CDR2 X_1ISX_2S$X_3X_4X_5X_6$YYADSVKG (SEQ ID số:126), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm S và A, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm S và G, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm S và G, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm S và G, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm Y và R, và X_6 được chọn từ nhóm bao gồm R và T.

CDR3 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$PYSX_8X_9WYDYYYGMDV (SEQ ID số:127), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm E và D, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm G và Q, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm V và R, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm S và E, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm G và V, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm S và G, X_7 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là S, X_8 được chọn từ nhóm bao gồm I và S, và X_9 được chọn từ nhóm bao gồm S và G.

Trình tự liên ứng HC4

CDR1 SX_1GMH (SEQ ID số:128), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm F và Y.

CDR2 VISX_1DGSX_2KYX_3X_4DSVKG (SEQ ID số:129), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm F và Y, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm I và H, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm S và Y, và X_4 được chọn từ nhóm bao gồm V và A.

CDR3 $X_1RX_2X_3X_4X_5X_6SX_7X_8YYX_9X_{10}X_{11}YYGX_{12}X_{13}V$ (SEQ ID số:130), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm D và E, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm L và K, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm N và R, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm Y và V, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm Y và T, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm D và M, X_7 được chọn từ nhóm bao gồm S và T, X_8 được chọn từ nhóm bao gồm G và L, X_9 được chọn từ nhóm bao gồm H và Y, X_{10} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là Y, X_{11} được chọn từ nhóm bao gồm K và F, X_{12} được chọn từ nhóm bao gồm M và L, và X_{13} được chọn từ nhóm bao gồm A và D.

Trình tự liên ứng HCA

CDR1 $X_1X_2X_3MX_4$ (SEQ ID số:131), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm N và S, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm A, Y và F, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm W, A và G, và X_4 được chọn từ nhóm bao gồm S và H.

CDR2 $X_1IX_2X_3X_4X_5X_6GX_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}VKG$ (SEQ ID số:132), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm R, A và V, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm K, S và W, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm S, G, F và Y, X_4 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm K và T, X_5 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là T, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm D và S, X_7 được chọn từ nhóm bao gồm G và S, X_8 được chọn từ nhóm bao gồm T, R, I, N và H, X_9 được chọn từ nhóm bao gồm T và K, X_{10} được chọn từ nhóm bao gồm D và Y, X_{11} được chọn từ nhóm bao gồm Y và S, X_{12} được chọn từ nhóm bao gồm T, A và V, X_{13} được chọn từ nhóm bao gồm A và D, và X_{14} được chọn từ nhóm bao gồm P và S.

CDR3 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}GX_{18}X_{19}V$ (SEQ ID số:133), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm D, A và E, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm R, Q và G, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm T, R, L, G và K, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm G, E, N, I và R, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm Y, V và A, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm S, G, Y, A và T, X_7 được chọn từ nhóm bao gồm I, P, D, A và M, X_8 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm S và Y, X_9 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm W, S và T, X_{10} được chọn từ nhóm

bao gồm S, G và L, X_{11} được chọn từ nhóm bao gồm S, G, L và Y, X_{12} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm W và Y, X_{13} được chọn từ nhóm bao gồm Y và H, X_{14} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm Y và D, X_{15} được chọn từ nhóm bao gồm Y, K và F, X_{16} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là Y, X_{17} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là Y, X_{18} được chọn từ nhóm bao gồm M và L, và X_{19} được chọn từ nhóm bao gồm D và A.

Trình tự liên ứng HCB

CDR1 $X_1X_2X_3X_4X_5$ (SEQ ID số:134), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm N, G, D, S và A, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm A, F và Y, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm W, Y, A và G, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm M và L, và X_5 được chọn từ nhóm bao gồm S và H.

CDR2 $X_1IX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}G$ (SEQ ID số:135), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm R, W, A, V, S và F, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm K, N, S, W và R, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm S, P, G, F và Y, X_4 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm K, T và R, X_5 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm T và A, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm D, N, H, S và Y, X_7 được chọn từ nhóm bao gồm G và S, X_8 được chọn từ nhóm bao gồm G và S, X_9 được chọn từ nhóm bao gồm T, G, R, I, N, H và Y, X_{10} được chọn từ nhóm bao gồm T, K, R và P, X_{11} được chọn từ nhóm bao gồm D, N, Y và E, X_{12} được chọn từ nhóm bao gồm Y và S, X_{13} được chọn từ nhóm bao gồm T, A và V, X_{14} được chọn từ nhóm bao gồm A, Q và D, X_{15} được chọn từ nhóm bao gồm P, K và S, X_{16} được chọn từ nhóm bao gồm V và F, và X_{17} được chọn từ nhóm bao gồm K và Q.

CDR3 $X_1X_2X_3X_4X_5SX_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}GX_{17}X_{18}V$ (SEQ ID số:136), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm D, G, A và E, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm R, G và Q, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm T, M, Y, R, L, G và K, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm G, S, E, N, I và R, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm Y, I, G, V và A, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm S, I, Y, G, A và T, X_7 được chọn từ nhóm bao gồm I, M, A, P và D, X_8 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm S, L và Y,

X_9 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm W, R, S và T, X_{10} được chọn từ nhóm bao gồm S, G và L, X_{11} được chọn từ nhóm bao gồm S, V, L, G và Y, X_{12} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm F, Y và W, X_{13} được chọn từ nhóm bao gồm Y, P, S và H, X_{14} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm Y, P, D và H, X_{15} được chọn từ nhóm bao gồm Y, K và F, X_{16} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là Y, X_{17} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là Y, và X_{18} được chọn từ nhóm bao gồm M và L.

Theo phương án bất kỳ trong số các phương án xác định trình tự liên ứng được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể là, ví dụ, polypeptit AVIMER, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể tái tổ hợp, kháng thể của người (ví dụ, kháng thể hoàn toàn của người), kháng thể được làm giống như của người, kháng thể thể khảm, kháng thể đa đặc hiệu, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó. Ngoài ra, đoạn kháng thể của protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể là đoạn Fab, và đoạn Fab', đoạn $F(ab')_2$, đoạn Fv, đoạn Fv chuỗi đơn dạng đime (diabody) hoặc phân tử kháng thể chuỗi đơn. Ví dụ, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể là kháng thể đơn dòng của người, và có thể là, ví dụ, kháng thể typ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4. Ngoài ra, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể là protein liên kết kháng nguyên trung hòa.

Theo phương án bất kỳ trong số các phương án xác định trình tự liên ứng được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể liên kết đặc hiệu với cả CRLR của người và RAMP1 của người và không liên kết đặc hiệu với thụ thể AM1, AM2 hoặc thụ thể amylin của người (ví dụ, AMY1), ví dụ, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể liên kết đặc hiệu với CGRP R của người với $K_D \leq 1\mu M$, $\leq 100nM$, $\leq 10nM$ hoặc $\leq 5nM$, ví dụ, như được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm liên kết FACS và được phân tích, ví dụ, bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong tài liệu Rathanaswami, et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 334 (2005) 1004–1013. Theo phương án bất kỳ trong số các phương án xác định trình tự liên ứng được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể ức chế

một cách chọn lọc CGRP R của người, so với thụ thể AM1, AM2 hoặc thụ thể AMY1 của người, ví dụ, với tỷ lệ chọn lọc là từ 100 trở lên, từ 250 trở lên, từ 500 trở lên, từ 750 trở lên, từ 1.000 trở lên, từ 2.500 trở lên, từ 5.000 trở lên hoặc từ 10.000 trở lên, trong đó mức ức chế chọn lọc có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm cAMP như được mô tả trong các ví dụ ở đây. Theo phương án bất kỳ trong số các phương án xác định trình tự liên ứng được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể có Ki là ≤100nM, ≤10nM, ≤1nM, ≤0,5nM hoặc ≤0,1nM trong thử nghiệm cạnh tranh liên kết CGRP, ví dụ, trong thử nghiệm cạnh tranh liên kết CGRP được đánh dấu phóng xạ ^{125}I vào các màng tế bào biểu hiện CGRP R của người, ví dụ, thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 5 ở đây.

Một số protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập được mô tả chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 85%, và 90% hoặc 95% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:158-170. Một số protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập được mô tả chứa trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 85%, và 90% hoặc 95% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:137-153. Một số protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập được mô tả chứa trình tự V_H mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90% hoặc 95% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:158-170, và V_L mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80%, 85%, 90% hoặc 95% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:137-153. Theo một số phương án, các protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) chứa trình tự (i) được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:158-170, hoặc (ii) như được xác định bởi (i) và chứa một hoặc nhiều (ví dụ, năm, mười, mười lăm hoặc hai mươi) đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; (B) V_L chứa trình tự (iii) được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:137-153, hoặc (iv) như được xác định bởi (iii) chứa một hoặc nhiều (ví dụ, năm, mười, mười lăm hoặc hai mươi) đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; hoặc (C) V_H nêu trong (A) và V_L nêu trong (B). Theo một số phương án, các

protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:158-170 và V_L chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:137-153.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:158, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_H chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:159, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_H chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:160, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_H chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:161, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_H chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:162, (ii) trình tự mà giống ít nhất 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_H chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:163, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95%

với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_H chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:164, (ii) trình tự mà ít nhất giống là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_H chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:165, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_H chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:166, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_H chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:167, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_H chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:168, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_H chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:169, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên

tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_H chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:170, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:137, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_L chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:138, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_L chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:139, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_L chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:140, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_L chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:141, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên

tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_L chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:142, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_L chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:143, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_L chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:144, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_L chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:145, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_L chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:146, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_L chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:147, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết

axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_L chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:148, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_L chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:149, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_L chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:150, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_L chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:151, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_L chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:152, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa V_L chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:153, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án bất kỳ trong số các phương án xác định trình tự V_L và V_H được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể là, ví dụ, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể tái tổ hợp, kháng thể của người (ví dụ, kháng thể hoàn toàn của người), kháng thể được làm giống như của người, kháng thể thể khảm, kháng thể đa đặc hiệu, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó. Ngoài ra, đoạn kháng thể của protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể là đoạn Fab, và đoạn Fab', đoạn $F(ab')_2$, đoạn Fv, đoạn Fv chuỗi đơn dạng đime (diabody) hoặc phân tử kháng thể chuỗi đơn. Ví dụ, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể là kháng thể đơn dòng của người, và có thể là, ví dụ, kháng thể typ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4. Ngoài ra, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể là protein liên kết kháng nguyên trung hòa.

Theo phương án bất kỳ trong số các phương án xác định trình tự V_L và V_H được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể liên kết đặc hiệu với cả CRLR của người và RAMP1 của người và không liên kết đặc hiệu vào thụ thể AM1, AM2 hoặc thụ thể amylin của người (ví dụ, AMY1), ví dụ, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể liên kết đặc hiệu với CGRP R của người với $K_D \leq 1\mu M$, $\leq 100nM$, $\leq 10nM$ hoặc $\leq 5nM$, ví dụ, như được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm liên kết FACS và được phân tích, ví dụ, bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong tài liệu Rathanaswami, et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 334 (2005) 1004–1013. Theo phương án bất kỳ trong số các phương án xác định trình tự V_L và V_H được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể ức chế một cách chọn lọc CGRP R của người, so với thụ thể AM1, AM2 hoặc thụ thể AMY1 của người, ví dụ, với tỷ lệ chọn lọc là từ 100 trở lên, từ 250 trở lên, từ 500 trở lên, từ 750 trở lên, từ 1.000 trở lên, từ 2.500 trở lên, từ 5.000 trở lên hoặc từ 10.000 trở lên, trong đó mức ức chế chọn lọc có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm cAMP như được mô tả trong các ví dụ ở đây. Theo phương án bất kỳ trong số các phương án xác định trình tự V_L và V_H được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể có Ki là $\leq 100nM$, $\leq 10nM$, $\leq 1nM$, $\leq 0,5nM$ hoặc $\leq 0,1nM$ trong thử nghiệm cạnh tranh liên kết CGRP, ví dụ, trong thử nghiệm cạnh

tranh liên kết CGRP được đánh dấu phóng xạ ^{125}I vào các màng tế bào biểu hiện CGRP R của người, ví dụ, thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 5 ở đây.

Theo một khía cạnh, các protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa trình tự chuỗi nặng mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90% hoặc 95% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:29-41. Một số protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập được mô tả chứa trình tự chuỗi nhẹ mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90% hoặc 95% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:12-28. Một số protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa trình tự chuỗi nặng mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90% hoặc 95% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số: 29-41, và trình tự chuỗi nhẹ mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90% hoặc 95% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số: 12-28. Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự (i) được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số: 29-41, hoặc (ii) như được xác định bởi (i) và chứa một hoặc nhiều (ví dụ, năm, mười, mười lăm hoặc hai mươi) đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự (iii) được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số: 12-28, hoặc (iv) như được xác định bởi (iii) chứa một hoặc nhiều (ví dụ, năm, mười, mười lăm hoặc hai mươi) đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; hoặc (C) chuỗi nặng nêu trong (A) và chuỗi nhẹ nêu trong (B). Theo một số phương án, các protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa chuỗi nặng chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số: 29-41 và chuỗi nhẹ chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số: 12-28.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:29, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi

nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:12, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:30, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:13, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:31, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:14, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:32, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:15, (ii) trình tự mà

giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:33, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:16, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:29, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:17, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:34, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:18, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như

được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:33, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:19, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:29, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:20, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:35, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:21, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như

được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:36, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:22, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:37, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:23, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:38, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:23, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như

được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:33, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:24, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:39, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:25, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:40, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:26, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như

được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:41, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:27, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa (A) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:41, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin; và (B) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm (i) SEQ ID số:28, (ii) trình tự mà giống ít nhất là 90% hoặc 95% với trình tự được xác định bởi (i), và (iii) trình tự như được xác định bởi (i) chứa lên tới mười đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin.

Theo phương án bất kỳ trong số các phương án xác định trình tự chuỗi nặng và trình tự chuỗi nhẹ được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể chứa trình tự chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ đã chỉ ra, nhưng có peptit tín hiệu khác nhau hoặc không có peptit tín hiệu. Theo phương án bất kỳ trong số các phương án xác định trình tự chuỗi nặng và trình tự chuỗi nhẹ được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể là, ví dụ, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể tái tổ hợp, kháng thể của người (ví dụ, kháng thể hoàn toàn của người), kháng thể được làm giống như của người, kháng thể thể khảm, kháng thể đa đặc hiệu, hoặc đoạn liên kết kháng

nguyên của nó. Ngoài ra, đoạn kháng thể của protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể là đoạn Fab, và đoạn Fab', đoạn $F(ab')_2$, đoạn Fv, đoạn Fv chuỗi đơn dạng đime (diabody) hoặc phân tử kháng thể chuỗi đơn. Ví dụ, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể là kháng thể đơn dòng của người, và có thể là, ví dụ, kháng thể typ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4. Ngoài ra, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể là protein liên kết kháng nguyên trung hòa.

Theo phương án bất kỳ trong số các phương án xác định trình tự chuỗi nặng và trình tự chuỗi nhẹ được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể liên kết đặc hiệu với cả CRLR của người và RAMP1 của người và không liên kết đặc hiệu với thụ thể AM1, AM2 hoặc thụ thể amylin của người (ví dụ, AMY1), ví dụ, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể liên kết đặc hiệu với CGRP R của người với $K_D \leq 1\mu M$, $\leq 100nM$, $\leq 10nM$ hoặc $\leq 5nM$, ví dụ, như được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm liên kết FACS và được phân tích, ví dụ, bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong tài liệu Rathanaswami, et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 334 (2005) 1004–1013. Theo phương án bất kỳ trong số các phương án xác định trình tự chuỗi nặng và trình tự chuỗi nhẹ được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể ức chế một cách chọn lọc CGRP R của người, so với thụ thể AM1, AM2 hoặc thụ thể AMY1 của người, ví dụ, với tỷ lệ chọn lọc là từ 100 trở lên, từ 250 trở lên, từ 500 trở lên, từ 750 trở lên, từ 1.000 trở lên, từ 2.500 trở lên, từ 5.000 trở lên hoặc từ 10.000 trở lên, trong đó mức ức chế chọn lọc có thể được xác định bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm cAMP như được mô tả trong các ví dụ ở đây. Theo phương án bất kỳ trong số các phương án xác định trình tự chuỗi nặng và trình tự chuỗi nhẹ được đề cập trên đây, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể có Ki là $\leq 100nM$, $\leq 10nM$, $\leq 1nM$, $\leq 0,5nM$ hoặc $\leq 0,1nM$ trong thử nghiệm cạnh tranh liên kết CGRP, ví dụ, trong thử nghiệm cạnh tranh liên kết CGRP được đánh dấu phóng xạ ^{125}I vào các màng tế bào biểu hiện CGRP R của người, ví dụ, thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 5 ở đây.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế còn đề cập đến polynucleotit axit nucleic đã được phân lập mà mã hóa protein bất kỳ trong số các protein liên kết kháng nguyên CGRP R được tóm tắt trên đây. Theo một phương án, polynucleotit đã được phân lập chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:175, 176, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 186, 187, 188, 189, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209 và 210. Theo phương án khác, polynucleotit đã được phân lập chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:224-258. Theo phương án khác, polynucleotit đã được phân lập chứa trình tự mà có khả năng lai dưới các điều kiện lai nghiêm ngặt với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:224-258. Theo phương án khác, polynucleotit đã được phân lập chứa trình tự mà giống khoảng 80%, 85%, 90% hoặc 95% trở lên với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID số:224-258. Trong một số trường hợp, các phân tử axit nucleic đã được phân lập được liên kết theo cách có thể kiểm soát vào trình tự điều khiển. Theo các phương án có liên quan, các polynucleotit đã được phân lập được kết hợp vào vectơ biểu hiện.

Sáng chế cũng đề cập đến các dòng tế bào được biến nạp với các vectơ biểu hiện chứa các polynucleotit đã được phân lập như được mô tả trên đây. Theo một khía cạnh có liên quan, sáng chế còn đề cập đến các vectơ biểu hiện và các tế bào chủ được biến nạp hoặc được chuyển nhiễm với các vectơ biểu hiện mà chứa các phân tử axit nucleic đã được phân lập được đề cập trên đây mà mã hóa các protein liên kết kháng nguyên CGRP R được mô tả trên đây.

Theo khía cạnh khác, sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra các protein liên kết kháng nguyên này bao gồm bước tạo ra protein liên kết kháng nguyên từ tế bào chủ tiết protein liên kết kháng nguyên này. Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên được tạo ra bằng cách sử dụng chất có tính sinh miễn dịch chứa thụ thể CGRP tan được. Theo một số phương án, thụ thể CGRP tan được này thu được bằng cách đồng biểu hiện và tinh chế miền ngoại bào (ECD) đầu cuối N của CRLR của người và ECD của RAMP1 của người, ví dụ, ECD của CRLR của người chứa SEQ ID số: 6 và ECD của RAMP1 chứa SEQ ID số: 8, ví dụ, như được mô tả trong các ví dụ 1 và 2 ở đây.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa ít nhất một trong số các protein liên kết kháng nguyên được tóm tắt trên đây và tá dược dược dụng. Theo một phương án, dược phẩm có thể chứa hoạt chất bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm chất đồng vị phóng xạ, nuclit phóng xạ, độc tố, hoặc chất trị liệu và nhóm hóa trị liệu.

Theo một khía cạnh, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập hữu hiệu trong việc ức chế tình trạng giãn mạch và/hoặc giảm nhẹ chứng viêm thần kinh khi được sử dụng cho bệnh nhân. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập hữu hiệu trong việc làm giảm tần suất và/hoặc mức độ trầm trọng của các bệnh đau đầu, ví dụ, bệnh đau nửa đầu. Ví dụ, protein liên kết kháng nguyên có thể được sử dụng làm chất điều trị khẩn cấp bệnh đau nửa đầu, và/hoặc làm chất điều trị dự phòng để phòng ngừa hoặc làm giảm tần suất và/hoặc mức độ trầm trọng của các triệu chứng, cụ thể là các triệu chứng đau, gắn liền với cơn đau nửa đầu.

Các khía cạnh khác còn đề xuất ít nhất một protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập được tóm tắt trên đây để sử dụng trong phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa tình trạng bệnh gắn liền với CGRP R ở bệnh nhân. Theo một phương án, tình trạng bệnh này là bệnh đau đầu, ví dụ, bệnh đau nửa đầu hoặc bệnh đau đầu từng cơn hoặc dạng đau khác, ví dụ, chứng đau mạn tính; theo phương án khác, tình trạng bệnh là bệnh đái tháo đường (typ II); theo phương án khác, tình trạng bệnh là chứng viêm, cụ thể là, chứng viêm thần kinh; theo phương án khác, tình trạng bệnh là rối loạn tim mạch; theo phương án khác, tình trạng bệnh là tình trạng loạn huyết động lực gắn liền với sự nhiễm nội độc tố huyết và nhiễm khuẩn; theo phương án khác, tình trạng bệnh là tình trạng giãn mạch.

Theo khía cạnh khác, sáng chế còn đề cập đến ít nhất một protein liên kết kháng nguyên được đề xuất ở đây và/hoặc được tóm tắt trên đây để sử dụng trong phương pháp ức chế sự liên kết của CGRP với CGRP R của người, ví dụ, phần ngoại bào của CGRP R, ở bệnh nhân.

Các khía cạnh này và các khía cạnh khác sẽ được mô tả chi tiết hơn ở đây. Mỗi khía cạnh trong số các khía cạnh được đề cập có thể bao hàm các phương án khác nhau được đề cập ở đây. Do đó, dự định rằng mỗi phương án trong số các phương án liên quan

đến một yếu tố hoặc tổ hợp của các yếu tố đều có thể được bao hàm trong mỗi khía cạnh đã được mô tả, và tất cả tổ hợp như vậy của các khía cạnh và các phương án nêu trên đều được xem là rõ ràng. Các dấu hiệu, các đối tượng và các ưu điểm khác của sáng chế sẽ được làm rõ trong phần mô tả chi tiết sáng chế sau đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện đoạn sắp xếp thẳng hàng các trình tự RAMP-1 từ người, khỉ đuôi dài (khỉ cynomolgus) và chuột cống.

Fig.2 thể hiện đoạn sắp xếp thẳng hàng các trình tự CRLR từ người, khỉ đuôi dài và chuột cống.

Fig.3A và Fig.3B thể hiện đoạn sắp xếp thẳng hàng trình tự dựa trên phương diện phát sinh loài của các CDR chuỗi nhẹ từ các dòng kháng thể kháng thụ thể CGRP đã nêu có các chuỗi nhẹ kapa, và các trình tự liên ứng tương ứng cụ thể.

Fig.4 thể hiện đoạn sắp xếp thẳng hàng trình tự dựa trên phương diện phát sinh loài của các CDR chuỗi nhẹ từ các dòng kháng thể kháng thụ thể CGRP đã nêu có các chuỗi nhẹ lambda, và các trình tự liên ứng tương ứng cụ thể.

Fig.5A, Fig.5B, Fig.5C, Fig.5D và Fig.5E thể hiện đoạn sắp xếp thẳng hàng trình tự dựa trên phương diện phát sinh loài của các CDR chuỗi nặng từ các dòng kháng thể kháng thụ thể CGRP đã nêu, và các trình tự liên ứng tương ứng cụ thể.

Fig.5F thể hiện các trình tự liên ứng của các CDR chuỗi nặng của kháng thể kháng thụ thể CGRP tiêu biểu được bộc lộ ở đây.

Fig.6 là đồ thị của dữ liệu từ hai thử nghiệm thể hiện phần trăm ức chế đối với quá trình liên kết phối tử được đánh dấu vào CGRP R bởi 1092 dịch nổi bề mặt của tế bào lai kháng CGRP R (các hình thoi) và 68 dịch nổi bề mặt của đối chứng âm (các hình vuông).

Fig.7A-Fig.7D thể hiện dữ liệu IC50 tiêu biểu trong thử nghiệm cAMP từ các tế bào biểu hiện thụ thể hCGRP (Fig.7A), hAM1 (Fig.7B), hAM2 (Fig.7C) và thụ thể amylin của người (Fig.7D) của ba mAb kháng CGRP R đã nêu.

Fig.8 thể hiện một ví dụ về dữ liệu liên kết ^{125}I-CGRP như có thể được sử dụng để xác định Ki của mAb đối với thụ thể CGRP của người.

Fig.9A-Fig.9D thể hiện dữ liệu cạnh tranh Biacore của các kháng thể đã chọn được bộc lộ ở đây.

Fig.10 thể hiện sự xác định hằng số Kd trong thử nghiệm FACS của mAb 12G8.

Fig.11 thể hiện đoạn sắp xếp thẳng hàng các trình tự RAMP1 của khỉ đuôi dài, người, thể khảm của người, chuột cống và khỉ redut.

Fig.12A-Fig.12B thể hiện đoạn xếp thẳng hàng các trình tự CRLR của người, khỉ đuôi dài, khỉ redut, chuột cống, thể khảm của người và trình tự CRLR liên ứng.

Fig.13A-Fig.13C thể hiện dữ liệu FACS tiêu biểu của các thụ thể CGRP thể khảm khác nhau liên kết vào các kháng thể kháng CGRP R.

Fig.14 thể hiện các bản đồ peptit thu được từ các sản phẩm phân giải bởi AspN của CGRP R đơn lẻ (phổ sắc ký A) và từ sản phẩm phân giải của mẫu đối chứng chứa kháng thể đơn dòng 12G8 của CGRP R (phổ sắc ký B).

Fig.15 thể hiện các sản phẩm phân giải bởi AspN của CGRP R trong sự có mặt của kháng thể trung hòa CGRP R với các nồng độ khác nhau.

Fig.16 thể hiện các sản phẩm phân giải bởi AspN của CGRP R trong sự có mặt của kháng thể trung hòa CGRP R, 4E4, với các nồng độ khác nhau.

Fig.17 thể hiện cường độ nhuộm hóa mô miễn dịch của các tế bào biểu hiện các hợp phần thụ thể khác nhau với kháng thể 32H7.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các đề mục của từng phần được sử dụng ở đây chỉ nhằm mục đích tạo bố cục và không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của đối tượng được mô tả.

Trừ khi được định nghĩa theo cách khác trong bản mô tả này, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này sẽ có nghĩa mà thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ngoài ra, trừ khi văn cảnh yêu cầu theo

cách khác, các thuật ngữ dạng số ít sẽ bao gồm cả dạng số nhiều và các thuật ngữ dạng số nhiều sẽ bao gồm cả dạng số ít.

Nhìn chung, các danh pháp được sử dụng có liên quan đến, và các kỹ thuật về, việc nuôi cấy tế bào và mô, sinh học phân tử, miễn dịch học, vi sinh vật học, di truyền học và hóa học protein và hóa học axit nucleic và phép lai được mô tả ở đây là các danh pháp và các kỹ thuật đã biết rõ và thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp và các kỹ thuật nêu trong bản mô tả này thường được thực hiện theo các phương pháp thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và như được mô tả trong các tài liệu tham khảo khái quát và các tài liệu tham khảo cụ thể hơn mà được trích dẫn và bàn luận trong suốt bản mô tả này trừ khi được nêu khác đi. Xem, ví dụ, tài liệu Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), và Harlow và Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các phản ứng enzym và các kỹ thuật tinh chế được thực hiện theo hướng dẫn kỹ thuật của nhà sản xuất, như thường được thực hiện trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc như được mô tả ở đây. Các thuật ngữ được sử dụng có liên quan đến, và các quy trình và các kỹ thuật trong phòng thí nghiệm về, hóa phân tích, hóa hữu cơ tổng hợp, và hóa y học và hóa dược học được mô tả ở đây là các thuật ngữ, quy trình và kỹ thuật đã biết rõ và thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật chuẩn có thể được sử dụng để tổng hợp hóa học, phân tích hóa học, điều chế, bào chế và đưa dược phẩm vào cơ thể, và điều trị bệnh nhân.

Cần phải hiểu rằng sáng chế này không bị giới hạn ở các phương pháp, quy trình và chất phản ứng cụ thể, v.v, được mô tả ở đây và như vậy, có thể thay đổi. Các thuật ngữ được sử dụng ở đây chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không có dự định làm giới hạn phạm vi của sáng chế, phạm vi của sáng chế chỉ được xác định bằng các điểm yêu cầu bảo hộ.

Ngoại trừ trong các ví dụ thực hiện sáng chế, hoặc trong trường hợp có quy định khác, tất cả các con số thể hiện lượng của các thành phần hoặc các điều kiện phản ứng được sử dụng ở đây cần phải được hiểu là có thể được thay đổi trong tất cả các trường hợp bởi thuật ngữ "khoảng". Thuật ngữ "khoảng" khi được sử dụng cùng với tỷ lệ phần trăm có nghĩa là ±1%.

Các định nghĩa

Thuật ngữ "polynucleotit" hoặc "axit nucleic" bao gồm cả polyme nucleotit chuỗi đơn và polyme nucleotit chuỗi kép. Các nucleotit trong polynucleotit có thể là ribonucleotit hoặc deoxyribonucleotit hoặc dạng cải biến của một trong hai loại nucleotit này. Dạng cải biến này bao gồm dạng cải biến bazơ như dẫn xuất inosin và bromouridin, dạng cải biến riboza như 2',3'-dideoxyriboza, và dạng cải biến liên kết giữa các nucleotit như phosphothioat, phosphodithioat, phosphoselenoat, phosphodiselenoat, phosphoanilothioat, phosphoaniladat và phosphoamidat.

Thuật ngữ "oligonucleotit" có nghĩa là polynucleotit chứa từ 200 nucleotit trở xuống. Theo một số phương án, các oligonucleotit có chiều dài là từ 10 đến 60 bazơ. Theo các phương án khác, các oligonucleotit có chiều dài là 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc từ 20 đến 40 nucleotit. Các oligonucleotit có thể là chuỗi đơn hoặc chuỗi kép, ví dụ, để sử dụng trong việc tạo cấu trúc gen đột biến. Các oligonucleotit có thể là oligonucleotit có nghĩa hoặc oligonucleotit đối nghĩa. Oligonucleotit có thể bao gồm chất đánh dấu, bao gồm chất đánh dấu phóng xạ, chất đánh dấu huỳnh quang, hapten hoặc chất đánh dấu có tính kháng nguyên, dùng cho thử nghiệm phát hiện. Các oligonucleotit có thể được sử dụng, ví dụ, làm các đoạn mồi PCR, các đoạn mồi nhân dòng hoặc các đầu dò lai.

"Phân tử axit nucleic đã được phân lập" có nghĩa là ADN hoặc ARN có nguồn gốc từ hệ gen, ARN thông tin, ADN bổ sung hoặc có nguồn gốc tổng hợp hoặc tổ hợp của chúng mà không kết hợp với tất cả hoặc một phần của polynucleotit mà trong đó polynucleotit đã được phân lập này được tìm thấy trong tự nhiên, hoặc được liên kết vào polynucleotit mà nó không liên kết vào đó trong tự nhiên. Với các mục đích của bản mô tả này, cần phải hiểu rằng "phân tử axit nucleic chứa" trình tự nucleotit cụ thể không bao

hàm các nhiễm sắc thể nguyên vẹn. Phân tử axit nucleic đã được phân lập "chứa" trình tự axit nucleic đã nêu có thể bao gồm, bên cạnh các trình tự đã nêu này, các trình tự mã hóa lên tới mười hoặc thậm chí lên tới hai mươi protein khác hoặc các phần của chúng, hoặc có thể bao gồm các trình tự điều hòa được liên kết theo cách có thể kiểm soát mà có tác dụng điều khiển quá trình biểu hiện của vùng mã hóa của các trình tự axit nucleic đã nêu, và/hoặc có thể bao gồm các trình tự vectơ.

Trừ khi có quy định khác, đầu cuối bên tay trái của trình tự polynucleotit chuỗi đơn bất kỳ được đề cập ở đây là đầu cuối 5'; chiều tay trái của trình tự polynucleotit chuỗi kép được gọi là chiều 5'. Chiều bổ sung từ 5' đến 3' của sản phẩm phiên mã ARN mới sinh được gọi là chiều phiên mã; các vùng trình tự trên chuỗi ADN có cùng trình tự với sản phẩm phiên mã ARN mà là 5' đến đầu cuối 5' của sản phẩm phiên mã ARN được gọi là "các trình tự ngược phía trên"; các vùng trình tự trên chuỗi ADN có cùng trình tự với sản phẩm phiên mã ARN mà là 3' đến đầu cuối 3' của sản phẩm phiên mã ARN được gọi là "các trình tự xuôi phía dưới".

Thuật ngữ "trình tự điều khiển" được dùng để chỉ trình tự polynucleotit mà có thể tác động đến quá trình biểu hiện và xử lý trình tự mã hóa mà nó được gắn vào. Bản chất của các trình tự điều khiển này có thể phụ thuộc vào sinh vật chủ. Theo các phương án cụ thể, các trình tự điều khiển của sinh vật nhân sơ có thể bao gồm trình tự khởi đầu, vị trí liên kết ribosom và trình tự kết thúc phiên mã. Ví dụ, các trình tự điều khiển của sinh vật nhân thực có thể bao gồm trình tự khởi đầu chứa một hoặc nhiều vị trí nhận biết đối với các yếu tố phiên mã, trình tự tăng cường phiên mã và trình tự kết thúc phiên mã. "Trình tự điều khiển" có thể bao gồm trình tự dẫn và/hoặc trình tự đối tác dung hợp.

Thuật ngữ "vectơ" có nghĩa là phân tử hoặc thực thể bất kỳ (ví dụ, axit nucleic, plasmit, thể thực khuẩn hoặc virut) được sử dụng để chuyển thông tin mã hóa protein vào tế bào chủ.

Thuật ngữ "vectơ biểu hiện" hoặc "cấu trúc biểu hiện" được dùng để chỉ vectơ mà thích hợp cho quá trình biến nạp tế bào chủ và chứa các trình tự axit nucleic có tác dụng điều khiển và/hoặc kiểm soát (cùng với tế bào chủ) quá trình biểu hiện một hoặc nhiều

vùng mã hóa khác loại được liên kết vào đó theo cách có thể kiểm soát. Cấu trúc biểu hiện có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các trình tự mà tác động hoặc kiểm soát quá trình phiên mã, dịch mã, và nếu các intron tồn tại thì tác động đến quá trình tách intron ra khỏi ARN của vùng mã hóa được liên kết vào đó theo cách có thể kiểm soát.

Trong bản mô tả này, "liên kết theo cách có thể kiểm soát" có nghĩa là các hợp phần mà được áp dụng thuật ngữ này ở trong mối liên hệ cho phép chúng thực hiện các chức năng vốn có của chúng dưới các điều kiện thích hợp. Ví dụ, trình tự điều khiển trong vectơ mà "được liên kết theo cách có thể kiểm soát" với trình tự mã hóa protein được gắn vào đó sao cho đạt được sự biểu hiện trình tự mã hóa protein dưới các điều kiện tương thích với hoạt tính phiên mã của các trình tự điều khiển.

Thuật ngữ "tế bào chủ" có nghĩa là tế bào mà đã được biến nạp, hoặc có khả năng được biến nạp với trình tự axit nucleic và nhờ đó biểu hiện gen đang được quan tâm. Thuật ngữ này bao gồm thế hệ sau của tế bào gốc, cho dù thế hệ sau này có giống hệt về hình thái hoặc về cấu trúc di truyền với tế bào gốc ban đầu hay không, miễn là gen đang được quan tâm có mặt.

Thuật ngữ "tải nạp" có nghĩa là sự chuyển các gen từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác, thường là bằng thể thực khuẩn. "Tải nạp" cũng được dùng để chỉ sự thu nhận và chuyển các trình tự tế bào nhân thực bởi retrovirut thiếu chức năng sao chép.

Thuật ngữ "chuyển nhiễm" có nghĩa là sự hấp thu ADN ngoại lai hoặc ADN ngoại sinh bởi tế bào, và tế bào được "chuyển nhiễm" khi ADN ngoại sinh được đưa vào bên trong màng tế bào. Một số kỹ thuật chuyển nhiễm đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và được bộc lộ ở đây. Xem, ví dụ, tài liệu Graham et al., 1973, Virology 52:456; Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, trên đây; Davis et al., 1986, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier; Chu et al., 1981, Gene 13:197. Các kỹ thuật này có thể được sử dụng để đưa một hoặc nhiều nhóm ADN ngoại sinh vào các tế bào chủ thích hợp.

Thuật ngữ "biến nạp" được dùng để chỉ sự thay đổi về các đặc điểm di truyền của tế bào, và tế bào được biến nạp khi nó được cải biến để chứa ADN hoặc ARN mới. Ví dụ, tế bào được biến nạp khi nó được cải biến về mặt di truyền từ trạng thái nguyên thể của nó bằng cách đưa vật liệu di truyền mới vào thông qua kỹ thuật chuyển nhiễm, tải nạp hoặc các kỹ thuật khác. Sau khi chuyển nhiễm hoặc tải nạp, ADN gây biến nạp có thể tái tổ hợp với ADN của tế bào bằng cách kết hợp theo cách vật lý vào nhiễm sắc thể của tế bào này, hoặc có thể được duy trì một cách tạm thời trong vai trò là yếu tố thể bổ sung mà không được sao chép, hoặc có thể sao chép một cách độc lập trong vai trò là plasmit. Tế bào được xem là đã được "biến nạp một cách ổn định" khi ADN gây biến nạp được sao chép cùng với sự phân chia tế bào.

Các thuật ngữ "polypeptit" hoặc "protein" được sử dụng thay thế cho nhau ở đây để chỉ polyme của các gốc axit amin. Các thuật ngữ này cũng áp dụng cho các polyme axit amin mà trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin là thể tương tự hoặc thể bắt chước của axit amin tương ứng có trong tự nhiên, cũng như cho các polyme axit amin có trong tự nhiên. Các thuật ngữ này còn có thể bao hàm các polyme axit amin mà đã được cải biến, ví dụ, bằng cách bổ sung gốc hydrat cacbon để tạo glycoprotein, hoặc được phosphoryl hóa. Các polypeptit và protein có thể được tạo ra bởi tế bào có trong tự nhiên và tế bào không tái tổ hợp; hoặc được tạo ra bởi tế bào được thiết kế về mặt di truyền hoặc tế bào tái tổ hợp, và chứa các phân tử có trình tự axit amin của protein nguyên thể, hoặc các phân tử có các đột biến khuyết, đột biến bổ sung và/hoặc đột biến thế một hoặc nhiều axit amin của trình tự nguyên thể. Các thuật ngữ "polypeptit" và "protein" theo cách cụ thể bao hàm các protein liên kết kháng nguyên, ví dụ, protein liên kết kháng nguyên CGRP R, protein liên kết CGRP R, kháng thể, hoặc các trình tự mà có các đột biến khuyết, đột biến bổ sung và/hoặc đột biến thế một hoặc nhiều axit amin của protein liên kết kháng nguyên. Thuật ngữ "đoạn polypeptit" được dùng để chỉ polypeptit có đột biến khuyết đầu cuối amino, đột biến khuyết đầu cuối carboxyl và/hoặc đột biến khuyết phần bên trong so với protein có độ dài đầy đủ. Các đoạn như vậy cũng có thể chứa các axit amin được cải biến so với protein có độ dài đầy đủ. Theo các phương án cụ thể, các đoạn có chiều dài khoảng 5 đến 500 axit amin. Ví dụ, các đoạn có thể có chiều dài ít nhất

là 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 hoặc 450 axit amin. Các đoạn polypeptit hữu ích bao gồm các đoạn có chức năng miễn dịch của kháng thể, bao gồm các miền liên kết. Trong trường hợp kháng thể liên kết CGRP R, các đoạn hữu ích bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vùng CDR, miền biến đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, một phần của chuỗi kháng thể hoặc chỉ là miền biến đổi của nó bao gồm hai CDR, và các phần tương tự. "Thụ thể CGRP" hay "CGRP R" được hiểu là bao gồm RAMP1 và CRLR.

Thuật ngữ "protein đã được phân lập" (ví dụ, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập), "polypeptit đã được phân lập" hoặc "kháng thể đã được phân lập" có nghĩa là protein, polypeptit hoặc kháng thể được nói đến (1) không có ít nhất một số protein khác mà bình thường nó được tìm thấy cùng với chúng, (2) gần như không có các protein khác từ cùng một nguồn, ví dụ, từ cùng một loài, (3) được biểu hiện bởi tế bào từ loài khác, (4) đã được tách ra khỏi ít nhất 50 phần trăm polynucleotit, lipit, hydrat cacbon hoặc các vật liệu khác mà kết hợp với nó trong tự nhiên, (5) được kết hợp theo cách có thể kiểm soát (bằng tương tác cộng hóa trị hoặc tương tác không cộng hóa trị) với polypeptit mà không kết hợp nó trong tự nhiên, hoặc (6) không có trong tự nhiên. Thông thường, "protein đã được phân lập", "polypeptit đã được phân lập" hoặc "kháng thể đã được phân lập" cấu thành ít nhất khoảng 5%, ít nhất khoảng 10%, ít nhất khoảng 25% hoặc ít nhất khoảng 50% mẫu đã nêu. ADN hệ gen, ADN bổ sung, ARN thông tin hoặc ARN khác, có nguồn gốc tổng hợp, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng có thể mã hóa protein đã được phân lập này. Tốt hơn nếu protein, polypeptit hoặc kháng thể đã được phân lập gần như không có các protein khác hoặc các polypeptit khác hoặc các chất nhiễm tạp khác mà được tìm thấy trong môi trường tự nhiên của nó và sẽ gây cản trở cho công dụng trị liệu, chẩn đoán, phòng bệnh, nghiên cứu hoặc công dụng khác của nó.

"Biến thể" của polypeptit (ví dụ, protein liên kết kháng nguyên hoặc kháng thể) bao gồm trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin được chèn vào, được làm khuyết và/hoặc được thế vào trình tự axit amin này so với trình tự polypeptit khác. Biến thể bao gồm protein dung hợp.

"Dẫn xuất" của polypeptit là polypeptit (ví dụ, protein liên kết kháng nguyên hoặc kháng thể) mà đã được cải biến hóa học theo phương thức khác với các biến thể chèn, biến thể khuyết hoặc biến thể thế, ví dụ, thông qua quá trình tiếp hợp với gốc hóa học khác.

Thuật ngữ "có trong tự nhiên" được sử dụng trong suốt bản mô tả này liên quan đến các vật liệu sinh học như polypeptit, axit nucleic, tế bào chủ và các chất tương tự được dùng để chỉ các vật liệu được tìm thấy trong tự nhiên.

"Protein liên kết kháng nguyên" trong bản mô tả này có nghĩa là protein mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích đã định, như CGRP R, cụ thể là CGRP R của động vật linh trưởng, ví dụ, CGRP R của người. Protein liên kết kháng nguyên CGRP R liên kết đặc hiệu với thụ thể CGRP của người.

Protein liên kết kháng nguyên được cho là "liên kết đặc hiệu" với đích của nó khi hằng số phân ly (K_D) là $\leq 10^{-6}$ M. Kháng thể liên kết đặc hiệu kháng nguyên đích với "ái lực cao" khi K_D là $\leq 1x\ 10^{-8}$ M. Theo một phương án, kháng thể sẽ liên kết vào CGRP R, hoặc CGRP R của người với $K_D \leq 5x\ 10^{-7}$; theo phương án khác, kháng thể sẽ liên kết với $K_D \leq 1x\ 10^{-7}$; theo phương án khác, kháng thể sẽ liên kết với $K_D \leq 5x\ 10^{-8}$; theo phương án khác, kháng thể sẽ liên kết với $K_D \leq 1x\ 10^{-8}$; theo phương án khác, kháng thể sẽ liên kết với $K_D \leq 5x\ 10^{-9}$; theo phương án khác, kháng thể sẽ liên kết với $K_D \leq 1x\ 10^{-9}$; theo phương án khác, kháng thể sẽ liên kết với $K_D \leq 5x\ 10^{-10}$; theo phương án khác, kháng thể sẽ liên kết với $K_D \leq 1x\ 10^{-10}$.

Kháng thể, đoạn liên kết kháng nguyên của nó hoặc protein liên kết kháng nguyên "ức chế một cách chọn lọc" thụ thể đặc hiệu so với các thụ thể khác khi IC50 của kháng thể, đoạn liên kết kháng nguyên của nó hoặc protein liên kết kháng nguyên này trong thử nghiệm ức chế đối với thụ thể đặc hiệu thấp hơn ít nhất 50 lần so với IC50 trong thử nghiệm ức chế đối với thụ thể "tham chiếu" khác. "Tỷ lệ chọn lọc" là IC50 của thụ thể tham chiếu chia cho IC50 của thụ thể đặc hiệu. Kháng thể, đoạn liên kết kháng nguyên của nó hoặc protein liên kết kháng nguyên ức chế một cách chọn lọc thụ thể CGRP của người nếu IC50 của kháng thể, đoạn liên kết kháng nguyên của nó hoặc protein liên kết

kháng nguyên này trong thử nghiệm cAMP, ví dụ, thử nghiệm ức chế cAMP như được mô tả trong ví dụ 4 ở đây, thấp hơn ít nhất 50 lần so với IC50 của cùng kháng thể, đoạn liên kết kháng nguyên của nó hoặc protein liên kết kháng nguyên đó trong thử nghiệm ức chế đối với thụ thể AM1, AM2 hoặc thụ thể amylin của người (ví dụ, AMY1). Theo một ví dụ không nhằm giới hạn sáng chế, nếu IC50 của một kháng thể kháng CGRP R đặc hiệu trong thử nghiệm cAMP đối với hCGRP R là, ví dụ, từ 0,1nM đến 20nM, và IC50 của cùng kháng thể đó trong thử nghiệm cAMP đối với thụ thể hAM1, hAM2 hoặc AMY1 của người là từ 1000nM trở lên, thì kháng thể đó ức chế một cách chọn lọc thụ thể hCGRP. Protein liên kết kháng nguyên mà ức chế một cách chọn lọc thụ thể đặc hiệu cũng được hiểu là protein liên kết kháng nguyên trung hòa đối với thụ thể đó.

"Vùng liên kết kháng nguyên" có nghĩa là protein, hoặc một phần của protein, mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đã định. Ví dụ, phần của protein liên kết kháng nguyên đó mà chứa các gốc axit amin tương tác với kháng nguyên và đem lại cho protein liên kết kháng nguyên này tính đặc hiệu và ái lực của nó đối với kháng nguyên được gọi là "vùng liên kết kháng nguyên". Vùng liên kết kháng nguyên thường bao gồm một hoặc nhiều "vùng liên kết bổ sung" ("CDR"). Các vùng liên kết kháng nguyên cụ thể còn bao gồm một hoặc nhiều vùng "khung". "CDR" là trình tự axit amin mà góp phần vào ái lực và tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên. Các vùng "khung" có thể giúp ích trong việc duy trì cấu hình thích hợp của các CDR để thúc đẩy sự liên kết giữa vùng liên kết kháng nguyên và kháng nguyên.

Theo các khía cạnh cụ thể, sáng chế đề cập đến các protein liên kết kháng nguyên tái tổ hợp mà liên kết với protein CGRP R hoặc CGRP R của người. Trong văn cảnh này, "protein tái tổ hợp" là protein được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp, tức là, thông qua sự biểu hiện của axit nucleic tái tổ hợp như được mô tả ở đây. Các phương pháp và các kỹ thuật dùng để tạo ra protein tái tổ hợp là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thuật ngữ "kháng thể" được dùng để chỉ globulin miễn dịch nguyên vẹn thuộc isotyp bất kỳ, hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà có thể cạnh tranh với kháng thể

nguyên vẹn để liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích, và bao gồm, ví dụ, kháng thể thể khảm, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể hoàn toàn của người và kháng thể đặc hiệu kép. Như vậy, "kháng thể" là một loại protein liên kết kháng nguyên. Kháng thể nguyên vẹn thường chứa ít nhất hai chuỗi nặng có độ dài đầy đủ và hai chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ, nhưng trong một số trường hợp có thể chứa ít chuỗi hơn, như các kháng thể có trong tự nhiên của loài lạc đà có thể chỉ chứa các chuỗi nặng. Các kháng thể có thể chỉ được lấy từ một nguồn duy nhất, hoặc có thể là "thể khảm", tức là, các phần khác nhau của kháng thể này có thể được lấy từ hai kháng thể khác nhau như được mô tả thêm dưới đây. Các protein liên kết kháng nguyên, các kháng thể hoặc các đoạn liên kết có thể được tạo ra trong tế bào lai, bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp, hoặc bằng kỹ thuật phân cắt hóa học hoặc phân cắt bằng enzym đối với các kháng thể nguyên vẹn. Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ "kháng thể" bao gồm, ngoài các kháng thể chứa hai chuỗi nặng có độ dài đầy đủ và hai chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ ra, các dẫn xuất, các biến thể, các đoạn và các dạng đột biến của chúng, các ví dụ về chúng được mô tả dưới đây.

Thuật ngữ "chuỗi nhẹ" bao gồm chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ và các đoạn của nó có trình tự vùng biến đổi đủ để đem lại tính đặc hiệu liên kết. Chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ bao gồm vùng biến đổi, V_L, và vùng cố định, C_L. Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là ở đầu cuối amino của polypeptit. Các chuỗi nhẹ bao gồm chuỗi kapa và chuỗi lambda.

Thuật ngữ "chuỗi nặng" bao gồm chuỗi nặng có độ dài đầy đủ và các đoạn của nó có trình tự vùng biến đổi đủ để đem lại tính đặc hiệu liên kết. Chuỗi nặng có độ dài đầy đủ bao gồm vùng biến đổi, V_H, và ba vùng cố định, C_H1, C_H2 và C_H3. Miền V_H là ở đầu cuối amino của polypeptit và các miền C_H là ở đầu cuối carboxyl, trong đó C_H3 là gần nhất với đầu cuối carboxy của polypeptit. Chuỗi nặng có thể thuộc isotyp bất kỳ, bao gồm IgG (bao gồm phân lớp IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4), IgA (bao gồm phân lớp IgA1 và IgA2), IgM và IgE.

Thuật ngữ "trình tự tín hiệu", "trình tự dẫn" hoặc "peptit tín hiệu" được dùng để chỉ chuỗi peptit ngắn (dài 3-60 axit amin) có tác dụng điều khiển quá trình vận chuyển protein. Peptit tín hiệu cũng có thể được gọi là tín hiệu nhắm đích, trình tự tín hiệu, peptit

chuyển tiếp hoặc tín hiệu định khu. Một số peptit tín hiệu được phân cắt ra khỏi protein bằng peptidaza tín hiệu sau khi protein được vận chuyển, sao cho dạng có hoạt tính sinh học của protein (ví dụ, protein liên kết kháng nguyên như được mô tả ở đây) là dạng bị phân cắt ngắn hơn. Do vậy, các thuật ngữ như "kháng thể chứa chuỗi nặng...", "kháng thể chứa chuỗi nhẹ...", v.v., trong đó kháng thể này được xác định đặc điểm là có chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có trình tự đã được nhận diện cụ thể, được hiểu là bao gồm các kháng thể có trình tự đã được nhận diện cụ thể, các kháng thể có trình tự đã được nhận diện cụ thể ngoại trừ các trình tự tín hiệu được thay thế bằng các trình tự tín hiệu khác, cũng như các kháng thể có trình tự đã được nhận diện, trừ đi các trình tự tín hiệu bất kỳ.

Thuật ngữ "đoạn liên kết kháng nguyên" (hoặc đơn giản là "đoạn") của kháng thể hoặc chuỗi globulin miễn dịch (chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ) trong bản mô tả này bao gồm một phần (bất kể phần đó thu được hoặc được tổng hợp như thế nào) của kháng thể mà thiếu ít nhất một số axit amin có mặt trong chuỗi có độ dài đầy đủ nhưng phần này có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên. Các đoạn như vậy có hoạt tính sinh học ở chỗ chúng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích và có thể cạnh tranh với các protein liên kết kháng nguyên khác, bao gồm các kháng thể nguyên vẹn, để liên kết đặc hiệu với epitop đã cho. Theo một khía cạnh, đoạn này sẽ giữ lại ít nhất một CDR có mặt trong chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ hoặc chuỗi nặng có độ dài đầy đủ, và theo một số phương án, đoạn này sẽ chứa một chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ hoặc một phần của nó. Các đoạn có hoạt tính sinh học này có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp, hoặc có thể được tạo ra bằng kỹ thuật phân cắt hóa học hoặc phân cắt bằng enzym đối với các protein liên kết kháng nguyên, bao gồm các kháng thể nguyên vẹn. Các đoạn globulin miễn dịch có chức năng miễn dịch bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, các kháng thể miền và các kháng thể chuỗi đơn, và có thể được lấy từ nguồn động vật có vú bất kỳ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, người, chuột nhắt, chuột cống, lạc đà hoặc thỏ. Dự tính thêm rằng phần có chức năng của các protein liên kết kháng nguyên được bộc lộ ở đây, ví dụ, một hoặc nhiều CDR, có thể được liên kết cộng hóa trị vào protein thứ hai hoặc vào phân tử nhỏ để tạo ra chất trị liệu nhắm đến một đích cụ thể trong cơ thể, có các tính chất trị liệu chức năng kép, hoặc có thời gian bán hủy kéo dài trong huyết thanh.

"Đoạn Fab" chứa một chuỗi nhẹ và C_H1 và các vùng biến đổi của một chuỗi nặng. Chuỗi nặng của phân tử Fab không thể tạo cầu liên kết disulfua với phân tử chuỗi nặng khác.

Vùng "Fc" chứa hai đoạn chuỗi nặng chứa miền C_H1 và miền C_H2 của kháng thể. Hai đoạn chuỗi nặng này được nối với nhau bằng hai cầu liên kết disulfua trở lên và bằng các tương tác kỵ nước của các miền C_H3.

"Đoạn Fab'" chứa một chuỗi nhẹ và một phần của một chuỗi nặng mà chứa miền V_H và miền C_H1 và cả vùng giữa miền C_H1 và miền C_H2, sao cho cầu liên kết disulfua liên chuỗi có thể được tạo ra giữa hai chuỗi nặng của hai đoạn Fab' để tạo phân tử $F(ab')_2$.

Đoạn "$F(ab')_2$" chứa hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng chứa một phần của vùng cố định giữa miền C_H1 và miền C_H2, sao cho cầu liên kết disulfua liên chuỗi được tạo ra giữa hai chuỗi nặng này. Vì vậy, đoạn $F(ab')_2$ bao gồm hai đoạn Fab' mà được nối với nhau bằng cầu liên kết disulfua giữa hai chuỗi nặng.

"Đoạn Fv" chứa các vùng biến đổi từ cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, nhưng thiếu các vùng cố định.

"Kháng thể chuỗi đơn" là phân tử Fv trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được nối kết bằng một liên kết linh động để tạo chuỗi polypeptit đơn, chuỗi này tạo vùng liên kết kháng nguyên. Các kháng thể chuỗi đơn được thảo luận chi tiết trong công bố đơn patent quốc tế số WO 88/01649 và patent Mỹ số 4,946,778 và số 5,260,203, các nội dung bộc lộ của chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

"Kháng thể miền" là đoạn globulin miễn dịch có chức năng miễn dịch chỉ chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Trong một số trường hợp, hai hoặc nhiều vùng V_H được nối kết cộng hóa trị bằng liên kết peptit để tạo ra kháng thể miền hóa trị hai. Hai vùng V_H của kháng thể miền hóa trị hai có thể nhắm đến cùng một kháng nguyên hoặc các kháng nguyên khác nhau.

"Protein liên kết kháng nguyên hóa trị hai" hoặc "kháng thể hóa trị hai" chứa hai vị trí liên kết kháng nguyên. Trong một số trường hợp, hai vị trí liên kết này có cùng tính

đặc hiệu kháng nguyên. Protein liên kết kháng nguyên hóa trị hai và kháng thể hóa trị hai có thể là đặc hiệu kép, xem phần dưới đây.

"Protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu" hoặc "kháng thể đa đặc hiệu" là loại mà nhắm đến nhiều hơn một kháng nguyên hoặc epitop.

Protein liên kết kháng nguyên hoặc kháng thể "đặc hiệu đôi", "đặc hiệu kép" hoặc "chức năng kép" lần lượt là protein liên kết kháng nguyên hoặc kháng thể lai có hai vị trí liên kết kháng nguyên khác nhau. Các protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép và các kháng thể đặc hiệu kép là loại protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu hoặc kháng thể đa đặc hiệu và có thể được tạo ra bằng các phương pháp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dung hợp các tế bào lai hoặc liên kết các đoạn Fab'. Xem, ví dụ, tài liệu Songsivilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553. Hai vị trí liên kết của protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoặc kháng thể đặc hiệu kép sẽ liên kết vào hai epitop khác nhau, hai epitop này có thể nằm trên cùng một đích protein hoặc hai đích protein khác nhau.

Thuật ngữ "protein liên kết kháng nguyên trung hòa" hoặc "kháng thể trung hòa" lần lượt được dùng để chỉ protein liên kết kháng nguyên hoặc kháng thể mà liên kết với phối tử, ngăn cản sự liên kết của phối tử vào đối tác liên kết của nó và làm gián đoạn đáp ứng sinh học mà nhẽ ra sẽ là kết quả của sự liên kết phối tử này vào đối tác liên kết của nó. Trong đánh giá tình trạng liên kết và tính đặc hiệu của protein liên kết kháng nguyên, ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên có chức năng miễn dịch của nó, kháng thể hoặc đoạn ức chế về cơ bản sự liên kết của phối tử với đối tác liên kết của nó khi lượng kháng thể dư làm giảm lượng đối tác liên kết được liên kết với phối tử này đi ít nhất khoảng 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% hoặc lớn hơn (như được đo trong thử nghiệm cạnh tranh liên kết *in vitro*). Trong trường hợp protein liên kết CGRP R, phân tử trung hòa này sẽ làm giảm khả năng của CGRP R trong việc liên kết CGRP.

Thuật ngữ "cạnh tranh", khi được sử dụng trong trường hợp các protein liên kết kháng nguyên mà có thể liên kết với cùng một vùng trên kháng nguyên đích, có nghĩa là

sự cạnh tranh giữa các protein liên kết kháng nguyên được xác định bằng thử nghiệm trong đó protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên có chức năng miễn dịch của nó) được thử nghiệm ngăn cản hoặc ức chế sự liên kết đặc hiệu của protein liên kết kháng nguyên tham chiếu (ví dụ, phối tử hoặc kháng thể tham chiếu) với kháng nguyên chung (ví dụ, CGRP R hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó). Có thể sử dụng thử nghiệm bất kỳ trong số các thử nghiệm liên kết cạnh tranh, ví dụ: thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) pha rắn trực tiếp hoặc gián tiếp, thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA) pha rắn trực tiếp hoặc gián tiếp, thử nghiệm cạnh tranh kiểu sandwich (xem, ví dụ, tài liệu Stahli et al., 1983, Methods in Enzymology 9:242-253); EIA biotin-avidin pha rắn trực tiếp (xem, ví dụ, tài liệu Kirkland et al., 1986, J. Immunol. 137:3614-3619), thử nghiệm được đánh dấu pha rắn trực tiếp, thử nghiệm kiểu sandwich được đánh dấu pha rắn trực tiếp (xem, ví dụ, tài liệu Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); RIA được đánh dấu pha rắn trực tiếp có sử dụng chất đánh dấu I-125 (xem, ví dụ, tài liệu Morel et al., 1988, Molec. Immunol. 25:7-15); EIA biotin-avidin pha rắn trực tiếp (xem, ví dụ, tài liệu Cheung, et al., 1990, Virology 176:546-552); và RIA được đánh dấu trực tiếp (Moldenhauer et al., 1990, Scand. J. Immunol. 32:77-82). Thử nghiệm như vậy có thể bao gồm việc sử dụng kháng nguyên đã tinh chế được liên kết vào bề mặt rắn hoặc các tế bào mang một trong hai loại này, protein liên kết kháng nguyên thử nghiệm không được đánh dấu và protein liên kết kháng nguyên tham chiếu được đánh dấu. Có thể đo tình trạng ức chế cạnh tranh bằng cách xác định lượng chất đánh dấu được liên kết vào bề mặt rắn hoặc các tế bào với sự có mặt của protein liên kết kháng nguyên thử nghiệm. Các protein liên kết kháng nguyên đã được nhận diện bằng thử nghiệm cạnh tranh (các protein liên kết kháng nguyên cạnh tranh) bao gồm các protein liên kết kháng nguyên liên kết với cùng epitop như protein liên kết kháng nguyên tham chiếu và các protein liên kết kháng nguyên mà liên kết với epitop liền kề đủ gần epitop được liên kết bởi protein liên kết kháng nguyên tham chiếu để sự cản trở không gian xảy ra. Thông thường, khi protein liên kết kháng nguyên cạnh tranh có mặt ở mức dư, nó sẽ ức chế sự liên kết đặc hiệu của protein liên kết kháng nguyên tham chiếu vào kháng nguyên chung ít nhất là 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%,

70% hoặc 75%. Trong một số trường hợp, mức liên kết bị ức chế ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 97% hoặc lớn hơn. Cũng có thể đo mức ức chế cạnh tranh bằng cách giữ cố định protein liên kết kháng nguyên tham chiếu vào nền, ví dụ, "chip cảm biến", thu bắt kháng nguyên trên nền đó thông qua quá trình liên kết vào kháng thể tham chiếu, và thử nghiệm xem liệu protein liên kết kháng nguyên khác (protein liên kết kháng nguyên cạnh tranh) có thể liên kết thêm vào kháng nguyên này hay không. Một ví dụ về thử nghiệm cạnh tranh liên kết nêu sau sử dụng phép phân tích Biacore, và được mô tả trong ví dụ 7 ở đây.

Thuật ngữ "kháng nguyên" hoặc "chất sinh miễn dịch" được dùng để chỉ phân tử hoặc một phần của phân tử có khả năng được liên kết bởi tác nhân liên kết chọn lọc, như protein liên kết kháng nguyên (bao gồm, ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên có chức năng miễn dịch của nó), và ngoài ra, có khả năng được sử dụng trong động vật để tạo ra các kháng thể có khả năng liên kết với kháng nguyên đó. Kháng nguyên có thể có một hoặc nhiều epitop mà có khả năng tương tác với các protein liên kết kháng nguyên khác nhau, ví dụ, các kháng thể.

Thuật ngữ "epitop" là phần phân tử mà được liên kết bởi protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, kháng thể). Thuật ngữ này bao gồm yếu tố quyết định bất kỳ mà có khả năng liên kết đặc hiệu vào protein liên kết kháng nguyên, như kháng thể hoặc vào thụ thể tế bào T. Epitop có thể là tiếp giáp hoặc không tiếp giáp (ví dụ, (i) trong polypeptit chuỗi đơn, các gốc axit amin mà không tiếp giáp với nhau trong trình tự polypeptit nhưng nằm trong phạm vi của phân tử được liên kết bởi protein liên kết kháng nguyên, hoặc (ii) trong thụ thể dạng multime, ví dụ, CGRP R, chứa hai hoặc nhiều hợp phần riêng biệt, ví dụ, RAMP1 và CRLR, các gốc axit amin mà có mặt trên hai hoặc nhiều hợp phần riêng biệt này nhưng nằm trong phạm vi của thụ thể dạng multime được liên kết bởi protein liên kết kháng nguyên). Theo các phương án cụ thể, các epitop có thể là thể bắt chước ở chỗ chúng chứa cấu trúc ba chiều tương tự với epitop được sử dụng để tạo ra protein liên kết kháng nguyên, nhưng không chứa hoặc chỉ chứa một số gốc axit amin trong số các gốc axit amin được tìm thấy trong epitop được sử dụng để tạo ra protein liên kết kháng

nguyên. Thông thường nhất là các epitop nằm trên các protein, nhưng trong một số trường hợp có thể nằm trên các loại phân tử khác, như axit nucleic. Các yếu tố quyết định epitop có thể bao gồm các nhóm bề mặt có hoạt tính hóa học của các phân tử như axit amin, đường mạch bên, nhóm phosphoryl hoặc sulfonyl, và có thể có các đặc điểm cấu trúc ba chiều đặc trưng và/hoặc các đặc điểm tích điện đặc trưng. Nhìn chung, các kháng thể đặc hiệu đối với một kháng nguyên đích cụ thể sẽ ưu tiên nhận biết epitop trên kháng nguyên đích trong hỗn hợp phức tạp của các protein và/hoặc các đại phân tử.

Thuật ngữ "độ đồng nhất" được dùng để chỉ mối liên hệ giữa các trình tự của hai phân tử polypeptit trở lên hoặc hai phân tử axit nucleic trở lên, như được xác định bằng cách sắp xếp thẳng hàng và so sánh các trình tự này. "Phần trăm độ đồng nhất" có nghĩa là phần trăm các gốc giống nhau giữa các axit amin hoặc các nucleotit trong các phân tử được so sánh và được tính trên cơ sở kích cỡ của phân tử nhỏ nhất trong số các phân tử được so sánh. Trong các phép tính này, các khoảng trống trong các đoạn sắp xếp thẳng hàng (nếu có) phải được giải quyết bằng mô hình toán học hoặc chương trình máy tính cụ thể (tức là, "thuật toán"). Các phương pháp mà có thể được sử dụng để tính toán độ đồng nhất của các polypeptit hoặc các axit nucleic được sắp xếp thẳng hàng bao gồm các phương pháp được mô tả trong tài liệu Computational Molecular Biology, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., ed.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; và Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073.

Trong tính toán phần trăm độ đồng nhất, các trình tự cần được so sánh được sắp xếp thẳng hàng theo cách tạo ra sự ghép cặp lớn nhất giữa các trình tự này. Chương trình máy tính được sử dụng để xác định phần trăm độ đồng nhất là gói chương trình GCG, gói này bao gồm GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer

Group, University of Wisconsin, Madison, WI). Thuật toán máy tính GAP được sử dụng để sắp xếp thẳng hàng hai polypeptit hoặc polynucleotit mà dùng để xác định phần trăm độ đồng nhất trình tự. Các trình tự được sắp xếp thẳng hàng để có được sự ghép cặp tối ưu của axit amin hoặc nucleotit tương ứng của chúng ("khoảng ghép cặp", như được xác định bằng thuật toán). Điểm phạt mở khoảng trống (được tính là 3 x đường chéo trung bình, trong đó "đường chéo trung bình" là giá trị trung bình của đường chéo ma trận so sánh được sử dụng; "đường chéo" là điểm hoặc con số được gán cho mỗi ghép cặp axit amin hoàn hảo bằng ma trận so sánh cụ thể) và điểm phạt mở rộng khoảng trống (thường là 1/10 lần điểm phạt mở khoảng trống), cũng như ma trận so sánh như PAM 250 hoặc BLOSUM 62 được sử dụng cùng với thuật toán. Theo các phương án cụ thể, ma trận so sánh tiêu chuẩn (xem tài liệu Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 về ma trận so sánh PAM 250; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 về ma trận so sánh BLOSUM 62) cũng được sử dụng bởi thuật toán.

Các thông số được đề nghị dùng để xác định phần trăm độ đồng nhất của các trình tự polypeptit hoặc nucleotit bằng cách sử dụng chương trình GAP là như sau:

Thuật toán: Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453;

Ma trận so sánh: BLOSUM 62 nêu trong tài liệu Henikoff et al., 1992, trên đây;

Điểm phạt khoảng trống: 12 (nhưng không có điểm phạt cho các khoảng trống cuối)

Điểm phạt chiều dài khoảng trống: 4

Ngưỡng tương tự: 0

Các sơ đồ sắp xếp thẳng hàng cụ thể dùng để sắp xếp thẳng hàng hai trình tự axit amin có thể chỉ tạo ra sự ghép cặp vùng ngắn của hai trình tự, và vùng được sắp xếp thẳng hàng nhỏ này có thể có độ đồng nhất trình tự rất cao mặc dù không có mối liên quan rõ rệt giữa hai trình tự có độ dài đầy đủ. Do vậy, phương pháp sắp xếp thẳng hàng được chọn

(chương trình GAP) có thể được điều chỉnh nếu muốn để tạo ra đoạn sắp xếp thẳng hàng mà kéo dài qua ít nhất 50 axit amin tiếp giáp của polypeptit đích.

Trong bản mô tả này, "gần như tinh khiết" có nghĩa là loại phân tử được mô tả là loại chủ yếu có mặt, tức là, tính theo số mol, nó có nhiều hơn bất kỳ loại riêng rẽ nào khác trong cùng một hỗn hợp. Theo các phương án cụ thể, phân tử gần như tinh khiết là hợp phần trong đó loại phân tử đang nói đến chiếm ít nhất 50% (tính theo số mol) của toàn bộ các loại đại phân tử có mặt. Theo các phương án khác, hợp phần gần như tinh khiết chiếm ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 99% của toàn bộ các loại đại phân tử có mặt trong hợp phần này. Theo các phương án khác, loại phân tử đang nói đến được tinh chế đến độ đồng nhất cần thiết, trong đó loại phân tử nhiễm tạp không thể phát hiện được trong hợp phần bằng các phương pháp phát hiện thông thường và vì vậy, hợp phần này chỉ chứa một loại đại phân tử có thể phát hiện được.

Thuật ngữ "điều trị" được dùng để chỉ dấu hiệu thành công bất kỳ trong việc điều trị hoặc làm giảm bớt tổn thương, bệnh lý hoặc tình trạng bệnh, bao gồm thông số chủ quan hoặc khách quan bất kỳ như sự giảm nhẹ; sự thuyên giảm; sự giảm dần các triệu chứng hoặc làm cho tổn thương, bệnh lý hoặc tình trạng bệnh dễ chịu hơn đối với bệnh nhân; làm chậm tốc độ thoái hóa hoặc sụt sức; làm cho điểm thoái hóa cuối cùng ít suy nhược hơn; cải thiện tình trạng khỏe mạnh về tinh thần hoặc cơ thể của bệnh nhân. Việc điều trị hoặc làm giảm bớt các triệu chứng có thể là dựa trên cơ sở các thông số chủ quan hoặc khách quan; bao gồm các kết quả kiểm tra cơ thể, các kiểm tra tâm thần-thần kinh và/hoặc đánh giá tâm thần. Ví dụ, các phương pháp cụ thể được trình bày ở đây điều trị thành công bệnh đau nửa đầu về phương diện phòng bệnh hoặc trong vai trò là phương pháp điều trị khẩn cấp, làm giảm tần suất của bệnh đau nửa đầu, làm giảm mức độ trầm trọng của bệnh đau nửa đầu và/hoặc giảm nhẹ triệu chứng gắn liền với bệnh đau nửa đầu.

"Lượng hữu hiệu" thường là lượng đủ để làm giảm mức độ trầm trọng và/hoặc tần suất của các triệu chứng, loại bỏ các triệu chứng và/hoặc nguyên nhân cơ bản, phòng ngừa sự xuất hiện các triệu chứng và/hoặc nguyên nhân cơ bản của chúng, và/hoặc cải thiện hoặc khắc phục hư hại do hoặc gắn liền với bệnh đau nửa đầu. Theo một số phương

án, lượng hữu hiệu là lượng hữu hiệu để điều trị hoặc lượng hữu hiệu để phòng ngừa. "Lượng hữu hiệu để điều trị" là lượng đủ để cứu chữa tình trạng bệnh (ví dụ, bệnh đau nửa đầu) hoặc các triệu chứng, cụ thể là tình trạng hoặc các triệu chứng gắn liền với tình trạng bệnh, hoặc theo cách khác là ngăn ngừa, cản trở, làm chậm hoặc đảo ngược sự tiến triển của tình trạng bệnh hoặc triệu chứng không mong muốn bất kỳ khác gắn liền với bệnh theo bất cứ cách nào. "Lượng hữu hiệu để phòng ngừa" là lượng dược phẩm mà, khi được sử dụng cho đối tượng, sẽ có tác dụng phòng ngừa theo dự định, ví dụ, phòng ngừa hoặc trì hoãn sự khởi phát (hoặc sự tái phát) của bệnh đau nửa đầu, hoặc làm giảm khả năng khởi phát (hoặc tái phát) của bệnh đau nửa đầu hoặc các triệu chứng của bệnh đau nửa đầu. Tác dụng điều trị hoặc phòng ngừa đầy đủ không nhất thiết phải xuất hiện với việc sử dụng một liều và có thể xuất hiện chỉ sau khi sử dụng một đợt các liều. Vì vậy, lượng hữu hiệu để phòng bệnh hoặc điều trị có thể được sử dụng trong một hoặc nhiều lần sử dụng.

"Axit amin" bao gồm nghĩa thông thường của nó trong lĩnh vực kỹ thuật này. Hai mươi axit amin có trong tự nhiên và các từ viết tắt của chúng tuân thủ theo cách sử dụng thông thường. Xem tài liệu Immunology-A Synthesis, 2nd Edition, (E. S. Golub and D. R. Green, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, Mass. (1991), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đối với mục đích bất kỳ. Các chất đồng phân lập thể (ví dụ, các axit amin D) của hai mươi axit amin thông thường nêu trên, các axit amin không có trong tự nhiên như các axit amin được thế hai lần tại α,α, các axit amin N-alkyl và các axit amin không thông thường khác có thể cũng là các thành phần thích hợp của các polypeptit và được bao hàm trong cụm từ "axit amin". Các ví dụ về các axit amin không thông thường bao gồm: 4-hydroxyprolin, γ-carboxyglutamat, ε-N,N,N-trimetyllysin, ε-N-axetyllysin, O-phosphoserin, N-axetylserin, N-formylmetionin, 3-metylhistidin, 5-hydroxylysin, σ-N-metylarginin, và các axit amin tương tự khác và các axit imin (ví dụ, 4-hydroxyprolin). Trong ký hiệu polypeptit được sử dụng ở đây, chiều tay trái là chiều đầu cuối amino và chiều tay phải là chiều đầu cuối carboxyl, theo quy ước và cách dùng chuẩn.

Tổng quan

Sáng chế đề cập đến các protein liên kết kháng nguyên mà liên kết protein CGRP R, bao gồm protein CGRP R của người (hCGRP R). Các protein liên kết kháng nguyên được đề cập là các polypeptit mà trong đó một hoặc nhiều vùng xác định bổ sung (CDR), như được mô tả ở đây, được gắn và/hoặc liên kết vào đó. Trong một số protein liên kết kháng nguyên, các CDR này được gắn vào vùng "khung", vùng này định hướng (các) CDR sao cho thu được các tính chất liên kết kháng nguyên thích hợp của (các) CDR. Nhìn chung, các protein liên kết kháng nguyên được đề cập có thể cản trở, phong bế, làm giảm hoặc điều biến sự tương tác giữa CGRP và CGRP R.

Các protein liên kết kháng nguyên cụ thể được mô tả ở đây là các kháng thể hoặc có nguồn gốc từ các kháng thể. Theo các phương án cụ thể, cấu trúc polypeptit của các protein liên kết kháng nguyên là dựa trên cơ sở các kháng thể, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể đơn dòng, kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể mini, kháng thể miền, kháng thể tổng hợp (trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "thể bắt chước kháng thể"), kháng thể thể khảm, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể của người, thể dung hợp kháng thể (trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "thể tiếp hợp kháng thể"), và các đoạn của chúng. Các cấu trúc khác nhau được mô tả thêm dưới đây.

Các protein liên kết kháng nguyên được đề xuất ở đây đã được chứng minh là có khả năng liên kết với CGRP R, cụ thể là CGRP R của người. Như được mô tả thêm trong các ví dụ dưới đây, các protein liên kết kháng nguyên cụ thể được thử nghiệm và được phát hiện thấy là có khả năng liên kết với các epitop khác với các epitop được liên kết bởi các kháng thể khác mà hướng đến một thành phần hoặc các thành phần còn lại trong số các thành phần của CGRP R. Các protein liên kết kháng nguyên được đề cập cạnh tranh với CGRP, và nhờ đó ngăn ngừa CGRP không cho liên kết vào thụ thể của nó. Kết quả là, các protein liên kết kháng nguyên được đề xuất ở đây có khả năng ức chế hoạt tính của CGRP R. Cụ thể, các protein liên kết kháng nguyên liên kết vào các epitop này có thể có một hoặc nhiều hoạt tính dưới đây: ức chế, không kể các hoạt tính khác, sự kích thích quá trình truyền tín hiệu CGRP R, ức chế tình trạng giãn mạch, gây ra tình trạng co mạch, làm

giảm chứng viêm, ví dụ, chứng viêm thần kinh, và các ảnh hưởng sinh lý khác do CGRP R gây ra khi liên kết CGRP.

Các protein liên kết kháng nguyên được bộc lộ ở đây có nhiều công dụng. Một số protein trong số các protein liên kết kháng nguyên này, ví dụ, hữu ích trong các thử nghiệm liên kết đặc hiệu, tinh chế ái lực đối với CGRP R, đặc biệt là hCGRP R hoặc các phối tử của nó và trong các thử nghiệm sàng lọc để nhận diện các chất đối kháng khác của hoạt tính CGRP R. Một số protein trong số các protein liên kết kháng nguyên này hữu ích để ức chế quá trình liên kết của CGRP vào CGRP R.

Các protein liên kết kháng nguyên có thể được sử dụng trong nhiều ứng dụng điều trị, như được giải thích ở đây. Ví dụ, các protein liên kết kháng nguyên CGRP R cụ thể hữu ích để điều trị các tình trạng bệnh gắn liền với sự truyền tín hiệu do CGRP R gây ra, như làm giảm, giảm bớt hoặc điều trị tần suất và/hoặc mức độ trầm trọng của bệnh đau nửa đầu, làm giảm, giảm bớt hoặc điều trị bệnh đau đầu từng cơn, làm giảm, giảm bớt hoặc điều trị chứng đau mạn tính, giảm bớt hoặc điều trị bệnh đái tháo đường (typ II), làm giảm, giảm bớt hoặc điều trị các rối loạn tim mạch, và làm giảm, giảm bớt hoặc điều trị các tình trạng loạn huyết động lực gắn liền với sự nhiễm nội độc tố huyết và nhiễm khuẩn ở bệnh nhân. Các công dụng khác của protein liên kết kháng nguyên bao gồm, ví dụ, chẩn đoán các bệnh hoặc các tình trạng bệnh gắn liền với CGRP R và các thử nghiệm sàng lọc để xác định sự có mặt hoặc sự vắng mặt của CGRP R. Một số protein trong số các protein liên kết kháng nguyên được mô tả ở đây hữu ích trong điều trị các hậu quả, triệu chứng và/hoặc bệnh lý gắn liền với hoạt tính CGRP R. Các hậu quả, triệu chứng và/hoặc bệnh lý này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các loại bệnh đau nửa đầu khác nhau.

Thụ thể CGRP

Các protein liên kết kháng nguyên được bộc lộ ở đây liên kết với CGRP R, cụ thể là CGRP R của người. CGRP R là một mutime bao gồm cả CRLR và RAMP1. Trình tự nucleotit của CRLR của người được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID số:1. Trình tự axit amin của CRLR của người được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID số:2. Trình tự nucleotit của RAMP1 của người được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID số:3. Trình tự axit amin

của RAMP1 của người được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID số:4. Các protein liên kết kháng nguyên được mô tả ở đây liên kết phần ngoại bào của CGRP R, bao gồm phần ngoại bào của CRLR và RAMP1. Miền ngoại bào ("ECD") tiêu biểu của CRLR của người được mã hóa bởi trình tự nucleotit được thể hiện dưới dạng SEQ ID số:5, và có trình tự axit amin được thể hiện dưới dạng SEQ ID số:6. Trình tự này bao gồm peptit tín hiệu; ECD của CRLR hoàn thiện (trừ đi peptit tín hiệu) tiêu biểu có trình tự axit amin được thể hiện dưới dạng SEQ ID số:10. ECD tiêu biểu của RAMP1 của người được mã hóa bởi trình tự nucleotit được thể hiện dưới dạng SEQ ID số:7, và có trình tự axit amin được thể hiện dưới dạng SEQ ID số:8. Trình tự này bao gồm peptit tín hiệu; ECD của RAMP1 hoàn thiện (trừ đi peptit tín hiệu) tiêu biểu có trình tự axit amin được thể hiện dưới dạng SEQ ID số:11. Như được mô tả dưới đây, các protein CGRP R có thể còn bao gồm các đoạn. Trong bản mô tả này, các thuật ngữ này được sử dụng thay thế cho nhau để chỉ thụ thể, cụ thể là, trừ khi có quy định khác, thụ thể của người mà liên kết đặc hiệu với CGRP.

Thuật ngữ CGRP R còn bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự axit amin CGRP R, ví dụ, các vị trí glycosyl hóa được liên kết vào N có thể có. Vì vậy, các protein liên kết kháng nguyên có thể liên kết vào hoặc được tạo ra từ các protein được glycosyl hóa tại một hoặc nhiều vị trí.

Các protein liên kết thụ thể CGRP

Sáng chế đề cập đến các tác nhân liên kết chọn lọc hữu ích trong việc điều tiết hoạt tính của CGRP R. Các tác nhân này bao gồm, ví dụ, các protein liên kết kháng nguyên mà chứa miền liên kết kháng nguyên (ví dụ, các kháng thể chuỗi đơn, các kháng thể miền, các phân tử kết dính miễn dịch và các polypeptit có vùng liên kết kháng nguyên) và liên kết đặc hiệu vào CGRP R, cụ thể là CGRP R của người. Một số trong số các tác nhân này, ví dụ, hữu ích trong việc ức chế sự liên kết của CGRP vào CGRP R, và vì vậy, có thể được sử dụng để ức chế, cản trở hoặc điều biến một hoặc nhiều hoạt tính gắn liền với quá trình truyền tín hiệu CGRP R.

Nhìn chung, các protein liên kết kháng nguyên được đề cập thường chứa một hoặc nhiều CDR như được mô tả ở đây (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6). Trong một số trường hợp, protein liên kết kháng nguyên chứa (a) cấu trúc polypeptit và (b) một hoặc nhiều CDR mà được chèn vào và/hoặc nối vào cấu trúc polypeptit này. Cấu trúc polypeptit có thể có các dạng khác nhau. Ví dụ, nó có thể là, hoặc chứa, khung của kháng thể có trong tự nhiên, hoặc đoạn hoặc biến thể của nó, hoặc có thể là tổng hợp hoàn toàn về bản chất. Các ví dụ về các cấu trúc polypeptit khác nhau được mô tả thêm dưới đây.

Theo các phương án cụ thể, cấu trúc polypeptit của các protein liên kết kháng nguyên là kháng thể hoặc có nguồn gốc từ kháng thể, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể đơn dòng, kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể mini, kháng thể miền, kháng thể tổng hợp (trong bản mô tả này đôi khi được gọi là "thể bắt chước kháng thể"), kháng thể thể khảm, kháng thể được làm giống như của người, thể dung hợp kháng thể (đôi khi được gọi là "thể tiếp hợp kháng thể"), và các phần hoặc các đoạn của mỗi loại này, một cách tương ứng. Trong một số trường hợp, protein liên kết kháng nguyên là đoạn miễn dịch của kháng thể (ví dụ, Fab, Fab', $F(ab')_2$ hoặc scFv). Các cấu trúc khác nhau được mô tả và định nghĩa thêm ở đây.

Các protein liên kết kháng nguyên cụ thể được đề cập ở đây liên kết đặc hiệu với CGRP R của người. Theo một phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên liên kết đặc hiệu với protein CGRP R của người chứa CRLR của người có trình tự axit amin có SEQ ID số:2 và RAMP1 của người có trình tự axit amin có SEQ ID số:4.

Theo các phương án trong đó protein liên kết kháng nguyên được sử dụng cho các ứng dụng trị liệu, protein liên kết kháng nguyên có thể ức chế, cản trở hoặc điều biến một hoặc nhiều hoạt tính sinh học của CGRP R. Trong trường hợp này, protein liên kết kháng nguyên liên kết đặc hiệu và/hoặc ức chế về cơ bản quá trình liên kết của CGRP R của người với CGRP khi lượng kháng thể dư làm giảm lượng CGRP R của người được liên kết với CGRP, hoặc ngược lại, đi ít nhất là khoảng 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% hoặc lớn hơn (ví dụ, bằng cách đo mức liên kết trong thử nghiệm cạnh tranh liên kết *in vitro*).

Cấu trúc kháng thể có trong tự nhiên

Một số protein liên kết kháng nguyên được đề cập có cấu trúc thường gắn liền với các kháng thể có trong tự nhiên. Các đơn vị cấu trúc của các kháng thể này thường bao gồm một hoặc nhiều tetrame, mỗi tetrame bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mặc dù một số loài động vật có vú cũng sản sinh các kháng thể chỉ có chuỗi nặng riêng lẻ. Trong một kháng thể điển hình, mỗi cặp hoặc bộ đôi bao gồm một chuỗi "nhẹ" có độ dài đầy đủ (theo các phương án cụ thể, khoảng 25kDa) và một chuỗi "nặng" có độ dài đầy đủ (theo các phương án cụ thể, khoảng 50-70kDa). Mỗi chuỗi globulin miễn dịch riêng biệt bao gồm một vài "miền globulin miễn dịch", mỗi miền bao gồm khoảng 90 đến 110 axit amin và biểu hiện kiểu gấp nếp đặc trưng. Các miền này là các đơn vị cơ sở cấu thành polypeptit kháng thể. Phần đầu cuối amino của mỗi chuỗi thường bao gồm miền biến đổi chịu trách nhiệm về việc nhận biết kháng nguyên. Phần đầu cuối carboxy được bảo toàn hơn về phương diện tiến hóa so với đầu còn lại của chuỗi và được gọi là "vùng cố định" hay "vùng C". Các chuỗi nhẹ của người thường được phân loại thành chuỗi nhẹ kapa và chuỗi nhẹ lambda, và mỗi loại trong số này chứa một miền biến đổi và một miền cố định. Các chuỗi nặng thường được phân loại thành chuỗi mu, delta, gama, alpha hoặc epsilon, và các chuỗi này xác định isotyp của kháng thể lần lượt là IgM, IgD, IgG, IgA và IgE. IgG có một vài phân lớp, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Các phân lớp IgM bao gồm IgM và IgM2. Các phân lớp IgA bao gồm IgA1 và IgA2. Ở người, các isotyp IgA và IgD chứa bốn chuỗi nặng và bốn chuỗi nhẹ; các isotyp IgG và IgE chứa hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ; và isotyp IgM chứa năm chuỗi nặng và năm chuỗi nhẹ. Vùng C của chuỗi nặng thường chứa một hoặc nhiều miền mà có thể chịu trách nhiệm về chức năng tác động. Số lượng vùng cố định chuỗi nặng sẽ phụ thuộc vào isotyp. Ví dụ, mỗi chuỗi nặng IgG chứa ba vùng C được gọi là C_H1, C_H2 và C_H3. Các kháng thể được đề cập có thể có isotyp và phân lớp bất kỳ trong số các isotyp và phân lớp này. Theo các phương án cụ thể, kháng thể CGRP R thuộc phân lớp IgG1, IgG2 hoặc IgG4.

Trong các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ, vùng biến đổi và vùng cố định được nối bằng vùng "J" có chiều dài khoảng từ mười hai axit amin trở lên, trong đó

chuỗi nặng còn bao gồm vùng "D" có thêm khoảng mười axit amin nữa. Xem, ví dụ, tài liệu Fundamental Immunology, 2nd ed., Ch. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press (được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn cho mọi mục đích). Các vùng biến đổi của mỗi cặp chuỗi nhẹ/chuỗi nặng thường tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên.

Một ví dụ về miền cố định chuỗi nặng IgG2 của kháng thể đơn dòng CGRP R tiêu biểu có trình tự axit amin như sau:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCP
APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(326 gốc cuối cùng của trình tự này được thể hiện dưới dạng SEQ ID số:29).

Một ví dụ về miền cố định chuỗi nhẹ kapa của kháng thể đơn dòng CGRP R tiêu biểu có trình tự axit amin như sau:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (107 gốc cuối cùng của trình tự này được thể hiện dưới dạng SEQ ID số:14).

Các vùng biến đổi của các chuỗi globulin miễn dịch thường có cùng cấu trúc tổng thể, chứa các vùng khung (FR) tương đối được bảo toàn, được nối kết bằng ba vùng siêu biến, được gọi thông thường hơn là "vùng quyết định bổ sung" hay CDR. Các CDR từ hai chuỗi của mỗi cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ được đề cập trên đây thường được sắp xếp thẳng hàng bởi các vùng khung để tạo thành cấu trúc mà liên kết đặc hiệu với epitop đặc hiệu trên protein đích (ví dụ, CGRP R). Từ đầu cuối N đến đầu cuối C, cả vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trong tự nhiên và vùng biến đổi chuỗi nặng có trong tự nhiên đều thường tuân theo thứ tự sau đây của các yếu tố: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4. Một hệ thống đánh số đã được đặt ra để gán các con số cho các axit amin mà chiếm các vị trí

trong mỗi miền trong số các miền này. Hệ thống đánh số này được xác định trong tài liệu Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 và 1991, NIH, Bethesda, MD), hoặc Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342:878-883.

Các vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ khác nhau được đề cập ở đây được mô tả trong bảng 3. Mỗi vùng trong số các vùng biến đổi này có thể được gắn vào vùng cố định chuỗi nặng và vùng cố định chuỗi nhẹ nêu trên để lần lượt tạo thành chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể hoàn chỉnh. Ngoài ra, mỗi trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được tạo ra như vậy có thể được kết hợp để tạo thành cấu trúc kháng thể hoàn chỉnh. Cần phải hiểu rằng các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đề cập ở đây cũng có thể được gắn vào các miền cố định khác có trình tự khác so với các trình tự tiêu biểu được liệt kê trên đây.

Các ví dụ cụ thể về một số chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ và chuỗi nặng có độ dài đầy đủ của các kháng thể được đề cập và các trình tự axit amin tương ứng của chúng được tóm tắt trong các bảng 2A và 2B. Bảng 2A thể hiện các trình tự chuỗi nhẹ tiêu biểu, và bảng 2B thể hiện các trình tự chuỗi nặng tiêu biểu.

Bảng 2A – Các trình tự axit amin chuỗi nhẹ của kháng thể tiêu biểu

SEQ ID số:	Ký hiệu	Được chứa trong dòng	Trình tự
12	L1	01E11 LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQSVLTQPPSVS EAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAP KLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQT GDEADYYCGTWDSRLSAVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
13	L2	01H7 LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQSVLTQPPSAS GTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGAAP KLLIFRSNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAAWDDSLSGWVFGGGTKLTVLGQP KANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV

			TVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S
14	L3	02E7 LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWFQQKPGKAPK RLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPE DLATYYCLQYNIYPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
15	L4	03B6 LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCSSELTQDPTVS VALGQTVKITCQGDSLRSFYASWYQQKPGQAPV LVFYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQA EDEADYYCNSRDSSVYHLVLGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
16	L5	03C8 LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIILAQTPLSLS VTPGQPASISCKSSQSLLHSAGKTYLYWYLQKPG QPPQLLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGIYYCMQSFPLPLTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
17	L6	04E4 LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQSVLTQPPSVS AAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAP KLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSTTLGITGLQT GDEADYYCGTWDSRLSAVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
18	L7	04H6 LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIVMTQSPLSL PVTPGEPASISCRSSQSLLHSFGYNYLDWYLQKPG QSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCMQALQTPFTFGPGTKVDIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
19	L8	05F5 LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIILTQTPLSLS VTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPG QPPQLLIYEVSNRFSGEPDRFSGSGSGTDFTLKISR

			VEAEDVGTYYCMQSFPLPLTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
20	L9	09D4 LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQSVLTQPPSVS AAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQFPGTAP KLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQT GDEADYYCGTWDSRLSAVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
21	L10	09F5 LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQSVLTQSPSAS GTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGAAP KLLILRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLTISGLRS EDEADYYCAAWDDSLSGWVFGGGTKLTVLGQP KANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV TVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S
22	L11	10E4 LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQSVLTQPPSAS GTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPK LLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSE DEADFYCAARDESLNGVVFGGGTKLTVLGQPKA NPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
23	L12	11D11 HL 11H9 LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQSVLTQPPSAS GTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGAAP KLLIFRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAAWDDSLSGWVFGGGTKLTVLGQP KANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV TVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S
24	L13	12E8 LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDITLTQTPLSLS VSPGQPASISCKSSQSLLHSDGRNYLYWYLQKPG QPPQLLIYEVSNRFSGLPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGIYYCMQSFPLPLTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C

25	L14	12G8 HL	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQSVLTQPPSVS AAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAP KLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQT GDEADYYCGTWDSRLSAVVFGGGTKLTVLGQPK ANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
26	L15	13H2 LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCRASQGIRKDLGWYQQKPGKAP KRLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP EDFATYYCLQYNSFPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
27	L16	32H7 LC	METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSLSP GERATLSCRASQSVSSGYLTWYQQKPGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYGNSLCRFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
28	L17	32H7 CS LC	METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSLSP GERATLSCRASQSVSSGYLTWYQQKPGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYGNSLSRFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Bảng 2B – Các trình tự axit amin chuỗi nặng của kháng thể tiêu biểu

SEQ ID số:	Ký hiệu	Được chứa trong dòng	Trình tự
29	H1	01E11 HC 04E4 HC 09D4 HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGG VVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGK GLEWVAVISFDGSIKYSVDSVKGRFTISRDNSKNT LFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRLNYYDSSGYYH YKYYGMAVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTC

			NVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
30	H2	01H7 HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEVQLVESGGGL VKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKG LEWVGRIKSTTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDRTGYSISWSSY YYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTC NVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
31	H3	02E7 HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEVQLLESGGGL VQPGESLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKDQREVGPYSSGWY DYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTC NVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
32	H4	03B6 HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPG QGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDT SISTAYMELSRLRSDDTAVYFCARDQMSIIMLRGV FPPYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAP

			CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTC NVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
33	H5	03C8 HC 05F5 HC 12E8 HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGG VVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSHESYADSVKGRFTISRDISKNT LYLQMNSLRAEDTAVYFCARERKRVTMSTLYYY FYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
34	H6	04H6 HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEVQLVESGGGL VKPGRSLRLSCTASGFTFGDYAMSWFRQAPGKGL EWIGFIRSRAYGGTPEYAASVKGRFTISRDDSKTI AYLQMNSLKTEDTAVYFCARGRGIAARWDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKV DKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
35	H7	09F5 HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEVQLVESGGGL VKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKG LEWVGRIKSKTDGGTTDYTAPVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLKAEDTAVYYCTTDRTGYSISWSSY

			YYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTC NVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
36	H8	10E4 HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMYWVRQAPG QGLEWMGWISPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTS ISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVRGGYSGYAGLYS HYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
37	H9	11D11 HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEVQLVESGGGL VKPGGSLRLSCAASGFTFGNAWMSWVRQAPGKG LEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLKTEDTAVYFCTTDRTGYSISWSSY YYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTC NVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
38	H10	11H9 HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEVQLVESGGGL VKPGGSLRLSCAASGFTFGNAWMSWVRQAPGKG

			LEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDRTGYSISWSSY YYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTC NVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
39	H11	12G8 HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGG VVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGK GLEWVAVISFDGSIKYSVDSVKGRFTISRDNSKNT LFLQMNSLRAEDTAVYYCARDRLNYYDSSGYYH YKYYGLAVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
40	H12	13H2 HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCEVQLVESGGGL VKPGGSLRLSCAASGYTFSTYSMNWVRQAPGKG LEWVSSISSSSSYRYYADSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMSSLRAEDTAVYYCAREGVSGSSPYSISWYD YYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK

41	H13	32H7 HC	MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCQVQLVESGGG VVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFIISRDKSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGGIAAAGLYYY YGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K

22 axit amin đầu tiên của mỗi trình tự trong số các trình tự chuỗi nhẹ trong bảng 2A, ngoại trừ 32H7 và 32H7 CS, là trình tự tín hiệu. Trong trường hợp của 32H7 và 32H7 CS, trình tự tín hiệu này là 20 axit amin. Cũng như vậy, 22 axit amin đầu tiên của mỗi trình tự trong số các trình tự chuỗi nặng trong bảng 2B là trình tự tín hiệu. Các peptit tín hiệu này có thể được thay đổi thành các peptit tín hiệu có các trình tự khác, ví dụ, để có được sự biểu hiện tối ưu hơn trong các tế bào chủ cụ thể. Do đó, cần phải hiểu rằng sáng chế còn bao gồm các kháng thể có trình tự chuỗi nhẹ và/hoặc trình tự chuỗi nặng như được thể hiện trong các bảng 2A và 2B, nhưng có các trình tự tín hiệu khác.

Mặt khác, mỗi chuỗi nặng trong số các chuỗi nặng tiêu biểu (H1, H2, H3, v.v.) được liệt kê trong bảng 2B có thể được kết hợp với chuỗi nhẹ bất kỳ trong số các chuỗi nhẹ tiêu biểu được thể hiện trong bảng 2A để tạo thành kháng thể. Các ví dụ về các dạng kết hợp như vậy bao gồm H1 được kết hợp với chuỗi bất kỳ trong số từ L1 đến L17; H2 được kết hợp với chuỗi bất kỳ trong số từ L1 đến L17; H3 được kết hợp với chuỗi bất kỳ trong số từ L1 đến L17, v.v.. Trong một số trường hợp, các kháng thể bao gồm ít nhất một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ từ các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được liệt kê trong các bảng 2A và 2B. Trong một số trường hợp, các kháng thể chứa hai chuỗi nặng khác nhau và hai chuỗi nhẹ khác nhau được liệt kê trong các bảng 2A và 2B. Trong các trường hợp khác,

các kháng thể chứa hai chuỗi nhẹ giống nhau và hai chuỗi nặng giống nhau. Ví dụ, kháng thể hoặc đoạn có chức năng miễn dịch có thể bao gồm hai chuỗi nặng H1 và hai chuỗi nhẹ L1, hoặc hai chuỗi nặng H2 và hai chuỗi nhẹ L2, hoặc hai chuỗi nặng H3 và hai chuỗi nhẹ L3 và các dạng kết hợp tương tự khác của các cặp chuỗi nhẹ và các cặp chuỗi nặng như được liệt kê trong các bảng 2A và 2B.

Các protein liên kết kháng nguyên được đề cập khác là các biến thể của các kháng thể được tạo ra bằng cách kết hợp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thể hiện trong các bảng 2A và 2B và chứa chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng mà mỗi chuỗi này có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% hoặc 99% với các trình tự axit amin của các chuỗi này. Trong một số trường hợp, các kháng thể như vậy bao gồm ít nhất một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ, trong khi đó trong các trường hợp khác, các dạng biến thể chứa hai chuỗi nhẹ giống nhau và hai chuỗi nặng giống nhau.

Các miền biến đổi của kháng thể

Sáng chế còn đề cập đến các protein liên kết kháng nguyên mà chứa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm V_H1, V_H2, V_H3, V_H4, V_H5, V_H6, V_H7, V_H8, V_H9, V_H10, V_H11, V_H12 và V_H13, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm V_L1, V_L2, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16 và V_L17, như được thể hiện trong bảng 3 dưới đây, và các đoạn có chức năng miễn dịch, các dẫn xuất, các mutein và các biến thể của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng này.

Các đoạn sắp xếp thẳng hàng của trình tự của các vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ khác nhau lần lượt được trình bày trong Fig.1A và Fig.1B.

Protein liên kết kháng nguyên thuộc loại này có thể được ký hiệu chung bằng công thức "V_Hx/ V_Ly", trong đó "x" tương ứng với số lượng vùng biến đổi chuỗi nặng và "y" tương ứng với số lượng vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

Bảng 3: Các trình tự axit amin của chuỗi V_H và V_L tiêu biểu

Được chứa trong dòng	Ký hiệu	SEQ ID số	Trình tự axit amin
1E11	V_L1	137	QSVLTQPPSVSEAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY VSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGS KSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSRLSA VVFGGGTKLTVL
1H7	V_L2	138	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYV YWYQQLPGAAPKLLIFRSNQRPSGVPDRFSGS KSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSG WVFGGGTKLTVL
2E7	V_L3	139	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDL GWFQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPEDLATYYCLQYNIYPWTF GQGTKVEIK
3B6	V_L4	140	SSELTQDPTVSVALGQTVKITCQGDSLRSFYAS WYQQKPGQAPVLVFYGKNNRPSGIPDRFSGSS SGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSVYHL VLGGGTKLTVL
3C8	V_L5	141	DIILAQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSAG KTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQSFPL PLTFGGGTKVEIK
4E4	V_L6	142	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY VSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGS KSGTSTTLGITGLQTGDEADYYCGTWDSRLSA VVFGGGTKLTVL
4H6	V_L7	143	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSFG YNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAL QTPFTFGPGTKVDIK
5F5	V_L8	144	DIILTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDG KTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGEPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGTYYCMQSFPL PLTFGGGTKVEIK

Được chứa trong dòng	Ký hiệu	SEQ ID số	Trình tự axit amin
9D4	V_L9	145	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY VSWYQQFPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGS KSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSRLSA VVFGGGTKLTVL
9F5	V_L10	146	QSVLTQSPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYV YWYQQLPGAAPKLLILRNNQRPSGVPDRFSGS KSGTSASLTISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSG WVFGGGTKLTVL
10E4	V_L11	147	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTV NWYQQLPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRFSGS KSGTSASLAISGLQSEDEADFYCAARDESLNG VVFGGGTKLTVL
11D11 11H9	V_L12	148	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYV YWYQQLPGAAPKLLIFRNNQRPSGVPDRFSGS KSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSG WVFGGGTKLTVL
12E8	V_L13	149	DITLTQTPLSLSVSPGQPASISCKSSQSLLHSDG RNYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGLPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQSFPL PLTFGGGTKVEIK
12G8	V_L14	150	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY VSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGS KSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSRLSA VVFGGGTKLTVL
13H2	V_L15	151	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRKDL GWYQQKPGKAPKRLIYGASSLQSGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYNSFPWTF GQGTKVEIK
32H7	V_L16	152	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSGYL TWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGNSLCRF GQGTKLEIK

Được chứa trong dòng	Ký hiệu	SEQ ID số	Trình tự axit amin
32H7 CS	V_L17	153	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSGYL TWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGNSLSRF GQGTKLEIK
32H8	V_L18	154	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSILDSS NNDNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ YYNTPFTFGPGTKVDIK
33B5	V_L19	155	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDL GWYQQKPGKAPKRLIYVASSLQSGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYNTYPLTF GGGTKVEIK
33E4	V_L20	156	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNL AWYQQKPGQAPRLLIHDASPRTAGIPARFSGS GSGTEFTLTINSLQSEDFAVYYCQQYNYWTPIT FGQGTRLEIK
34E3	V_L21	157	QSVLTQPPSMSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNY VSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGS KSGTSATLGITGLQTGDEANYCCGTWDIGLSV WVFGGGTKLTVL
4E4 9D4 1E11	V_H1	158	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSF GMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSIKYSVDS VKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYY CARDRLNYYDSSGYYHYKYYGMAVWGQGTT VTVSS
1H7	V_H2	159	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNA WMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSTTDGGTTDY AAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCTTDRTGYSISWSSYYYYYGMDVWGQG TTVTVSS
2E7	V_H3	160	EVQLLESGGGLVQPGESLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRTYYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKDQREVGPYSSGWYDYYYGMDVWGQGTT VTVSS

Được chứa trong dòng	Ký hiệu	SEQ ID số	Trình tự axit amin
3B6	V_H4	161	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTG YYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNY AQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTA VYFCARDQMSIIMLRGVFPPYYYGMDVWGQG TTVTVSS
3C8 12E8 5F5	V_H5	162	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY GMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSHESYAD SVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVY FCARERKRVTMSTLYYYFYYGMDVWGQGTT VTVSS
4H6	V_H6	163	EVQLVESGGGLVKPGRSLRLSCTASGFTFGDY AMSWFRQAPGKGLEWIGFIRSRAYGGTPEYA ASVKGRFTISRDDSKTIAYLQMNSLKTEDTAV YFCARGRGIAARWDYWGQGTLVTVSS
9F5	V_H7	164	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNA WMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDY TAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKAEDTA VYYCTTDRTGYSISWSSYYYYYGMDVWGQG TTVTVSS
10E4	V_H8	165	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTD YYMYWVRQAPGQGLEWMGWISPNSGGTNYA QKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAV YYCVRGGYSGYAGLYSHYYGMDVWGQGTT VTVSS
11D11	V_H9	166	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGNA WMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDY AAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYFCTTDRTGYSISWSSYYYYYGMDVWGQGT TVTVSS
11H9	V_H10	167	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGNA WMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDY AAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCTTDRTGYSISWSSYYYYYGMDVWGQG TTVTVSS

Được chứa trong dòng	Ký hiệu	SEQ ID số	Trình tự axit amin
12G8	V_H11	168	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSF GMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSIKYSVDS VKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYY CARDRLNYYDSSGYYHYKYYGLAVWGQGTT VTVSS
13H2	V_H12	169	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFSTY SMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYRYYADS VKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTAVYY CAREGVSGSSPYSISWYDYYYGMDVWGQGTT VTVSS
32H7	V_H13	170	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY GMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYA DSVKGRFIISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARAGGIAAAGLYYYYGMDVWGQGTTVT VSS
32H8	V_H14	171	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTA YYLHWVRQAPGQGLEWMGWINPHSGGTNYA QKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAV FYCARGRQWLGFDYWGQGTLVTVSS
33E4	V_H15	172	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLSCAVYGGSFGG YYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGGTKYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFC ARGDVVGFFDYWGQGTLVTVSS
33B5	V_H16	173	QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSCKASGYTFTG YYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNY VQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTA VYYCARNEYSSAWPLGYWGQGTLVTVSS
34E3	V_H17	174	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGV GVAWIRQPPGKALEWLALIYWTDDKRYSPSL KSRLTITKDTSKNQVVLRMTNMDPLDTATYFC AHRPGGWFDPWGQGTLVTVSS

Mỗi vùng trong số các vùng biến đổi chuỗi nặng được liệt kê trong bảng 3 có thể được kết hợp với vùng bất kỳ trong số các vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong

bảng 3 để tạo thành protein liên kết kháng nguyên. Các ví dụ về các dạng kết hợp như vậy bao gồm V_H1 được kết hợp với vùng bất kỳ trong số V_L1, V_L2, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16 hoặc V_L17; V_H2 được kết hợp với vùng bất kỳ trong số V_L1, V_L2, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16 hoặc V_L17; V_H3 được kết hợp với vùng bất kỳ trong số V_L1, V_L2, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16 hoặc V_L17; v.v..

Trong một số trường hợp, protein liên kết kháng nguyên bao gồm ít nhất một vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc một vùng biến đổi chuỗi nhẹ từ các vùng được liệt kê trong bảng 3. Trong một số trường hợp, protein liên kết kháng nguyên bao gồm ít nhất hai vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ khác nhau từ các vùng được liệt kê trong bảng 3. Một ví dụ về protein liên kết kháng nguyên như vậy chứa (a) một V_H1, và (b) một trong số V_H2, V_H3, V_H4, V_H5, V_H6, V_H7, V_H8, V_H9, V_H10, V_H11, V_H12 hoặc V_H13. Ví dụ khác chứa (a) một V_H2, và (b) một trong số V_H1, V_H3, V_H4, V_H5, V_H6, V_H7, V_H8, V_H9, V_H10, V_H11, V_H12 hoặc V_H13. Ví dụ khác nữa chứa (a) một V_H3, và (b) một trong số V_H1, V_H2, V_H4, V_H5, V_H6, V_H7, V_H8, V_H9, V_H10, V_H11, V_H12 hoặc V_H13, v.v.. Ví dụ khác nữa về protein liên kết kháng nguyên như vậy chứa (a) một V_L1, và (b) một trong số V_L2, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16, V_L17, V_L18, V_L19, V_L20 hoặc V_L21. Ví dụ khác nữa về protein liên kết kháng nguyên như vậy chứa (a) một V_L2, và (b) một trong số V_L1, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16, V_L17, V_L18, V_L19, V_L20 hoặc V_L21. Ví dụ khác nữa về protein liên kết kháng nguyên như vậy chứa (a) một V_L3, và (b) một trong số V_L1, V_L2, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16, V_L17, V_L18, V_L19, V_L20 hoặc V_L21, v.v..

Các dạng kết hợp khác nhau của các vùng biến đổi chuỗi nặng có thể được kết hợp với dạng bất kỳ trong số các dạng kết hợp khác nhau của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được hiểu rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Trong các trường hợp khác, protein liên kết kháng nguyên chứa hai vùng biến đổi chuỗi nhẹ giống nhau và/hoặc hai vùng biến đổi chuỗi nặng giống nhau. Ví dụ, protein liên kết kháng nguyên có thể là kháng thể hoặc đoạn có chức năng miễn dịch mà chứa hai vùng biến đổi chuỗi nhẹ và hai vùng biến đổi chuỗi nặng ở dạng kết hợp của các cặp vùng biến đổi chuỗi nhẹ và các cặp vùng biến đổi chuỗi nặng như được liệt kê trong bảng 3.

Một số protein liên kết kháng nguyên được đề cập chứa miền biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin khác với trình tự của miền biến đổi chuỗi nặng được chọn từ V_H1, V_H2, V_H3, V_H4, V_H5, V_H6, V_H7, V_H8, V_H9, V_H10, V_H11, V_H12 và V_H13 chỉ ở 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 gốc axit amin, trong đó mỗi khác biệt về trình tự như vậy độc lập là đột biến khuyết, đột biến chèn hoặc đột biến thế một axit amin, trong đó các đột biến khuyết, đột biến chèn và/hoặc đột biến thế này làm thay đổi không nhiều hơn 15 axit amin so với các trình tự miền biến đổi nêu trên. Vùng biến đổi chuỗi nặng trong một số protein liên kết kháng nguyên chứa trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% hoặc 99% với các trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng V_H1, V_H2, V_H3, V_H4, V_H5, V_H6, V_H7, V_H8, V_H9, V_H10, V_H11, V_H12 và V_H13.

Các protein liên kết kháng nguyên cụ thể chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin khác với trình tự của miền biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ V_L1, V_L2, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16 hoặc V_L17 chỉ ở 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 gốc axit amin, trong đó mỗi khác biệt về trình tự như vậy độc lập là đột biến khuyết, đột biến chèn hoặc đột biến thế một axit amin, trong đó các đột biến khuyết, đột biến chèn và/hoặc đột biến thế này làm thay đổi không nhiều hơn 15 axit amin so với các trình tự miền biến đổi nêu trên. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ trong một số protein liên kết kháng nguyên chứa trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% hoặc 99% với các trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ V_L1, V_L2, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16 hoặc V_L17.

Trong các trường hợp khác nữa, các protein liên kết kháng nguyên chứa các cặp miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng sau đây: VL1 với VH1, VL2 với VH2, VL3 với VH3, VL4 với VH4, VL5 với VH5, VL6 với VH1, VL7 với VH6, VL8 với VH5, VL9 với VH1, VL10 với VH7, VL11 với H8, VL12 với VH9, VL12 với VH10, VL13 với VH5, VL14 với VH11, VL15 với VH12, VL16 với VH13 và VL17 với VH13. Trong một số trường hợp, các protein liên kết kháng nguyên trong các cặp nêu trên có thể chứa các trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% hoặc 99% với các miền biến đổi đã định.

Các protein liên kết kháng nguyên khác nữa, ví dụ, các kháng thể hoặc các đoạn có chức năng miễn dịch, bao gồm các dạng biến thể của chuỗi nặng biến thể và chuỗi nhẹ biến thể như vừa được mô tả.

Các CDR

Các protein liên kết kháng nguyên được bộc lộ ở đây là các polypeptit mà trong đó một hoặc nhiều CDR được ghép, chèn và/hoặc nối vào đó. Protein liên kết kháng nguyên có thể có 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 CDR. Vì vậy, protein liên kết kháng nguyên có thể có, ví dụ, một CDR1 chuỗi nặng ("CDRH1"), và/hoặc một CDR2 chuỗi nặng ("CDRH2"), và/hoặc một CDR3 chuỗi nặng ("CDRH3"), và/hoặc một CDR1 chuỗi nhẹ ("CDRL1"), và/hoặc một CDR2 chuỗi nhẹ ("CDRL2"), và/hoặc một CDR3 chuỗi nhẹ ("CDRL3"). Một số protein liên kết kháng nguyên chứa cả CDRH3 và CDRL3. CDR chuỗi nặng và CDR chuỗi nhẹ đặc hiệu lần lượt được thể hiện trong các bảng 4A và 4B.

Các vùng quyết định bổ sung (các CDR) và vùng khung (FR) của kháng thể đã nêu có thể được nhận diện bằng cách sử dụng hệ thống được Kabat và cộng sự mô tả trong tài liệu Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Hunam Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991. Các kháng thể cụ thể được bộc lộ ở đây chứa một hoặc nhiều trình tự axit amin giống hoặc có trình tự giống về cơ bản với các trình tự axit amin của một hoặc nhiều CDR được trình bày trong bảng 4A (các CDRH) và bảng 4B (các CDRL).

Bảng 4A: Các trình tự axit amin của CDR chuỗi nặng tiêu biểu

Số	SEQ ID số:	Được chứa trong trình tự tham chiếu	Ký hiệu	Trình tự
42	73	1E11HCDR1 4E4HCDR1 9D4HCDR1 12G8HCDR1	CDRH 1-1	SFGMH
43	76	1H7HCDR1 9F5HCDR1 11D11HCDR1 11H9HCDR1	CDRH 1-2	NAWMS
44	79	2E7HCDR1	CDRH 1-3	SYAMS
45	82	3B6HCDR1	CDRH 1-4	GYYMH
46	85	3C8HCDR1 5F5HCDR1 12E8HCDR1	CDRH 1-5	SYGMH
47	88	4H6HCDR1	CDRH 1-6	DYAMS
48	92	10E4HCDR1	CDRH 1-7	DYYMY
49	97	13H2HCDR1	CDRH 1-8	TYSMN
50	100	32H7HCDR1	CDRH 1-9	SYGMH
51	74	1E11HCDR2 4E4HCDR2 9D4HCDR2 12G8HCDR2	CDRH 2-1	VISFDGSIKYSVDSVKG
52	77	1H7HCDR2	CDRH 2-2	RIKSTTDGGTTDYAAPVKG
53	80	2E7HCDR2	CDRH 2-3	AISGSGGRTYYADSVKG
54	83	3B6HCDR2	CDRH 2-4	WINPNSGGTNYAQKFQG
55	86	3C8HCDR2 5F5HCDR2 12E8HCDR2	CDRH 2-5	VISYDGSHESYADSVKG
56	89	4H6HCDR2	CDRH 2-6	FIRSRAYGGTPEYAASVKG
57	91	9F5HCDR2	CDRH 2-7	RIKSKTDGGTTDYTAPVKG
58	93	10E4HCDR2	CDRH 2-8	WISPNSGGTNYAQKFQG

Số	SEQ ID số:	Được chứa trong trình tự tham chiếu	Ký hiệu	Trình tự
59	95	11D11HCDR2 11H9HCDR2	CDRH 2-9	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG
60	98	13H2HCDR2	CDRH 2-10	SISSSSSYRYYADSVKG
61	101	32H7HCDR2	CDRH 2-11	VIWYDGSNKYYADSVKG
62	75	1E11HCDR3 4E4HCDR3 9D4HCDR3	CDRH 3-1	DRLNYYDSSGYYHYKYYGMAV
63	78	1H7HCDR3 9F5HCDR3 11D11HCDR3 11H9HCDR3	CDRH 3-2	DRTGYSISWSSYYYYYGMDV
64	81	2E7HCDR3	CDRH 3-3	DQREVGPYSSGWYDYYYGMDV
65	84	3B6HCDR3	CDRH 3-4	DQMSIIMLRGVFPPYYYGMDV
66	87	3C8HCDR3 5F5HCDR3 12E8HCDR3	CDRH 3-5	ERKRVTMSTLYYYFYYGMDV
67	90	4H6HCDR3	CDRH 3-6	GRGIAARWDY
68	94	10E4HCDR3	CDRH 3-7	GGYSGYAGLYSHYYGMDV
69	96	12G8HCDR3	CDRH 3-8	DRLNYYDSSGYYHYKYYGLAV
70	99	13H2HCDR3	CDRH 3-9	EGVSGSSPYSISWYDYYYGMDV
71	102	32H7HCDR3	CDRH 3-10	AGGIAAAGLYYYYGMDV

Bảng 4B: Các trình tự axit amin của CDR chuỗi nhẹ tiêu biểu

Số	SEQ ID số:	Được chứa trong trình tự tham chiếu	Ký hiệu	Trình tự
72	42	1E11LCD1 4E4LCD1 9D4LCD1 12G8LCD1	CDRL 1-1	SGSSSNIGNNYVS

Số	SEQ ID số:	Được chứa trong trình tự tham chiếu	Ký hiệu	Trình tự
73	45	1H7LCD1 9F5LCD1 11D11LC1 11H9LCD1	CDRL 1-2	SGSSSNIGSNYVY
74	48	2E7LCD1	CDRL 1-3	RASQGIRNDLG
75	51	3B6LCD1	CDRL 1-4	QGDSLRSFYAS
76	54	3C8LCD1	CDRL 1-5	KSSQSLLHSAGKTYLY
77	57	4H6LCD1	CDRL 1-6	RSSQSLLHSFGYNYLD
78	60	5F5LCD1	CDRL 1-7	KSSQSLLHSDGKTYLY
79	62	10E4LCD1	CDRL 1-8	SGSSSNIGSNTVN
80	65	12E8LCD1	CDRL 1-9	KSSQSLLHSDGRNYLY
81	66	13H2LCD1	CDRL 1-10	RASQGIRKDLG
82	69	32H7 LCD1 32H7m LCD1	CDRL 1-11	RASQSVSSGYLT
83	43	1E11LCD2 4E4LCD2 9D4LCD2 12G8LCD2	CDRL 2-1	DNNKRPS
84	46	1H7LCD2	CDRL 2-2	RSNQRPS
85	49	2E7LCD2	CDRL 2-3	AASSLQS
86	52	3B6LCD2	CDRL 2-4	GKNNRPS
87	55	3C8LCD2 5F5LCD2 12E8LCD2	CDRL 2-5	EVSNRFS
88	58	4H6LCD2	CDRL 2-6	LGSNRAS
89	61	9F5LCD2 11D11LC2 11H9LCD2	CDRL 2-7	RNNQRPS
90	63	10E4LCD2	CDRL 2-8	TNNQRPS
91	67	13H2LCD2	CDRL 2-9	GASSLQS
92	70	32H7 LCD2 32H7m LCD2	CDRL 2-10	GASSRAT

Số	SEQ ID số:	Được chứa trong trình tự tham chiếu	Ký hiệu	Trình tự
93	44	1E11LCD3 4E4LCD3 9D4LCD3 12G8LCD3	CDRL 3-1	GTWDSRLSAVV
94	47	1H7LCD3 9F5LCD3 11D11LC3 11H9LCD3	CDRL 3-2	AAWDDSLSGWV
95	50	2E7LCD3	CDRL 3-3	LQYNIYPWT
96	53	3B6LCD3	CDRL 3-4	NSRDSSVYHLV
97	56	3C8LCD3 5F5LCD3 12E8LCD3	CDRL 3-5	MQSFPLPLT
98	59	4H6LCD3	CDRL 3-6	MQALQTPFT
99	64	10E4LCD3	CDRL 3-7	AARDESLNGVV
100	68	13H2LCD3	CDRL 3-8	LQYNSFPWT
101	71	32H7 LCD3	CDRL 3-9	QQYGNSLCR
102	72	32H7m LCD3	CDRL 3-10	QQYGNSLSR

Cấu trúc và các tính chất của các CDR trong kháng thể có trong tự nhiên đã được mô tả trên đây. Một cách vắn tắt, trong kháng thể thông thường, các CDR được gắn trong khung trong vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ nơi chúng cấu thành các vùng chịu trách nhiệm về sự liên kết và nhận biết kháng nguyên. Vùng biến đổi chứa ít nhất ba CDR chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, xem trên đây (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD; đồng thời xem tài liệu Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883), trong vùng khung (các vùng khung được ký hiệu 1-4, FR1, FR2, FR3 và FR4, trong tài liệu Kabat et al., 1991, trên đây; đồng thời xem tài liệu Chothia and Lesk, 1987, trên đây). Tuy nhiên, các CDR được đề cập ở đây có thể không chỉ được sử

dụng để xác định miền liên kết kháng nguyên của cấu trúc kháng thể thông thường, mà còn có thể được gắn trong các cấu trúc polypeptit khác, như được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh, các CDR được đề cập là (a) CDRH được chọn từ nhóm bao gồm (i) CDRH1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:73, 76, 79, 82, 85, 88, 92, 97 và 100; (ii) CDRH2 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:74, 77, 80, 83, 86, 89, 91, 93, 95, 98, 101 và 129; (iii) CDRH3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:75, 78, 81, 84, 87, 90, 96, 99, 102 và 123; và (iv) CDRH nêu trong (i), (ii) và (iii) mà chứa một hoặc nhiều, ví dụ, một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn nữa, đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin mà không nhiều hơn năm, bốn, ba, hai hoặc một axit amin; (B) CDRL được chọn từ nhóm bao gồm (i) CDRL1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:42, 45, 48, 51, 54, 57, 62, 65, 66 và 69; (ii) CDRL2 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 63, 67 và 70; (iii) CDRL3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:44, 47, 50, 53, 56, 59, 64, 68, 71 và 72; và (iv) CDRL nêu trong (i), (ii) và (iii) mà chứa một hoặc nhiều, ví dụ, một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn nữa, đột biến thế axit amin (ví dụ, đột biến thế axit amin bảo thủ), đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin mà không nhiều hơn năm, bốn, ba, hai hoặc một axit amin.

Theo khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên chứa 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 dạng biến thể của CDR được liệt kê trong các bảng 4A và 4B, mỗi dạng biến thể này có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 85%, 90% hoặc 95% với trình tự CDR được liệt kê trong các bảng 4A và 4B. Một số protein liên kết kháng nguyên chứa 1, 2, 3, 4, 5 hoặc 6 dạng biến thể của CDR được liệt kê trong các bảng 4A và 4B, mỗi dạng biến thể này khác không nhiều hơn 1, 2, 3, 4 hoặc 5 axit amin so với các CDR được liệt kê trong các bảng này.

Theo khía cạnh khác nữa, các CDR được bộc lộ ở đây bao gồm các trình tự liên ứng thu được từ các nhóm kháng thể đơn dòng có liên quan. Như được mô tả ở đây, "trình tự liên ứng" được dùng để chỉ các trình tự axit amin có các axit amin bảo thủ chung giữa các trình tự và các axit amin biến đổi mà có thể thay đổi trong các trình tự axit amin

đã nêu. Các trình tự liên ứng CDR được đề cập bao gồm các CDR tương ứng với mỗi trong số CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 và CDRL3.

Theo khía cạnh khác nữa, protein liên kết kháng nguyên chứa các dạng kết hợp sau đây của CDRL1, CDRL2 và CDRL3: các SEQ ID số: 42, 43 và 44; các SEQ ID số: 45, 46 và 47; các SEQ ID số: 48, 49 và 50; các SEQ ID số: 51, 52 và 53; các SEQ ID số: 54, 55 và 56; các SEQ ID số: 57, 58 và 59; các SEQ ID số: 60, 55 và 56; các SEQ ID số: 45, 61 và 47; các SEQ ID số: 62, 63 và 64; các SEQ ID số: 65, 55 và 56; các SEQ ID số: 66, 67 và 68; các SEQ ID số: 69, 70 và 71; và các SEQ ID số: 69, 70 và 72.

Theo một khía cạnh bổ sung, protein liên kết kháng nguyên chứa các dạng kết hợp sau đây của CDRH1, CDRH2 và CDRH3: các SEQ ID số: 73, 74 và 75; các SEQ ID số: 76, 77 và 78; các SEQ ID số: 79, 80 và 81; các SEQ ID số: 82, 83 và 84; các SEQ ID số: 85, 86 và 87; các SEQ ID số: 88, 89 và 90; các SEQ ID số: 76, 91 và 78; các SEQ ID số: 92, 93 và 94; các SEQ ID số: 76, 95 và 78; các SEQ ID số: 73, 74 và 96; các SEQ ID số: 97, 98 và 99; và các SEQ ID số: 100, 101 và 102.

Theo khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên chứa các dạng kết hợp sau đây của CDRL1, CDRL2 và CDRL3 với CDRH1, CDRH2 và CDRH3: các SEQ ID số: 42, 43 và 44 với các SEQ ID số: 73, 74 và 75; các SEQ ID số: 45, 46 và 47 với các SEQ ID số: 76, 77 và 78; các SEQ ID số: 48, 49 và 50 với các SEQ ID số: 79, 80 và 81; các SEQ ID số: 51, 52 và 53 với các SEQ ID số: 82, 83 và 84; các SEQ ID số: 54, 55 và 56 với các SEQ ID số: 85, 86 và 87; các SEQ ID số: 57, 58 và 59 với các SEQ ID số: 88, 89 và 90; các SEQ ID số: 60, 55 và 56 với các SEQ ID số: 85, 86 và 87; các SEQ ID số: 45, 61 và 47 với các SEQ ID số: 76, 91 và 78; các SEQ ID số: 62, 63 và 64 với các SEQ ID số: 92, 93 và 94; các SEQ ID số: 45, 61 và 47 với các SEQ ID số: 76, 95 và 78; các SEQ ID số: 65, 55 và 56 với các SEQ ID số: 85, 86 và 87; các SEQ ID số: 42, 43 và 44 với các SEQ ID số: 73, 74 và 96; các SEQ ID số: 66, 67 và 68 với các SEQ ID số: 97, 98 và 99; các SEQ ID số: 69, 70 và 71 với các SEQ ID số: 100, 101 và 102; và các SEQ ID số: 69, 70 và 72 với các SEQ ID số: 100, 101 và 102.

Các trình tự liên ứng được xác định bằng cách sử dụng các phân tích chuẩn về phát sinh loài của các CDR tương ứng với V_H và V_L của các kháng thể kháng CGRP R. Các trình tự liên ứng này được xác định bằng cách giữ các CDR tiếp giáp trong cùng trình tự tương ứng với V_H hoặc V_L.

Như được minh họa trong Fig.3A, Fig.3B, Fig.4, Fig.5A, Fig.5B, Fig.5C, Fig.5D và Fig.5E, phép phân tích phả hệ đối với các protein liên kết kháng nguyên được đề cập ở đây tạo ra các nhóm trình tự có liên quan, được ký hiệu là các nhóm CDR chuỗi nhẹ K1, K2, K3 và K4 (Fig.3A và Fig.3B), các nhóm CDR chuỗi nhẹ L1, L2, L3 và L4 (Fig.4), và các nhóm CDR chuỗi nặng HC1 (Fig.5A), HC2 (Fig.5B), HC3 (Fig.5C), HC4 (Fig.5C), HC5 (Fig.5D) và HC6 (Fig.5E). Một số trong số các nhóm trên đây được sử dụng để tạo ra các trình tự liên ứng bổ sung, như được minh họa trong Fig.3A, Fig.3B, Fig.4 và Fig.5F, để thu được các nhóm CDR chuỗi nhẹ K1,4 (Fig.3A), K2,3 (Fig.3B), L1,2,3 (Fig, 4) và LAll (Fig.4), và các nhóm CDR chuỗi nặng HCA và HCB (Fig.5F).

Các trình tự liên ứng của các nhóm vùng CDR khác nhau được thể hiện dưới đây:

Trình tự liên ứng K1

CDR1 RASQGIRX_1DLG (SEQ ID số:103), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm N và K.

CDR2 X_1ASSLQS (SEQ ID số:104), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm A và G.

CDR3 LQYNX_1X_2PWT (SEQ ID số:105), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm I và S, và X_2 được chọn từ nhóm bao gồm Y và F.

Trình tự liên ứng K4

CDR3 QQYGNSLX_1R (SEQ ID số:106), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm S và C.

Trình tự liên ứng K1,4

CDR1 RASQ$X_1X_2X_3X_4$GX_5LX_6 (SEQ ID số:107), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm S và G, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm V và I, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm S và

R, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm S, N và K, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm Y và D, và X_6 được chọn từ nhóm bao gồm T và G.

CDR2 $X_1ASSX_2X_3X_4$ (SEQ ID số:108), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm G và A, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm R và L, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm A và Q, và X_4 được chọn từ nhóm bao gồm T và S.

CDR3 $X_1QYX_2X_3X_4X_5X_6X_7$ (SEQ ID số:109), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm Q và L, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm G và N, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm N và T, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm S, Y và F, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm L và P, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm C, W và S, và X_7 được chọn từ nhóm bao gồm R và T.

Trình tự liên ứng K3

CDR1 $KSSQSLLHSX_1GX_2X_3YLY$ (SEQ ID số:110), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm D và A, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm R và K, và X_3 được chọn từ nhóm bao gồm N và T.

Trình tự liên ứng K2,3

CDR1 $X_1SSQSLLHSX_2GX_3X_4YLX_5$ (SEQ ID số:111), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm R và K, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm F, D và A, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm Y, R và K, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm N và T, và X_5 được chọn từ nhóm bao gồm D và Y.

CDR2 $X_1X_2SNRX_3S$ (SEQ ID số:112), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm L và E, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm G và V, và X_3 được chọn từ nhóm bao gồm A và F.

CDR3 $MQX_1X_2X_3X_4PX_5T$ (SEQ ID số:113), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm A và S, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm L và F, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm Q và P, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm T và L, và X_5 được chọn từ nhóm bao gồm F và L.

Trình tự liên ứng Lm3

CDR2 RX_1NQRPS (SEQ ID số:114), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm N và S.

Trình tự liên ứng Lm1,2,3

CDR1 SGSSSNIGX$_1$NX$_2$VX$_3$ (SEQ ID số:115), trong đó X$_1$ được chọn từ nhóm bao gồm N và S, X$_2$ được chọn từ nhóm bao gồm Y và T, và X$_3$ được chọn từ nhóm bao gồm S, N và Y.

CDR2 X$_1$X$_2$NX$_3$RPS (SEQ ID số:116), trong đó X$_1$ được chọn từ nhóm bao gồm D, T và R, X$_2$ được chọn từ nhóm bao gồm N và S, và X$_3$ được chọn từ nhóm bao gồm K và Q.

CDR3 X$_1$X$_2$X$_3$DX$_4$X$_5$LX$_6$X$_7$VV (SEQ ID số:117), trong đó X$_1$ được chọn từ nhóm bao gồm G và A, X$_2$ được chọn từ nhóm bao gồm T và A, X$_3$ được chọn từ nhóm bao gồm W và R, X$_4$ được chọn từ nhóm bao gồm S và D, X$_5$ được chọn từ nhóm bao gồm R và S, X$_6$ được chọn từ nhóm bao gồm S và N, và X$_7$ được chọn từ nhóm bao gồm A và G.

Trình tự liên ứng LAll

CDR1 X$_1$GX$_2$X$_3$SX$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$X$_{11}$ (SEQ ID số:118), trong đó X$_1$ được chọn từ nhóm bao gồm S và Q, X$_2$ có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là S, X$_3$ được chọn từ nhóm bao gồm S và D, X$_4$ có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là N, X$_5$ được chọn từ nhóm bao gồm I và L, X$_6$ được chọn từ nhóm bao gồm G và R, X$_7$ được chọn từ nhóm bao gồm N và S, X$_8$ được chọn từ nhóm bao gồm N và F, X$_9$ được chọn từ nhóm bao gồm Y và T, X$_{10}$ được chọn từ nhóm bao gồm V và A, và X$_{11}$ được chọn từ nhóm bao gồm S, N và Y.

CDR2 X$_1$X$_2$NX$_3$RPS (SEQ ID số:119), trong đó X$_1$ được chọn từ nhóm bao gồm D, G, T và R, X$_2$ được chọn từ nhóm bao gồm N, K và S, và X$_3$ được chọn từ nhóm bao gồm K, N và Q.

CDR3 X$_1$X$_2$X$_3$DX$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$X$_9$V (SEQ ID số:120), trong đó X$_1$ được chọn từ nhóm bao gồm G, N và A, X$_2$ được chọn từ nhóm bao gồm T, S và A, X$_3$ được chọn từ nhóm bao gồm W và R, X$_4$ được chọn từ nhóm bao gồm S và D, X$_5$ được chọn từ nhóm bao gồm R và S, X$_6$ được chọn từ nhóm bao gồm L và V, X$_7$ được chọn từ nhóm bao gồm S, Y và N, X$_8$ được chọn từ nhóm bao gồm A, H và G, và X$_9$ được chọn từ nhóm bao gồm V và L.

Trình tự liên ứng HC1

CDR1 X_1YYMX$_2$ (SEQ ID số:121), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm G và D, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm H và Y.

CDR2 WIX$_1$PNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID số:122), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm N và S.

CDR3 $X_1X_2X_3SX_4X_5X_6X_7X_8GX_9X_{10}X_{11}X_{12}YYX_{13}$GMDV (SEQ ID số:123), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm D và G, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm Q và G, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm M và Y, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm I và G, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm I và Y, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm M và A, X_7 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là L, X_8 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là R, X_9 được chọn từ nhóm bao gồm V và L, X_{10} được chọn từ nhóm bao gồm F và Y, X_{11} được chọn từ nhóm bao gồm P và S, X_{12} được chọn từ nhóm bao gồm P và H, và X_{13} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là Y.

Trình tự liên ứng HC2

CDR2 RIKSX$_1$TDGGTTDYX$_2$APVKG (SEQ ID số:124), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm K và T, và X_2 được chọn từ nhóm bao gồm T và A.

Trình tự liên ứng HC3

CDR1 X$_1$YX$_2$MX$_3$ (SEQ ID số:125), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm T và S, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm S và A, và X_3 được chọn từ nhóm bao gồm N và S.

CDR2 X$_1$ISX$_2$SX$_3$X$_4$X$_5$X$_6$YYADSVKG (SEQ ID số:126), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm S và A, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm S và G, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm S và G, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm S và G, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm Y và R, và X_6 được chọn từ nhóm bao gồm R và T.

CDR3 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$PYSX$_8$X$_9$WYDYYYGMDV (SEQ ID số:127), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm E và D, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm G và Q, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm V và R, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm S và E, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm G và V, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm S và G, X_7 có mặt hoặc không có mặt,

và nếu có mặt, là S, X_8 được chọn từ nhóm bao gồm I và S, và X_9 được chọn từ nhóm bao gồm S và G.

Trình tự liên ứng HC4

CDR1 SX_1GMH (SEQ ID số:128), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm F và Y.

CDR2 $VISX_1DGSX_2KYX_3X_4DSVKG$ (SEQ ID số:129), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm F và Y, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm I và H, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm S và Y, và X_4 được chọn từ nhóm bao gồm V và A.

CDR3 $X_1RX_2X_3X_4X_5X_6SX_7X_8YYX_9X_{10}X_{11}YYGX_{12}X_{13}V$ (SEQ ID số:130), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm D và E, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm L và K, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm N và R, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm Y và V, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm Y và T, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm D và M, X_7 được chọn từ nhóm bao gồm S và T, X_8 được chọn từ nhóm bao gồm G và L, X_9 được chọn từ nhóm bao gồm H và Y, X_{10} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là Y, X_{11} được chọn từ nhóm bao gồm K và F, X_{12} được chọn từ nhóm bao gồm M và L, và X_{13} được chọn từ nhóm bao gồm A và D.

Trình tự liên ứng HCA

CDR1 $X_1X_2X_3MX_4$ (SEQ ID số:131), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm N và S, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm A, Y và F, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm W, A và G, và X_4 được chọn từ nhóm bao gồm S và H.

CDR2 $X_1IX_2X_3X_4X_5X_6GX_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}VKG$ (SEQ ID số:132), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm R, A và V, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm K, S và W, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm S, G, F và Y, X_4 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm K và T, X_5 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là T, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm D và S, X_7 được chọn từ nhóm bao gồm G và S, X_8 được chọn từ nhóm bao gồm T, R, I, N và H, X_9 được chọn từ nhóm bao gồm T và K, X_{10} được chọn từ nhóm bao gồm D và Y, X_{11} được chọn từ nhóm bao gồm Y và S, X_{12} được chọn

từ nhóm bao gồm T, A và V, X_{13} được chọn từ nhóm bao gồm A và D, và X_{14} được chọn từ nhóm bao gồm P và S.

CDR3 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}GX_{18}X_{19}V$ (SEQ ID số:133), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm D, A và E, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm R, Q và G, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm T, R, L, G và K, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm G, E, N, I và R, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm Y, V và A, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm S, G, Y, A và T, X_7 được chọn từ nhóm bao gồm I, P, D, A và M, X_8 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm S và Y, X_9 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm W, S và T, X_{10} được chọn từ nhóm bao gồm S, G và L, X_{11} được chọn từ nhóm bao gồm S, G, L và Y, X_{12} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm W và Y, X_{13} được chọn từ nhóm bao gồm Y và H, X_{14} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm Y và D, X_{15} được chọn từ nhóm bao gồm Y, K và F, X_{16} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là Y, X_{17} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là Y, X_{18} được chọn từ nhóm bao gồm M và L, và X_{19} được chọn từ nhóm bao gồm D và A.

Trình tự liên ứng HCB

CDR1 $X_1X_2X_3X_4X_5$ (SEQ ID số:134), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm N, G, D, S và A, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm A, F và Y, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm W, Y, A và G, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm M và L, và X_5 được chọn từ nhóm bao gồm S và H.

CDR2 $X_1IX_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}G$ (SEQ ID số:135), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm R, W, A, V, S và F, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm K, N, S, W và R, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm S, P, G, F và Y, X_4 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm K, T và R, X_5 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm T và A, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm D, N, H, S và Y, X_7 được chọn từ nhóm bao gồm G và S, X_8 được chọn từ nhóm bao gồm G và S, X_9 được chọn từ nhóm bao gồm T, G, R, I, N, H và Y, X_{10} được chọn từ nhóm bao gồm T, K, R và P, X_{11} được chọn từ nhóm bao gồm D, N, Y và E, X_{12} được chọn từ

nhóm bao gồm Y và S, X_{13} được chọn từ nhóm bao gồm T, A và V, X_{14} được chọn từ nhóm bao gồm A, Q và D, X_{15} được chọn từ nhóm bao gồm P, K và S, X_{16} được chọn từ nhóm bao gồm V và F, và X_{17} được chọn từ nhóm bao gồm K và Q.

CDR3 $X_1X_2X_3X_4X_5SX_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}GX_{17}X_{18}V$ (SEQ ID số:136), trong đó X_1 được chọn từ nhóm bao gồm D, G, A và E, X_2 được chọn từ nhóm bao gồm R, G và Q, X_3 được chọn từ nhóm bao gồm T, M, Y, R, L, G và K, X_4 được chọn từ nhóm bao gồm G, S, E, N, I và R, X_5 được chọn từ nhóm bao gồm Y, I, G, V và A, X_6 được chọn từ nhóm bao gồm S, I, Y, G, A và T, X_7 được chọn từ nhóm bao gồm I, M, A, P và D, X_8 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm S, L và Y, X_9 có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm W, R, S và T, X_{10} được chọn từ nhóm bao gồm S, G và L, X_{11} được chọn từ nhóm bao gồm S, V, L, G và Y, X_{12} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm F, Y và W, X_{13} được chọn từ nhóm bao gồm Y, P, S và H, X_{14} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, được chọn từ nhóm bao gồm Y, P, D và H, X_{15} được chọn từ nhóm bao gồm Y, K và F, X_{16} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là Y, X_{17} có mặt hoặc không có mặt, và nếu có mặt, là Y, và X_{18} được chọn từ nhóm bao gồm M và L.

Trong một số trường hợp, protein liên kết kháng nguyên chứa ít nhất một CDR1, CDR2, hoặc CDR3 chuỗi nặng có một trong số các trình tự liên ứng trên đây. Trong một số trường hợp, protein liên kết kháng nguyên chứa ít nhất một CDR1, CDR2, hoặc CDR3 chuỗi nhẹ có một trong số các trình tự liên ứng trên đây. Trong các trường hợp khác, protein liên kết kháng nguyên chứa ít nhất hai CDR chuỗi nặng theo các trình tự liên ứng trên đây, và/hoặc ít nhất hai CDR chuỗi nhẹ theo các trình tự liên ứng trên đây. Trong các trường hợp khác nữa, protein liên kết kháng nguyên chứa ít nhất ba CDR chuỗi nặng theo các trình tự liên ứng trên đây, và/hoặc ít nhất ba CDR chuỗi nhẹ theo các trình tự liên ứng trên đây.

Các protein liên kết kháng nguyên tiêu biểu

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập mà liên kết CGRP R, chứa (A) một hoặc nhiều vùng xác định bổ sung (CDRH)

của chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm: (i) CDRH1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:73, 76, 79, 82, 85, 88, 92, 97 và 100; (ii) CDRH2 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:74, 77, 80, 83, 86, 89, 91, 93, 95, 98, 101 và 129; (iii) CDRH3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:75, 78, 81, 84, 87, 90, 96, 99, 102 và 123; và (iv) CDRH nêu trong (i), (ii) và (iii) mà chứa một hoặc nhiều, ví dụ, một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn nữa, đột biến thế axit amin, đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin mà không nhiều hơn năm, bốn, ba, bốn, hai hoặc một axit amin; (B) một hoặc nhiều vùng xác định bổ sung (CDRL) của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm: (i) CDRL1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:42, 45, 48, 51, 54, 57, 62, 65, 66 và 69; (ii) CDRL2 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 63, 67 và 70; (iii) CDRL3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:44, 47, 50, 53, 56, 59, 64, 68, 71 và 72; và (iv) CDRL nêu trong (i), (ii) và (iii) mà chứa một hoặc nhiều, ví dụ, một, hai, ba, bốn hoặc nhiều hơn nữa, đột biến thế axit amin, đột biến khuyết axit amin hoặc đột biến chèn axit amin mà không nhiều hơn năm, bốn, ba, bốn, hai hoặc một axit amin; hoặc (C) một hoặc nhiều CDRH chuỗi nặng nêu trong (A) và một hoặc nhiều CDRL chuỗi nhẹ nêu trong (B).

Theo phương án khác nữa, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể chứa (A) CDRH được chọn từ nhóm bao gồm (i) CDRH1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:73, 76, 79, 82, 85, 88, 92, 97 và 100; (ii) CDRH2 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:74, 77, 80, 83, 86, 89, 91, 93, 95, 98, 101 và 129; và (iii) CDRH3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:75, 78, 81, 84, 87, 90, 96, 99, 102 và 123; (B) CDRL được chọn từ nhóm bao gồm (i) CDRL1 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:42, 45, 48, 51, 54, 57, 62, 65, 66 và 69; (ii) CDRL2 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 63, 67 và 70; và (iii) CDRL3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:44, 47, 50, 53, 56, 59, 64, 68, 71 và 72; hoặc (C) một hoặc nhiều CDRH chuỗi nặng nêu trong (A) và một hoặc nhiều CDRL chuỗi nhẹ nêu trong (B). Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập có thể chứa (A) CDRH1 có SEQ ID số:73, 76, 79, 82, 85, 88, 92, 97 và 100, CDRH2 có SEQ ID số:74, 77, 80, 83, 86, 89, 91, 93, 95, 98, 101 và 129, và CDRH3 có SEQ ID số:75, 78, 81, 84, 87, 90, 96, 99, 102 và 123, và (B) CDRL1 của SEQ ID số:42, 45, 48, 51, 54, 57, 62, 65, 66 và 69, CDRL2 có

SEQ ID số:43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 63, 67 và 70, và CDRL3 của SEQ ID số:44, 47, 50, 53, 56, 59, 64, 68, 71 và 72.

Theo phương án khác, vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% hoặc 99% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:158-170, và/hoặc V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% hoặc 99% với trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số:137-153. Theo phương án khác nữa, V_H được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số: 158-170, và/hoặc V_L được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID số: 137-153.

Theo khía cạnh khác, sáng chế còn đề cập đến protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập mà liên kết đặc hiệu vào epitop được hình thành từ các gốc axit amin của cả thành phần CRLR và thành phần RAMP1 của CGRP R.

Theo phương án khác nữa, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập được mô tả trên đây chứa trình tự axit amin thứ nhất chứa ít nhất một trong số các trình tự liên ứng CDRH được bộc lộ ở đây, và trình tự axit amin thứ hai chứa ít nhất một trong số các trình tự liên ứng CDRL được bộc lộ ở đây. Theo một khía cạnh, trình tự axit amin thứ nhất chứa ít nhất hai trong số các trình tự liên ứng CDRH, và/hoặc trình tự axit amin thứ hai chứa ít nhất hai trong số các trình tự liên ứng CDRL.

Theo các phương án cụ thể, trình tự axit amin thứ nhất và trình tự axit amin thứ hai được liên kết cộng hóa trị với nhau.

Theo phương án khác nữa, trình tự axit amin thứ nhất của protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập bao gồm CDRH3 có SEQ ID số:75, 78, 81, 84, 87, 90, 96, 99, 102 và 123, CDRH2 có SEQ ID số:74, 77, 80, 83, 86, 89, 91, 93, 95, 98, 101 và 129, và CDRH1 có SEQ ID số:73, 76, 79, 82, 85, 88, 92, 97 và 100, và/hoặc trình tự axit amin thứ hai của protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập chứa CDRL3 có SEQ ID số:44, 47, 50, 53, 56, 59, 64, 68, 71 và 72, CDRL2 có SEQ ID số:43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 63, 67 và 70, và CDRL1 của SEQ ID số:42, 45, 48, 51, 54, 57, 62, 65, 66 và 69.

Theo phương án khác nữa, protein liên kết kháng nguyên chứa ít nhất hai trình tự CDRH của các trình tự chuỗi nặng H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12 hoặc H13, như được thể hiện trong bảng 5A. Theo phương án khác nữa, protein liên kết kháng nguyên chứa ít nhất hai trình tự CDRL của các trình tự chuỗi nhẹ L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, L14, L15, L16 hoặc L17, như được thể hiện trong bảng 5B. Theo phương án khác nữa, protein liên kết kháng nguyên chứa ít nhất hai trình tự CDRH của các trình tự chuỗi nặng H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12 hoặc H13, như được thể hiện trong bảng 5A, và ít nhất hai CDRL của các trình tự chuỗi nhẹ L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, L14, L15, L16 hoặc L17, như được thể hiện trong bảng 5B.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên chứa các trình tự CDRH1, CDRH2 và CDRH3 của các trình tự chuỗi nặng H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12 hoặc H13, như được thể hiện trong bảng 5A. Theo phương án khác nữa, protein liên kết kháng nguyên chứa các trình tự CDRL1, CDRL2 và CDRL3 của các trình tự chuỗi nhẹ L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11, L12, L13, L14, L15, L16 hoặc L17, như được thể hiện trong bảng 5B.

Theo phương án khác nữa, protein liên kết kháng nguyên chứa tất cả sáu CDR của L1 và H1, hoặc L2 và H2, hoặc L3 và H3, hoặc L4 và H4, hoặc L5 và H5, hoặc L6 và H1, hoặc L7 và H6, hoặc L8 và H5, hoặc L9 và H1, hoặc L10 và H7, hoặc L11 và H8, hoặc L12 và H9, hoặc L12 và H10, hoặc L13 và H5, hoặc L14 và H11, hoặc L15 và H12, hoặc L16 và H13, hoặc L17 và H13, như được thể hiện trong các bảng 5A và 5B.

Bảng 5A – Các vùng trình tự axit amin của chuỗi nặng tiêu biểu

Trình tự tham chiếu	Nhóm chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	Số SEQ ID của chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	Nhóm vùng biến đổi chuỗi nặng	Số SEQ ID của vùng biến đổi chuỗi nặng	Số SEQ ID của CDRH1	Số SEQ ID của CDRH2	Số SEQ ID của CDRH3

Trình tự tham chiếu	Nhóm chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	Số SEQ ID của chuỗi nặng có độ dài đầy đủ	Nhóm vùng biến đổi chuỗi nặng	Số SEQ ID của vùng biến đổi chuỗi nặng	Số SEQ ID của CDRH1	Số SEQ ID của CDRH2	Số SEQ ID của CDRH3
1E11	H1	29	V_H1	158	73	74	75
1H7	H2	30	V_H2	159	76	77	78
2E7	H3	31	V_H3	160	79	80	81
3B6	H4	32	V_H4	161	82	83	84
3C8	H5	33	V_H5	162	85	86	87
4E4	H1	29	V_H1	158	73	74	75
4H6	H6	34	V_H6	163	88	89	90
5F5	H5	33	V_H5	162	85	86	87
9D4	H1	29	V_H1	158	73	74	75
9F5	H7	35	V_H7	164	76	91	78
10E4	H8	36	V_H8	165	92	93	94
11D11	H9	37	V_H9	166	76	95	78
11H9	H10	38	V_H10	167	76	95	78
12E8	H5	33	V_H5	162	85	86	87
12G8	H11	39	V_H11	168	73	74	96
13H2	H12	40	V_H12	169	97	98	99
32H7	H13	41	V_H13	170	100	101	102
32H7 CS	H13	41	V_H13	170	100	101	102
32H8			V_H14	171			
33B5			V_H15	172			
33E4			V_H16	173			
34E3			V_H17	174			

Bảng 5B – Các vùng trình tự axit amin của chuỗi nhẹ tiêu biểu

Trình tự tham chiếu	Nhóm chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ	Số SEQ ID của chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ	Nhóm vùng biến đổi chuỗi nhẹ	Số SEQ ID của vùng biến đổi chuỗi nhẹ	Số SEQ ID của CDRL1	Số SEQ ID số của CDRL2	Số SEQ ID của CDRL3
1E11	L1	12	V_L1	137	42	43	44
1H7	L2	13	V_L2	138	45	46	47
2E7	L3	14	V_L3	139	48	49	50
3B6	L4	15	V_L4	140	51	52	53
3C8	L5	16	V_L5	141	54	55	56
4E4	L6	17	V_L6	142	42	43	44
4H6	L7	18	V_L7	143	57	58	59
5F5	L8	19	V_L8	144	60	55	56
9D4	L9	20	V_L9	145	42	43	44
9F5	L10	21	V_L10	146	45	61	47
10E4	L11	22	V_L11	147	62	63	64
11D11	L12	23	V_L12	148	45	61	47
11H9	L12	23	V_L12	148	45	61	47
12E8	L13	24	V_L13	149	65	55	56
12G8	L14	25	V_L14	150	42	43	44
13H2	L15	26	V_L15	151	66	67	68
32H7	L16	27	V_L16	152	69	70	71
32H7 CS	L17	28	V_L17	153	69	70	72
32H8			V_L18	154			
33B5			V_L19	155			
33E4			V_L20	156			
34E3			V_L21	157			

Theo một khía cạnh, các protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập được đề cập ở đây có thể là kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể tái tổ hợp, kháng thể của người, kháng thể được làm giống như của người, kháng thể thể khảm, kháng thể đa đặc hiệu, hoặc đoạn kháng thể liên kết kháng nguyên của nó.

Theo phương án khác, đoạn kháng thể của protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập được đề cập ở đây có thể là đoạn Fab, đoạn Fab', đoạn $F(ab')_2$, đoạn Fv, đoạn Fv chuỗi đơn dạng đime (diabody) hoặc phân tử kháng thể chuỗi đơn.

Theo phương án khác nữa, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập được đề cập ở đây là kháng thể của người và có thể là thuộc typ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên chỉ chứa polypeptit chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng như được trình bày trong các bảng 5A-5B. Theo một số phương án, protein liên kết kháng nguyên chỉ chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ hoặc miền biến đổi chuỗi nặng như các miền được liệt kê trong các bảng 5A-5B. Các protein liên kết kháng nguyên này có thể được pegyl hóa bằng một hoặc nhiều phân tử PEG.

Theo khía cạnh khác nữa, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập được đề cập ở đây có thể được gắn với nhóm đánh dấu và có thể cạnh tranh để liên kết với phần ngoại bào của CGRP R của người với protein liên kết kháng nguyên của một trong số các protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập được đề cập ở đây. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập được đề cập ở đây có thể làm giảm mức hóa ứng động của bạch cầu đơn nhân to, ức chế sự di chuyển của bạch cầu đơn nhân to vào các khối u hoặc ức chế tình trạng tích tụ và chức năng của đại thực bào gắn với khối u trong khối u, khi được sử dụng cho bệnh nhân.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận thấy rằng, đối với protein liên kết kháng nguyên bất kỳ có nhiều hơn một CDR từ các trình tự đã được mô tả, dạng kết hợp bất kỳ của các CDR được chọn độc lập từ các trình tự đã được mô tả là hữu ích. Vì vậy, có thể tạo ra protein liên kết kháng nguyên có một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu CDR được chọn một cách độc lập. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình

trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận thấy rằng các phương án cụ thể thường sử dụng các dạng kết hợp của các CDR mà không lặp lại, ví dụ, các protein liên kết kháng nguyên thường không được tạo ra với hai vùng CDRH2, v.v..

Một số protein liên kết kháng nguyên được đề cập được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Các protein liên kết kháng nguyên và các epitop liên kết và các miền liên kết

Khi protein liên kết kháng nguyên được nói là liên kết với epitop, như một hoặc cả hai thành phần của CGRP R, hoặc miền ngoại bào của CGRP R, ví dụ, điều đó có nghĩa là protein liên kết kháng nguyên này liên kết đặc hiệu vào phần đã định của CGRP R, các phần này có thể nằm trên CRLR, RAMP1, hoặc các phần bắc cầu của cả CRLR và RAMP1. Trong các trường hợp protein liên kết kháng nguyên chỉ liên kết với CRLR (và không liên kết với RAMP1), protein liên kết kháng nguyên này không được dự kiến là sẽ liên kết chọn lọc với CGRP R vì CRLR được chia sẻ, không kể những thứ khác, với AM1 và các thụ thể AM1. Tương tự, trong các trường hợp protein liên kết kháng nguyên chỉ liên kết với RAMP1 (và không liên kết với CRLR), protein liên kết kháng nguyên này không được dự kiến là sẽ liên kết chọn lọc với CGRP R vì RAMP1 được chia sẻ, không kể những thứ khác, với thụ thể AMY1. Trong các trường hợp protein liên kết kháng nguyên tương tác với cả CRLR và RAMP1, thì protein liên kết kháng nguyên này được dự kiến là sẽ liên kết với các gốc hoặc các trình tự của các gốc, hoặc các vùng trong cả CRLR và RAMP1. Không có phương án nào trong số các phương án trên đây dự kiến là protein liên kết kháng nguyên sẽ tiếp xúc với mọi gốc trong CRLR hoặc RAMP1. Tương tự, không phải mọi đột biến thế hoặc đột biến khuyết axit amin trong CRLR, RAMP1 hoặc các miền ngoại bào của chúng đều được dự kiến là tác động một cách đáng kể đến ái lực liên kết.

Các phương pháp được nêu chi tiết, ví dụ, trong ví dụ 10, có thể được sử dụng để đánh giá vùng nào của các thụ thể dạng multime, như CGRP R, có thể liên quan đến sự liên kết với các protein liên kết kháng nguyên đã được chọn.

Các protein liên kết kháng nguyên cạnh tranh

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến các protein liên kết kháng nguyên mà cạnh tranh với một trong số các kháng thể hoặc các đoạn chức năng được nêu minh họa hoặc "tham chiếu" liên kết với epitop được mô tả trên đây để liên kết đặc hiệu vào CGRP R. Các protein liên kết kháng nguyên này cũng có thể liên kết với cùng một epitop như một trong số các protein liên kết kháng nguyên được nêu minh họa ở đây, hoặc epitop gối chồng. Các protein liên kết kháng nguyên và các đoạn mà cạnh tranh với hoặc liên kết với cùng một epitop như các protein liên kết kháng nguyên được nêu minh họa hoặc tham chiếu được dự kiến là thể hiện được các tính chất chức năng tương tự. Các protein liên kết kháng nguyên và các đoạn được nêu minh họa bao gồm các protein và các đoạn có chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, các vùng biến đổi V_L1- V_L17 và V_H1- V_H13, và các CDR được thể hiện trong các bảng 2A, 2B, 3, 4A, 4B, 5A và 5B. Vì vậy, một ví dụ cụ thể là các protein liên kết kháng nguyên được đề cập bao gồm các protein mà cạnh tranh với kháng thể có: (a) tất cả 6 CDR được liệt kê đối với kháng thể được liệt kê trong các bảng 5A và 5B; (b) V_H và V_L được chọn từ V_L1- V_L17 và V_H1- V_H13 và được liệt kê đối với kháng thể được liệt kê trong các bảng 5A và 5B; hoặc (c) hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng như đã được xác định đối với kháng thể được liệt kê trong các bảng 5A và 5B. Các ví dụ khác về kháng thể tham chiếu thích hợp bao gồm các kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự tương ứng với trình tự bất kỳ trong số các trình tự được thể hiện dưới dạng SEQ ID số:158-170 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự tương ứng với trình tự bất kỳ trong số các trình tự được thể hiện dưới dạng SEQ ID số:137-153.

Có thể đánh giá tình trạng cạnh tranh liên kết, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm liên kết, như thử nghiệm Biacore được mô tả trong ví dụ 7 dưới đây. Trong ví dụ này, 19 kháng thể được mô tả ở đây được thử nghiệm kháng lại mỗi kháng thể trong sáu kháng thể "tham chiếu", bao gồm năm kháng thể trung hòa (11D11, 3B6, 4H6, 12G8 và 9F5) và một kháng thể không trung hòa (34E3). Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong bảng 13 cho thấy rằng tất cả các kháng thể trung hòa đã được thử nghiệm (1E11, 1H7, 2E7, 3B6, 3C8, 4E4, 4H6, 5F5, 9D4, 9F5, 10E4, 11D11, 11H9, 12E8, 12G8, 13H2 và 32H7) về cơ bản đều

liên kết với cùng một vùng của CGRP R, vùng này khác biệt với vùng của CGRP R mà được liên kết bởi các kháng thể không trung hòa đã được thử nghiệm (32H8, 33B5, 33E4 và 34E3). Dựa trên cơ sở các dữ liệu này, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trung hòa sẽ được sử dụng làm protein liên kết kháng nguyên tham chiếu tiêu biểu trong thử nghiệm cạnh tranh, đặc biệt là kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trung hòa mà được giữ cố định trong thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 7, bao gồm 11D11, 3B6, 4H6, 12G8, và 9F5.

Các kháng thể đơn dòng

Các protein liên kết kháng nguyên được đề cập bao gồm các kháng thể đơn dòng mà liên kết với CGRP R. Các kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách làm bất tử các tế bào lách được lấy từ động vật chuyển gen sau khi hoàn thành lịch trình gây miễn dịch. Các tế bào lách này có thể được làm bất tử bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách dung hợp chúng với các tế bào u tủy để tạo ra tế bào lai. Tốt hơn là, các tế bào u tủy dùng trong các quy trình dung hợp sản xuất tế bào lai không tạo ra kháng thể, có hiệu suất dung hợp cao và các khiếm khuyết enzym mà làm cho chúng không có khả năng sinh trưởng trong các môi trường chọn lọc cụ thể, môi trường này chỉ hỗ trợ cho sự sinh trưởng của các tế bào dung hợp mong muốn (các tế bào lai). Các ví dụ về các dòng tế bào thích hợp để sử dụng trong quy trình dung hợp tế bào chuột nhắt bao gồm Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 và S194/5XXO Bul; các ví dụ về các dòng tế bào được sử dụng trong các quy trình dung hợp tế bào chuột cống bao gồm R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F và 4B210. Các dòng tế bào khác hữu ích trong quy trình dung hợp tế bào là U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 và UC729-6. Phương pháp tiêu biểu dùng để tạo ra các kháng thể đơn dòng được mô tả trong ví dụ 2 dưới đây.

Trong một số trường hợp, dòng tế bào lai được sản xuất bằng cách gây miễn dịch cho động vật (ví dụ, động vật chuyển gen có các trình tự globulin miễn dịch của người) bằng chất sinh miễn dịch CGRP R; thu các tế bào lách từ động vật đã được gây miễn dịch; dung hợp các tế bào lách đã được thu này với dòng tế bào u tủy, nhờ đó tạo ra các tế

bào lai; thiết lập các dòng tế bào lai từ các tế bào lai này, và nhận diện dòng tế bào lai mà tạo ra được kháng thể có tác dụng liên kết với CGRP R (ví dụ, như được mô tả trong các ví dụ 1-3 dưới đây). Các dòng tế bào lai như vậy, và các kháng thể đơn dòng kháng CGRP R do chúng sản xuất ra, là các khía cạnh của sáng chế này.

Các kháng thể đơn dòng do dòng tế bào lai tiết ra có thể được tinh chế bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Các tế bào lai hoặc mAb có thể được sàng lọc thêm để nhận diện các mAb có các tính chất cụ thể, như khả năng liên kết với các tế bào biểu hiện CGRP, khả năng phong bế hoặc cản trở sự liên kết của phối tử CGRP hoặc peptit $CGRP_{8-37}$, hoặc khả năng phong bế về mặt chức năng đối với thụ thể, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm cAMP, ví dụ, như được mô tả dưới đây.

Các kháng thể thể khảm và kháng thể được làm giống như của người.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể thể khảm và kháng thể được làm giống như của người dựa trên cơ sở các trình tự trên đây. Các kháng thể đơn dòng dùng làm chất trị liệu có thể được cải biến theo các cách khác nhau trước khi sử dụng. Một ví dụ là kháng thể thể khảm, là kháng thể bao gồm các đoạn protein từ các kháng thể khác nhau mà được liên kết cộng hóa trị để tạo ra các chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của globulin miễn dịch chức năng hoặc các phần có chức năng miễn dịch của chúng. Nhìn chung, một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là giống với hoặc tương đồng với trình tự tương ứng trong các kháng thể thu được từ một loài cụ thể hoặc thuộc lớp kháng thể hoặc phân lớp kháng thể cụ thể, trong khi phần còn lại của (các) chuỗi là giống với hoặc tương đồng với trình tự tương ứng trong các kháng thể thu được từ loài khác hoặc thuộc lớp kháng thể hoặc phân lớp kháng thể khác. Về các phương pháp liên quan đến các kháng thể thể khảm, xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,816,567; và tài liệu Morrison et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Việc ghép CDR được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 6,180,370, số 5,693,762, số 5,693,761, số 5,585,089 và số 5,530,101.

Nhìn chung, mục đích của việc sản xuất kháng thể thể khảm là để tạo ra thể khảm trong đó số lượng axit amin từ loài bị bệnh được dự định điều trị được tối đa hóa. Một ví

dụ là kháng thể "được ghép CDR", trong đó kháng thể này chứa một hoặc nhiều vùng quyết định bổ sung (CDR) từ một loài cụ thể hoặc thuộc lớp kháng thể hoặc phân lớp kháng thể cụ thể, trong khi phần còn lại của (các) chuỗi kháng thể là giống với hoặc tương đồng với trình tự tương ứng trong các kháng thể thu được từ loài khác hoặc thuộc lớp kháng thể hoặc phân lớp kháng thể khác. Để sử dụng ở người, vùng biến đổi hoặc các CDR được chọn từ kháng thể động vật gặm nhấm thường được ghép vào kháng thể của người, thay thế các vùng biến đổi hoặc các CDR có trong tự nhiên của kháng thể của người.

Một loại kháng thể thể khảm hữu ích là kháng thể "được làm giống như của người". Nhìn chung, kháng thể được làm giống như của người được tạo ra từ kháng thể đơn dòng được nuôi cấy ban đầu trong động vật không phải người. Các gốc axit amin cụ thể trong kháng thể đơn dòng này, thường là từ các phần không nhận biết kháng nguyên của kháng thể, được cải biến để tương đồng với các gốc tương ứng trong kháng thể của người thuộc isotyp tương ứng. Có thể thực hiện việc làm giống như của người, ví dụ, bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau bằng cách thế ít nhất một phần của vùng biến đổi của động vật gặm nhấm cho các vùng tương ứng trong kháng thể của người (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,585,089 và số 5,693,762; Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-27; Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536).

Theo một khía cạnh, các CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được đề cập ở đây (xem bảng 4) được ghép vào các vùng khung (FR) từ các kháng thể từ cùng một loài hoặc từ loài khác theo phương diện phát sinh loài. Ví dụ, các CDR của các vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ V_H1, V_H2, V_H3, V_H4, V_H5, V_H6, V_H7, V_H8, V_H9, V_H10, V_H11, V_H12 và V_H13, và/hoặc V_L1, V_L2, V_L3, V_L4, V_L5, V_L6, V_L7, V_L8, V_L9, V_L10, V_L11, V_L12, V_L13, V_L14, V_L15, V_L16 và V_L17 có thể được ghép vào các FR liên ứng của người. Để tạo ra các FR liên ứng của người, các FR từ một số trình tự axit amin chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của người có thể được sắp xếp thẳng hàng để nhận diện trình tự axit amin liên ứng. Theo các phương án

khác, các FR của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ được bộc lộ ở đây được thay thế bằng các FR từ chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ khác. Theo một khía cạnh, các axit amin hiếm trong các FR của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CGRP R không được thay thế, trong khi các axit amin còn lại của FR được thay thế. "Axit amin hiếm" là axit amin đặc biệt nằm ở vị trí trong đó axit amin đặc biệt này thường không được tìm thấy trong FR. Theo cách khác, các vùng biến đổi đã được ghép từ một chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ có thể được sử dụng với vùng cố định khác với vùng cố định của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ cụ thể được bộc lộ ở đây. Theo các phương án khác, các vùng biến đổi được ghép là một phần của kháng thể Fv chuỗi đơn.

Theo các phương án cụ thể, các vùng cố định từ loài không phải là người có thể được sử dụng cùng với (các) vùng biến đổi của người để tạo ra các kháng thể lai.

Các kháng thể hoàn toàn của người

Sáng chế còn đề cập đến các kháng thể hoàn toàn của người. Đã có sẵn các phương pháp sản xuất kháng thể hoàn toàn của người đặc hiệu với kháng nguyên đã nêu mà không cần cho con người tiếp xúc với kháng nguyên đó ("kháng thể hoàn toàn của người"). Một phương pháp cụ thể được đưa ra để thực hiện việc sản xuất các kháng thể hoàn toàn của người là phương pháp làm hệ thống miễn dịch dịch thể của chuột nhắt "giống như của người". Việc đưa các locus globulin miễn dịch (Ig) của người vào các con chuột nhắt trong đó các gen Ig nội sinh đã bị bất hoạt là một phương pháp sản xuất các kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người (mAb) trong chuột nhắt, là động vật mà có thể được gây miễn dịch bằng kháng nguyên mong muốn bất kỳ. Việc sử dụng các kháng thể hoàn toàn của người có thể giảm thiểu đáp ứng miễn dịch và phản ứng dị ứng mà có thể thỉnh thoảng xảy ra do sử dụng mAb của chuột nhắt hoặc mAb có nguồn gốc từ chuột nhắt làm chất trị liệu cho người.

Các kháng thể hoàn toàn của người có thể được sản xuất bằng cách gây miễn dịch các động vật chuyển gen (thường là chuột nhắt) mà có khả năng sản xuất các kho kháng thể của người mà không sản xuất được globulin miễn dịch nội sinh. Các kháng nguyên dùng cho mục đích này thường có sáu axit amin tiếp giáp trở lên, và tùy ý được tiếp hợp

với chất mang, như hapten. Xem, ví dụ, tài liệu Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555; Jakobovits et al., 1993, Nature 362:255-258; và Bruggermann et al., 1993, Year in Immunol. 7:33. Theo một ví dụ về phương pháp như vậy, các động vật chuyển gen này được tạo ra bằng cách vô hiệu hóa các locus globulin miễn dịch nội sinh của chuột nhắt mà mã hóa các chuỗi globulin miễn dịch nặng hoặc nhẹ của chuột nhắt trong đó, và chèn vào hệ gen chuột nhắt các đoạn ADN hệ gen lớn của người mà chứa các locus mã hóa protein chuỗi nặng và protein chuỗi nhẹ của người. Sau đó, các động vật đã được cải biến một phần mà có ít phần bổ thể đầy đủ hơn của các locus globulin miễn dịch của người được lai chéo để thu được động vật có tất cả các cải biến hệ miễn dịch mong muốn. Khi được cho dùng chất sinh miễn dịch, các động vật chuyển gen này tạo ra các kháng thể mà đặc hiệu miễn dịch đối với chất sinh miễn dịch nhưng có các trình tự axit amin của người thay vì của chuột, bao gồm các vùng biến đổi. Để có thêm thông tin chi tiết về các phương pháp như vậy, xem, ví dụ, WO96/33735 và WO94/02602. Các phương pháp khác liên quan đến chuột nhắt chuyển gen dùng để tạo các kháng thể của người được mô tả trong patent Mỹ số 5,545,807; số 6,713,610; số 6,673,986; số 6,162,963; số 5,545,807; số 6,300,129; số 6,255,458; số 5,877,397; số 5,874,299 và số 5,545,806; trong các công bố đơn PCT WO91/10741, WO90/04036, và trong EP 546073B1 và EP 546073A1.

Các con chuột nhắt chuyển gen được mô tả trên đây, trong bản mô tả này được gọi là chuột nhắt "HuMab", chứa locus gen nhỏ của globulin miễn dịch của người có chức năng mã hóa trình tự globulin miễn dịch chuỗi nặng ([mu] và [gama]) và chuỗi nhẹ [kapa] chưa được tái sắp xếp của người, cùng với các đột biến có định hướng có tác dụng làm bất hoạt các locus chuỗi [mu] và [kapa] nội sinh (Lonberg et al., 1994, Nature 368:856-859). Do vậy, các con chuột nhắt này thể hiện mức biểu hiện giảm của IgM hoặc [kapa] của chuột để đáp ứng lại việc gây miễn dịch, và các gen chuyển của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đưa vào trải qua quá trình chuyển lớp (class switching) và đột biến sôma để tạo ra các kháng thể đơn dòng [kapa] IgG ái lực cao của người (Lonberg et al., nêu trên; Lonberg and Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93; Harding and Lonberg, 1995, Ann. N.Y Acad. Sci. 764:536-546). Việc tạo ra chuột nhắt HuMab được mô tả chi tiết

trong tài liệu Taylor et al., 1992, Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen et al., 1993, International Immunology 5:647-656; Tuaillon et al., 1994, J. Immunol. 152:2912-2920; Lonberg et al., 1994, Nature 368:856-859; Lonberg, 1994, Handbook of Exp. Pharmacology 113:49-101; Taylor et al., 1994, International Immunology 6:579-591; Lonberg and Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93; Harding and Lonberg, 1995, Ann. N.Y Acad. Sci. 764:536-546; Fishwild et al., 1996, Nature Biotechnology 14:845-851; các tài liệu tham khảo này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn cho mọi mục đích. Xem thêm patent Mỹ số 5,545,806; số 5,569,825; số 5,625,126; số 5,633,425; số 5,789,650; số 5,877,397; số 5,661,016; số 5,814,318; số 5,874,299; và số 5,770,429; cũng như patent Mỹ số 5,545,807; các công bố đơn quốc tế số WO 93/1227; WO 92/22646 và WO 92/03918, các nội dung bộc lộ trong tất cả các tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn cho mọi mục đích. Các công nghệ được sử dụng để sản xuất kháng thể của người trong các con chuột nhắt chuyển gen này được bộc lộ cả trong WO 98/24893, và Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15:146-156, các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Ví dụ, các chủng chuột nhắt chuyển gen HCo7 và HCo12 có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể kháng CGRP R. Các chi tiết khác nữa liên quan đến việc sản xuất các kháng thể của người bằng cách sử dụng chuột nhắt chuyển gen được nêu trong các ví dụ dưới đây.

Bằng cách sử dụng công nghệ tế bào lai, các mAb của người đặc hiệu với kháng nguyên có độ đặc hiệu mong muốn có thể được sản xuất và được chọn từ các con chuột nhắt chuyển gen như được mô tả trên đây. Các kháng thể như vậy có thể được nhân dòng và được biểu hiện bằng cách sử dụng vectơ và tế bào chủ thích hợp, hoặc các kháng thể này có thể được thu từ các tế bào lai được nuôi cấy.

Các kháng thể hoàn toàn của người cũng có thể được nhận từ các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn (như được bộc lộ trong tài liệu Hoogenboom et al., 1991, J. Mol. Biol. 227:381; và Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581). Các kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn bắt chước sự chọn lựa miễn dịch thông qua sự biểu hiện các kho kháng thể trên bề mặt thể thực khuẩn dạng sợi, và sau đó lựa chọn thể thực khuẩn thông qua sự liên

kết của chúng vào kháng nguyên được chọn. Một kỹ thuật như vậy được mô tả trong công bố đơn PCT số WO 99/10494 (được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), tài liệu này mô tả việc phân lập các kháng thể chủ vận chức năng và ái lực cao đối với thụ thể MPL và thụ thể msk bằng cách sử dụng phương pháp như vậy.

Các protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoặc chức năng kép

Các protein liên kết kháng nguyên được đề cập còn bao gồm kháng thể đặc hiệu kép và kháng thể chức năng kép mà chứa một hoặc nhiều CDR hoặc một hoặc nhiều vùng biến đổi như được mô tả trên đây. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể chức năng kép trong một số trường hợp là kháng thể lai nhân tạo có hai cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ khác nhau và hai vị trí liên kết khác nhau. Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bằng các phương pháp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dung hợp các tế bào lai hoặc liên kết các đoạn Fab'. Xem, ví dụ, tài liệu Songsivilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553.

Các dạng khác

Một số protein liên kết kháng nguyên được đề cập là dạng biến thể của các protein liên kết kháng nguyên được bộc lộ trên đây (ví dụ, các protein có các trình tự được liệt kê trong các bảng 2-5). Ví dụ, một số protein liên kết kháng nguyên có một hoặc nhiều đột biến thế axit amin bảo thủ trong một hoặc nhiều chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, các vùng biến đổi hoặc CDR được liệt kê trong các bảng 2-5.

Các axit amin có trong tự nhiên có thể được phân chia thành các nhóm dựa trên cơ sở các tính chất mạch bên phổ biến:

1) kỵ nước: norleuxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

2) trung tính ưa nước: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

3) có tính axit: Asp, Glu;

4) có tính bazơ: His, Lys, Arg;

5) các gốc làm ảnh hưởng đến sự định hướng chuỗi: Gly, Pro; và

6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Các đột biến thế axit amin bảo thủ có thể liên quan đến sự trao đổi thành viên của một trong số các nhóm này với thành viên khác của cùng một nhóm. Các đột biến thế axit amin bảo thủ có thể bao hàm các gốc axit amin không có trong tự nhiên, các axit amin này thường được đưa vào bằng phép tổng hợp peptit hóa học hơn là bằng phép tổng hợp trong các hệ thống sinh học. Các axit amin này bao gồm các thể bắt chước peptit và các dạng đảo ngược hay đảo chiều khác của các gốc axit amin.

Các đột biến thế không bảo thủ có thể liên quan đến sự trao đổi thành viên của một trong số các nhóm trên đây với thành viên từ nhóm khác. Các gốc được thế này có thể được đưa vào các vùng của kháng thể mà tương đồng với các kháng thể của người, hoặc vào các vùng không tương đồng của phân tử này.

Để tạo ra các thay đổi này, theo các phương án cụ thể, chỉ số kỵ nước của các axit amin có thể được xét đến. Đặc tính kỵ nước của protein được tính bằng cách gán cho mỗi axit amin một giá trị bằng số ("chỉ số kỵ nước") và sau đó, tính trung bình lặp lại các giá trị này dọc theo chuỗi peptit. Mỗi axit amin được gán một chỉ số kỵ nước dựa trên cơ sở tính kỵ nước và đặc điểm tích điện của nó. Chỉ số kỵ nước là: isoleuxin (+4,5); valin (+4,2); leuxin (+3,8); phenylalanin (+2,8); xystein/xystin (+2,5); metionin (+1,9); alanin (+1,8); glyxin (-0,4); threonin (-0,7); serin (-0,8); tryptophan (-0,9); tyrosin (-1,3); prolin (-1,6); histidin (-3,2); glutamat (-3,5); glutamin (-3,5); aspartat (-3,5); asparagin (-3,5); lysin (-3,9) và arginin (-4,5).

Tầm quan trọng của đặc tính kỵ nước trong việc đem lại chức năng tương tác sinh học cho protein là đã được hiểu rõ trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, tài liệu Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-131). Đã biết rằng các axit amin cụ thể có thể được thế cho các axit amin khác có điểm số hoặc chỉ số kỵ nước tương tự và vẫn giữ lại được hoạt tính sinh học tương tự. Để tạo ra các thay đổi dựa trên cơ sở chỉ số kỵ nước, theo các phương án cụ thể, việc thế các axit amin có chỉ số kỵ nước nằm trong phạm vi ±2 được sử dụng. Theo một số khía cạnh, việc thế các axit amin có chỉ số kỵ nước nằm trong phạm vi ±1

được sử dụng, và theo các khía cạnh khác, việc thế các axit amin có chỉ số kỵ nước nằm trong phạm vi ±0,5 được sử dụng.

Trong lĩnh vực kỹ thuật này, cũng cần phải hiểu rằng việc thế các axit amin tương tự có thể được thực hiện một cách hữu hiệu dựa trên cơ sở tính ưa nước, đặc biệt là trong trường hợp peptit hoặc protein có chức năng sinh học được tạo ra bằng cách như vậy được dự định dùng trong các phương án về miễn dịch học, như trong trường hợp này. Theo các phương án cụ thể, tính ưa nước trung bình cục bộ cao nhất của protein, được khống chế bởi tính ưa nước của các axit amin liền kề của nó, có tương quan với tính sinh miễn dịch và liên kết kháng nguyên hoặc tính sinh miễn dịch của nó, tức là, tương quan với tính chất sinh học của protein này.

Các giá trị về tính ưa nước sau đây được gán cho các gốc axit amin: arginin (+3,0); lysin (+3,0); aspartat (+3,0±1); glutamat (+3,0±1); serin (+0,3); asparagin (+0,2); glutamin (+0,2); glyxin (0); threonin (-0,4); prolin (-0,5±1); alanin (-0,5); histidin (-0,5); xystein (-1,0); metionin (-1,3); valin (-1,5); leuxin (-1,8); isoleuxin (-1,8); tyrosin (-2,3); phenylalanin (-2,5) và tryptophan (-3,4). Để tạo ra các thay đổi dựa trên cơ sở các giá trị về tính ưa nước tương tự, theo các phương án cụ thể, việc thế các axit amin có giá trị về tính ưa nước nằm trong phạm vi ±2 được sử dụng, theo các phương án khác, việc thế các axit amin có giá trị về tính ưa nước nằm trong phạm vi ±1 được sử dụng, và theo các phương án khác nữa, việc thế các axit amin có giá trị về tính ưa nước nằm trong phạm vi ±0,5 được sử dụng. Trong một số trường hợp, cũng có thể nhận diện các epitop từ các trình tự axit amin cơ bản dựa trên cơ sở tính ưa nước. Các vùng này còn được gọi là "các vùng lõi epitop".

Các đột biến thế axit amin bảo thủ tiêu biểu được trình bày trong bảng 6.

Bảng 6: Các đột biến thế axit amin bảo thủ

Gốc ban đầu	Đột biến thế tiêu biểu
Ala	Ser
Arg	Lys

Gốc ban đầu	Đột biến thế tiêu biểu
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể xác định được các biến thể thích hợp của các polypeptit được đề cập ở đây bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết rõ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể nhận diện các vùng thích hợp của phân tử có thể được thay đổi mà không phá hủy hoạt tính bằng cách nhắm vào các vùng không được cho là quan trọng đối với hoạt tính. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ nhận diện được các gốc và các phần của các phân tử mà được bảo toàn trong số các polypeptit tương tự. Theo các phương án khác, thậm chí các vùng mà có thể là quan trọng đối với hoạt tính sinh học hoặc đối với cấu trúc cũng có thể được thế axit amin bảo thủ mà không phá hủy hoạt tính sinh học hoặc không gây ảnh hưởng tiêu cực đến cấu trúc polypeptit.

Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xem xét các nghiên cứu cấu trúc-chức năng nhằm nhận diện các gốc trong các polypeptit tương tự mà quan trọng đối với hoạt tính hoặc cấu trúc. Dựa vào việc so sánh này, có thể dự đoán tầm quan trọng của các gốc axit amin trong protein mà tương ứng với các gốc axit amin quan trọng đối với hoạt tính hoặc cấu trúc trong các protein tương tự. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể chọn các đột biến thế axit amin tương tự về phương diện hóa học cho các gốc axit amin quan trọng đã được dự đoán như vậy.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng có thể phân tích cấu trúc 3 chiều và trình tự axit amin liên quan đến cấu trúc đó trong các polypeptit tương tự. Với các thông tin này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dự đoán kết quả sắp xếp thẳng hàng của các gốc axit amin của kháng thể về cấu trúc ba chiều của nó. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể chọn không thực hiện các thay đổi triệt để đối với các gốc axit amin được dự đoán là nằm trên bề mặt của protein, vì các gốc này có thể liên quan đến các tương tác quan trọng với các phân tử khác. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tạo ra các biến thể thử nghiệm chứa một đột biến thế axit amin ở mỗi gốc axit amin mong muốn. Sau đó, có thể sàng lọc các biến thể này bằng cách sử dụng các thử nghiệm đối với hoạt tính trung hòa CGRP R (xem các ví dụ dưới đây), từ đó thu được thông tin liên quan đến các axit amin mà có thể được thay đổi và các axit amin mà không được thay đổi. Nói cách khác, dựa vào thông tin thu được từ các thử nghiệm thường quy như vậy, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng xác định các vị trí axit amin mà cần tránh việc thế tiếp tục ở dạng riêng biệt hoặc ở dạng kết hợp với các đột biến khác.

Một số tài liệu khoa học đã được công bố tập trung vào việc dự đoán cấu trúc bậc hai. Xem tài liệu Moult, 1996, Curr. Op. in Biotech. 7:422-427; Chou et al., 1974, Biochem. 13:222-245; Chou et al., 1974, Biochemistry 113:211-222; Chou et al., 1978, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47:45-148; Chou et al., 1979, Ann. Rev. Biochem. 47:251-276; và Chou et al., 1979, Biophys. J. 26:367-384. Ngoài ra, hiện đã có các chương trình máy tính để trợ giúp cho việc dự đoán cấu trúc bậc hai. Một phương pháp dự

đoán cấu trúc bậc hai là dựa trên cơ sở lập mô hình về tính tương đồng. Ví dụ, hai polypeptit hoặc protein mà có độ đồng nhất trình tự là lớn hơn 30%, hoặc độ tương tự lớn hơn 40% có thể có cấu trúc hình học tôpô tương tự. Sự phát triển cơ sở dữ liệu về cấu trúc protein (PDB) gần đây đã đem lại khả năng dự đoán tốt hơn về cấu trúc bậc hai, bao gồm số nếp gấp có thể có trong cấu trúc polypeptit hoặc cấu trúc protein. Xem tài liệu Holm et al., 1999, Nucl. Acid. Res. 27:244-247. Đã có gợi ý rằng (Brenner et al., 1997, Curr. Op. Struct. Biol. 7:369-376) số nếp gấp trong polypeptit hoặc protein đã nêu là có giới hạn, và khi số lượng cấu trúc tới hạn đã được phân giải, thì việc dự đoán cấu trúc sẽ trở nên chính xác hơn đáng kể.

Các phương pháp khác để dự đoán cấu trúc bậc hai bao gồm "xâu chuỗi (threading)" (Jones, 1997, Curr. Opin. Struct. Biol. 7:377-387; Sippl et al., 1996, Structure 4:15-19), "phân tích profin" (Bowie et al., 1991, Science 253:164-170; Gribskov et al., 1990, Meth. Enzym. 183:146-159; Gribskov et al., 1987, Proc. Nat. Acad. Sci. 84:4355-4358) và "liên quan tiến hóa" (xem tài liệu Holm, 1999, trên đây; và Brenner, 1997, trên đây).

Theo một số phương án, các đột biến thế axit amin được tạo ra để: (1) làm giảm tính dễ bị thủy phân protein, (2) làm giảm tính dễ bị oxy hóa, (3) làm thay đổi ái lực liên kết để tạo phức protein, (4) làm thay đổi ái lực liên kết phối tử hoặc ái lực liên kết kháng nguyên, và/hoặc (4) đem lại hoặc cải biến các tính chất lý hóa hoặc tính chất chức năng khác cho các polypeptit này. Ví dụ, một hoặc nhiều đột biến thế axit amin (theo các phương án cụ thể là đột biến thế axit amin bảo thủ) có thể được tạo ra trong trình tự có trong tự nhiên. Các đột biến thế có thể được tạo ra trong phần kháng thể mà nằm ngoài (các) miền tạo thành các tiếp xúc liên phân tử). Theo các phương án này, các đột biến thế axit amin bảo thủ có thể được sử dụng để không thay đổi về cơ bản các đặc tính cấu trúc của trình tự gốc (ví dụ, một hoặc nhiều đột biến thế axit amin mà không phá vỡ cấu trúc bậc hai đặc trưng cho protein liên kết kháng nguyên nguyên thể hoặc protein liên kết kháng nguyên gốc). Các ví dụ về cấu trúc bậc hai và cấu trúc bậc ba của polypeptit đã được nhận biết trong lĩnh vực kỹ thuật này được mô tả trong tài liệu Proteins, Structures

and Molecular Principles (Creighton, Ed.), 1984, W. H. New York: Freeman and Company; Introduction to Protein Structure (Branden and Tooze, eds.), 1991, New York: Garland Publishing; và Thornton et al., 1991, Nature 354:105, mỗi tài liệu được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các biến thể kháng thể được ưu tiên khác bao gồm các biến thể xystein, trong đó một hoặc nhiều gốc xystein trong trình tự axit amin gốc hoặc trình tự axit amin nguyên thể bị làm khuyết hoặc thế bằng axit amin khác (ví dụ, serin). Các biến thể xystein là hữu ích, bên cạnh các hữu ích khác, khi các kháng thể phải được tái gấp nếp thành cấu hình có hoạt tính sinh học. Các biến thể xystein có thể có ít gốc xystein hơn kháng thể nguyên thể, và thường có số lượng chẵn để giảm thiểu các tương tác hình thành từ các xystein không được bắt cặp.

Chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, các vùng biến đổi và các CDR được bộc lộ có thể được sử dụng để điều chế polypeptit chứa vùng liên kết kháng nguyên mà có thể liên kết đặc hiệu vào CGRP R. Ví dụ, một hoặc nhiều CDR được liệt kê trong các bảng 4 và 5 có thể được kết hợp vào phân tử (ví dụ, polypeptit) theo cách cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị để tạo ra đoạn kết dính miễn dịch. Đoạn kết dính miễn dịch có thể kết hợp (các) CDR như là một phần của chuỗi polypeptit lớn hơn, có thể liên kết cộng hóa trị (các) CDR vào chuỗi polypeptit khác, hoặc có thể kết hợp (các) CDR theo cách không cộng hóa trị. (Các) CDR giúp cho đoạn kết dính miễn dịch liên kết đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể đang được quan tâm (ví dụ, CGRP R hoặc epitop của nó).

Sáng chế còn đề cập đến các thể bắt chước (ví dụ, "thể bắt chước peptit" hoặc "thể giả peptit") dựa trên cơ sở các vùng biến đổi và các CDR được mô tả ở đây. Các thể tương tự này có thể là các peptit, các chất không phải peptit hoặc các dạng kết hợp của vùng peptit và vùng không phải peptit. Fauchere, 1986, Adv. Drug Res. 15:29; Veber and Freidinger, 1985, TINS p. 392; và Evans et al., 1987, J. Med. Chem. 30:1229, tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn đối với mục đích bất kỳ. Các thể bắt chước peptit mà tương tự về mặt cấu trúc với các peptit hữu hiệu để trị liệu, có thể được sử dụng để tạo ra hiệu quả trị liệu hoặc hiệu quả phòng bệnh tương tự. Các hợp chất này thường được

phát triển với sự trợ giúp của phương pháp lập mô hình phân tử bằng máy tính. Nhìn chung, các thể giả peptit là các protein tương tự về mặt cấu trúc với kháng thể thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn, như khả năng liên kết đặc hiệu với CGRP R, nhưng có một hoặc nhiều liên kết peptit được tùy ý thay thế bằng liên kết được chọn từ: -CH_2NH-, -CH_2S-, -CH_2-CH_2-, -CH-CH-(cis và trans), -$COCH_2$-, -$CH(OH)CH_2$- và -CH_2SO-, bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này. Việc thế có hệ thống một hoặc nhiều axit amin của trình tự liên ứng bằng axit amin D cùng loại (ví dụ, D-lysin thay cho L-lysin) có thể được sử dụng theo các phương án cụ thể để tạo ra các protein ổn định hơn. Ngoài ra, cũng có thể tạo ra các peptit bị hạn chế chứa trình tự liên ứng hoặc biến thể trình tự liên ứng giống về cơ bản bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (Rizo and Gierasch, 1992, Ann. Rev. Biochem. 61:387), tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), ví dụ, bằng cách bổ sung các gốc xystein bên trong mà có khả năng tạo ra các cầu disulfua nội phân tử mà đóng vòng peptit này.

Các dẫn xuất của các protein liên kết kháng nguyên được mô tả ở đây cũng được đề cập đến. Các protein liên kết kháng nguyên đã được dẫn xuất hóa có thể chứa phân tử hoặc chất bất kỳ mà truyền tính chất mong muốn cho kháng thể hoặc đoạn của nó, như thời gian bán hủy tăng trong ứng dụng cụ thể. Protein liên kết kháng nguyên đã được dẫn xuất hóa có thể chứa, ví dụ, gốc có thể phát hiện được (hoặc đánh dấu) (ví dụ, phân tử có hoạt tính phóng xạ, phân tử so màu, phân tử kháng nguyên hoặc phân tử enzym, hạt có thể phát hiện được (như hạt có từ tính hoặc hạt có mật độ điện tử cao (ví dụ, hạt vàng)), hoặc phân tử mà liên kết được vào phân tử khác (ví dụ, biotin hoặc streptavidin)), gốc trị liệu hoặc gốc chẩn đoán (ví dụ, gốc có hoạt tính phóng xạ, gốc gây độc tế bào hoặc gốc có dược tính), hoặc phân tử mà làm tăng khả năng thích hợp của protein liên kết kháng nguyên với ứng dụng cụ thể (ví dụ, sử dụng cho đối tượng, như đối tượng người, hoặc các ứng dụng *in vivo* hoặc *in vitro* khác). Các ví dụ về các phân tử mà có thể được sử dụng để dẫn xuất hóa protein liên kết kháng nguyên bao gồm albumin (ví dụ, albumin huyết thanh người) và polyetylen glycol (PEG). Các dẫn xuất protein liên kết kháng nguyên được liên kết albumin và được PEGyl hóa có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết rõ trong lĩnh vực này. Các protein liên kết kháng nguyên cụ thể bao gồm polypeptit chuỗi

đơn được pegyl hóa như được mô tả ở đây. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên được tiếp hợp hoặc theo cách khác được liên kết vào transthyretin (TTR) hoặc biến thể TTR. TTR hoặc biến thể TTR có thể được cải biến về phương diện hóa học bằng, ví dụ, hóa chất được chọn từ nhóm bao gồm dextran, poly(n-vinyl pyrolidon), polyetylen glycol, propropylen glycol homopolyme, polypropylen oxit/etylen oxit co-polyme, polyol được polyoxyetyl hóa và rượu polyvinylic.

Các dẫn xuất khác bao gồm thể tiếp hợp cộng hóa trị hoặc thể tiếp hợp kết tụ của các protein liên kết CGRP R với các protein hoặc các polypeptit khác, như bằng cách biểu hiện các protein dung hợp tái tổ hợp chứa các polypeptit khác loại được dung hợp vào đầu cuối N hoặc đầu cuối C của protein liên kết CGRP R. Ví dụ, peptit được tiếp hợp có thể là polypeptit tín hiệu (hoặc polypeptit dẫn) khác loại, ví dụ, trình tự dẫn yếu tố alpha của nấm men, hoặc peptit như thẻ gắn epitop. Các protein dung hợp chứa protein liên kết kháng nguyên CGRP có thể chứa các peptit được bổ sung để tạo thuận lợi cho quá trình tinh chế hoặc nhận diện protein liên kết CGRP R (ví dụ, poly-His). Protein liên kết CGRP R cũng có thể được liên kết với peptit FLAG như được mô tả trong tài liệu Hopp et al., 1988, Bio/Technology 6:1204; và patent Mỹ số 5,011,912. Peptit FLAG này có tính kháng nguyên cao và cung cấp epitop có thể liên kết thuận nghịch bởi kháng thể đơn dòng (mAb) đặc hiệu, giúp cho thử nghiệm nhanh và tinh chế dễ dàng đối với protein tái tổ hợp được biểu hiện. Các chất phản ứng hữu ích cho việc điều chế protein dung hợp trong đó peptit FLAG được dung hợp vào polypeptit đã nêu là có bán trên thị trường (Sigma, St. Louis, Missouri).

Các oligome mà chứa một hoặc nhiều protein liên kết CGRP R có thể được dùng làm chất đối kháng CGRP R. Các oligome có thể ở dạng dime, trime hoặc oligome bậc cao hơn được liên kết theo cách cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị. Các oligome chứa hai protein liên kết CGRP R trở lên được dự định sử dụng, với một ví dụ là đồng dime. Các oligome khác bao gồm dị dime, đồng trime, dị trime, đồng tetrame, dị tetrame, v.v..

Một phương án đề xuất các oligome chứa nhiều polypeptit liên kết CGRP R được nối kết thông qua các tương tác cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị giữa các gốc peptit

được dung hợp vào các protein liên kết CGRP R. Các peptit này có thể là các liên kết peptit (các liên kết đệm), hoặc các peptit mà có tính chất thúc đẩy quá trình oligome hóa. Các khóa kéo leuxin và các polypeptit cụ thể có nguồn gốc từ các kháng thể nằm trong số các peptit mà có thể thúc đẩy quá trình oligome hóa các protein liên kết CGRP R được gắn kết vào đó, như được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Theo các phương án cụ thể, oligome chứa từ hai đến bốn protein liên kết CGRP R. Các gốc protein liên kết CGRP R của oligome này có thể ở dạng bất kỳ trong số các dạng được mô tả trên đây, ví dụ, các biến thể hoặc các đoạn. Tốt hơn là, các oligome chứa các protein liên kết CGRP R mà có hoạt tính liên kết CGRP R.

Theo một phương án, oligome được tạo ra bằng cách sử dụng các polypeptit có nguồn gốc từ các globulin miễn dịch. Việc tạo ra các protein dung hợp chứa các polypeptit khác loại cụ thể được dung hợp vào các phần khác nhau của các polypeptit có nguồn gốc từ kháng thể (bao gồm miền Fc) đã được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535; Byrn et al., 1990, Nature 344:677; và Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", trong Current Protocols in Immunology, tập bổ sung 4, các trang 10.19.1-10.19.11.

Một phương án đề xuất dime chứa hai protein dung hợp được tạo ra bằng cách dung hợp protein liên kết CGRP R vào vùng Fc của kháng thể. Dime này có thể được tạo ra bằng cách, ví dụ, chèn đoạn gen dung hợp mã hóa protein dung hợp vào vectơ biểu hiện thích hợp, biểu hiện đoạn gen dung hợp trong các tế bào chủ được biến nạp với vectơ biểu hiện tái tổ hợp, và cho phép protein dung hợp đã được biểu hiện tập hợp nhiều như các phân tử kháng thể, sau đó các cầu liên kết disulfua liên chuỗi hình thành giữa các gốc Fc để thu được dime.

Thuật ngữ "polypeptit Fc" trong bản mô tả này bao gồm dạng nguyên thể và dạng đột biến của các polypeptit có nguồn gốc từ vùng Fc của kháng thể. Thuật ngữ này còn bao hàm dạng cắt ngắn của các polypeptit này mà chứa vùng bản lề có tác dụng thúc đẩy quá trình dime hóa. Các protein dung hợp chứa các gốc Fc (và các oligome được tạo ra từ

đó) đem lại ưu điểm là tinh chế dễ dàng bằng kỹ thật sắc ký ái lực qua cột Protein A hoặc cột Protein G.

Một polypeptit Fc thích hợp, được mô tả trong đơn PCT số WO 93/10151 và patent Mỹ số 5,426,048 và số 5,262,522, là polypeptit chuỗi đơn kéo dài từ vùng bản lề đầu cuối N đến đầu cuối C nguyên thể của vùng Fc của kháng thể IgG1 của người. Polypeptit Fc hữu ích khác là mutein Fc được mô tả trong patent Mỹ số 5,457,035, và trong tài liệu Baum et al., 1994, EMBO J. 13:3992-4001. Trình tự axit amin của mutein này giống với trình tự axit amin của trình tự Fc nguyên thể được trình bày trong WO 93/10151, ngoại trừ axit amin 19 đã được thay đổi từ Leu sang Ala, axit amin 20 đã được thay đổi từ Leu sang Glu, và axit amin 22 đã được thay đổi từ Gly sang Ala. Mutein này thể hiện ái lực giảm đối với các thụ thể Fc.

Theo các phương án khác, phần biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của protein liên kết CGRP R như được bộc lộ ở đây có thể được thế cho phần biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể.

Theo cách khác, oligome là protein dung hợp chứa nhiều protein liên kết CGRP R, có hoặc không có các liên kết peptit (các peptit đệm). Các liên kết peptit thích hợp là các liên kết peptit được mô tả trong patent Mỹ số 4,751,180 và số 4,935,233.

Phương pháp khác để tạo ra các dẫn xuất oligome protein liên kết CGRP R bao gồm việc sử dụng khóa kéo leuxin. Các miền khóa kéo leuxin là các peptit có tác dụng thúc đẩy quá trình oligome hóa các protein mà trong đó chúng được tìm thấy. Các khóa kéo leuxin đã được nhận diện ban đầu trong một số protein liên kết ADN (Landschulz et al., 1988, Science 240:1759), và sau đó đã được phát hiện trong các loại protein khác. Các khóa kéo leuxin đã biết là các peptit có trong tự nhiên và các dẫn xuất của chúng mà có tác dụng dime hóa hoặc trime hóa. Các ví dụ về miền khóa kéo leuxin thích hợp cho việc sản xuất các protein oligome tan được được mô tả trong đơn PCT số WO 94/10308, và khóa kéo leuxin có nguồn gốc từ protein D hoạt động bề mặt (SPD) của phổi, được mô tả trong tài liệu Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Việc sử dụng khóa kéo leuxin được cải biến mà cho phép trime hóa ổn định protein

khác loại được dung hợp vào đó được mô tả trong tài liệu Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-278. Theo một phương pháp, các protein dung hợp tái tổ hợp chứa dẫn xuất hoặc đoạn protein liên kết CGRP R được dung hợp vào peptit khóa kéo leuxin được biểu hiện trong tế bào chủ thích hợp, và các dẫn xuất hoặc các đoạn oligome protein liên kết CGRP R tan được tạo thành được thu hồi từ dịch nổi bề mặt của giống cấy.

Theo các phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên có K_D (ái lực liên kết cân bằng) là nhỏ hơn 1pM, 10pM, 100pM, 1nM, 2nM, 5nM, 10nM, 25nM hoặc 50nM.

Khía cạnh khác đề xuất protein liên kết kháng nguyên có thời gian bán hủy là ít nhất một ngày *in vitro* hoặc *in vivo* (ví dụ, khi được sử dụng cho đối tượng là người). Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên có thời gian bán hủy là ít nhất ba ngày. Theo phương án khác, kháng thể hoặc một phần của nó có thời gian bán hủy là bốn ngày hoặc dài hơn. Theo phương án khác, kháng thể hoặc một phần của nó có thời gian bán hủy là tám ngày hoặc dài hơn. Theo phương án khác, kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó được dẫn xuất hóa hoặc được cải biến sao cho nó có thời gian bán hủy dài hơn so với kháng thể chưa được dẫn xuất hóa hoặc chưa được cải biến. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên chứa các đột biến điểm để làm tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh, như được mô tả trong WO 00/09560, được công bố ngày 24 tháng 2 năm 2000, được đưa vào bằng cách viện dẫn.

Glycosyl hóa

Protein liên kết kháng nguyên có thể có kiểu glycosyl hóa khác hoặc được thay đổi so với kiểu được phát hiện thấy trong loại nguyên thể. Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, các kiểu glycosyl hóa có thể phụ thuộc vào cả trình tự protein (ví dụ, sự có mặt hoặc sự vắng mặt của các gốc axit amin glycosyl hóa cụ thể, được thảo luận dưới đây), hoặc tế bào chủ hoặc sinh vật chủ mà trong đó protein được tạo ra. Các hệ biểu hiện cụ thể được mô tả dưới đây.

Sự glycosyl hóa các polypeptit thường là được liên kết vào N hoặc được liên kết vào O. Liên kết vào N được dùng để chỉ sự gắn kết gốc hydrat cacbon vào mạch bên của

gốc asparagin. Các trình tự tri-peptit asparagin-X-serin và asparagin-X-threonin, trong đó X là axit amin bất kỳ ngoại trừ prolin, là các trình tự nhận biết dùng cho việc gắn gốc hydrat cacbon bằng enzym vào mạch bên asparagin. Vì vậy, sự có mặt của một trong hai trình tự tri-peptit này trong polypeptit tạo ra vị trí glycosyl hóa tiềm năng. Sự glycosyl hóa được liên kết vào O được dùng để chỉ sự gắn một trong số các đường N-axetylgalactosamin, galactoza hoặc xyloza vào axit hydroxyamin, thông thường nhất là serin hoặc threonin, mặc dù 5-hydroxyprolin hoặc 5-hydroxylysin cũng có thể được sử dụng.

Việc thêm các vị trí glycosyl hóa vào protein liên kết kháng nguyên được thực hiện một cách thuận tiện bằng cách thay đổi trình tự axit amin sao cho nó chứa một hoặc nhiều trình tự tri-peptit được mô tả trên đây (đối với các vị trí glycosyl hóa được liên kết vào N). Cũng có thể thực hiện việc thay đổi bằng cách thêm, hoặc thay thế bằng, một hoặc nhiều gốc serin hoặc threonin vào trình tự ban đầu (đối với các vị trí glycosyl hóa được liên kết vào O). Để cho dễ dàng, trình tự axit amin của protein liên kết kháng nguyên có thể được thay đổi thông qua các thay đổi ở cấp độ ADN, cụ thể là bằng cách gây đột biến ADN mã hóa polypeptit đích tại các bazơ được chọn trước sao cho các codon được tạo ra sẽ dịch mã thành các axit amin mong muốn.

Cách khác để làm tăng số lượng các gốc hydrat cacbon trên protein liên kết kháng nguyên là bằng cách cộng hợp hóa học hoặc cộng hợp bằng enzym các glycosit vào protein này. Các quy trình này thuận lợi ở chỗ chúng không đòi hỏi sự sản xuất protein trong tế bào chủ mà có khả năng glycosyl hóa để có thể glycosyl hóa được liên kết vào N và glycosyl hóa được liên kết vào O. Tùy thuộc vào phương thức cộng hợp được sử dụng, (các) đường có thể được gắn vào (a) arginin và histidin, (b) các nhóm carboxyl tự do, (c) các nhóm sulfhydryl tự do như các nhóm của xystein, (d) các nhóm hydroxyl tự do như các nhóm của serin, threonin hoặc hydroxyprolin, (e) các gốc thơm như các gốc của phenylalanin, tyrosin hoặc tryptophan, hoặc (f) nhóm amit của glutamin. Các phương pháp này được mô tả trong WO 87/05330 được công bố ngày 11 tháng 9 năm 1987, và trong tài liệu Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev, Biochem., các trang 259-306.

Việc loại bỏ các gốc hydrat cacbon có mặt trên protein liên kết kháng nguyên ban đầu có thể được thực hiện bằng phương pháp hóa học hoặc enzym. Quá trình khử glycosyl hóa hóa học đòi hỏi phải cho protein tiếp xúc với hợp chất axit triflometansulfonic hoặc hợp chất tương đương. Phương pháp xử lý này tạo ra sự phân cắt phần lớn hoặc tất cả các đường ngoại trừ đường liên kết (N-axetylglucosamin hoặc N-axetylgalactosamin), nhưng để lại polypeptit nguyên vẹn. Sự khử glycosyl hóa hóa học được mô tả trong tài liệu Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 và tài liệu Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Có thể đạt được sự phân cắt các gốc hydrat cacbon trên polypeptit bằng enzym bằng cách sử dụng các endoglycosidaza và exoglycosidaza như được mô tả trong tài liệu Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Có thể ngăn ngừa sự glycosyl hóa tại các vị trí glycosyl hóa tiềm năng bằng cách sử dụng hợp chất tunicamyxin như được mô tả trong tài liệu Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Tunicamyxin ngăn chặn sự hình thành các liên kết protein-N-glycosit.

Vì vậy, các khía cạnh của sáng chế bao hàm các biến thể glycosyl hóa của các protein liên kết kháng nguyên, trong đó số lượng và/hoặc loại của (các) vị trí glycosyl hóa đã được thay đổi so với các trình tự axit amin của polypeptit gốc. Theo các phương án cụ thể, các biến thể protein kháng thể chứa số lượng vị trí glycosyl hóa được liên kết vào N nhiều hơn hoặc ít hơn so với kháng thể nguyên thể. Vị trí glycosyl hóa được liên kết vào N được đặc trưng bởi trình tự: Asn-X-Ser hoặc Asn-X-Thr, trong đó gốc axit amin được ký hiệu là X có thể là gốc axit amin bất kỳ ngoại trừ prolin. Sự thế các gốc axit amin để tạo ra trình tự này đem lại vị trí tiềm năng mới cho việc thêm mạch hydrat cacbon được liên kết vào N. Theo cách khác, sự thế mà loại bỏ hoặc thay đổi trình tự này sẽ ngăn chặn việc thêm mạch hydrat cacbon được liên kết vào N có mặt trong polypeptit nguyên thể. Ví dụ, có thể làm giảm mức glycosyl hóa bằng cách làm khuyết Asn hoặc bằng cách thế Asn bằng axit amin khác. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều vị trí được liên kết vào N mới được tạo ra. Các kháng thể thường có vị trí glycosyl hóa được liên kết vào N trong vùng Fc.

Các chất đánh dấu và các nhóm tác động

Theo một số phương án, quá trình liên kết kháng nguyên bao gồm một hoặc nhiều chất đánh dấu. Thuật ngữ "nhóm đánh dấu" hoặc "chất đánh dấu" có nghĩa là chất đánh dấu bất kỳ có thể phát hiện được. Các ví dụ về các nhóm đánh dấu thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất dưới đây: các chất đồng vị phóng xạ hoặc nuclit phóng xạ (ví dụ, ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I), các nhóm huỳnh quang (ví dụ, FITC, rodamin, chất phát quang lantanoit), các nhóm enzym (ví dụ, peroxidaza cải ngựa, β-galactosidaza, luxiferaza, phosphataza kiềm), các nhóm phát quang hóa, nhóm biotinyl, hoặc epitop polypeptit đã được xác định trước được nhận biết bởi chất chỉ thị thứ cấp (ví dụ, các trình tự cặp khóa kéo leuxin, các vị trí liên kết dành cho kháng thể thứ cấp, các miền liên kết kim loại, các thẻ gắn epitop). Theo một số phương án, nhóm đánh dấu được cộng hợp với protein liên kết kháng nguyên thông qua các đoạn đệm có độ dài khác nhau để làm giảm sự cản trở không gian tiềm tàng. Các phương pháp khác nhau dùng để đánh dấu protein là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sử dụng khi thấy phù hợp.

Thuật ngữ "nhóm tác động" có nghĩa là nhóm bất kỳ được cộng hợp với protein liên kết kháng nguyên hoạt động trong vai trò là chất gây độc tế bào. Các ví dụ về nhóm tác động thích hợp là các chất đồng vị phóng xạ hoặc nuclit phóng xạ (ví dụ, ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I). Các nhóm thích hợp khác bao gồm các độc tố, các nhóm trị liệu hoặc các nhóm hóa trị liệu. Các ví dụ về các nhóm thích hợp bao gồm calicheamixin, auristatin, geldanamyxin và maytansin. Theo một số phương án, nhóm tác động được cộng hợp với protein liên kết kháng nguyên thông qua các đoạn đệm có độ dài khác nhau để làm giảm sự cản trở không gian tiềm tàng.

Nhìn chung, các chất đánh dấu thuộc nhiều nhóm, tùy thuộc vào thử nghiệm mà trong đó chúng sẽ được phát hiện: a) các chất đánh dấu đồng vị, các chất này có thể là các chất đồng vị phóng xạ hoặc các chất đồng vị nặng; b) các chất đánh dấu có từ tính (ví dụ, các hạt có từ tính); c) các gốc có hoạt tính oxy hóa-khử; d) các thuốc nhuộm quang học; các nhóm enzym (ví dụ, peroxidaza cải ngựa, β-galactosidaza, luxiferaza, phosphataza

kiềm); e) các nhóm được biotin hóa; và f) các epitop polypeptit đã được xác định trước được nhận biết bởi chất chỉ thị thứ cấp (ví dụ, các trình tự cặp khóa kéo leuxin, các vị trí liên kết dành cho kháng thể thứ cấp, các miền liên kết kim loại, các thẻ gắn epitop, v.v.). Theo một số phương án, nhóm đánh dấu được cộng hợp với protein liên kết kháng nguyên thông qua các đoạn đệm có độ dài khác nhau để làm giảm sự cản trở không gian tiềm tàng. Các phương pháp khác nhau dùng để đánh dấu protein là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các chất đánh dấu đặc hiệu bao gồm thuốc nhuộm quang học, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nhóm mang màu, chất phát quang và nhóm huỳnh quang, trong đó nhóm huỳnh quang là đặc hiệu trong nhiều trường hợp. Các nhóm huỳnh quang có thể là các chất huỳnh quang "phân tử nhỏ" hoặc các chất huỳnh quang chứa protein.

"Chất đánh dấu huỳnh quang" có nghĩa là phân tử bất kỳ mà có thể phát hiện được thông qua các tính chất huỳnh quang vốn có của nó. Các chất đánh dấu huỳnh quang thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, fluoresxein, rodamin, tetrametylrodamin, eosin, erytrosin, coumarin, metyl-coumarin, pyren, phẩm xanh malachit, stilben, Lucifer Yellow, Cascade BlueJ, Texas Red, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, phẩm xanh Oregon, các thuốc nhuộm Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow và R-phycoerythrin (PE) (Molecular Probes, Eugene, Oregon), FITC, rodamin và Texas Red (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Các thuốc nhuộm quang học thích hợp, bao gồm các nhóm huỳnh quang, được mô tả trong tài liệu Molecular Probes Handbook do Richard P. Haugland biên tập, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các chất đánh dấu huỳnh quang chứa protein thích hợp còn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, protein huỳnh quang xanh lục, bao gồm loại Renilla, Ptilosarcus hoặc Aequorea của GFP (Chalfie et al., 1994, Science 263:802-805), EGFP (Clontech Labs., Inc., số truy cập ngân hàng gen U55762), protein huỳnh quang xanh lam (BFP, Quantum

Biotechnologies, Inc., Quebec, Canada; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6:178-182), protein huỳnh quang vàng đậm (EYFP, Clontech Labs., Inc.), luxiferaza (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417), β galactosidaza (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2603-2607) và Renilla (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, các patent Mỹ số 5292658, số 5418155, số 5683888, số 5741668, số 5777079, số 5804387, số 5874304, số 5876995, số 5925558).

Các trình tự axit nucleic mã hóa các protein liên kết kháng nguyên CGRP

Sáng chế còn đề cập đến các axit nucleic mà mã hóa cho các protein liên kết kháng nguyên được mô tả ở đây hoặc các phần của chúng, bao gồm các axit nucleic mã hóa một hoặc cả hai chuỗi kháng thể, hoặc đoạn, dẫn xuất, mutein hoặc biến thể của chúng, các polynucleotit mã hóa các vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chỉ mã hóa các CDR, các polynucleotit đủ để sử dụng làm các đầu dò lai, các đoạn mồi dùng cho PCR hoặc các đoạn mồi dùng cho việc giải trình tự để nhận diện, phân tích, gây đột biến hoặc khuếch đại polynucleotit mã hóa polypeptit, các axit nucleic đối nghĩa dùng để ức chế quá trình biểu hiện polynucleotit, và các trình tự bổ sung của các loại trên đây. Các axit nucleic này có thể có độ dài bất kỳ. Chúng có thể có độ dài là, ví dụ, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1.000, 1.500 nucleotit hoặc nhiều hơn nữa, và/hoặc có thể chứa một hoặc nhiều trình tự bổ sung, ví dụ, trình tự điều hòa, và/hoặc là một phần của một axit nucleic lớn hơn, ví dụ, vectơ. Các axit nucleic này có thể là chuỗi đơn hoặc chuỗi kép và có thể chứa các nucleotit ARN và/hoặc ADN, và các biến thể nhân tạo của chúng (ví dụ, các axit nucleic peptit).

Bảng 7 thể hiện các trình tự axit nucleic tiêu biểu mã hóa vùng cố định chuỗi nặng IgG2, vùng cố định chuỗi nhẹ kapa và vùng cố định chuỗi nhẹ lambda hCL-1. Vùng biến đổi bất kỳ được đề cập ở đây có thể được gắn vào các vùng cố định này để tạo ra các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoàn chỉnh. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng các trình tự của các vùng cố định này chỉ được đưa ra làm các ví dụ cụ thể, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể sử dụng các vùng cố định khác, bao gồm vùng cố định chuỗi

nặng IgG1, các vùng cố định chuỗi nặng IgG3 hoặc IgG4, vùng bất kỳ trong số bảy vùng cố định chuỗi nhẹ lambda, bao gồm hCL-1, hCL-2, hCL-3 và hCL-7; các vùng cố định mà đã được cải biến để có tính ổn định tốt hơn, tình trạng biểu hiện tốt hơn, tính khả thi trong việc sản xuất tốt hơn hoặc các đặc tính mong muốn khác, và các vùng tương tự. Theo một số phương án, các trình tự vùng biến đổi được nối vào các trình tự vùng cố định khác mà đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các trình tự axit nucleic tiêu biểu mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện trong bảng 8.

Bảng 7: Các trình tự axit nucleic của vùng cố định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tiêu biểu

Typ	Trình tự axit nucleic/SEQ ID số
Chuỗi nặng IgG2	gctagcaccaagggcccatcggtcttcccctggcgccctgctccaggagcacctccgaga gcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtg gaactcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacagtcctcaggac tctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcacccagacctacacc tgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatgtt gtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtcttcctcttcccc ccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacgtgcgtggtggtgg acgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgc ataatgccaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgt cctcaccgttgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaac aaaggcctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaagggcagccccgagaa ccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctg acctgcctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggc agccggagaacaactacaagaccacacctcccatgctggactccgacggctccttcttcctct acagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgt gatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaat ga [SEQ ID số:259]
Chuỗi nhẹ kapa IgG2	cgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaa ctgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggt ggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggga cagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaa agtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaac aggggagagtgttag [SEQ ID số:260]

Typ	Trình tự axit nucleic/SEQ ID số
Chuỗi nhẹ lambda hCL-1 IgG2	ggtcagcccaaggccaaccccactgtcactctgttcccgccctcctctgaggagctccaagc caacaaggccacactagtgtgtctgatcagtgacttctacccgggagctgtgacagtggcct ggaaggcagatggcagccccgtcaaggcgggagtggagaccaccaaaccctccaaacag agcaacaacaagtacgcggccagcagctacctgagcctgacgcccgagcagtggaagtcc cacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaagggagcaccgtggagaagacagtggc ccctacagaatgttcatag [SEQ ID số:261]

Bảng 8 thể hiện các trình tự axit nucleic tiêu biểu mã hóa các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, trong đó các trình tự CDRL1, CDRL2 và CDRL3, hoặc CDRH1, CDRH2 và CDRH3 khác nhau, được gắn vào.

Bảng 8: Các trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tiêu biểu

Trình tự tham chiếu	SEQ ID số	Trình tự axit nucleic
2E7 V_L	175	gacatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacaga gtcaccatcacttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggttt cagcagaaaccagggaaagcccctaagcgcctgatctatgctgcatccagttt gcaaagtggggtcccatcaaggttcagcggcagtggatctgggacagaattc actctcacaatcagcagcctgcagcctgaagatttagcaacttattactgtctac agtataatatttacccgtggacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
13H2 V_L	176	gacatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacaga gtcaccatcacttgccgggcaagtcagggcattagaaaggatttaggctggta tcagcagaaaccagggaaagcccctaagcgcctgatctatggagcatccagt ttgcaaagtggggtcccatcaaggttcagcggcagtggatctgggacagaatt cactctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttgcaacttattactgtcta cagtataatagtttcccgtggacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaa a
33B5 V_L	177	aggtgcagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagtctggggcctcagt gaaggtctcctgcaaggcttctggatacaccttcaccggctactatatgcactg ggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatgggatggatcaaccc taacagtggtggcacaaactatgtacagaagtttcagggcagggtcaccatga ccagggacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcaggctgagat ctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagaaatgagtatagcagtgcctgg cccttggggtattggggccagggaaccctggtcaccgtctctagt

Trình tự tham chiếu	SEQ ID số	Trình tự axit nucleic
4H6 V_L	178	gatattgtgatgactcagtctccactctccctgcccgtcacccctggagagccg gcctccatctcctgcaggtctagtcagagcctcctgcatagttttgggtacaact atttggattggtacctgcagaagccagggcagtctccacagctcctgatctattt gggttctaatcgggcctccggggtccctgacaggttcagtggcagtggatca ggcacagattttacactgaaaatcagcagagtggaggctgaggatgttggggt ttattactgcatgcaagctctacaaactccattcactttcggccctgggaccaaa gtggatatcaaa
3C8 V_L	179	gatattatactggcccagactccactttctctgtccgtcacccctggacagccg gcctccatctcctgcaagtctagtcagagcctcctgcacagtgctggaaagac ctatttgtattggtacctgcagaagccaggccagcctccacagctcctgatctat gaagtttccaaccggttctctggagtgccagataggttcagtggcagcgggtc agggacagatttcacactgaaaatcagccgggtggaggctgaggatgttggg atttattactgcatgcaaagttttccgcttccgctcactttcggcggagggacca aggtggagatcaaa
5F5 V_L	180	gatattattctgacccagactccactttctctgtccgtcacccctggacagccgg cctccatctcctgcaagtctagtcagagcctcctgcacagtgatggaaagacct atttgtattggtacctgcagaagcccggccagcctccacagctcctgatctatg aagtttccaaccggttctctggagagccagataggttcagtggcagcgggtca gggacagatttcacactgaaaatcagccgggtggaggctgaggatgttggga cttattattgcatgcaaagttttccgcttccgctcactttcggcggagggaccaa ggtggagatcaaa
12E8 V_L	181	gatattacactgacccagactccactttctctgtccgtctcccctggacagccg gcctccatctcctgcaagtctagtcagagcctcctgcacagtgatggaaggaa ctatctgtattggtacctgcagaagccaggccagcctccacagctcctgatcta tgaagtgtccaaccggttctctggactgccagataggttcagtggcagcgggt cagggacagatttcacactgaaaatcagccgggtggaggctgaggatgttgg gatttattactgcatgcaaagttttccgcttccgctcactttcggcggagggacc aaggtggagatcaaa
32H7 V_L	182	gaaattgtgttgacgcagtctccaggcaccctgtctttgtctccaggggaaaga gccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttagcagcggctacttaacctg gtaccagcagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatggtgcatcca gcagggccactggcatcccagacaggttcagtggcagtgggtctgggacag acttcactctcaccatcagcagactggagcctgaagattttgcagtgtattactg tcagcagtatggtaactcactgtgcaggtttggccaggggaccaagctggag atcaaa

Trình tự tham chiếu	SEQ ID số	Trình tự axit nucleic
32H7 CS V_L	183	gaaattgtgttgacgcagtctccaggcaccctgtctttgtctccaggggaaaga gccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttagcagcggctacttaacctg gtaccagcagaaacctggccaggctcccagactcctcatctatggtgcatcca gcagggccactggcatcccagacaggttcagtggcagtgggtctgggacgg acttcactctcaccatcagcagactggagcctgaagattttgcagtgtattactg tcagcagtatggtaactcactgagcaggtttggccaggggaccaagctggag atcaaa
33E4 V_L	184	gaaatagtgatgacgcagtctccagccaccctgtctgtgtctccaggggaaag agccaccctctcctgtagggccagtcagagtgttcgcagcaatttagcctggta ccagcagaaacctggccaggctcccaggctcctcattcatgatgcatccccca ggaccgctggtatcccagccaggttcagtggcagtggatctgggacagaatt cactctcaccatcaacagcctgcagtctgaagattttgcagtttattactgtcagc agtataattactggactccgatcaccttcggccaagggacacgactggagatt aaa
32H8 V_L	185	gacatcgtgatgacccagtctccagactccctggctgtgtctctgggcgagag ggccaccatcaactgcaagtccagccagagtattttagacagctccaacaatg ataactacttagcttggtaccagcagaaaccaggacagcctcctaaactgctc atttactgggcatctacccgggaatccggggtccctgaccgattcagtggcag cgggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcaggctgaagatg tggcagtttattactgtcagcaatattataatactccattcactttcggccctggga ccaaagtggatatcaaa
1E11 V_L	186	cagtctgtgttgacgcagccgccctcagtgtctgaggccccaggacagaagg tcaccatctcctgctctggaagcagctccaacattgggaataattatgtatcctg gtaccagcagctcccaggaacagcccccaaactcctcatttatgacaataata agcgaccctcagggattcctgaccgattctctggctccaagtctggcacgtca gccaccctgggcatcaccggactccagactggggacgaggccgattattact gcggaacatgggatagccgcctgagtgctgtggttttcggcggagggaccaa gctgaccgtccta
4E4 V_L	187	cagtctgtgttgacgcagccgccctcagtgtctgcggccccaggacagaagg tcaccatctcctgctctggaagcagctccaacattgggaataattatgtatcctg gtaccagcagctcccaggaacagcccccaaactcctcatttatgacaataata agcgaccctcagggattcctgaccgattctctggctccaagtctggcacgtca accaccctgggcatcaccggactccagactggggacgaggccgattattact gcggaacatgggatagccgcctgagtgctgtggttttcggcggagggaccaa gctgaccgtccta

Trình tự tham chiếu	SEQ ID số	Trình tự axit nucleic
9D4 V_L	188	cagtctgtgttgacgcagccgccctcagtgtctgcggccccaggacagaagg tcaccatctcctgctctggaagcagctccaacattgggaataattatgtatcctg gtaccagcagttcccaggaacagcccccaaactcctcatttatgacaataataa gcgaccctcagggattcctgaccgattctctggctccaagtctggcacgtcag ccaccctgggcatcaccggactccagactggggacgaggccgattattactg cggaacatgggatagccgcctgagtgctgtggttttcggcggagggaccaag ctgaccgtccta
12G8 V_L	189	cagtctgtgttgacgcagccgccctcagtgtctgcggccccaggacagaagg tcaccatctcctgctctggaagcagctccaacattgggaataattatgtatcctg gtaccagcagctcccaggaacagcccccaaactcctcatttatgacaataata agcgaccctcagggattcctgaccgattctctggctccaagtctggcacgtca gccaccctgggcatcaccggactccagactggggacgaggccgattattact gcggaacatgggatagccgcctgagtgctgtggttttcggcggagggaccaa gctgaccgtccta
34E3 V_L	190	cagtctgtgttgacgcagccgccctcaatgtctgcggccccaggacagaagg tcaccatctcctgctctggaagcagctccaacattgggaataattatgtatcctg gtaccagcagctcccaggaacagcccccaaactcctcatttatgacaataata agcgaccctcagggattcctgaccgattctctggctccaagtctggcacgtca gccaccctgggcatcaccggactccagactggggacgaggccaattactgct gcggaacatgggatatcggcctgagtgtttgggtgttcggcggagggaccaa actgaccgtccta
10E4 V_L	191	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagg gtcaccatctcttgttctggaagcagttccaatatcggaagtaatactgtgaact ggtaccagcagctcccaggaacggcccccaaactcctcatctatactaataat cagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctc agcctccctggccatcagtggactccagtctgaggatgaggctgatttttactgt gcagcgcgggatgagagcctgaatggtgtggtattcggcggagggaccaag ctgaccgtccta
11D11 V_L 11H9 V_L	192	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagaga gtcaccatctcttgttctggaagcagctccaacatcggcagtaattatgtatact ggtaccagcagctcccaggagcggcccccaaactcctcatctttaggaataat cagcggccctcaggggtccctgaccgcttctctggctccaagtctggcacctc agcctccctggccatcagtgggctccggtccgaggatgaggctgattattact gtgcagcatgggatgacagcctgagtggttgggtgttcggcggagggacca agctgaccgtccta

Trình tự tham chiếu	SEQ ID số	Trình tự axit nucleic
1H7 V_L	193	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagaga gtcaccatctcttgttctggaagcagctccaacatcggcagtaattatgtatact ggtaccagcagctcccaggagcggcccccaaactcctcatctttaggagtaat cagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctc agcctccctggccatcagtgggctccggtccgaggatgaggctgattattact gtgcagcatgggatgacagcctgagtggttgggtgttcggcggagggacca agctgaccgtccta
9F5 V_L	194	cagtctgtgctgactcagtcaccctcagcgtctgggacccccgggcagagag tcaccatctcttgttctggaagcagctccaacatcggcagtaattatgtatactg gtaccagcagctcccaggagcggcccccaaactcctcatccttaggaataatc agcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctca gcctccctgaccatcagtgggctccggtccgaggatgaggctgactattattgt gcagcatgggatgacagcctgagtggttgggtgttcggcggagggaccaag ctgaccgtccta
3B6 V_L	195	tcttctgagctgactcaggaccctactgtgtctgtggccttgggacagacagtc aaaatcacatgccaaggagacagcctcagaagtttttatgcaagctggtacca gcagaagccaggacaggcccctgtacttgtcttctatggtaaaaacaaccggc cctcagggatcccagaccgattctctggctccagctcaggaaacacagcttcc ttgaccatcactggggctcaggcggaagatgaggctgactattattgtaattcc cgggacagcagtgtttaccatctggtactcggcggagggaccaagctgaccg tccta
3B6 V_H	196	caggtgcagttggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctggggcctca gtgaaggtctcctgcaaggcttctggatacaccttcaccggctactatatgcact gggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatgggatggatcaacc ctaacagtggtggcacaaactatgcacagaagtttcagggcagggtcaccat gaccagggacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcaggctgag atctgacgacacggccgtgtatttctgtgcgagagatcaaatgagtattattatg cttcggggagtttttcccccttactattacggtatggacgtctggggccaaggg accacggtcaccgtctctagt
10E4 V_H	197	caggtgcagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctggggcctca gtgaaggtctcctgcaaggcttctggatacaccttcaccgactactatatgtact gggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatgggatggatcagcc ctaatagtggtggcacaaactatgcccagaagtttcagggcagggtcaccatg accagggacacgtctatcagcacagcctacatggagctgagtaggctgagat ctgacgacacggccgtgtattactgtgtgagaggaggatatagtggctacgct gggctctactcccactactacggtatggacgtctggggccaagggaccacgg tcaccgtctctagt

Trình tự tham chiếu	SEQ ID số	Trình tự axit nucleic
32H8 V_H	198	caggtgcagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctggggcctca gtgaaggtctcctgcaaggcttctggatacaccttcaccgcctactatttacact gggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatgggatggatcaacc ctcacagtggtggcacaaactatgcacagaagtttcagggcagggtcaccat gaccagggacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcaggctgag atctgacgacacggccgtgttctactgtgcgagaggaaggcagtggctgggc tttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctctagt
33B5 V_H	199	gacatccagatgacccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacaga gttaccattacttgccgggcaagtcagggcattagaaatgatttaggctggtatc agcagaaaccagggaaagcccctaagcgcctgatctatgttgcatccagtttg caaagtggggtcccatcaaggttcagcggcagtggatctgggacagaattca ctctcacaatcagcagcctgcagcctgaagattttgcaacttattactgtctaca gtataacacttacccgctcactttcggcggagggaccaaggtggagatcaag
11D11 V_H	200	gaggtacagctggtggagtctgggggaggcttggtaaagcctgggggtcc ctcagactctcctgtgcagcctctggattcactttcggtaacgcctggatgagct gggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggttggccgtattaaaa gcaaaactgatggtgggacaacagactacgctgcacccgtgaaaggcagatt caccatctcaagagatgattcaaaaaacacgctgtatctgcaaatgaacagcct gaaaaccgaggacacagccgtgtatttctgtaccacagatcggaccgggtat agcatcagctggtctagttactactactactacggtatggacgtctggggccaa gggaccacggtcaccgtctctagt
9F5 V_H	201	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtaaagcctgggggtcc cttagactctcctgtgcagcctctggattcactttcagtaacgcctggatgagct gggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggttggccgtattaaaa gcaaaactgatggtgggacaacagactacactgcacccgtgaaaggcagatt caccatctcaagagatgattcaaaaaacacgctgtatctgcaaatgaatagcct gaaagccgaggacacagccgtgtattactgtaccacagatcggaccgggtat agcatcagctggtctagttactactactactacggtatggacgtctggggccaa gggaccacggtcaccgtctctagt
11H9 V_H	202	gaggtacagctggtggagtctgggggaggcttggtaaagcctgggggtcc cttagactctcctgtgcagcctctggattcactttcggtaacgcctggatgagct gggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggttggccgtattaaaa gcaaaactgatggtgggacaacagactacgctgcacccgtgaaaggcagatt caccatctcaagagatgattcaaaaaacacgctgtatctgcaaatgaacagcct gaaaaccgaggacacagccgtgtattactgtaccacagatcggaccgggtat agcatcagctggtctagttactactactactacggtatggacgtctggggccaa gggaccacggtcaccgtctctagt

Trình tự tham chiếu	SEQ ID số	Trình tự axit nucleic
1H7 V_H	203	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtaaagcctgggggtcc cttagactctcctgtgcagcctctggattcactttcagtaacgcctggatgagct gggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggttggccgtattaaaa gcacaactgatggtgggacaacagactacgctgcacccgtgaaaggcagatt caccatctcaagagatgattcaaaaaacacgctgtatctgcaaatgaacagcct gaaaaccgaggacacagccgtgtattactgtaccacagatcggaccggatat agcatcagctggtctagttactactactacggtatggacgtctggggccaa gggaccacggtcaccgtctctagt
13H2 V_H	204	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcctggtcaagcctgggggtcc ctgagactctcctgtgcagcctctggatacaccttcagtacctatagcatgaact gggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcatccattagtag tagtagtagttacagatattacgcagactcagtgaagggccgattcaccatctc cagagacaacgccaagaactcactgtatctgcaaatgagtagcctgagagcc gaggacacggctgtgtattactgtgcgagagaaggggtgtctggcagttcgc cgtatagcatcagctggtacgactactattacggtatggacgtctggggccaa gggaccacggtcaccgtctctagt
2E7 V_H	205	gaggtgcagctattggagtctgggggaggcttggtacagcctggggagtccc tgagactctcctgtgcagcctctgggttcacctttagcagctatgccatgagctg ggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcagctattagtggt agtggtggtcgcacatactacgcagactccgtgaagggccggttcaccatctc cagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaatagcctgagagcc gaggacacggccgtatattactgtgcgaaagatcaaagggaggtagggccg tatagcagtggctggtacgactactactacggtatggacgtctggggccaagg gaccacggtcaccgtctctagt
3C8 V_H 12E8 V_H 5F5 V_H	206	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtcc ctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtagctatggcatgcact gggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatttcata tgatggaagtcatgaatcctatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctc cagagacatttccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctg aggacacggctgtgtatttctgtgcgagagagaggaaacgggttacgatgtct accttatattactacttctactacggtatggacgtctggggccaagggaccacg gtcaccgtctctagt

Trình tự tham chiếu	SEQ ID số	Trình tự axit nucleic
4E4 V_H 9D4 V_H 1E11 V_H	207	caggtgcagctggtggaatctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtcc ctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtagctttggcatgcact gggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatcatt tgatggaagtattaagtattctgtagactccgtgaagggccgattcaccatctcc agagacaattcaaagaacacgctgtttctgcaaatgaacagcctgcgagccg aggacacggctgtgtattactgtgcgagagatcggctcaattactatgatagta gtggttattatcactacaaatactacggtatggccgtctggggccaagggacc acggtcaccgtctctagt
12G8 V_H	208	caggtgcagctggtggaatctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtcc ctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtagctttggcatgcattg ggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatcattt gatggaagtattaagtactctgtagactccgtgaagggccgattcaccatctcc agagacaattcaaagaacacgctgtttctgcaaatgaacagcctgcgagccg aggacacggctgtgtattactgtgcgagagatcggctcaattactatgatagta gtggttattatcactacaaatactacggtctggccgtctggggccaagggacc acggtcaccgtctctagt
4H6 V_H	209	gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtaaagccagggcggtcc ctgagactctcctgtacagcttctggattcacctttggtgattatgctatgagctg gttccgccaggctccagggaaggggctggagtggataggtttcattagaagc agagcttatggtgggacaccagaatacgccgcgtctgtgaaaggcagattca ccatctcaagagatgattccaaaaccatcgcctatctgcaaatgaacagcctga aaaccgaggacacagccgtgtatttctgtgctagaggacggggtattgcagct cgttgggactactggggccagggaaccctggtcaccgtctctagt
32H7 V_H	210	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtcc ctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtagctatggcatgcact gggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggt atgatggaagtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcatcatct ccagagataaatccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagc cgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagcgggggtatagcagcagct ggcctctactactactacggtatggacgtctggggccaagggaccacggtca ccgtctctagt
33E4 V_H	211	caggtgcagttacagcagtggggcgcaggactgttgaagccttcggagacc ctgtccctcagctgcgctgtctatggtgggtccttcggtggttactactggagct ggatccgccagcccccagggaaggggctggagtggattggggaaatcaatc atagtggaggcaccaagtacaacccgtccctcaagagtcgagtcaccatatc agtagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgaccgccg cggacacggctgtgtatttctgtgcgagaggcgatgtagtaggtttctttgacta ttggggccagggaaccctggtcaccgtctctagt

Bảng 9 thể hiện các số nhận diện trình tự (số SEQ ID) của các trình tự axit nucleic tiêu biểu mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoàn chỉnh, cũng như các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, của các protein liên kết kháng nguyên đã được phân lập tiêu biểu, cụ thể là các protein liên kết hCGRP R được bộc lộ ở đây.

Bảng 9 – Các số SEQ ID của trình tự axit nucleic của HC, LC, V_H và V_L tiêu biểu

Trình tự tham chiếu	Số SEQ ID của vùng biến đổi chuỗi nhẹ	Số SEQ ID của vùng biến đổi chuỗi nặng	Số SEQ ID của chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ	Số SEQ ID của chuỗi nặng có độ dài đầy đủ
2E7	175	205	226	244
13H2	176	204	239	257
4H6	178	209	230	248
3C8	179	206	228	246
5F5	180	206	231	249
12E8	181	206	237	255
1E11	186	207	224	242
4E4	187	207	229	247
9D4	188	207	232	250
12G8	189	208	238	256
10E4	191	197	234	252
11D11	192	200	235	253
11H9	192	202	236	254
1H7	193	203	225	243
9F5	194	201	233	251
3B6	195	196	227	245
32H7	182	210	240	258

Trình tự tham chiếu	Số SEQ ID của vùng biến đổi chuỗi nhẹ	Số SEQ ID của vùng biến đổi chuỗi nặng	Số SEQ ID của chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ	Số SEQ ID của chuỗi nặng có độ dài đầy đủ
32H7 CS	183	210	241	258
32H8	185	198		
33B5	177	199		
33E4	184	211		
34E3	190	212		

Các axit nucleic mã hóa các protein liên kết kháng nguyên cụ thể, hoặc các phần của chúng (ví dụ, kháng thể có độ dài đầy đủ, chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, miền biến đổi, hoặc CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 hoặc CDRL3) có thể được phân lập từ các tế bào B của các con chuột nhắt đã được gây miễn dịch bằng CGRP R hoặc các thành phần gây miễn dịch của nó, ví dụ, bằng cách gây miễn dịch bằng CGRP R có độ dài đầy đủ (chứa cả CRLR và RAMP1), bằng miền ngoại bào của CGRP R (chứa các miền ngoại bào của CRLR và RAMP1), bằng các tế bào nguyên vẹn biểu hiện CGRP R, bằng các màng được chuẩn bị từ các tế bào biểu hiện CGRP R, bằng các protein dung hợp, ví dụ, các thể dung hợp Fc, chứa CRLR, RAMP1 (hoặc các miền ngoại bào của chúng) được dung hợp vào Fc, và các phương pháp đã biết khác trong lĩnh vực này, ví dụ, như được mô tả trong các ví dụ 1-3 ở đây. Axit nucleic có thể được phân lập bằng các quy trình thông thường như phản ứng chuỗi polymeraza (PCR). Kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn là ví dụ khác về kỹ thuật đã biết để có thể tạo ra các dẫn xuất của các kháng thể và các protein liên kết kháng nguyên khác. Theo một phương pháp, các polypeptit mà là thành phần của protein liên kết kháng nguyên đang được quan tâm được biểu hiện trong hệ biểu

hiện tái tổ hợp thích hợp bất kỳ, và các polypeptit được biểu hiện được cho kết hợp để tạo thành phân tử protein liên kết kháng nguyên.

Các axit nucleic được thể hiện trong các bảng 7-9 là chỉ nhằm mục đích minh họa. Do sự thoái hóa của mã di truyền, nên mỗi trình tự trong số các trình tự polypeptit được liệt kê trong các bảng 2-5 hoặc theo cách khác được mô tả ở đây cũng được mã hóa bởi một số lượng lớn các trình tự axit nucleic khác bên cạnh các trình tự được đề cập. Vì vậy, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng bản mô tả này cung cấp phần mô tả và bộc lộ đầy đủ bằng văn bản để cho phép thực hiện sáng chế đối với mỗi trình tự nucleotit thoái hóa mã hóa mỗi protein liên kết kháng nguyên.

Một khía cạnh còn đề xuất các axit nucleic mà lai với các axit nucleic khác (ví dụ, các axit nucleic chứa trình tự nucleotit được liệt kê trong bảng 7, bảng 8, bảng 9 và/hoặc các SEQ ID số:224-258) dưới các điều kiện lai cụ thể. Các phương pháp lai axit nucleic là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, tài liệu Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Như được định nghĩa ở đây, điều kiện lai nghiêm ngặt vừa phải sử dụng dung dịch rửa sơ bộ chứa 5x natri clorua/natri xitrat (SSC), SDS 0,5%, EDTA 1,0mM (độ pH = 8,0), đệm lai là formamit khoảng 50%, 6x SSC, và nhiệt độ lai là 55°C (hoặc các dung dịch lai tương tự khác, như dung dịch chứa formamit khoảng 50%, với nhiệt độ lai là 42°C), và điều kiện rửa là 60°C, trong 0,5x SSC, SDS 0,1%. Điều kiện lai nghiêm ngặt là lai trong 6x SSC ở 45°C, sau đó là rửa một hoặc nhiều lần trong 0,1x SSC, SDS 0,2% ở 68°C. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể điều chỉnh điều kiện lai và/hoặc điều kiện rửa để làm tăng hoặc làm giảm mức độ nghiêm ngặt của việc lai sao cho các axit nucleic chứa trình tự nucleotit mà giống nhau ít nhất là 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% hoặc 99% thường vẫn được lai với nhau.

Các thông số cơ bản ảnh hưởng đến việc lựa chọn các điều kiện lai và hướng dẫn về thiết đặt các điều kiện thích hợp được nêu trong, ví dụ, tài liệu Sambrook, Fritsch, and Maniatis (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., trên đây; và Current Protocols in Molecular

Biology, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., các phần 2.10 và 6.3-6.4), và có thể được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này xác định một cách dễ dàng dựa trên cơ sở, ví dụ, chiều dài và/hoặc thành phần bazơ của axit nucleic.

Có thể đưa các thay đổi vào bằng cách đưa đột biến vào axit nucleic, nhờ đó dẫn đến các thay đổi trong trình tự axit amin của polypeptit (ví dụ, kháng thể hoặc dẫn xuất kháng thể) mà nó mã hóa. Có thể đưa các đột biến vào bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Theo một phương án, một hoặc nhiều gốc axit amin cụ thể được thay đổi bằng cách sử dụng, ví dụ, quy trình gây đột biến điểm định hướng. Theo phương án khác, một hoặc nhiều gốc được chọn một cách ngẫu nhiên được thay đổi bằng cách sử dụng, ví dụ, quy trình gây đột biến ngẫu nhiên. Dù được tạo ra như thế nào, thì polypeptit đột biến cũng vẫn có thể được biểu hiện và được sàng lọc để có được tính chất mong muốn.

Các đột biến có thể được đưa vào axit nucleic mà không làm thay đổi một cách đáng kể hoạt tính sinh học của polypeptit mà nó mã hóa. Ví dụ, có thể tạo ra các đột biến thế nucleotit, dẫn đến các đột biến thế axit amin tại các gốc axit amin không thiết yếu. Theo cách khác, một hoặc nhiều đột biến có thể được đưa vào axit nucleic mà làm thay đổi một cách chọn lọc hoạt tính sinh học của polypeptit mà nó mã hóa. Ví dụ, đột biến có thể làm thay đổi hoạt tính sinh học về lượng hoặc về chất. Các ví dụ về các thay đổi về lượng bao gồm làm tăng, làm giảm hoặc loại bỏ hoạt tính. Các ví dụ về các thay đổi về chất bao gồm thay đổi tính đặc hiệu kháng nguyên của kháng thể. Theo một phương án, axit nucleic mã hóa protein liên kết kháng nguyên bất kỳ được mô tả ở đây có thể được gây đột biến để làm thay đổi trình tự axit amin bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử đã được thiết lập vững chắc trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Khía cạnh khác đề xuất các phân tử axit nucleic thích hợp để sử dụng làm các đoạn mồi hoặc đầu dò lai dùng dùng để phát hiện các trình tự axit nucleic. Phân tử axit nucleic có thể chỉ chứa một phần của trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có độ dài đầy đủ, ví dụ, một đoạn mà có thể được sử dụng làm đầu dò hoặc đoạn mồi hoặc đoạn mà mã hóa phần có hoạt tính (ví dụ, phần liên kết CGRP R) của polypeptit.

Các đầu dò dựa trên cơ sở trình tự axit nucleic có thể được sử dụng để phát hiện axit nucleic này hoặc các axit nucleic tương tự, ví dụ, các sản phẩm phiên mã mã hóa polypeptit. Đầu dò có thể bao gồm nhóm đánh dấu, ví dụ, chất đồng vị phóng xạ, hợp chất huỳnh quang, enzym hoặc đồng yếu tố enzym. Các đầu dò như vậy có thể được sử dụng để nhận diện tế bào biểu hiện polypeptit này.

Khía cạnh khác đề xuất các vectơ chứa axit nucleic mã hóa polypeptit hoặc một phần của nó (ví dụ, đoạn chứa một hoặc nhiều CDR hoặc một hoặc nhiều vùng biến đổi). Các ví dụ về các vectơ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, plasmit, vectơ virut, vectơ không phải thể bổ sung của động vật có vú và vectơ biểu hiện, ví dụ, vectơ biểu hiện tái tổ hợp. Các vectơ biểu hiện tái tổ hợp có thể chứa axit nucleic ở dạng thích hợp cho quá trình biểu hiện axit nucleic trong tế bào chủ. Các vectơ biểu hiện tái tổ hợp bao gồm một hoặc nhiều trình tự điều hòa, được chọn dựa trên cơ sở các tế bào chủ được sử dụng để biểu hiện, trình tự này được liên kết theo cách có thể kiểm soát vào trình tự axit nucleic cần được biểu hiện. Các trình tự điều hòa bao gồm các trình tự mà điều khiển quá trình biểu hiện cơ định của trình tự nucleotit trong nhiều loại tế bào chủ (ví dụ, trình tự tăng cường của gen sớm SV40, trình tự khởi đầu của virut gây sacôm Rous và trình tự khởi đầu của virut cự bào), các trình tự mà điều khiển quá trình biểu hiện của trình tự nucleotit chỉ trong các tế bào chủ nhất định (ví dụ, các trình tự điều hòa đặc hiệu đối với mô, xem tài liệu Voss et al., 1986, Trends Biochem. Sci. 11:287, Maniatis et al., 1987, Science 236:1237, được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn), và các trình tự mà điều khiển quá trình biểu hiện có thể cảm ứng được của trình tự nucleotit khi đáp ứng lại sự điều trị hoặc điều kiện cụ thể (ví dụ, trình tự khởi đầu metallothionin trong các tế bào động vật có vú và trình tự khởi đầu có tính đáp ứng với tet và/hoặc trình tự khởi đầu có tính đáp ứng với streptomyxin trong cả hệ nhân sơ và hệ nhân thực (xem tài liệu đã trích dẫn). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng thiết kế của vectơ biểu hiện có thể phụ thuộc vào các yếu tố như sự chọn lựa tế bào chủ sẽ được biến nạp, mức biểu hiện protein mong muốn, v.v.. Các vectơ biểu hiện có thể được đưa vào tế bào chủ để nhờ đó tạo ra peptit hoặc protein, bao gồm peptit hoặc protein dung hợp, được mã hóa bởi axit nucleic như được mô tả ở đây.

Khía cạnh khác đề xuất các tế bào chủ mà vectơ biểu hiện tái tổ hợp được đưa vào trong đó. Tế bào chủ có thể là tế bào nhân sơ bất kỳ (ví dụ, *E. coli*) hoặc tế bào nhân thực (ví dụ, tế bào nấm men, tế bào côn trùng hoặc tế bào động vật có vú (ví dụ, tế bào CHO)). Vectơ ADN có thể được đưa vào tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân thực thông qua các kỹ thuật biến nạp hoặc chuyển nhiễm thông thường. Đối với việc chuyển nhiễm ổn định các tế bào động vật có vú, đã biết rằng, tùy thuộc vào vectơ biểu hiện và kỹ thuật chuyển nhiễm được sử dụng, chỉ có một phần nhỏ các tế bào là có thể kết hợp ADN ngoại lai vào hệ gen của chúng. Để nhận diện và chọn lựa các thể kết hợp này, gen mã hóa yếu tố đánh dấu có thể chọn lọc (ví dụ, về tính kháng chất kháng sinh) thường được đưa vào các tế bào chủ cùng với gen đang được quan tâm. Các yếu tố đánh dấu có thể chọn lọc được ưu tiên bao gồm các chất đánh dấu có khả năng đem lại tính kháng thuốc, như G418, hygromyxin và metotrexat. Các tế bào được chuyển nhiễm một cách ổn định với axit nucleic đã được đưa vào có thể được nhận diện bằng việc chọn lọc theo thuốc (ví dụ, các tế bào mà đã kết hợp yếu tố đánh dấu có thể chọn lọc sẽ sống sót, trong khi các tế bào còn lại bị chết), trong số các phương pháp khác.

Tạo các protein liên kết kháng nguyên

Các kháng thể không phải của người được đề cập có thể, ví dụ, được thu từ động vật sản sinh kháng thể bất kỳ, như chuột nhắt, chuột cống, thỏ, dê, lừa hoặc động vật linh trưởng không phải là người (như khỉ (ví dụ, khỉ đuôi dài hoặc khỉ redut) hoặc khỉ không đuôi (ví dụ, tinh tinh)). Các kháng thể không phải của người có thể được sử dụng, ví dụ, trong các ứng dụng giống cấy tế bào và các ứng dụng dựa trên cơ sở giống cấy tế bào *in vitro*, hoặc ứng dụng bất kỳ khác trong đó đáp ứng miễn dịch đối với kháng thể không xảy ra hoặc không đáng kể, có thể được ngăn ngừa, không phải là mối lo ngại, hoặc được mong muốn. Theo các phương án cụ thể, có thể tạo các kháng thể này bằng cách gây miễn dịch các động vật bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, như được mô tả trên đây và/hoặc trong các ví dụ 1-3 dưới đây. Các ví dụ này mô tả việc tạo ra các kháng thể kháng CGRP R có sử dụng ba chế phẩm sinh miễn dịch khác nhau – (i) các tế bào nguyên vẹn biểu hiện các dạng có độ dài đầy đủ của hai thành phần chính của CGRP R – RAMP1

và CRLR; (ii) các dịch chiết màng từ các tế bào này; và (iii) CGRP R tan được thu được bằng cách đồng biểu hiện và tinh chế các miền ngoại bào đầu cuối N của CRLR và RAMP1. Các kháng thể có thể là đa dòng, đơn dòng, hoặc có thể được tổng hợp trong các tế bào chủ bằng cách biểu hiện ADN tái tổ hợp. Các kháng thể hoàn toàn của người có thể được tạo ra như được mô tả trên đây bằng cách gây miễn dịch các động vật chuyển gen chứa các locus globulin miễn dịch của người hoặc bằng cách chọn lọc thư viện biểu hiện thể thực khuẩn mà biểu hiện kho kháng thể của người.

Các kháng thể đơn dòng (mAb) có thể được sản xuất bằng các kỹ thuật, bao gồm phương pháp kháng thể đơn dòng thông thường, ví dụ, kỹ thuật lai tế bào sôma chuẩn được mô tả trong tài liệu Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495. Theo cách khác, các kỹ thuật khác dùng để sản xuất các kháng thể đơn dòng có thể được sử dụng, ví dụ, kỹ thuật biến nạp virut hoặc biến nạp gây ung thư đối với các tế bào bạch huyết B. Một cơ thể động vật thích hợp cho việc tạo ra các tế bào lai là cơ thể chuột, đây là một quy trình đã được thiết lập rất vững chắc. Các quy trình gây miễn dịch và các kỹ thuật phân lập các tế bào lách đã được gây miễn dịch dùng để dung hợp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và các phương pháp minh họa được mô tả trong các ví dụ dưới đây. Đối với các quy trình này, các tế bào B của chuột nhắt đã được gây miễn dịch thường được dung hợp với đối tác dung hợp đã được làm bất tử thích hợp, như dòng tế bào u tủy của chuột. Nếu muốn, chuột cống hoặc các động vật có vú khác nữa có thể được gây miễn dịch thay vì chuột nhắt và các tế bào B của các động vật này có thể được dung hợp với dòng tế bào u tủy của chuột để tạo ra các tế bào lai. Theo cách khác, dòng tế bào u tủy từ nguồn không phải là chuột nhắt có thể được sử dụng. Các quy trình dung hợp dùng để sản xuất tế bào lai cũng đã được biết rõ.

Các kháng thể chuỗi đơn được đề cập có thể được tạo ra bằng cách liên kết các đoạn của miền biến đổi chuỗi nặng và miền biến đổi chuỗi nhẹ (vùng Fv) thông qua cầu liên kết axit amin (liên kết peptit ngắn), tạo ra chuỗi polypeptit đơn. Các Fv chuỗi đơn (scFv) này có thể được tạo ra bằng cách dung hợp ADN mã hóa liên kết peptit giữa các ADN mã hóa hai polypeptit miền biến đổi (V_L và V_H). Các polypeptit thu được có thể gấp

nếp ngược trở lại trên chính chúng để tạo các monome liên kết kháng nguyên, hoặc chúng có thể tạo các multime (ví dụ, dime, trime hoặc tetrame), tùy thuộc vào chiều dài của liên kết linh hoạt giữa hai miền biến đổi (Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108). Bằng cách kết hợp các polypeptit chứa V_L và V_H khác nhau, có thể tạo ra các scFv dạng multime mà liên kết vào các epitop khác nhau (Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40). Các kỹ thuật đã được phát triển để sản xuất các kháng thể chuỗi đơn bao gồm các kỹ thuật được mô tả trong patent Mỹ số 4,946,778; Bird, 1988, Science 242:423; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879; Ward et al., 1989, Nature 334:544, de Graaf et al., 2002, Methods Mol Biol. 178:379-387. Các kháng thể chuỗi đơn có nguồn gốc từ các kháng thể được đề cập ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các scFv chứa các dạng kết hợp miền biến đổi của các vùng biến đổi chuỗi nặng và các vùng biến đổi chuỗi nhẹ được mô tả trong bảng 3, hoặc các dạng kết hợp của các miền biến đổi chuỗi nhẹ và các miền biến đổi chuỗi nặng mà chứa các CDR được mô tả trong các bảng 4A và 4B.

Các kháng thể được đề cập ở đây mà thuộc một phân lớp có thể được làm thay đổi thành các kháng thể thuộc phân lớp khác bằng cách sử dụng các phương pháp chuyển phân lớp. Vì vậy, các kháng thể IgG có thể có nguồn gốc, ví dụ, từ kháng thể IgM, và ngược lại. Các kỹ thuật này cho phép tạo ra các kháng thể mới có các tính chất liên kết kháng nguyên của kháng thể đã nêu (kháng thể gốc), nhưng đồng thời thể hiện tính chất sinh học gắn liền với isotyp hoặc phân lớp kháng thể khác với isotyp hoặc phân lớp của kháng thể gốc. Các kỹ thuật ADN tái tổ hợp có thể được sử dụng. ADN đã được nhân dòng mã hóa các polypeptit kháng thể cụ thể có thể được sử dụng trong các quy trình này, ví dụ, ADN mã hóa miền cố định của kháng thể thuộc isotyp mong muốn. Xem, ví dụ, tài liệu Lantto et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:303-316.

Do vậy, các kháng thể được đề cập bao gồm các kháng thể chứa, ví dụ, các dạng kết hợp của miền biến đổi được mô tả trên đây, có isotyp mong muốn (ví dụ, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE và IgD) cũng như đoạn Fab hoặc đoạn $F(ab')_2$ của chúng. Ngoài ra, nếu muốn có IgG4, cũng có thể mong muốn đưa đột biến điểm (CPSCP->CPPCP) vào

vùng bản lề như được mô tả trong tài liệu Bloom et al., 1997, Protein Science 6:407, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn) để làm giảm xu hướng tạo thành các cầu liên kết disulfua trong chuỗi H mà có thể dẫn đến tính khác loại trong các kháng thể IgG4.

Ngoài ra, các kỹ thuật để thu được các kháng thể có các tính chất khác nhau (tức là, các ái lực khác nhau đối với kháng nguyên mà chúng liên kết vào) cũng là đã biết. Một kỹ thuật như vậy, được gọi là kỹ thuật sắp xếp lại chuỗi, bao gồm việc biểu hiện các kho gen của miền biến đổi của globulin miễn dịch trên bề mặt thể thực khuẩn dạng sợi, thường được gọi là kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn. Kỹ thuật sắp xếp lại chuỗi được sử dụng để tạo ra các kháng thể có ái lực cao đối với hapten 2-phenyloxazol-5-on, như được mô tả trong tài liệu Marks et al., 1992, BioTechnology 10:779.

Có thể tạo ra các cải biến bảo thủ cho các vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được mô tả trong bảng 3, hoặc các CDR được mô tả trong các bảng 4A và 4B (và các cải biến tương ứng cho các axit nucleic mã hóa) để tạo ra protein liên kết CGRP R có đặc điểm chức năng và đặc điểm hóa sinh mong muốn cụ thể. Các phương pháp dùng để thu được các cải biến như vậy được mô tả trên đây.

Các protein liên kết kháng nguyên CGRP có thể còn được cải biến theo các cách khác. Ví dụ, nếu chúng được dự định sử dụng cho các mục đích điều trị, thì chúng có thể được tiếp hợp với polyetylen glycol (được pegyl hóa) để kéo dài thời gian bán hủy trong huyết thanh hoặc để cải thiện khả năng đưa protein vào cơ thể. Theo cách khác, vùng V của các kháng thể đang được quan tâm hoặc các đoạn của chúng có thể được dung hợp với vùng Fc của phân tử kháng thể khác. Vùng Fc được sử dụng cho mục đích này có thể được cải biến sao cho nó không liên kết bổ sung, nhờ đó làm giảm khả năng gây ra sự dung giải tế bào ở bệnh nhân khi protein dung hợp được sử dụng làm chất trị liệu. Ngoài ra, các kháng thể đang được quan tâm hoặc các đoạn chức năng của chúng có thể được tiếp hợp với albumin huyết thanh người để nâng cao thời gian bán hủy trong huyết thanh của kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó. Đối tác dung hợp hữu ích khác của các protein liên kết kháng nguyên hoặc các đoạn của chúng là transthyretin (TTR).

TTR có khả năng tạo tetrame, do đó, protein dung hợp TTR-kháng thể có thể tạo ra kháng thể đa hóa trị mà có thể làm tăng ái lực liên kết của nó.

Theo cách khác, có thể đạt được các cải biến đáng kể về đặc điểm chức năng và/hoặc đặc điểm hóa sinh của các protein liên kết kháng nguyên được mô tả ở đây bằng cách tạo ra các đột biến thế trong trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mà khác nhau một cách đáng kể về tác dụng của chúng đối với việc duy trì (a) cấu trúc phần khung chính của phân tử trong vùng thế, ví dụ, ở dạng cấu hình xoắn ốc hoặc cấu hình phiến, (b) điện tích hoặc tính kỵ nước của phân tử tại vị trí đích, hoặc (c) độ lớn của mạch bên. "Sự thế axit amin bảo thủ" có thể bao gồm sự thế gốc axit amin nguyên thể bằng gốc không nguyên thể mà có ít hoặc không có tác dụng đối với tính phân cực hoặc điện tích của gốc axit amin tại vị trí đó. Xem bảng 4 nêu trên. Ngoài ra, gốc nguyên thể bất kỳ trong polypeptit cũng có thể được thế bằng alanin, như đã được mô tả trên đây về kỹ thuật gây đột biến quét alanin.

Các đột biến thế axit amin (bảo thủ hay không bảo thủ) của các kháng thể đang được quan tâm có thể được tạo ra bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này bằng cách áp dụng các kỹ thuật thông thường. Các đột biến thế axit amin có thể được sử dụng để nhận diện các gốc quan trọng của các kháng thể được đề cập ở đây, hoặc để làm tăng hoặc làm giảm ái lực của các kháng thể này đối với CGRP R của người hoặc để làm thay đổi ái lực liên kết của các protein liên kết kháng nguyên khác được mô tả ở đây.

Các phương pháp biểu hiện protein liên kết kháng nguyên

Các hệ và cấu trúc biểu hiện ở dạng các plasmit, các vectơ biểu hiện, các kết cấu phiên mã hoặc biểu hiện mà chứa ít nhất một polynucleotit được mô tả trên đây cũng được đề xuất, cũng như các tế bào chủ chứa các hệ hoặc cấu trúc biểu hiện này.

Các protein liên kết kháng nguyên được đề cập ở đây có thể được tạo ra bằng kỹ thuật bất kỳ trong số các kỹ thuật thông thường. Ví dụ, các protein liên kết kháng nguyên CGRP R có thể được tạo ra bằng các hệ biểu hiện tái tổ hợp, bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, tài liệu Monoclonal Antibodies,

Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet et al. (eds.) Plenum Press, New York (1980); và Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988).

Các protein liên kết kháng nguyên có thể được biểu hiện trong các dòng tế bào lai (ví dụ, cụ thể là, các kháng thể có thể được biểu hiện trong các tế bào lai) hoặc trong các dòng tế bào không phải tế bào lai. Các cấu trúc biểu hiện mã hóa các kháng thể có thể được sử dụng để biến nạp tế bào chủ động vật có vú, tế bào chủ côn trùng hoặc tế bào chủ vi sinh vật. Việc biến nạp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết để đưa các polynucleotit vào tế bào chủ, bao gồm, ví dụ, đóng gói polynucleotit trong virut hoặc thể thực khuẩn và tải nạp tế bào chủ với cấu trúc này bằng các quy trình chuyển nhiễm đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như được minh họa trong các patent Mỹ số 4,399,216; số 4,912,040; số 4,740,461; số 4,959,455. Quy trình biến nạp tối ưu được sử dụng sẽ phụ thuộc vào loại tế bào chủ được biến nạp. Các phương pháp dùng để đưa các polynucleotit khác loại vào các tế bào động vật có vú là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chuyển nhiễm qua trung gian dextran, kết tủa canxi phosphat, chuyển nhiễm qua trung gian polybren, dung hợp thể nguyên sinh, mở lỗ bằng xung điện, bao nang (các) polynucleotit trong liposom, trộn axit nucleic với các lipit tích điện dương, và vi tiêm trực tiếp ADN vào các nhân tế bào.

Các cấu trúc biểu hiện tái tổ hợp thường chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit chứa một hoặc nhiều vùng sau đây: một hoặc nhiều CDR được đề cập ở đây; vùng cố định chuỗi nhẹ; vùng biến đổi chuỗi nhẹ; vùng cố định chuỗi nặng (ví dụ, C_H1, C_H2 và/hoặc C_H3); và/hoặc phần khung đỡ khác của protein liên kết kháng nguyên CGRP R. Các trình tự axit nucleic này được chèn vào vectơ biểu hiện thích hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật nối chuẩn. Theo một phương án, vùng cố định chuỗi nặng hoặc vùng cố định chuỗi nhẹ được nối vào đầu cuối C của vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ đặc hiệu kháng CGRP R và được nối vào vectơ biểu hiện. Vectơ này thường được chọn để phát huy chức năng trong tế bào chủ cụ thể được sử dụng (tức là, vectơ này tương hợp với bộ máy tế bào chủ, cho phép sự khuếch đại và/hoặc biểu hiện gen có thể

diễn ra). Theo một số phương án, các vectơ được sử dụng sẽ dùng đến các thử nghiệm bổ sung đoạn-protein bằng cách sử dụng các chất chỉ thị protein, như dihydrofolat reductaza (xem, ví dụ, patent Mỹ số 6,270,964, tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Có thể mua các vectơ biểu hiện thích hợp, ví dụ, từ Invitrogen Life Technologies hoặc BD Biosciences (trước đây là "Clontech"). Các vectơ hữu ích khác dùng cho việc nhân dòng và biểu hiện các kháng thể và các đoạn bao gồm các vectơ được mô tả trong tài liệu Bianchi and McGrew, 2003, Biotech. Biotechnol. Bioeng. 84:439-44, tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các vectơ biểu hiện thích hợp khác được mô tả, ví dụ, trong Methods Enzymol., vol. 185 (D. V. Goeddel, ed.), 1990, New York: Academic Press.

Thông thường, các vectơ biểu hiện được sử dụng trong tế bào bất kỳ trong số các tế bào chủ sẽ chứa các trình tự dùng để duy trì plasmit và để nhân dòng và biểu hiện các trình tự nucleotit ngoại sinh. Các trình tự như vậy, được gọi chung là "trình tự kẹp sườn", theo các phương án cụ thể thường chứa một hoặc nhiều trình tự nucleotit sau đây: trình tự khởi đầu, một hoặc nhiều trình tự tăng cường, điểm khởi đầu sao chép, trình tự kết thúc phiên mã, trình tự intron hoàn chỉnh chứa vị trí ghép nối cho và nhận, trình tự mã hóa trình tự dẫn dùng cho quá trình tiết polypeptit, vị trí liên kết ribosom, trình tự polyadenyl hóa, vùng đa liên kết dùng để chèn axit nucleic mã hóa polypeptit cần được biểu hiện, và yếu tố đánh dấu có thể chọn lọc. Mỗi trình tự trong số các trình tự này được mô tả dưới đây.

Tùy ý, vectơ có thể chứa trình tự mã hóa "thẻ gắn", tức là phân tử oligonucleotit nằm ở đầu cuối 5′ hoặc 3′ của trình tự mã hóa protein liên kết CGRP R; trình tự oligonucleotit mã hóa polyHis (như hexaHis), hoặc "thẻ gắn" khác như FLAG®, HA (hemaglutinin của virut cúm), hoặc myc, mà các kháng thể đối với chúng có bán trên thị trường. Thẻ gắn này thường được dung hợp với polypeptit khi biểu hiện polypeptit, và có thể đóng vai trò làm phương tiện cho việc tinh chế ái lực hoặc phát hiện protein liên kết CGRP R từ tế bào chủ. Việc tinh chế ái lực có thể được thực hiện, ví dụ, bằng kỹ thuật sắc ký cột có sử dụng các kháng thể kháng thẻ gắn này làm chất nền ái lực. Tùy ý, tiếp đó,

thẻ gắn này có thể được loại bỏ khỏi protein liên kết CGRP R đã được tinh chế bằng các cách khác nhau như sử dụng các peptidaza cụ thể để phân cắt.

Các trình tự kẹp sườn có thể là tương đồng (tức là, từ cùng một loài và/hoặc chủng với tế bào chủ), khác loại (tức là, từ loài không phải là loài hoặc chủng của tế bào chủ), lai (tức là, kết hợp các trình tự kẹp sườn từ nhiều hơn một nguồn), tổng hợp hoặc nguyên thể. Như vậy, nguồn của trình tự kẹp sườn có thể là sinh vật nhân sơ hoặc sinh vật nhân thực bất kỳ, sinh vật có xương sống hoặc sinh vật không có xương sống bất kỳ, hoặc thực vật bất kỳ, với điều kiện là trình tự kẹp sườn này phát huy chức năng trong, và có thể được hoạt hóa bởi, bộ máy tế bào chủ.

Có thể thu được các trình tự kẹp sườn hữu ích trong các vectơ bằng phương pháp bất kỳ trong một số phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này. Thông thường, các trình tự kẹp sườn hữu ích trong bản mô tả này đã được nhận diện trước đây bằng cách lập bản đồ và/hoặc bằng phương pháp cắt bằng endonucleaza giới hạn và vì vậy, có thể được phân lập từ nguồn mô thích hợp bằng cách sử dụng endonucleaza giới hạn thích hợp. Trong một số trường hợp, có thể biết được trình tự nucleotit đầy đủ của trình tự kẹp sườn. Ở đây, trình tự kẹp sườn có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây để nhân dòng hoặc tổng hợp axit nucleic.

Dù tất cả hay chỉ một phần của trình tự kẹp sườn là đã biết, trình tự kẹp sườn này cũng có thể thu được bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và/hoặc bằng cách sàng lọc thư viện hệ gen bằng đầu dò thích hợp như oligonucleotit và/hoặc đoạn trình tự kẹp sườn từ cùng loài hoặc loài khác. Khi không biết trình tự kẹp sườn, đoạn ADN chứa trình tự kẹp sườn có thể được phân lập từ mảnh ADN lớn hơn mà có thể chứa, ví dụ, trình tự mã hóa hoặc thậm chí là gen hoặc các gen khác. Có thể thực hiện việc phân lập bằng phương pháp cắt bằng endonucleaza giới hạn để tạo ra đoạn ADN thích hợp, sau đó phân lập bằng cách sử dụng kỹ thuật tinh chế trên gel agaroza, sắc ký cột Qiagen® (Chatsworth, CA) hoặc các phương pháp khác mà người có hiểu biết trung bình đã biết. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng nắm rõ việc chọn lựa các enzym thích hợp để thực hiện mục đích này.

Điểm khởi đầu sao chép thường là một phần của các vectơ biểu hiện nhân sơ được mua trên thị trường, và điểm khởi đầu này giúp khuếch đại vectơ trong tế bào chủ. Nếu vectơ được chọn không chứa vị trí khởi đầu sao chép, thì vị trí này có thể được tổng hợp hóa học dựa trên cơ sở trình tự đã biết, và được gắn vào vectơ này. Ví dụ, điểm khởi đầu sao chép từ plasmit pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) là thích hợp đối với hầu hết các vi khuẩn gram âm, và các nguồn virut khác (ví dụ, SV40, virut polioma, adenovirut, virut viêm miệng có mụn nước (VSV), hoặc virut gây u nhú như HPV hoặc BPV) là hữu ích đối với các vectơ nhân dòng trong tế bào động vật có vú. Nhìn chung, thành phần khởi đầu sao chép là không cần thiết đối với các vectơ biểu hiện của động vật có vú (ví dụ, điểm khởi đầu SV40 thường được sử dụng chỉ vì nó cũng chứa trình tự khởi đầu sớm của virut).

Trình tự kết thúc phiên mã thường nằm ở 3′ đối với đầu cuối của vùng mã hóa polypeptit và có chức năng kết thúc phiên mã. Thông thường, trình tự kết thúc phiên mã trong các tế bào nhân sơ là đoạn giàu G-C, sau đó là trình tự poly-T. Mặc dù trình tự này được nhân dòng một cách dễ dàng từ thư viện hoặc thậm chí được mua trên thị trường như là một phần của vectơ, nhưng nó cũng có thể được tổng hợp một cách dễ dàng bằng cách sử dụng các phương pháp tổng hợp axit nucleic như các phương pháp được mô tả ở đây.

Gen đánh dấu có thể chọn lọc mã hóa protein cần thiết cho sự sinh tồn và phát triển của tế bào chủ được cho sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy chọn lọc. Các gen đánh dấu có thể chọn lọc tiêu biểu mã hóa các protein mà (a) đem lại tính kháng đối với các chất kháng sinh hoặc các độc tố khác, ví dụ, ampixilin, tetraxyclin hoặc kanamyxin cho các tế bào chủ nhân sơ; (b) bổ sung các thiếu hụt dinh dưỡng thụ động của tế bào này; hoặc (c) cung cấp các dưỡng chất quan trọng không sẵn có từ môi trường phức hợp hoặc môi trường đã định. Các gen đánh dấu có thể chọn lọc cụ thể là gen kháng kanamyxin, gen kháng ampixilin và gen kháng tetraxyclin. Thuận lợi là, gen kháng neomyxin cũng có thể được sử dụng cho việc chọn lọc trong cả tế bào chủ nhân sơ và tế bào chủ nhân thực.

Các gen có thể chọn lọc khác có thể được sử dụng để khuếch đại gen mà sẽ được biểu hiện. Khuếch đại là quy trình trong đó các gen cần thiết cho việc sản xuất protein quan trọng đối với sự sinh tồn hoặc phát triển của tế bào được lặp lại nối tiếp nhau trong các nhiễm sắc thể của các thế hệ tế bào tái tổ hợp kế tiếp. Các ví dụ về các gen đánh dấu có thể chọn lọc thích hợp đối với các tế bào động vật có vú bao gồm gen dihydrofolat reductaza (DHFR) và gen thymidin kinaza không có trình tự khởi đầu. Các thể biến nạp tế bào động vật có vú được đặt dưới áp lực chọn lọc trong đó chỉ có các thể biến nạp là được làm thích nghi duy nhất để sống sót vì gen có thể chọn lọc có mặt trong vectơ. Áp lực chọn lọc được tạo ra bằng cách nuôi cấy các tế bào được biến nạp này dưới các điều kiện trong đó nồng độ chất chọn lọc trong môi trường được làm tăng lên liên tiếp, nhờ đó dẫn đến sự khuếch đại cả gen có thể chọn lọc và ADN mà mã hóa gen khác, như protein liên kết kháng nguyên mà liên kết vào CGRP R. Kết quả là, lượng tăng của polypeptit như protein liên kết kháng nguyên được tổng hợp từ ADN đã được khuếch đại.

Vị trí liên kết ribosom thường là cần thiết cho quá trình khởi đầu dịch mã ARN thông tin và được đặc trưng bởi trình tự Shine-Dalgarno (sinh vật nhân sơ) hoặc trình tự Kozak (sinh vật nhân thực). Yếu tố này thường nằm ở 3' đối với trình tự khởi đầu và 5' đối với trình tự mã hóa của polypeptit cần được biểu hiện.

Trong một số trường hợp, như khi muốn có sự glycosyl hóa trong hệ biểu hiện tế bào chủ có nhân thực, có thể điều chỉnh các trình tự đầu cuối N (presequence) hoặc trình tự được loại bỏ khi hoạt hóa (prosequence) để cải thiện hiệu suất hoặc mức glycosyl hóa. Ví dụ, có thể thay đổi vị trí phân cắt peptidaza của peptit tín hiệu cụ thể, hoặc bổ sung các trình tự được loại bỏ khi hoạt hóa, điều này cũng có thể ảnh hưởng đến quá trình glycosyl hóa. Sản phẩm protein cuối cùng có thể có, ở vị trí -1 (so với axit amin thứ nhất của protein hoàn thiện), một hoặc nhiều axit amin bổ sung gắn liền với quá trình biểu hiện, mà có thể đã không được loại bỏ một cách hoàn toàn. Ví dụ, sản phẩm protein cuối cùng có thể có một hoặc hai gốc axit amin được phát hiện thấy ơr vị trí phân cắt peptidaza, được gắn vào đầu cuối amino. Theo cách khác, việc sử dụng một số vị trí phân cắt enzym có

thể tạo ra dạng cắt ngắn không đáng kể của polypeptit mong muốn, nếu enzym này cắt ở vùng như vậy trong polypeptit hoàn thiện này.

Quá trình biểu hiện và nhân dòng thường chứa trình tự khởi đầu mà được nhận biết bởi sinh vật chủ và được liên kết theo cách có thể kiểm soát vào phân tử mã hóa protein liên kết CGRP R. Các trình tự khởi đầu là các trình tự không được phiên mã nằm ở phía trên (tức là, 5') đối với codon khởi đầu của gen cấu trúc (thường trong phạm vi khoảng 100 đến 1000bp) có chức năng kiểm soát quá trình phiên mã gen cấu trúc. Các trình tự khởi đầu thường được nhóm vào một trong hai nhóm: các trình tự khởi đầu có thể cảm ứng và các trình tự khởi đầu cơ định. Các trình tự khởi đầu có thể cảm ứng khởi động các mức phiên mã tăng từ ADN dưới sự kiểm soát của chúng khi đáp ứng lại thay đổi nào đó trong điều kiện nuôi cấy, như sự có mặt hoặc sự vắng mặt của chất dinh dưỡng hoặc sự thay đổi về nhiệt độ. Mặt khác, các trình tự khởi đầu cơ định lại phiên mã một cách đồng đều gen mà chúng liên kết theo cách có thể kiểm soát vào đó, tức là, có ít hoặc không có sự kiểm soát nào đối với quá trình biểu hiện gen. Một lượng lớn các trình tự khởi đầu, được nhận biết bởi các tế bào chủ tiềm năng, đã được biết rõ. Trình tự khởi đầu thích hợp được liên kết theo cách có thể kiểm soát vào ADN mã hóa chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ chứa protein liên kết CGRP R bằng cách loại bỏ trình tự khởi đầu ra khỏi ADN nguồn bằng phương pháp cắt bằng enzym giới hạn và chèn trình tự khởi đầu mong muốn vào vectơ này.

Các trình tự khởi đầu thích hợp để sử dụng với các vật chủ nấm men cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các trình tự tăng cường của nấm men được sử dụng một cách thuận lợi với các trình tự khởi đầu của nấm men. Các trình tự khởi đầu thích hợp để sử dụng với các tế bào chủ động vật có vú đã được biết rõ và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các trình tự thu được từ các hệ gen của các virut như virut polioma, virut đậu mùa, adenovirut (như adenovirut 2), virut gây u nhú bò, virut gây sacôm gia cầm, virut cự bào, retrovirut, virut viêm gan B và virut khỉ 40 (SV40). Các trình tự khởi đầu của động vật có vú thích hợp khác bao gồm các trình tự khởi đầu khác loại của động vật có vú, ví dụ, các trình tự khởi đầu sốc nhiệt và trình tự khởi đầu actin.

Các trình tự khởi đầu khác mà có thể được quan tâm bao gồm, nhưng không giới hạn ở: trình tự khởi đầu sớm của SV40 (Benoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310); trình tự khởi đầu CMV (Thornsen et al., 1984, Proc. Natl. Acad. U.S.A 81:659-663); trình tự khởi đầu được chứa trong đơn vị lặp lại dài đầu cuối 3' của virut gây sacôm Rous (Yamamoto et al., 1980, Cell 22:787-797); trình tự khởi đầu thymidin kinaza của virut gây mụn rộp (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-1445); trình tự khởi đầu và các trình tự điều hòa từ gen metallothionin (Prinster et al., 1982, Nature 296:39-42); và các trình tự khởi đầu nhân sơ như trình tự khởi đầu beta-lactamaza (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731); hoặc trình tự khởi đầu phiên mã tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25). Cũng được quan tâm là các vùng kiểm soát phiên mã của động vật dưới đây, các vùng này thể hiện tính đặc hiệu mô và đã được sử dụng trong động vật chuyển gen: vùng kiểm soát gen elastaza I hoạt động trong các tế bào nang tuyến tụy (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); vùng kiểm soát gen insulin hoạt động trong các tế bào beta tuyến tụy (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122); vùng kiểm soát gen globulin miễn dịch hoạt động trong các tế bào dạng bạch huyết (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444); vùng kiểm soát virut gây khối u vú ở chuột nhắt hoạt động trong tế bào tinh hoàn, tế bào vú, tế bào dạng bạch huyết và tế bào mast (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495); vùng kiểm soát gen albumin hoạt động trong gan (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1 :268-276); vùng kiểm soát gen alpha-feto-protein hoạt động trong gan (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 253:53-58); vùng kiểm soát gen kháng trypsin-alpha 1 hoạt động trong gan (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171); vùng kiểm soát gen beta-globin hoạt động trong các tế bào tủy sống (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); vùng kiểm soát gen protein myelin cơ bản mà hoạt động trong các tế bào ít nhánh trong não (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); vùng kiểm soát gen chuỗi nhẹ myosin-2 hoạt động trong cơ xương (Sani, 1985, Nature 314:283-286); và vùng kiểm soát gen giải

phóng hormon hướng sinh dục hoạt động trong vùng não dưới đồi (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

Trình tự tăng cường có thể được chèn vào vectơ để làm tăng sự phiên mã của ADN mã hóa chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng chứa protein liên kết CGRP R của người bởi các sinh vật nhân thực bậc cao. Các trình tự tăng cường là các yếu tố tác động dạng cis của ADN, thường có độ dài khoảng 10-300bp, mà tác động lên trình tự khởi đầu để làm tăng sự phiên mã. Các trình tự tăng cường tương đối độc lập về hướng và vị trí, được tìm thấy ở cả vị trí 5' và 3' đối với đơn vị phiên mã. Một vài trình tự tăng cường sẵn có từ các gen của động vật có vú là đã biết (ví dụ, globin, elastaza, albumin, alpha-feto-protein và insulin). Tuy nhiên, thông thường, trình tự tăng cường từ virut được sử dụng. Trình tự tăng cường SV40, trình tự tăng cường trình tự khởi đầu sớm của virut cự bào, trình tự tăng cường của virut polioma và các trình tự tăng cường của adenovirut đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này là các yếu tố tăng cường tiêu biểu dùng để hoạt hóa các trình tự khởi đầu nhân thực. Mặc dù trình tự tăng cường có thể được đặt trong vectơ ở 5' hoặc 3' đối với trình tự mã hóa, nhưng nó thường nằm ở vị trí 5' từ trình tự khởi đầu. Trình tự mã hóa trình tự tín hiệu (trình tự dẫn hoặc peptit tín hiệu) nguyên thể hoặc khác loại thích hợp có thể được kết hợp vào vectơ biểu hiện, để thúc đẩy quá trình tiết ngoại bào của kháng thể. Việc lựa chọn peptit tín hiệu hoặc trình tự dẫn phụ thuộc vào các loại tế bào chủ mà trong đó kháng thể sẽ được tạo ra, và trình tự tín hiệu khác loại có thể thay thế trình tự tín hiệu nguyên thể. Các ví dụ về các peptit tín hiệu mà phát huy chức năng trong các tế bào chủ động vật có vú bao gồm các peptit tín hiệu sau: trình tự tín hiệu đối với interleukin-7 (IL-7) được mô tả trong patent Mỹ số 4,965,195; trình tự tín hiệu đối với thụ thể interleukin-2 được mô tả trong tài liệu Cosman et al.,1984, Nature 312:768; peptit tín hiệu đối với thụ thể interleukin-4 được mô tả trong patent châu Âu số 0367 566; peptit tín hiệu đối với thụ thể interleukin-1 typ I được mô tả trong patent Mỹ số 4,968,607; peptit tín hiệu đối với thụ thể interleukin-1 typ II được mô tả trong patent châu Âu số 0 460 846.

Các vectơ biểu hiện được đề cập có thể được tạo cấu trúc từ vectơ ban đầu như vectơ có bán trên thị trường. Các vectơ này có thể chứa hoặc có thể không chứa tất cả các

trình tự kẹp sườn mong muốn. Trong trường hợp một hoặc nhiều trình tự kẹp sườn được mô tả ở đây không có mặt trong vectơ, thì chúng có thể được thu nhận một cách riêng biệt và được gắn vào vectơ. Các phương pháp được sử dụng nhằm thu được mỗi trong số các trình tự kẹp sườn là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Sau khi tạo cấu trúc vectơ và chèn phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, hoặc chuỗi nhẹ và chuỗi nặng chứa trình tự liên kết kháng nguyên CGRP R vào vị trí thích hợp của vectơ, vectơ đã hoàn thành này có thể được chèn vào tế bào chủ thích hợp nhằm khuếch đại và/hoặc biểu hiện polypeptit. Việc biến nạp vectơ biểu hiện dùng cho protein liên kết kháng nguyên vào tế bào chủ đã được chọn có thể được thực hiện bằng các phương pháp đã biết rõ, bao gồm chuyển nhiễm, gây nhiễm, đồng kết tủa canxi phosphat, mở lỗ bằng xung điện, vi tiêm, chuyển nhiễm liposom, chuyển nhiễm qua trung gian DEAE-dextran, hoặc các kỹ thuật đã biết khác. Phương pháp được chọn sẽ phụ thuộc một phần vào loại tế bào chủ được sử dụng. Các phương pháp này và các phương pháp thích hợp khác là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và được trình bày, ví dụ, trong tài liệu Sambrook et al., 2001, nêu trên.

Tế bào chủ, khi được nuôi cấy dưới các điều kiện thích hợp, sẽ tổng hợp protein liên kết kháng nguyên mà có thể được thu lại sau đó từ môi trường nuôi cấy (nếu tế bào chủ tiết nó vào môi trường này) hoặc một cách trực tiếp từ tế bào chủ sản xuất nó (nếu nó không được tiết). Việc chọn lựa tế bào chủ thích hợp sẽ phụ thuộc vào các yếu tố khác nhau, như các mức biểu hiện mong muốn, các cải biến polypeptit mà mong muốn hoặc cần thiết để có được hoạt tính (như sự glycosyl hóa hoặc sự phosphoryl hóa) và sự dễ dàng gấp nếp thành phân tử có hoạt tính sinh học.

Các dòng tế bào động vật có vú sẵn có làm vật chủ dùng để biểu hiện là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các dòng tế bào đã được làm bất tử sẵn có từ Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC: American Type Culture Collection), bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), tế bào HeLa, tế bào thận chuột đồng con (BHK), tế bào thận khỉ (COS), tế bào canxinom của tế bào gan người (ví dụ, Hep G2), và nhiều dòng tế bào khác. Theo các

phương án cụ thể, các dòng tế bào có thể được chọn thông qua việc xác định dòng tế bào nào có các mức biểu hiện cao và sản xuất liên tục các protein liên kết kháng nguyên có các tính chất liên kết CGRP R. Theo phương án khác, dòng tế bào từ chuỗi thế hệ tế bào B mà không tạo ra kháng thể của chính mình nhưng có khả năng tạo ra và tiết kháng thể khác loại có thể được chọn.

Ứng dụng protein liên kết kháng nguyên CGRP của người cho mục đích chẩn đoán và điều trị

Các protein liên kết kháng nguyên hữu ích trong việc phát hiện CGRP R trong các mẫu sinh học và nhận diện các tế bào hoặc mô mà sản xuất CGRP R. Ví dụ, các protein liên kết kháng nguyên CGRP R có thể được sử dụng trong các thử nghiệm chẩn đoán, ví dụ, các thử nghiệm liên kết để phát hiện và/hoặc định lượng CGRP R được biểu hiện trong mô hoặc tế bào. Các protein liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu vào CGRP R cũng có thể được sử dụng trong điều trị các bệnh liên quan đến CGRP R trong bệnh nhân có nhu cầu. Ngoài ra, các protein liên kết kháng nguyên CGRP R có thể được sử dụng để ức chế CGRP R không tạo phức hệ với phối tử CGRP của nó, nhờ đó điều biến hoạt tính sinh học của CGRP R trong tế bào hoặc mô. Các ví dụ về các hoạt tính mà có thể được điều biến bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ức chế tình trạng giãn mạch và/hoặc làm giảm nhẹ chứng viêm thần kinh. Vì vậy, các protein liên kết kháng nguyên liên kết với CGRP R có thể điều biến và/hoặc phong bế tương tác với các hợp chất liên kết khác và như vậy, có thể có công dụng trị liệu trong việc làm giảm nhẹ các bệnh liên quan đến CGRP R.

Các chỉ định

Bệnh hoặc tình trạng bệnh gắn liền với CGRP R của người bao gồm bệnh hoặc tình trạng bệnh bất kỳ mà sự khởi phát của nó ở bệnh nhân là do, ít nhất một phần, sự tương tác của CGRP R với phối tử của nó, CGRP, gây ra. Mức độ trầm trọng của bệnh hoặc tình trạng bệnh cũng có thể bị tăng nặng hoặc được giảm nhẹ bởi sự tương tác của CGRP R với CGRP. Các ví dụ về các bệnh và tình trạng bệnh mà có thể được điều trị bằng các protein liên kết kháng nguyên được mô tả ở đây bao gồm các bệnh đau đầu, như

đau đầu từng cơn, đau nửa đầu, bao gồm các cơn đau nửa đầu, đau mạn tính, đái tháo đường typ II, viêm, ví dụ, viêm thần kinh, các rối loạn tim mạch, và tình trạng loạn huyết động lực gắn liền với sự nhiễm nội độc tố huyết và nhiễm khuẩn.

Cụ thể, các protein liên kết kháng nguyên được mô tả ở đây có thể được sử dụng để điều trị bệnh đau nửa đầu, trong vai trò là điều trị khẩn cấp bắt đầu sau khi cơn đau nửa đầu đã bắt đầu, và/hoặc trong vai trò là điều trị dự phòng được sử dụng, ví dụ, hằng ngày, hằng tuần, hai tuần một lần, hằng tháng, hai tháng một lần, một năm hai lần, v.v.) để phòng ngừa hoặc làm giảm tần suất và/hoặc mức độ trầm trọng của các triệu chứng, ví dụ, các triệu chứng đau, gắn liền với cơn đau nửa đầu.

Các phương pháp chẩn đoán

Các protein liên kết kháng nguyên được mô tả ở đây có thể được sử dụng cho các mục đích chẩn đoán nhằm phát hiện, chẩn đoán hoặc theo dõi các bệnh và/hoặc các tình trạng bệnh gắn liền với CGRP R. Cũng được mô tả là các phương pháp phát hiện sự có mặt của CGRP R trong mẫu bằng cách sử dụng các phương pháp mô miễn dịch kinh điển đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (ví dụ, Tijssen, 1993, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Vol 15 (Eds R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg, Elsevier, Amsterdam); Zola, 1987, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, trang 147-158 (CRC Press, Inc.); Jalkanen et al., 1985, J. Cell. Biol. 101:976-985; Jalkanen et al., 1987, J. Cell Biol. 105:3087-3096). Việc phát hiện CGRP R có thể được thực hiện *in vivo* hoặc *in vitro*.

Các ứng dụng chẩn đoán được mô tả ở đây bao gồm việc sử dụng các protein liên kết kháng nguyên để phát hiện sự biểu hiện của CGRP R và tình trạng liên kết của các phối tử vào CGRP R. Các ví dụ về các phương pháp hữu ích trong việc phát hiện sự có mặt của CGRP R bao gồm các thử nghiệm miễn dịch, như thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) và thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA).

Đối với các ứng dụng chẩn đoán, protein liên kết kháng nguyên thường sẽ được đánh dấu bằng nhóm đánh dấu có thể phát hiện được. Các nhóm đánh dấu thích hợp bao

gồm, nhưng không giới hạn ở, các nhóm sau: các chất đồng vị phóng xạ hoặc nuclit phóng xạ (ví dụ, ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I), các nhóm huỳnh quang (ví dụ, FITC, rodamin, chất phát quang lantanoit), các nhóm enzym (ví dụ, peroxidaza cải ngựa, β-galactosidaza, luxiferaza, phosphataza kiềm), các nhóm phát quang hóa, các nhóm biotinyl, hoặc các epitop polypeptit đã được xác định trước được nhận biết bởi chất chỉ thị thứ cấp (ví dụ, các trình tự cặp khóa kéo leuxin, các vị trí liên kết dành cho kháng thể thứ cấp, các miền liên kết kim loại, các thẻ gắn epitop). Theo một số phương án, nhóm đánh dấu được cộng hợp với protein liên kết kháng nguyên thông qua các đoạn đệm có độ dài khác nhau để làm giảm sự cản trở không gian tiềm tàng. Các phương pháp khác nhau dùng để đánh dấu protein là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sử dụng.

Theo khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên có thể được sử dụng để nhận diện tế bào hoặc các tế bào biểu hiện CGRP R. Theo một phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên được đánh dấu bằng nhóm đánh dấu và sự liên kết của protein liên kết kháng nguyên đã được đánh dấu vào CGRP R được phát hiện. Theo một phương án cụ thể khác, sự liên kết của protein liên kết kháng nguyên với CGRP R được phát hiện *in vivo*. Theo một phương án cụ thể khác, protein liên kết kháng nguyên CGRP R được phân lập và được đo bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, tài liệu Harlow and Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor (ed. 1991 và các bản bổ sung định kỳ); John E. Coligan, ed., 1993, Current Protocols in Immunology New York: John Wiley & Sons.

Khía cạnh khác đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của phân tử thử nghiệm mà cạnh tranh với các protein liên kết kháng nguyên được đề xuất để liên kết với CGRP R. Ví dụ về một thử nghiệm như vậy bao gồm việc phát hiện lượng protein liên kết kháng nguyên tự do trong dung dịch chứa lượng CGRP R trong sự có mặt hoặc sự vắng mặt của phân tử thử nghiệm. Mức tăng về lượng protein liên kết kháng nguyên tự do (tức là, protein liên kết kháng nguyên không được liên kết vào CGRP R) sẽ cho biết rằng phân tử thử nghiệm có khả năng cạnh tranh liên kết CGRP R với protein liên kết kháng nguyên. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên được đánh dấu bằng nhóm đánh dấu.

Theo cách khác, phân tử thử nghiệm được đánh dấu và lượng phân tử thử nghiệm tự do được theo dõi trong sự có mặt và sự vắng mặt của protein liên kết kháng nguyên.

Các phương pháp điều trị: các dạng dược phẩm, các đường dùng thuốc

Sáng chế cũng mô tả các phương pháp sử dụng các protein liên kết kháng nguyên. Theo một số phương pháp, protein liên kết kháng nguyên được cấp cho bệnh nhân. Protein liên kết kháng nguyên này ức chế sự liên kết của CGRP với CGRP R của người.

Sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa lượng hữu hiệu để điều trị của một hoặc nhiều protein liên kết kháng nguyên và chất pha loãng, chất mang, chất làm tan, chất nhũ hóa, chất bảo quản và/hoặc chất phụ trợ dược dụng. Ngoài ra, sáng chế cũng mô tả các phương pháp điều trị bệnh nhân, ví dụ, điều trị bệnh đau nửa đầu, bằng cách sử dụng dược phẩm như vậy. Thuật ngữ "bệnh nhân" bao gồm đối tượng bị bệnh là người.

Các nguyên liệu bào chế chấp nhận được là không độc đối với người tiếp nhận ở các mức liều lượng và nồng độ được sử dụng. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến các dược phẩm chứa lượng hữu hiệu để điều trị của các protein liên kết kháng nguyên CGRP R của người.

Theo các phương án cụ thể, tốt hơn là, các nguyên liệu bào chế chấp nhận được là không độc đối với người tiếp nhận ở các mức liều lượng và nồng độ được sử dụng. Theo các phương án cụ thể, dược phẩm có thể chứa các nguyên liệu bào chế dùng để thay đổi, duy trì hoặc bảo quản, ví dụ, độ pH, độ thẩm thấu, độ nhớt, độ trong, màu sắc, tính đẳng trương, mùi hương, tính vô trùng, tính ổn định, tốc độ hòa tan hoặc giải phóng, độ hấp phụ hoặc độ thấm của chế phẩm. Theo các phương án này, các nguyên liệu bào chế thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các axit amin (như glyxin, glutamin, asparagin, arginin hoặc lysin); các chất kháng khuẩn; các chất chống oxy hóa (như axit ascorbic, natri sulfit hoặc natri hydro-sulfit); các chất đệm (như borat, bicacbonat, Tris-HCl, xitrat, phosphat hoặc các axit hữu cơ khác); các chất độn tạo khối (như manitol hoặc glyxin); các chất tạo chelat (như axit etylendiamin tetraaxetic (EDTA)); các chất tạo phức (như cafein, polyvinylpyrolidon, beta-xyclodextrin hoặc hydroxypropyl-beta-xyclodextrin); các chất

độn; monosacarit; disacarit; và các hydrat cacbon khác (như glucoza, mannoza hoặc dextrin); các protein (như albumin huyết thanh, gelatin hoặc globulin miễn dịch); chất tạo màu, chất tạo hương và chất pha loãng; các chất nhũ hóa; các polyme ưa nước (như polyvinylpyrolidon); polypeptit có trọng lượng phân tử thấp; các đối ion tạo muối (như natri); các chất bảo quản (như 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); các rượu đường (như manitol hoặc sorbitol); các chất tạo huyền phù; các chất hoạt động bề mặt hoặc các chất thấm ướt (như các pluronic, PEG, các sorbitan este, các polysorbat như polysorbat 20, polysorbat, triton, trometamin, lexitin, cholesterol, tyloxapal); các chất tăng cường tính ổn định (như sucroza hoặc sorbitol); các chất tăng cường trương lực (như halogenua kim loại kiềm, tốt hơn, là natri hoặc kali clorua, manitol sorbitol); các chất dẫn thuốc vào cơ thể; các chất pha loãng; các tá dược và/hoặc các chất phụ trợ dược. Xem tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences, 18" Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

Theo các phương án cụ thể, dược phẩm tối ưu sẽ được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này tùy thuộc vào, ví dụ, đường dùng thuốc dự định, dạng thức đưa vào cơ thể và liều lượng mong muốn. Xem, ví dụ, tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences nêu trên. Theo các phương án cụ thể, các chế phẩm như vậy có thể ảnh hưởng đến trạng thái vật lý, tính ổn định, tốc độ giải phóng *in vivo* và tốc độ thanh thải *in vivo* của các protein liên kết kháng nguyên được bộc lộ. Theo các phương án cụ thể, chất mang hoặc chất dẫn chủ yếu trong dược phẩm có thể là nước hoặc không phải nước về bản chất. Ví dụ, chất mang hoặc chất dẫn thích hợp có thể là nước dùng để tiêm, dung dịch muối sinh lý hoặc dịch não-tủy nhân tạo, có thể được bổ sung các nguyên liệu khác thường dùng trong chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa. Dung dịch nước muối đệm trung tính hoặc dung dịch nước muối được trộn với albumin huyết thanh là các chất dẫn tiêu biểu khác nữa. Theo các phương án cụ thể, các dược phẩm chứa đệm Tris có độ pH là 7,0-8,5, hoặc đệm axetat có độ pH 4,0-5,5, và có thể còn bao gồm sorbitol hoặc chất thay thế thích hợp. Theo các phương án cụ thể, các chế phẩm protein liên kết kháng nguyên

CGRP R của người có thể được bào chế cho mục đích bảo quản bằng cách trộn chế phẩm được chọn có độ tinh khiết mong muốn với các chất bào chế tùy ý (Remington's Pharmaceutical Sciences trên đây) ở dạng bánh đông khô hoặc dung dịch nước. Ngoài ra, theo các phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên CGRP R của người có thể được bào chế ở dạng chế phẩm đông khô bằng cách sử dụng các tá dược thích hợp như sucroza.

Các dược phẩm có thể được lựa chọn để đưa vào cơ thể qua đường ngoài đường tiêu hóa. Theo cách khác, các chế phẩm có thể được chọn để xông hít hoặc để đưa vào cơ thể qua đường tiêu hóa, như qua đường miệng. Việc bào chế các chế phẩm dược dụng như vậy là thuộc phạm vi kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Tốt hơn là, các thành phần chế phẩm có mặt với nồng độ chấp nhận được đối với vị trí dùng thuốc. Theo các phương án cụ thể, các chất đệm được sử dụng để duy trì chế phẩm ở độ pH sinh lý hoặc ở độ pH thấp hơn đôi chút, thường là trong khoảng độ pH từ khoảng 5 đến khoảng 8.

Khi phương thức dùng thuốc ngoài đường tiêu hóa được dự liệu, các chế phẩm trị liệu có thể được cung cấp ở dạng không có tác nhân gây sốt, dung dịch nước chấp nhận được để dùng ngoài đường tiêu hóa chứa protein liên kết CGRP R mong muốn của người trong chất dẫn dược dụng. Chất dẫn đặc biệt thích hợp để tiêm ngoài đường tiêu hóa là nước cất vô trùng trong đó protein liên kết kháng nguyên CGRP R của người được bào chế ở dạng dung dịch đẳng trương vô trùng, được bảo quản một cách đúng đắn. Theo các phương án cụ thể, việc bào chế có thể bao gồm việc phối chế phân tử mong muốn với chất như các vi cầu có thể tiêm được, các hạt có thể ăn mòn sinh học, các hợp chất polyme (như axit polylactic hoặc axit polyglycolic), các hạt hoặc các liposom, mà có thể đem lại sự giải phóng kéo dài hoặc có kiểm soát của sản phẩm mà có thể được đưa vào cơ thể bằng cách tiêm liều dự trữ (depot). Theo các phương án cụ thể, axit hyaluronic, có tác dụng nâng cao thời gian duy trì trong hệ tuần hoàn, cũng có thể được sử dụng. Theo các phương án cụ thể, các thiết bị đưa thuốc vào cơ thể có thể cấy ghép được có thể được sử dụng để đưa protein liên kết kháng nguyên mong muốn vào.

Các dược phẩm cụ thể được bào chế để xông hít. Theo một số phương án, các protein liên kết kháng nguyên CGRP R của người được bào chế ở dạng bột khô có thể xông hít được. Theo các phương án cụ thể, các dung dịch xông hít chứa protein liên kết kháng nguyên CGRP R của người cũng có thể được bào chế với chất đẩy để đưa vào cơ thể dưới dạng sol khí. Theo các phương án cụ thể, các dung dịch có thể được phun sương. Do đó, các phương pháp bào chế và phương thức dùng thuốc trong phổi được mô tả thêm trong đơn patent quốc tế số PCT/US94/001875, đơn này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn và mô tả phương thức đưa protein được cải biến về mặt hóa học vào trong phổi. Một số chế phẩm có thể được cho dùng qua đường miệng. Các protein liên kết kháng nguyên CGRP R của người mà được dùng theo phương thức này có thể được bào chế cùng với hoặc không cùng với các chất mang thường được sử dụng trong quá trình bào chế các dạng liều rắn như viên nén và viên nang. Theo các phương án cụ thể, viên nang có thể được thiết kế để giải phóng phần có hoạt tính của chế phẩm ở thời điểm trong đường dạ dày-ruột khi độ khả dụng sinh học được tối đa hóa và sự phân hủy trước khi vào hệ tuần hoàn được giảm thiểu. Các chất bổ sung có thể được đưa vào để tạo thuận lợi cho sự hấp thụ protein liên kết kháng nguyên CGRP R của người. Các chất pha loãng, chất tạo hương, các sáp có điểm nóng chảy thấp, các dầu thực vật, các chất làm trơn, các chất tạo huyền phù, các chất gây rã viên nén và các chất kết dính cũng có thể được sử dụng.

Một số dược phẩm chứa lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều protein liên kết kháng nguyên CGRP R của người trong hỗn hợp với các tá dược không độc mà thích hợp cho việc sản xuất viên nén. Bằng cách hòa tan các viên nén trong nước vô trùng, hoặc chất dẫn thích hợp khác, có thể điều chế được các dung dịch ở dạng liều đơn vị. Các tá dược thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất pha loãng trơ, như canxi cacbonat, natri cacbonat hoặc bicacbonat, lactoza hoặc canxi phosphat; hoặc các chất kết dính, như tinh bột, gelatin hoặc acacia; hoặc các chất làm trơn như magie stearat, axit stearic hoặc bột talc.

Các dược phẩm khác là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, bao gồm các chế phẩm chứa các protein liên kết kháng nguyên CGRP R của

người ở dạng chế phẩm giải phóng kéo dài hoặc chế phẩm giải phóng có kiểm soát. Các kỹ thuật bào chế các phương tiện giải phóng kéo dài hoặc giải phóng có kiểm soát khác, như các chất mang liposom, các hạt micro có thể ăn mòn sinh học hoặc các hạt xốp và thuốc tiêm dự trữ (depot), cũng là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, đơn patent quốc tế số PCT/US93/00829, tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn và mô tả quá trình giải phóng có kiểm soát của các hạt micro polyme xốp dùng để đưa các dược phẩm vào cơ thể. Các chế phẩm giải phóng kéo dài có thể bao gồm cơ chất polyme bán thấm ở dạng vật phẩm được tạo hình, ví dụ, màng mỏng hoặc viên vi nang. Các cơ chất giải phóng kéo dài có thể bao gồm polyeste, hydrogel, polylactit (như được bộc lộ trong patent Mỹ số 3,773,919 và công bố đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP 058481, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn), các copolyme của axit L-glutamic và gama etyl-L-glutamat (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), poly (2-hydroxyetyl-inethacrylat) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 và Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etylen vinyl axetat (Langer et al., 1981, trên đây) hoặc axit poly-D(-)-3-hydroxybutyric (công bố đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP 133,988). Chế phẩm giải phóng kéo dài có thể còn bao gồm các liposom mà có thể được điều chế bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, tài liệu Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; các công bố đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP 036,676; EP 088,046 và EP 143,949, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các dược phẩm dùng để sử dụng *in vivo* thường được tạo ra ở dạng chế phẩm vô trùng. Có thể thực hiện việc khử trùng bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng. Khi chế phẩm được làm đông khô, việc khử trùng bằng phương pháp này có thể được thực hiện trước hoặc sau khi làm đông khô và hoàn nguyên. Các chế phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa có thể được bảo quản ở dạng đông khô hoặc trong dung dịch. Các chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa thường được cho vào bình chứa có cửa tiếp cận vô trùng, ví dụ, túi đựng dung dịch dùng trong tĩnh mạch hoặc lọ có nút đậy có thể chọc thủng được bằng kim tiêm dưới da.

Theo các phương án cụ thể, các tế bào biểu hiện protein liên kết kháng nguyên tái tổ hợp như được bộc lộ ở đây được bao nang để đưa vào cơ thể (xem tài liệu Invest. Ophthalmol Vis Sci 43:3292-3298, 2002 và Proc. Natl. Acad. Sciences 103:3896-3901, 2006).

Trong các chế phẩm cụ thể, protein liên kết kháng nguyên có nồng độ là ít nhất bằng 10mg/ml, 20mg/ml, 30mg/ml, 40mg/ml, 50mg/ml, 60mg/ml, 70mg/ml, 80mg/ml, 90mg/ml, 100mg/ml hoặc 150mg/ml. Một số chế phẩm chứa chất đệm, sucroza và polysorbat. Một ví dụ về chế phẩm là chế phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên 50-100mg/ml, natri axetat 5-20mM, sucroza 5-10% trọng lượng/thể tích và polysorbat 0,002 – 0,008% trọng lượng/thể tích. Ví dụ, các chế phẩm cụ thể chứa protein liên kết kháng nguyên 65-75mg/ml trong đệm natri axetat 9-11mM, sucroza 8-10% trọng lượng/thể tích và polysorbat 0,005-0,006% trọng lượng/thể tích. Độ pH của các chế phẩm cụ thể này nằm trong khoảng từ 4,5 đến 6. Các chế phẩm khác có độ pH nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,5 (ví dụ, độ pH là 5,0; 5,2 hoặc 5,4).

Sau khi dược phẩm được bào chế, nó có thể được bảo quản trong lọ vô trùng ở dạng dung dịch, huyền phù, gel, nhũ tương, chất rắn, tinh thể, hoặc ở dạng bột được loại nước hoặc bột đông khô. Các chế phẩm này có thể được bảo quản ở dạng sử dụng được ngay hoặc ở dạng (ví dụ, đông khô) mà được hoàn nguyên trước khi sử dụng. Các kit dùng để tạo ra đơn vị sử dụng liều đơn cũng được đề cập. Các kit cụ thể chứa vật chứa thứ nhất có protein khô và vật chứa thứ hai có chế phẩm nước. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề cập đến các kit chứa bơm tiêm chứa sẵn thuốc có một ngăn và nhiều ngăn (ví dụ, bơm tiêm chứa chất lỏng và bơm tiêm chứa chất đông phô). Lượng hữu hiệu để điều trị của dược phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên CGRP R của người cần được sử dụng sẽ phụ thuộc vào, ví dụ, các mục tiêu và bối cảnh điều trị. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng các mức liều lượng thích hợp dùng để điều trị sẽ thay đổi, tùy thuộc một phần vào phân tử được đưa vào cơ thể, chỉ định mà cần được sử dụng protein liên kết kháng nguyên CGRP R của người, đường dùng thuốc, và kích cỡ (thể trọng, bề mặt cơ thể hoặc kích thước cơ quan) và/hoặc tình trạng (độ tuổi và sức khỏe

tổng quát) của bệnh nhân. Theo các phương án cụ thể, thầy thuốc lâm sàng có thể chuẩn độ liều lượng và thay đổi đường dùng thuốc để thu được tác dụng điều trị tối ưu.

Liều lượng tiêu biểu có thể nằm trong khoảng từ khoảng 1μg/kg đến khoảng 30mg/kg hoặc lớn hơn, tùy thuộc vào các yếu tố được đề cập trên đây. Theo các phương án cụ thể, liều lượng có thể nằm trong khoảng từ 10μg/kg đến khoảng 30mg/kg, tùy ý từ 0,1mg/kg đến khoảng 30mg/kg, theo cách khác từ 0,3mg/kg đến khoảng 20mg/kg. Trong một số ứng dụng, liều lượng nằm trong khoảng từ 0,5mg/kg đến 20mg/kg. Trong một số trường hợp, protein liên kết kháng nguyên được cho dùng theo liều là 0,3mg/kg, 0,5mg/kg, 1mg/kg, 3mg/kg, 10mg/kg hoặc 20mg/kg. Lịch trình dùng liều trong một số chế độ điều trị là ở mức liều lượng là 0,3mg/kg qW, 0,5mg/kg qW, 1mg/kg qW, 3 mg/kg qW, 10mg/kg qW hoặc 20mg/kg qW.

Tần suất dùng liều sẽ phụ thuộc vào các thông số dược động của protein liên kết kháng nguyên CGRP R của người cụ thể trong chế phẩm được sử dụng. Thông thường, thầy thuốc lâm sàng cho dùng chế phẩm cho đến khi đạt đến liều lượng đem lại hiệu quả mong muốn. Do đó, có thể cho dùng chế phẩm ở dạng liều đơn, hoặc ở dạng hai liều trở lên (liều này có thể chứa hoặc có thể không chứa cùng một lượng phân tử mong muốn) theo thời gian, hoặc ở dạng chế phẩm truyền liên tục thông qua thiết bị cấy ghép hoặc ống thông. Có thể xác định liều lượng thích hợp thông qua việc sử dụng dữ liệu liều lượng-đáp ứng thích hợp. Theo các phương án cụ thể, các protein liên kết kháng nguyên có thể được dùng cho các bệnh nhân trong suốt một khoảng thời gian kéo dài. Việc dùng protein liên kết kháng nguyên thường xuyên giúp giảm thiểu đáp ứng miễn dịch hoặc phản ứng dị ứng có hại thường gắn liền với các protein liên kết kháng nguyên mà không phải hoàn toàn của người, ví dụ, kháng thể được sản sinh để kháng lại kháng nguyên của người trong động vật không phải là người, ví dụ, kháng thể không phải hoàn toàn của người hoặc kháng thể không phải của người được sản xuất trong loài không phải là người.

Đường dùng dược phẩm là theo các phương pháp đã biết, ví dụ, qua đường miệng, bằng cách tiêm vào trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong não (trong nhu mô), trong não thất, trong cơ, trong mắt, trong động mạch, trong cửa hoặc trong thương tổn; bằng các

hệ giải phóng kéo dài hoặc bằng các thiết bị cấy ghép. Theo các phương án cụ thể, các chế phẩm có thể được dùng bằng cách tiêm liều lớn (bolus) hoặc một cách liên tục bằng cách truyền, hoặc bằng thiết bị cấy ghép.

Chế phẩm cũng có thể được dùng cục bộ bằng cách cấy ghép màng, bọt xốp hoặc vật liệu thích hợp khác mà phân tử mong muốn đã được hấp thụ hoặc được bao nang lên trên đó. Theo các phương án cụ thể, khi thiết bị cấy ghép được sử dụng, thiết bị này có thể được cấy ghép vào cơ quan hoặc mô thích hợp bất kỳ, và việc đưa phân tử mong muốn này vào cơ thể có thể là thông qua quá trình khuếch tán, viên liều lớn (bolus) giải phóng theo thời gian hoặc thông qua việc dùng liên tục.

Cũng có thể mong muốn sử dụng các dược phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên CGRP R của người *ex vivo*. Trong các trường hợp như vậy, các tế bào, các mô hoặc các cơ quan mà đã được lấy khỏi bệnh nhân được cho tiếp xúc với các dược phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên CGRP R của người, sau đó các tế bào, các mô và/hoặc các cơ quan này được cấy ghép trở lại bệnh nhân.

Cụ thể, các protein liên kết kháng nguyên CGRP R của người có thể được đưa vào cơ thể bằng cách cấy ghép các tế bào cụ thể đã được thiết kế về mặt di truyền, bằng cách sử dụng các phương pháp như các phương pháp được mô tả ở đây, để biểu hiện và tiết polypeptit. Theo các phương án cụ thể, các tế bào này có thể là tế bào động vật hoặc tế bào người, và có thể là thuộc cùng một cơ quan, khác loại hoặc ghép khác loại. Theo các phương án cụ thể, các tế bào này có thể được làm bất tử. Theo các phương án khác, để làm giảm nguy cơ đáp ứng miễn dịch, các tế bào có thể được bao nang để tránh sự thâm nhiễm vào mô xung quanh. Theo các phương án khác, các nguyên liệu bao nang thường là các màng hoặc vỏ bọc polyme bán thấm có tính tương hợp sinh học cho phép giải phóng (các) sản phẩm protein, nhưng ngăn chặn sự phá hủy tế bào bởi hệ miễn dịch của bệnh nhân hoặc bởi các yếu tố có hại khác từ các mô xunh quanh.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ nêu dưới đây, bao gồm các thử nghiệm đã được thực hiện và các kết quả đã thu được, được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa và không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1

Tạo thụ thể CGRP trong vai trò là kháng nguyên

A. Nhân dòng cấp độ phân tử đối với RAMP1 và CRLR của người

ADN bổ sung của CRLR của người (số truy cập ngân hàng gen U17473; SEQ ID số:1) và ADN bổ sung của RAMP1 của người (số truy cập ngân hàng gen AJ001014; SEQ ID số:3) lần lượt được nhân dòng vào các vectơ biểu hiện của tế bào động vật có vú là pcDNA3.1-Zeo và pcDNA3.1-Hyg (Invitrogen, Carlsbad, CA), để chuyển nhiễm các tế bào HEK 293EBNA (Invitrogen) như được mô tả dưới đây. ADN bổ sung của hCRLR và ADN bổ sung của hRAMP1 cũng được nhân dòng vào vectơ pDSRα24 (Kim, H. Y. et al. J. Inv. Derm. Symp. Proc. (2007) 12: 48-49) để chuyển nhiễm các tế bào AM-1 CHO (patent Mỹ số 6,210,924).

B. Các dòng tế bào được chuyển nhiễm một cách ổn định

1. Sự biểu hiện ổn định của CGRP R của người trong các tế bào 293EBNA

Các tế bào HEK 293EBNA (có bán từ ATCC hoặc Invitrogen) được gieo ở mật độ là $1,5x10^6$ tế bào trong mỗi đĩa 100mm. Sau 24 giờ, các tế bào được đồng chuyển nhiễm bằng 6µg ADN mạch thẳng của huRAMP1/pcDNA3.1-Hyg và huCRLR/pcDNA3.1-Zeo với FuGene6 (Invitrogen, Carlsbad, CA) theo các chỉ dẫn do Invitrogen cung cấp. Sau hai ngày, các tế bào được trypsin hóa và được cấy chuyển vào môi trường sinh trưởng chứa 400µg/ml hygromyxin + 250µg/ml zeoxin. Sau hai tuần, các khuẩn lạc kháng thuốc thu được được trypsin hóa và được gộp lại thành các nhóm. Cho các nhóm này trải qua bốn chu kỳ FACS, phân loại được thể tương tự peptit $CGRP_{8-37}$ được đánh dấu bằng Alexa 647 (được mô tả dưới đây). 5% cao nhất của các tế bào biểu hiện được thu lại ở mỗi chu kỳ.

2. Sự biểu hiện ổn định của CGRP R của người trong các tế bào AM-1 CHO

Các tế bào AM-1 CHO (biến thể thích nghi với môi trường sinh trưởng không chứa huyết thanh từ dòng tế bào khiếm khuyết CHO DHFR được mô tả trong tài liệu Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 4216 (1980), được gieo ở mật độ là $1,5x10^6$ tế bào trong mỗi đĩa 100mm. Sau 24 giờ, các tế bào được đồng chuyển nhiễm bằng 4µg ADN mạch thẳng của mỗi trong số pDSRα24/huRAMP1 và pDSRα24/huCRLR với FuGene6 (Invitrogen, Carlsbad, CA) theo các chỉ dẫn do Invitrogen cung cấp. Các tế bào đã được chuyển nhiễm được trypsin hóa 2 ngày sau khi chuyển nhiễm và được gieo vào môi trường sinh trưởng chọn lọc CHO DHFR chứa 10% FBS đã được thẩm tách và không được bổ sung hypoxantin/thymidin. Sau 2 tuần, các khuẩn lạc đã được chuyển nhiễm thu được được trypsin hóa và được gộp lại thành các nhóm. Các nhóm phải trải qua bước phân tích phân loại FACS.

3. Sự biểu hiện ổn định của adrenomedulin (AM1) của người trong các tế bào HEK 293EBNA

Các tế bào 293EBNA được gieo trong các đĩa 100mm ở mật độ là $1,5x10^6$ tế bào/đĩa trong DMEM (có hàm lượng glucoza cao) + FBS 5% + các axit amin không thiết yếu MEM 1% + natri pyruvat 1%. Ngày sau đó, các tế bào được đồng chuyển nhiễm bằng cách sử dụng thuốc thử chuyển nhiễm FuGENE 6 (Roche) với pcDNA3.1/zeoxin/huCRLR cộng với pcDNA3.1/hygromyxin/huRAMP2. Cả hai cấu trúc and này đều được làm thẳng bằng FspI. Sau 48 giờ, các tế bào được cấy chuyển vào các đĩa 100mm ở 3 mức mật độ tế bào ($8x10^5$, $3,2x10^5$ và $8x10^4$ tế bào/đĩa) trong môi trường sinh trưởng chứa 200µg/ml zeoxin. Môi trường này được thay đổi hai lần mỗi tuần. Sau một tuần, các đĩa này được nạp môi trường chứa 200µg/ml hygromyxin + 200µg/ml zeoxin. Sau hai tuần, 96 khuẩn lạc được phân lập bằng các vòng tách khuẩn lạc. Các khuẩn lạc còn lại được tập hợp vào một nhóm giống cấy riêng biệt. Các dòng và các nhóm này được thử nghiệm về khả năng đáp ứng của chúng đối với sự kích thích bằng chất chủ vận thụ thể hoặc forskolin. Một số dòng đã thể hiện khả năng đáp ứng tốt, và một dòng được chọn để sử dụng trong các thử nghiệm kế tiếp.

4. Sự biểu hiện ổn định của CGRP R của khỉ đuôi dài trong các tế bào HEK 293EBNA

Các tế bào 293EBNA được gieo trong các đĩa 100mm ở mật độ là $1,5x10^6$ tế bào/đĩa trong DMEM (có hàm lượng glucoza cao) + FBS 5% + các axit amin không thiết yếu MEM 1% + natri pyruvat 1%. Ngày sau đó, các tế bào được đồng chuyển nhiễm bằng cách sử dụng FuGENE 6 với pcDNA3.1/zeoxin/cynoCRLR cộng với pcDNA3.1/hygromyxin/cynoRAMP1. Cả hai cấu trúc này đều được làm thẳng bằng FspI. Sau 48 giờ, các tế bào được cấy chuyển vào môi trường sinh trưởng chứa 200µg/ml zeoxin + 400µg/ml hygromyxin ở các mức pha loãng là 1:20, 1:40, 1:100 và 1:200. Môi trường này được thay đổi hai lần mỗi tuần. Sau hai tuần, 96 khuẩn lạc đã được chuyển nhiễm được phân lập bằng cách sử dụng các vòng tách khuẩn lạc. Các dòng này được thử nghiệm về khả năng đáp ứng của chúng đối với sự kích thích bằng phối tử CGRP. Một số dòng đã thể hiện các mức đáp ứng cao tương tự, và một dòng được chọn để sử dụng trong các thử nghiệm kế tiếp.

C. Phân lập các tế bào thụ thể CGRP có mức biểu hiện cao

Thể tương tự peptit $CGRP_{8-37}$ được tổng hợp (Midwest Bio-Tech Inc. Fishers, IN) với trình tự dưới đây:

Ac-WVTHRLAGLLSRSGGVVRCNFVPTDVGPFAF-$_{NH2}$ (SEQ ID số:9)

Peptit này được đánh dấu bằng Alexa 647-NHS theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất (Molecular Probes, Inc. Cat A 2006). CGRP8-37 được đánh dấu bằng Alexa 647 thể hiện sự nhuộm màu đặc hiệu đối với các tế bào được chuyển nhiễm thụ thể CGRP và không đặc hiệu đối với các tế bào gốc không được chuyển nhiễm và được sử dụng làm thuốc thử FACS.

Các nhóm tế bào 293EBNA và AM-1 CHO được chuyển nhiễm thụ thể huCGRP (được tạo ra như trên đây) được phân loại lặp lại tới bốn lần bằng cách sử dụng peptit $CGRP_{8-37}$ được đánh dấu bằng Alexa 647. Các tế bào có mức biểu hiện cao được thu thập ở mỗi lần phân loại, được phát triển và sau lần phân loại cuối cùng, được làm đông lạnh vào các lọ. Các tế bào AM-1 CHO/huCGRP R được sử dụng để gây miễn dịch như được mô tả dưới đây, và các tế bào 293EBNA/huCGRP R được sử dụng để chuẩn độ huyết

thanh chuột nhắt sau khi gây miễn dịch và trong các lần sàng lọc liên kết đối với các dịch nổi bề mặt của tế bào lai.

D. Tạo thụ thể CGRP tan được

Các polypeptit thụ thể CGRP tan được chứa các miền ngoại bào (ECD) đầu cuối N của CRLR của người (SEQ ID số:6) và RAMP1 của người (SEQ ID số:8) được tạo ra bằng cách đồng chuyển nhiễm tạm thời các tế bào 293 6E (Durocher, et al., Nucleic Acids Res. 30:E9 (2002)) bằng các vectơ chứa các ADN bổ sung tương ứng (SEQ ID số:5 hoặc SEQ ID số:7) như được mô tả dưới đây. Các thẻ gắn thường dùng (polyHis, Flag, HA và/hoặc Fc) được sử dụng để tạo thuận lợi cho quá trình tiết và/hoặc tinh chế tiếp theo.

CGRP R ECD dị dime tan được được dung hợp vào Fc được tạo ra bằng cách nhân dòng PCR bằng các đoạn mồi thích hợp vào vectơ biểu hiện tạm thời pTT5 (Durocher, et al., trên đây). ECD-Fc đầu cuối N của CRLR chứa miền ngoại bào đầu cuối N của CRLR (SEQ ID số:6), được dung hợp vào Fc IgG1 của người. RAMP1 ECD-Fc chứa miền ngoại bào của RAMP1 (SEQ ID số:8) được dung hợp vào Fc IgG1 của người. Trong cả hai trường hợp, có nhóm liên kết bao gồm năm glyxin liên tiếp giữa miền ECD và Fc.

Thụ thể CGRP dị dime tan được được biểu hiện bằng cách đồng chuyển nhiễm hai cấu trúc như sau. Các tế bào 293-6E ở mật độ là $1x10^6$ tế bào/ml trong các bình lắc được chuyển nhiễm bằng 0,5mg/l ADN (hCRLR N-ter ECD-Fc/pTT5 và huRAMP1 ECD-Fc/pTT5) với 3ml PEI/mg ADN trong môi trường FreeStyle 293 (Invitrogen). Các tế bào được cho sinh trưởng trong huyền phù trong môi trường biểu hiện FreeStyle 293 được bổ sung pluronic F68 0,1% và genetixin 50µg/ml trong 7 ngày và được thu lại để tinh chế.

Các lần tinh chế từ môi trường đã được điều hòa ("CM") được thực hiện bằng cách đệm CM bằng cách thêm Tris 50mM, natri xitrat 400mM, và điều chỉnh độ pH đến 8,5. Sau đó, CM đã được đệm được cho đi qua cột ái lực protein A được làm cân bằng trong Tris 50mM, natri xitrat 400mM và độ pH được điều chỉnh đến 8,5. Cột Protein A được rửa bằng PBS và protein dung hợp Fc được rửa giải bằng HOAc 0,1N. Đỉnh được rửa giải chứa cả thành phần CRLR và RAMP1 khi được thử nghiệm bằng phương pháp thẩm tách

Western có sử dụng các kháng thể riêng biệt đặc hiệu đối với CRLR hoặc RAMP1. Bước LC-MS và giải trình tự đầu cuối N tiếp theo xác nhận được sự có mặt của cả dị dime CRLR:RAMP1 và đồng dime CRLR:CRLR ở tỷ lệ xấp xỉ (2:3). "Thụ thể CGRP tan được" này đã được chứng minh là cạnh tranh với $CGRP_{8-37}$ được đánh dấu bằng Alexa647 để liên kết vào các tế bào tái tổ hợp biểu hiện thụ thể CGRP trong phép phân tích FMAT, mặc dù nó không liên kết được với phối tử CGRP như được xác định bằng thử nghiệm Biacore. Nguyên liệu này được sử dụng làm chất sinh miễn dịch như được mô tả trong phần ví dụ, bất kể, không kể các thứ khác, tính không đồng nhất và sự thiếu khả năng liên kết phối tử CGRP của nó.

E. Tạo các chất chiết màng từ các tế bào biểu hiện thụ thể CGRP tái tổ hợp

Các chất chiết màng được tạo ra từ các tế bào biểu hiện thụ thể CGRP bằng cách sử dụng phương pháp được Bossé, R. và cộng sự mô tả, (Journal of Biomolecular Screening, 3(4): 285-292 (1998)). Một cách vắn tắt, xấp xỉ 5 gam bột nhão tế bào được làm lắng kết trong 50ml PBS ở tốc độ là 3.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C và được tái tạo huyền phù trong 30ml đệm dung giải lạnh (HEPES 25mM, độ pH = 7,4, $MgCl_2$ 3mM cộng với một viên nén hỗn hợp chất ức chế proteaza Roche/50ml). Sản phẩm dung giải được làm đồng nhất bằng Glas-Col (thiết bị làm đồng nhất thủy tinh Teflon) với ~20 lần giã ở tốc độ 5.000 vòng/phút và được quay trong rôto JA21 ở tốc độ 20.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Quy trình này được lặp lại thêm một lần nữa và lớp lắng kết cuối cùng được tái tạo huyền phù trong ~1-5ml đệm 'lớp lắng kết cuối cùng' (HEPES 25mM, độ pH = 7,4, $MgCl_2$ 3mM, sucroza 10% (trọng lượng/thể tích) cộng với một viên nén hỗn hợp chất ức chế proteaza Roche/50ml). Các chất chiết màng được cắt bằng cách cho đi qua các kim 16 G và 25 G 2-3 lần. Tổng nồng độ protein màng được xác định bằng thử nghiệm protein BCA vi đĩa (Microplate BCA Protein Assay) (Pierce).

Ví dụ 2

Tạo các kháng thể đối với thụ thể CGRP

A. Gây miễn dịch

Các lần gây miễn dịch được thực hiện bằng cách sử dụng các dạng kháng nguyên thụ thể CGRP dưới đây, các dạng này được tạo ra như được mô tả trong ví dụ 1:

(i) các thể chuyển nhiễm AM-1 CHO biểu hiện CRLR và RAMP1 có độ dài đầy đủ của người ở bề mặt tế bào, thu được bằng cách đồng chuyển nhiễm các tế bào CHO bằng ADN bổ sung của CRLR có độ dài đầy đủ của người (SEQ ID số:1) mã hóa polypeptit có trình tự SEQ ID số:2, và ADN bổ sung của RAMP1 (SEQ ID số:3) mã hóa polypeptit có trình tự SEQ ID số:4

(ii) chất chiết màng từ các tế bào được mô tả trong (i) trên đây; và

(iii) thụ thể CGRP tan được thu được bằng cách đồng biểu hiện và tinh chế ECD đầu cuối N của CRLR (SEQ ID số:6) và miền ngoại bào (ECD) của RAMP1 (SEQ ID số:8) như được mô tả trong ví dụ 1.

Các con chuột nhắt XENOMOUSE được gây miễn dịch bằng protein thụ thể CGRP tan được đã được tinh chế và các màng CGRP R đã được tinh chế được tạo ra từ các tế bào AM-1 CHO biểu hiện một cách ổn định CGRP R theo cùng một phương thức bằng cách sử dụng lần lượt các liều lượng là 10 µg/chuột nhắt và 150 µg/chuột nhắt. Các màng CGRP được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trên đây.

Các liều tăng cường tiếp đó được sử dụng ở các liều lượng là 10 µg/chuột nhắt của CGRP R tan được hoặc 75µg màng CGRP R đã được tinh chế. Các con chuột nhắt XENOMOUSE cũng được gây miễn dịch bằng các tế bào biểu hiện thụ thể CGRP bằng cách sử dụng các liều lượng là 3,4 x 10^6 tế bào đã được chuyển nhiễm bằng CGRP R/chuột nhắt và các liều tăng cường tiếp đó là 1,7 x 10^6 tế bào đã được chuyển nhiễm bằng CGRP R/chuột nhắt. Các vị trí tiêm được sử dụng là các tổ hợp của vị trí dưới da phần gốc của đuôi và trong màng bụng. Các lần gây miễn dịch được thực hiện theo các phương pháp được bộc lộ trong patent Mỹ số 7,064,244, được nộp ngày 19 tháng 2 năm 2002, nội dung bộc lộ của tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các chất phụ trợ TiterMax Gold (Sigma; cat. # T2684), Alum (E.M. Sergent Pulp and Chemical Co.,

Clifton, NJ, cat. # 1452-250) được điều chế theo các chỉ dẫn của các nhà sản xuất và được trộn theo tỷ lệ 1:1 giữa nhũ tương của chất phụ trợ vaf dung dịch kháng nguyên.

Huyết thanh được thu vào thời điểm 4 - 6 tuần sau lần tiêm thứ nhất và các độ chuẩn cụ thể được xác định bằng phép nhuộm FACs đối với các tế bào 293EBNA biểu hiện thụ thể CGRP tái tổ hợp.

Các con chuột nhắt được gây miễn dịch bằng các tế bào/các màng tế bào biểu hiện CGRP R có độ dài đầy đủ, các tế bào hoặc miền ngoại bào CGRP R tan được, với 11 - 17 lần gây miễn dịch trong khoảng thời gian xấp xỉ một đến ba tháng rưỡi. Các con chuột nhắt có độ chuẩn huyết thanh cao nhất được nhận diện và được chuẩn bị cho việc tạo tế bào lai. Các lần gây miễn dịch được thực hiện trong các nhóm gồm nhiều con chuột nhắt, thường là mười con. Các hạch bạch huyết vùng kheo và hạch bạch huyết vùng bẹn và các mô lách thường được gom lại từ mỗi nhóm để tạo ra các thể dung hợp.

B. Điều chế các kháng thể đơn dòng

Các con chuột biểu hiện độ chuẩn thích hợp được nhận diện, và các bạch huyết bào được thu từ các hạch bạch huyết dẫn lưu và, nếu cần thiết, được gom đối với mỗi nhóm họ gần. Các bạch huyết bào được tách khỏi mô dạng bạch huyết trong môi trường thích hợp (ví dụ, môi trường Eagle cải biến Dulbecco; DMEM; có thể mua được từ Invitrogen, Carlsbad, CA) để giải phóng các tế bào khỏi mô, và được tạo huyền phù trong DMEM. Các tế bào B được lựa chọn và/hoặc được phát triển bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp, và được dung hợp với đối tác dung hợp thích hợp, ví dụ, các tế bào u tủy không tiết P3X63Ag8.653 (American Type Culture Collection CRL 1580; Kearney et al, J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550).

Các bạch huyết bào được trộn với các tế bào đối tác dung hợp ở tỷ lệ là 1:4. Hỗn hợp tế bào được làm lắng kết một cách nhẹ nhàng bằng cách ly tâm ở tốc độ 400 x g trong 4 phút, dịch nổi bề mặt được gạn ra, và hỗn hợp tế bào được trộn một cách nhẹ nhàng bằng cách sử dụng pipet 1ml. Sự dung hợp được gây ra bằng PEG/DMSO (polyetylen glycol/dimetyl sulfoxit; được mua từ Sigma-Aldrich, St. Louis MO; 1ml cho mỗi triệu

bạch huyết bào). PEG/DMSO được bổ sung từ từ trong điều kiện khuấy nhẹ trong một phút, sau đó là trộn trong một phút. Sau đó, IDMEM (DMEM không có glutamin; 2ml cho mỗi triệu tế bào B), được bổ sung trong 2 phút trong điều kiện khuấy nhẹ, sau đó bổ sung thêm IDMEM (8ml cho mỗi triệu tế bào B) trong 3 phút.

Các tế bào đã được dung hợp được làm lắng kết một cách nhẹ nhàng (400 x g, 6 phút) và được tái tạo huyền phù trong 20ml môi trường chọn lọc (ví dụ, DMEM chứa azaserin và hypoxanthin [HA] và các nguyên liệu bổ sung khác nếu cần thiết) cho mỗi triệu tế bào B. Các tế bào được ủ trong 20-30 phút ở 37°C và sau đó được tái tạo huyền phù trong 200ml môi trường chọn lọc và được nuôi cấy trong ba đến bốn ngày trong các bình tam giác T175 trước khi đặt lên đĩa 96 giếng.

Các tế bào được phân phối vào các đĩa 96 giếng bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn để tối đa hóa khả năng hình thành dòng của các khuẩn lạc thu được. Sau một vài ngày nuôi cấy, các dịch nổi bề mặt của tế bào lai được thu lại và được đưa vào các thử nghiệm sàng lọc như được trình bày chi tiết trong các ví dụ dưới đây, bao gồm việc xác nhận tình trạng liên kết vào thụ thể CGRP của người, nhận diện các kháng thể phong bế bằng thử nghiệm cạnh tranh liên kết phối tử và đánh giá tính phản ứng chéo với các thụ thể khác liên quan đến thụ thể CGRP (ví dụ, thụ thể adrenomedulin của người). Các tế bào dương tính được chọn lọc tiếp và được thực hiện các kỹ thuật nhân dòng và kỹ thuật nhân phân dòng tiêu chuẩn. Các dòng nhân dòng được phát triển *in vitro*, và các kháng thể của người đã được tiết ra được thu để phân tích.

C. Phân tích trình tự của kháng thể đơn dòng đã được chọn

Các kháng thể đơn dòng đã được nhân phân dòng và được chọn được giải trình tự bằng cách sử dụng các phương pháp RT-PCR chuẩn. Bảng 2A thể hiện các trình tự axit amin của các chuỗi nhẹ của các kháng thể tiêu biểu được bộc lộ ở đây. Bảng 2B thể hiện các trình tự axit amin của các chuỗi nặng của các kháng thể tiêu biểu được bộc lộ ở đây.

Các trình tự axit amin tương ứng với các vùng CDR của các kháng thể đã được giải trình tự được sắp xếp thẳng hàng và các đoạn sắp xếp thẳng hàng được sử dụng để nhóm các dòng này theo tính tương tự.

Các đoạn sắp xếp thẳng hàng trình tự của các CDR chuỗi nhẹ từ các dòng có các chuỗi nhẹ kapa, và các trình tự liên ứng tương ứng cụ thể, được thể hiện trong Fig.3A và Fig.3B.

Các đoạn sắp xếp thẳng hàng trình tự của các CDR chuỗi nhẹ từ các dòng có các chuỗi nhẹ lambda, và các trình tự liên ứng tương ứng cụ thể, được thể hiện trong Fig.4.

Các đoạn sắp xếp thẳng hàng trình tự của các CDR chuỗi nặng của các kháng thể tiêu biểu được bộc lộ ở đây, và các trình tự liên ứng tương ứng cụ thể, được thể hiện trong Fig.5A, Fig.5B, Fig.5C, Fig.5D và Fig.5E.

Các trình tự liên ứng cụ thể của các CDR chuỗi nặng tiêu biểu được bộc lộ ở đây được thể hiện trong Fig.5F.

Ví dụ 3

Nhận diện các kháng thể đặc hiệu với thụ thể CGRP

A. Chọn lọc các kháng thể liên kết đặc hiệu với thụ thể CGRP bằng FMAT

Sau 14 ngày nuôi cấy, các dịch nổi bề mặt của tế bào lai được sàng lọc để thu các kháng thể đơn dòng đặc hiệu với CGRP R bằng kỹ thuật thử nghiệm đo phát quang thể tích nhỏ (Fluorometric Microvolume Assay Technology (FMAT)) (Applied Biosystems, Foster City, CA). Các dịch nổi bề mặt được sàng lọc dựa vào các tế bào AM-1 CHO huCGRP R hoặc các tế bào HEK 293 tái tổ hợp mà được chuyển nhiễm bằng CGRP R của người và được sàng lọc ngược lại dựa vào các tế bào HEK293 gốc (được chuẩn bị như được mô tả trong ví dụ 1).

Một cách vắn tắt, các tế bào trong môi trường Freestyle (Invitrogen, Carlsbad, CA) được gieo vào trong các đĩa FMAT 384 giếng theo thể tích là 50 µl/giếng ở mật độ là xấp xỉ 4000 tế bào/giếng đối với các thể chuyển nhiễm ổn định, và ở mật độ là xấp xỉ 16.000

tế bào/giếng đối với các tế bào gốc, và các tế bào được ủ qua đêm ở 37°C. Sau đó, 10 µl dịch nổi bề mặt được bổ sung vào mỗi giếng và các đĩa được ủ khoảng một giờ ở 4°C, sau đó 10 µl kháng thể thứ cấp kháng IgG-Cy5 của người (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) được bổ sung vào mỗi giếng ở nồng độ là 2,8µg/ml (nồng độ cuối là 400ng/ml). Sau đó, các đĩa được ủ trong một giờ ở 4°C, và sự phát huỳnh quang được đọc bằng cách sử dụng máy quét đồng tiêu lớn FMAT (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Đối với việc sàng lọc ngược, các tế bào HEK 293 hoặc AM-1 CHO gốc được gieo theo cách tương tự và các dịch nổi bề mặt được sàng lọc song song bằng FMAT trên các tế bào này để biệt hóa và loại bỏ các tế bào lai liên kết vào các protein thuộc tế bào mà không liên kết vào thụ thể CGRP.

B. Nhận diện các kháng thể phong bế bằng thử nghiệm cạnh tranh liên kết phối tử thông qua FMAT

Phương pháp cạnh tranh liên kết phối tử được phát triển để nhận diện các kháng thể (trong các dịch nổi bề mặt của tế bào lai) mà liên kết thụ thể CGRP và phong bế sự liên kết phối tử CGRP. Các đĩa 384 giếng (Corning Costar, Cat:#3712) được chuẩn bị có 5.000 tế bào AM-1 huCGRP R nhóm 2 và 20.000 tế bào CHO-S chưa được chuyển nhiễm trong mỗi giếng. 20µl dịch nổi bề mặt của tế bào lai kháng CGRP R được bổ sung vào mỗi giếng, và các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, 10µl peptit Alexa647 $CGRP_{8-37}$ 2,8µg/ml được bổ sung vào mỗi giếng và các đĩa được ủ trong 3 giờ nữa ở nhiệt độ trong phòng. Lượng Alexa647-$CGRP_{8-37}$ đã liên kết vào các tế bào được thử nghiệm trên hệ thống phát hiện tế bào FMAT 8200 (FMAT 8200 Cellular Detection System) (Applied Biosystems). Dữ liệu đầu ra vừa là giá trị L1 bằng số của cường độ tín hiệu (giá trị FL1 cao thể hiện cường độ tín hiệu cao) và đồng thời vừa là hình ảnh của các tế bào.

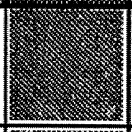
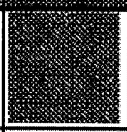
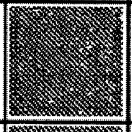
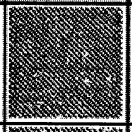
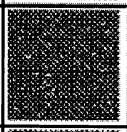
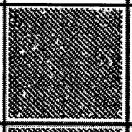
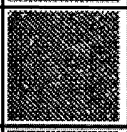
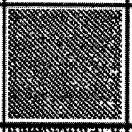
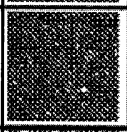
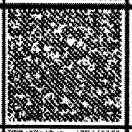
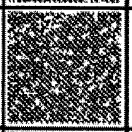
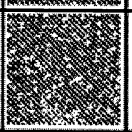
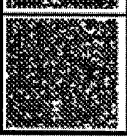
Các thử nghiệm bao gồm các dịch nổi bề mặt của tế bào lai đối chứng âm. Giá trị FL1 trung bình quan sát được trong các thử nghiệm đối chứng âm này được chấp nhận làm tín hiệu tối đa có thể có của thử nghiệm này. Các dịch nổi bề mặt thử nghiệm được so

sánh với tín hiệu tối đa này và phần trăm ức chế được tính đối với mỗi giếng (% ức chế = (1-(FL1 của dịch nổi bề mặt của tế bào lai kháng CGRP R/tín hiệu FL1 tối đa)).

Thông tin khái quát về dữ liệu này được thể hiện trên Fig.6. Trong thử nghiệm này, 1092 dịch nổi bề mặt kháng CGRP R được thử nghiệm bằng cách sử dụng thử nghiệm phối tử thụ thể. Dữ liệu được sắp xếp theo phân hạng bằng cách sử dụng phần trăm ức chế trung bình. Chín mươi dịch nổi bề mặt có phần trăm ức chế trung bình >25%, 31 dịch nổi bề mặt trong số này có phần trăm ức chế trung bình >50% và 7 dịch nổi bề mặt trong số này có phần trăm ức chế trung bình >70%.

Tập hợp dữ liệu tóm tắt được thể hiện trong bảng 10 dưới đây. Các mẫu có số nhận diện là 1-5 minh họa các ví dụ về các dịch nổi bề mặt của tế bào lai kháng CGRP R mà ức chế sự liên kết peptit Alexa647 $CGRP_{8-37}$ vào thụ thể CGRP và các mẫu có số nhận diện là 536 – 540 minh họa các ví dụ về các dịch nổi bề mặt của tế bào lai kháng CGRP R mà không ức chế sự liên kết của peptit Alexa647 $CGRP_{8-37}$ vào thụ thể CGRP.

Bảng 10 – Dữ liệu tiêu biểu từ thử nghiệm cạnh tranh liên kết phối tử FMAT

Số nhận diện mẫu	Thử nghiệm số 1			Thử nghiệm số 2		
	FL1	hình ảnh	% ức chế	FL1	hình ảnh	% ức chế
1	2264		84%	2585		88%
2	3007		77%	2804		85%
3	3460		72%	2929		84%
4	3650		70%	3294		79%
5	3764		69%	3246		80%
536	10412		0%	11142		-17%
537	10413		0%	9388		5%
538	10414		0%	9420		4%
539	10415		0%	10943		-14%
540	10415		0%	10561		-10%

Dựa vào các thử nghiệm cạnh tranh liên kết, khoảng 30 dịch nổi bề mặt được lựa chọn để tiếp tục xác định đặc điểm.

Ví dụ 4

Hoạt tính của các kháng thể đơn dòng phong bế đặc hiệu thụ thể CGRP trong thử nghiệm cAMP chức năng

A. Hoạt tính của kháng thể thụ thể CGRP.

Các kháng thể thụ thể CGRP đã được chọn được sàng lọc trong thử nghiệm cAMP được điều tiết bởi thụ thể CGRP *in vitro* để xác định hiệu lực nội tại. Thử nghiệm cAMP *in vitro* sử dụng dòng tế bào có nguồn gốc từ u nguyên bào thần kinh của người (SK-N-MC; Spengler, et al., (1973) In Vitro 8: 410) nhận được từ ATCC (ATCC Number HTB-10; "tế bào HTB-10"). Các tế bào HTB-10 biểu hiện CRLR và RAMP1, các thành phần này tạo thành thụ thể CGRP (L. M. McLatchie et al, 1998). Dòng tế bào 293EBNA biểu hiện CGRP R tái tổ hợp của khỉ đuôi dài được tạo ra như được mô tả trong ví dụ 1, và dòng tế bào L6 của chuột cống biểu hiện thụ thể CGRP của chuột cống được nhận từ ATCC (CRL-1458).

Kit thử nghiệm cAMP LANCE (PerkinElmer, Boston, MA) được sử dụng trong bước sàng lọc. Các thử nghiệm này được thực hiện trong các đĩa 96 giếng màu trắng theo tổng thể tích là 60µl. Một cách vắn tắt, vào ngày thử nghiệm, các tế bào HTB-10 đông lạnh được rã đông ở 37°C, các tế bào được rửa một lần bằng đệm thử nghiệm và 12µl huyền phù tế bào chứa 10000 tế bào được trộn với kháng thể kháng cAMP được đánh dấu bằng Alexa được bổ sung vào các đĩa 96 giếng nửa diện tích màu trắng. Sau khi bổ sung 12µl kháng thể thụ thể CGRP, hỗn hợp được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, 12µl chất chủ vận thụ thể CGRP là α-CGRP của người (nồng độ cuối là 1nM) được bổ sung và được ủ thêm trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi kích thích α-CGRP của người, 24µl hỗn hợp phát hiện được bổ sung và được ủ trong 60 phút ở nhiệt độ trong phòng và các đĩa này được đọc trên thiết bị EnVision (PerkinElmer, Boston, MA) ở Em665nM. Dữ liệu được xử lý và phân tích bằng Prizm (GraphPad Software Inc.) hoặc ActivityBase (IDBS).

Fig.7A thể hiện dữ liệu tiêu biểu thu được như được mô tả trên đây bằng cách sử dụng dòng tế bào HTB-10 biểu hiện thụ thể hCGRP đối với ba kháng thể là 3C8, 13H2 và 1E11. Dữ liệu này được vẽ đồ thị ở dạng tỷ lệ phần trăm so với đối chứng ("POC") ở

dạng hàm số của nồng độ kháng thể (3C8, 13H2 hoặc 1E11), và được làm khớp với đường cong hồi quy không tuyến tính chuẩn để thu được các giá trị IC50 được thể hiện ở phần đáy của Fig. này.

B. Sự thiếu hoạt tính của kháng thể trong các thụ thể liên quan.

Các tế bào biểu hiện các thụ thể liên quan là AM1 (các tế bào HEK 293 biểu hiện hCRLR+hRAMP2; D. R. Poyner, et al, Pharmacological review, 54:233-246, 2002), AM2 (các tế bào CHO biểu hiện hCRLR+hRAMP3; D. R. Poyner, et al, Pharmacological review, 54:233-246, 2002) hoặc thụ thể amylin AMY1 của người (các tế bào MCF-7 biểu hiện hCTR+hRAMP1; Wen-Ji Chen, et al, Molecular Pharmacology, 52: 1164-1175, 1997) được sử dụng để xác định tính chọn lọc của các kháng thể được thử nghiệm. Dòng tế bào HEK 293 biểu hiện AM1 được tạo ra như được mô tả trong ví dụ 1, trên đây. Dòng tế bào CHO biểu hiện AM2 được mua từ EuroScreen (hiện nay là PerkinElmer, Inc.); và dòng tế bào MCF-7 biểu hiện thụ thể amylin AMY1 của người (Zimmermann, et al, Journal of Endocrinology, 423-431, 1997), được nhận từ ATCC (HTB-22). Các kết quả tiêu biểu, được vẽ đồ thị như được mô tả trên đây, được thể hiện trong Fig.7B (các tế bào hAM1-HEK), Fig.7C (các tế bào hAM2-CHO) và Fig.7D (các tế bào hAMY-MCF-7). Lưu ý rằng không có kháng thể nào trong số các kháng thể được thử nghiệm có hoạt tính ức chế đáng kể đối với các thụ thể hAM1, hAM2 hoặc hAMY1 trong khoảng đã được thử nghiệm.

Các thử nghiệm tương tự được thực hiện bằng cách sử dụng các tế bào HEK tái tổ hợp biểu hiện các thụ thể CGRP của khỉ đuôi dài và các tế bào L6 của chuột cống biểu hiện thụ thể CGRP của chuột cống (ATCC). Dữ liệu từ các nghiên cứu này, cũng như dữ liệu IC50 bổ sung thu được như được mô tả trong phần A của ví dụ này, được trình bày tại cột "cAMP" trong bảng 11 dưới đây. Lưu ý rằng các giá trị IC50 đối với thụ thể CGRP của người và thụ thể CGRP của khỉ đuôi dài là nằm trong phạm vi nanomol, trong khi đó các hoạt tính đối với thụ thể CGRP của chuột cống, và các thụ thể AM1, AM2 và AMY1 của người, cũng như các tế bào MCF7 biểu hiện canxitonin (dữ liệu không được thể hiện) là đều lớn hơn 1 micromol. Sự chênh lệch về IC50 giữa thụ thể CGRP của người và các

thụ thể AM1, AM2, amylin và canxitonin của người chứng tỏ tính chọn lọc cao của các kháng thể này đối với thụ thể CGRP so với các thụ thể liên quan được tạo ra một phần từ cùng các thành phần của thụ thể này. IC50 thu được bằng cách sử dụng thụ thể CGRP của người và thụ thể CGRP của khỉ đuôi dài tương tự nhau, trong khi đó các kháng thể được thử nghiệm có vẻ như không phản ứng chéo với thụ thể CGRP của chuột cống.

Bảng 11

Dòng	Thử nghiệm cAMP						Thử nghiệm ^{125}I
	IC50 của hCGRP R (nM)	IC50 của CGRP R của khỉ đuôi dài (nM)	IC50 của CGRP R của chuột cống (nM)	IC50 của hAmylin1 (nM)	IC50 của hAM1 (nM)	IC50 của hAM2 (nM)	Ki của CGRP của người (nM)
01E11.2	1,77	2,79	>1000	>1000	>1000	>1000	0,030
01H7.2	3,27	4,74	>1000	>1000	>1000	>1000	0,079
02A10.1	11,81	17,6	>1000	>1000	>1000	>1000	0,291
02E7.2	6,30	5.51	>1000	>1000	>1000	>1000	0,117
03A5.1	9,89	28,9	>1000	>1000	>1000	>1000	0,093
03B6.2	2,74	2,22	>1000	>1000	>1000	>1000	0,033
03C8.2	6,66	5,32	>1000	>1000	>1000	>1000	0,044
03H8.2	10,84	10,6	>1000	>1000	>1000	>1000	0,111
04E4.2	2,38	3,52	>1000	>1000	>1000	>1000	0,015
04H6.1	3,78	5.59	>1000	>1000	>1000	>1000	0,052
05F5.1	4,79	4,78	>1000	>1000	>1000	>1000	0,147
07B2.1	8,96	27,7	>1000	>1000	>1000	>1000	0,116
07B3.1	10,2	14,1	>1000	>1000	>1000	>1000	0,127
07F1.1	8,92	10,5	>1000	>1000	>1000	>1000	0,140
08B11.2	10,7	17,0	>1000	>1000	>1000	>1000	0,118
09D4.2	1,40	2,46	>1000	>1000	>1000	>1000	0,023
09F5.2	3,06	4,44	>1000	>1000	>1000	>1000	0,043
10E4.2	3,08	3,23	>1000	>1000	>1000	>1000	0,100
11A9.1	16,1	47,8	>1000	>1000	>1000	>1000	0,157
11D11.1	4,93	3,85	>1000	>1000	>1000	>1000	0,044
11H9.1	4,56	5,07	>1000	>1000	>1000	>1000	0,057
12E8.2	2,93	4,13	>1000	>1000	>1000	>1000	0,097
12G8.2	2,14	2,74	>1000	>1000	>1000	>1000	0,017
13D6.2	8,23	11,8	>1000	>1000	>1000	>1000	0,055

13E2.2	18,3	49,2	>1000	>1000	>1000	>1000	0,128
13H2.2	1,95	8,41	>1000	>1000	>1000	>1000	0,033
32H7.1G		1,93		>1000	>1000	>1000	

Ví dụ 5

Thử nghiệm liên kết phối tử phóng xạ CGRP để xác định Ki của kháng thể phong bế thụ thể

CGRP được đánh dấu bằng ^{125}I (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) và các màng tế bào từ các tế bào HTB-10 (PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts) được sử dụng cho thử nghiệm liên kết phối tử phóng xạ với sự có mặt của các kháng thể thử nghiệm với các mức nồng độ khác nhau để xác định các giá trị Ki tương ứng. Thử nghiệm liên kết CGRP được thiết đặt ở nhiệt độ trong phòng trong các đĩa 96 giếng chứa: 110µl đệm liên kết (Tris-HCl 20mM, độ pH = 7,5, MgSO4 5,0mM, BSA 0,2% (Sigma), 1 viên nén đệm CompleteTM/50ml (chất ức chế proteaza)); 20µl hợp chất thử nghiệm (10X); 20µl ^{125}I-hαCGRP (Amersham Biosciences; 10X); và 50µl huyền phù màng tế bào u nguyên bào thần kinh của người (HTB-10) (10µg cho mỗi giếng, PerkinElmer). Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ trong điều kiện lắc ở tốc độ 60 vòng/phút, và sau đó, các thành phần chứa trong mỗi giếng được lọc trên các đĩa lọc GF/C 96 giếng được xử lý bằng polyetylenimin (PEI) 0,5% (trong ít nhất một giờ). Các đĩa lọc GF/C này được rửa sáu lần bằng Tris 50mM được giữ lạnh bằng nước đá, độ pH = 7,5 và được làm khô trong lò ở 55°C trong 1 giờ. Sau đó, đáy của các đĩa GF/C được bịt kín. 40µl Microscint^{TM} 20 được bổ sung vào mỗi giếng, phần trên cùng của các đĩa GF/C được bịt kín bằng TopSeal^{TM}-A (màng bịt dạng dính ấn trên), và các đĩa GF/C được đếm bằng TopCount NXT (Packard). Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng Prizm (GraphPad Software Inc.)

Dữ liệu và các giá trị Ki tiêu biểu thu được bằng cách sử dụng các kháng thể 3C8, 12H2 và 1E11 được thể hiện trong Fig.8.

Cột ngoài cùng bên phải trong bảng 11 trên đây liệt kê các giá trị Ki của các mAb đã được chỉ ra trong thử nghiệm cạnh tranh liên kết CGRP được đánh dấu phóng xạ ^{125}I vào các màng tế bào HTB-10. Dữ liệu này cho thấy rằng các kháng thể thụ thể CGRP có tính cạnh tranh cao (tất cả đều nằm trong phạm vi cận nanomol) đối với liên kết CGRP.

Ví dụ 6

Thử nghiệm liên kết FACS dùng để xác định Kd của kháng thể phong bế thụ thể CGRP

Ái lực của các mAb kháng CGRP R đối với các thụ thể CGRP được biểu hiện trên các tế bào được xác định bằng cách sử dụng phương pháp FACS. Một cách vắn tắt, các tế bào biểu hiện AM-1 CHO huCGRP R, được chuẩn bị như được mô tả trên đây, được đặt vào các đĩa 96 giếng ở các mật độ là 16.000 hoặc 160.000 tế bào cho mỗi giếng trong môi trường DMEM chứa FBS 10%, NEAA, PS, L Glut, NaPyr và natri azit 0,05%. Các kháng thể thụ thể CGRP được chuẩn độ trong cùng môi trường từ 50nM đến 1pM và được ủ với các tế bào. Sau khi ủ qua đêm ở 4°C theo tổng thể tích là 120µl trên thiết bị lắc đĩa, các tế bào được rửa 2 lần bằng PBS + FBS 2%, ly tâm và loại bỏ dịch nổi bề mặt mỗi lần. Sau đó, 100µl G anti-Hu Fc Cy5 (5µg/ml; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, Mỹ) chứa 7AAD (5µl/giếng) được bổ sung vào mỗi giếng và được ủ ở 4°C trong 40 phút. Các tế bào được rửa 2 lần bằng PBS+ FBS 2%, ly tâm và loại bỏ dịch nổi bề mặt mỗi lần. Sau đó, 100µl đệm PBS + FBS 2% được bổ sung và được phân tích bằng FACS để xác định giá trị liên kết trung bình hình học. Kd được tính bằng cách sử dụng phần mềm KinExA bằng cách lấy giá trị trung bình hình học âm ở mỗi nồng độ kháng thể làm lượng Ab tự do có mặt (Rathanaswami, et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 334 (2005) 1004–1013). Dữ liệu thu được ở hai mức nồng độ tế bào khác nhau được phân tích bằng phép phân tích n đường cong để xác định Kd và khoảng tin cậy 95% như được mô tả trong tài liệu Rathanaswami, et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 334 (2005) 1004–1013.

Dữ liệu tiêu biểu với các phần khớp đường cong tương ứng được thể hiện trên Fig.10 đối với kháng thể 12G8.2. Dữ liệu của tám kháng thể phong bế được tạo ra nhằm minh họa cho phần mô tả sáng chế được thể hiện trong bảng 12. Một trong số các kháng

thể này (3B6) được phân tích vào hai ngày khác nhau. Tỷ lệ là 0,9 thu được cho thử nghiệm với các tế bào 16K thể hiện rằng nồng độ kháng nguyên được dự đoán là 0,9X Kd và vì vậy đường cong thu được bằng thử nghiệm này là đường cong được kiểm soát bằng Kd. Có thể thấy rằng các giá trị Kd thu được theo cách này là nằm trong phạm vi nanomol một chữ số thấp đối với tất cả các kháng thể được thử nghiệm.

Bảng 12

	Phân tích n đường cong				
	Kd (nM)	Kd thấp (nM)	Kd cao (nM)	% sai số	Tỷ lệ 16K
1H7	1,9	1,5	3	3,8	0,001
2E7	1,5	0,7	3,4	6,3	0,19
3B6 (a)	1,7	1,1	2,7	5,3	0,060
3B6 (b)	2,0	1,6	2,6	3,2	0,21
4E4	1,3	0,9	2,05	3,9	0,16
4H6	2,4	1,78	4,35	3,8	0,070
9D4	2,5	1,8	4,39	4,3	0,060
12E8	2,3	1,58	3,36	3,7	0,55
12G8	1,4	0,92	2,21	3,6	0,94

Ví dụ 7

Liên kết của kháng thể phong bế thụ thể CGRP bằng phân tích cạnh tranh liên kết BICORE

Các phân tích Biacore (Karlsson, R. et al., Methods; A Companion to Methods in Enzymology, 6: 99-110 (1994) được thực hiện như sau. Việc giữ cố định các kháng thể kháng thụ thể CGRP vào bề mặt chip cảm biến CM5 được thực hiện theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất, bằng cách sử dụng dòng chảy liên tục của HEPES 10mM, NaCl 0,15M,

EDTA 3,4mM, P-20 0,005%, độ pH = 7,4 (đệm HBS-EP). Các nhóm carboxyl trên bề mặt chip cảm biến được hoạt hóa bằng cách tiêm 60µl hỗn hợp chứa N-etyl-N' (dimetylaminopropyl)carbodiimit (EDC) 0,2M và N-hydroxysuxinimit (NHS) 0,05M. Thu được các bề mặt đặc hiệu bằng cách tiêm 180µl kháng thể kháng thụ thể CGRP được pha loãng trong axetat 10mM, độ pH = 4,0 ở nồng độ là 30µg/ml. Các nhóm có tính phản ứng dư trên các bề mặt được làm bất hoạt bằng cách tiêm 60µl etanolamin 1M. Các mức đã được giữ cố định cuối cùng của từng kháng thể là như sau:

Kháng thể	Đơn vị cộng hưởng (RU)
11D11	~5,900
3B6	~7,200
4H6	~8,000
12G8	~7,800
9F5	~6,600
34E3	~3,700

Bề mặt tham chiếu trống được cộng hợp giả cũng được tạo ra trên chip cảm biến. Thụ thể huCGRP tan được ở nồng độ là 100nM được thu bắt trên các chip cảm biến có một trong số sáu kháng thể đã được làm cố định được đề cập trên đây (11D11, 3B6, 4H6, 12G8, 9F5 hoặc 34E3). Sau đó, mỗi kháng thể trong số 20 kháng thể thử nghiệm kháng CGRP R được tiêm trên thụ thể huCGRP đã được thu bắt. Nếu kháng thể được tiêm nhận biết epitop khác biệt so với epitop được nhận biết bởi kháng thể đã được làm cố định, thì hiện tượng liên kết thứ hai sẽ được quan sát thấy. Nếu các kháng thể này nhận biết cùng một epitop hoặc các epitop rất giống nhau, thì chỉ quan sát thấy liên kết của thụ thể huCGRP.

Dữ liệu tiêu biểu thu được bằng cách sử dụng chip cảm biến được phủ kháng thể 3B6 đã được làm cố định được thể hiện trên Fig.9A. Bốn đường là dữ liệu thu được bằng cách sử dụng các kháng thể 1E11, 4E4, 2E7 và 12G8 trong dung dịch được tiêm. Các sự kiện xảy ra trong suốt thử nghiệm này được thể hiện bằng các chữ cái, với "A" tương ứng với thời điểm tiêm huCGRP R-Fc, "B" tương ứng với thời điểm kết thúc tiêm huCGRP R-Fc, "C" tương ứng với thời điểm tiêm mAb thứ cấp, và "D" tương ứng với thời điểm kết thúc tiêm mAb thứ cấp và bắt đầu rửa bằng chất đệm. Lưu ý rằng không có dấu hiệu

nào về tín hiệu liên kết bất kỳ từ kháng thể bất kỳ trong số kháng thể được tiêm trên bề mặt kháng thể đã được làm cố định, chứng tỏ rằng bốn kháng thể đã được tiêm nhận biết rõ ràng cùng một epitop hoặc (các) epitop rất giống nhau như kháng thể đã được làm cố định. Về cơ bản, quan sát được các kết quả giống nhau với tất cả các kháng thể phong bế đã được thử nghiệm mà được rửa qua mỗi bề mặt kháng thể trong số năm bề mặt kháng thể trung hòa đã được giữ cố định, chứng tỏ rằng tất cả các kháng thể phong bế kháng thụ thể huCGRP đã được thử nghiệm đều nhận biết cùng một epitop hoặc (các) epitop rất giống nhau và gối chồng lên nhau một cách rõ ràng.

Ngược lại, như được thể hiện một phần trên Fig.9B, Fig.9C và Fig.9D, bốn kháng thể đặc hiệu với thụ thể CGRP không phong bế đã được thử nghiệm là 32H8, 33B5, 33E4 và 34E3 không cạnh tranh được với 11D11 (dữ liệu không được thể hiện), 3B6 (Fig.9B), 12G8 (Fig.9C) và 9F5 (dữ liệu không được thể hiện) mặc dù 34E3 có thể cạnh tranh với 4H6 (Fig.9D) và cạnh tranh một cách yếu ớt với 32H7 (dữ liệu không được thể hiện). 32H8 không cạnh tranh được với 3B6, 4H6, 12G8, 9F5 hoặc kháng thể không phong bế 34E3, nhưng 33B5 và 33E4 có thể cạnh tranh với kháng thể không phong bế 34E3. Dữ liệu của tất cả các kháng thể phong bế và không phong bế được tóm tắt trong bảng 13 dưới đây. "NB" thể hiện là không liên kết; "+" thể hiện là liên kết đáng kể; và "Yếu" thể hiện là liên kết yếu.

Bảng 13

	Các kháng thể được giữ cố định					
Ab trong dung dịch	11D11	3B6	4H6	12G8	9F5	34E3
1E11	NB	NB	NB	NB	NB	+
1H7	NB	NB	NB	NB	NB	+
2E7	NB	NB	NB	NB	NB	+
3B6	NB	NB	NB	NB	NB	+
3C8	NB	NB	NB	NB	NB	+
4E4	NB	NB	NB	NB	NB	+
4H6	NB	NB	NB	NB	NB	NB
5F5	NB	NB	NB	NB	NB	+
9D4	NB	NB	NB	NB	NB	+
9F5	NB	NB	NB	NB	NB	+
10E4	NB	NB	NB	NB	NB	+

11D11	NB	NB	NB	NB	NB	+
11H9	NB	NB	NB	NB	NB	+
12E8	NB	NB	NB	NB	NB	+
12G8	NB	NB	NB	NB	NB	+
13H2	NB	NB	NB	NB	NB	+
32H7	NB	NB	NB	NB	NB	Yếu
32H8	+	+	+	+	+	+
33B5	+	+	+	+	+	NB
33E4	+	+	+	+	+	NB

Như có thể thấy được từ dữ liệu này, tất cả các kháng thể trung hòa hoặc phong bế đã được thử nghiệm đều liên kết vào cùng một vùng như năm kháng thể phong bế đã được giữ cố định; tức là, tất cả các kháng thể trung hòa đã được thử nghiệm đều liên kết vào cùng một vùng của phân tử CGRP R. Mặt khác, các kháng thể không phong bế nhìn chung không cạnh tranh với các kháng thể phong bế đã được giữ cố định, chứng tỏ rằng các kháng thể không phong bế chủ yếu liên kết vào một vùng khác của CGRP R.

Ví dụ 8

Liên kết của các kháng thể thụ thể CGRP vào thụ thể CGRP tan được trong phương pháp thẩm tách Western

Ba kháng thể phong bế thụ thể CGRP tiêu biểu được thử nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp thẩm tách Western về sự liên kết vào protein dung hợp muFc-thụ thể CGRP tan được.

100ng CGRP R-muFc đã được tinh chế (được tạo ra và tinh chế như được mô tả trên đây đối với CGRP R-huFc, ngoại trừ Fc của chuột nhắt, được sử dụng và nhóm liên kết giữa RAMP1 hoặc CRLR ECD và muFc được thay đổi thành "GGGGGVDGGGGGV" (SEQ ID số:213)) được pha loãng trong PBS với đệm mẫu PAGE có beta-mercaptoetanol (βME) (được khử) hoặc không có beta-mercaptoetanol (βME) (không được khử) ở nồng độ là 13,3%. Sau đó, mẫu chứa βME được đun sôi trong 4 phút. Mẫu được khử và mẫu không được khử được nạp lên các gel Tris-glyxin 4-20% (Invitrogen) riêng biệt có các làn xen kẽ của protein CGRP R-Fc và các yếu tố đánh dấu

trọng lượng phân tử (Invitrogen). Các gel được thẩm tách bằng điện lên các màng lọc nitroxenluloza 0,2µm (Invitrogen). Các sản phẩm thẩm tách được rửa bằng dung dịch nước muối được đệm bằng Tris + Tween 20 1% (TBST) và sau đó được phong bế bằng TBST + sữa bột khô 5% trong 30 phút. Các sản phẩm thẩm tách được cắt thành các dải dọc theo các làn yếu tố đánh dấu trọng lượng phân tử. Mỗi một dải có CGRP R-muFc được khử và không được khử được ủ với các kháng thể huCGRP R đã được tinh chế là 4E4, 9F5 hoặc 3B6 (pha loãng 1:500 trong TBST + sữa 5%), kháng thể N-20 kháng huRAMP1 ở dê (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Inc), kháng thể Fc-HRP kháng IgG của chuột nhắt ở thỏ (1:10.000) (Pierce), hoặc kháng thể Fc-HRP kháng IgG của người ở dê (1:10.000) (Pierce). Các sản phẩm thẩm tách được ủ với các kháng thể trong một giờ, sau đó rửa 3 lần, mỗi lần trong 10 phút bằng TBST + sữa 1%. Sau đó, các sản phẩm thẩm tách đã được xử lý bằng các kháng thể huCGRP R được ủ với kháng thể Fc-HRP kháng IgG của chuột nhắt ở dê (1:10.000 trong TBST + sữa 1%) và các sản phẩm thẩm tách đã được xử lý bằng kháng thể kháng huRAMP1 (N-20, kháng thể đa dòng của dê kháng RAMP1, Santa Cruz Biotech, CA) được ủ với kháng thể Fc-HRP kháng IgG của dê ở thỏ (1:10.000) trong 20 phút. Các sản phẩm thẩm tách được rửa 3 lần, mỗi lần trong 15 phút bằng TBST. Các sản phẩm thẩm tách là kháng thể huCGRP R và kháng thể kháng huRAMP1 được xử lý bằng thuốc thử phát hiện Pierce Supersignal West Pico (Pierce Supersignal West Pico Detection Reagent), và các sản phẩm thẩm tách Fc-HRP kháng IgG của chuột và kháng IgG của người được xử lý bằng thuốc thử phát hiện tiêu chuẩn Pierce (Pierce Standard Detection Reagent) (1 phút). Sau đó, rửa ảnh các sản phẩm thẩm tách bằng phim X quang Kodak Biomax MS.

Tất cả ba kháng thể thụ thể CGRP, 4E4, 9F5 và 3B6 đều có thể phát hiện CGRP R-muFc tan được (chứa RAMP1-ECD và CRLR ECD) dưới điều kiện không khử nhưng không thể phát hiện dưới điều kiện khử, chứng tỏ rằng epitop liên kết của các kháng thể CGRP R này có cấu trúc không gian và nhạy cảm với các liên kết disulfua (3 cặp trong RAMP1-ECD và 3 cặp trong CRLR N-ter ECD). Ngược lại, kháng thể kháng RAMP1 có bán trên thị trường là N-20 (Santa Cruz Biotech) liên kết với RAMP1 dưới cả điều kiện

khử và điều kiện không khử, chứng tỏ rằng vị trí liên kết đối với kháng thể N-20 chủ yếu là thẳng và không nhạy cảm với liên kết disulfua.

Ví dụ 9

Liên kết của các kháng thể phong bế thụ thể CGRP vào các thụ thể thể khảm

Các thụ thể CGRP được tạo ra từ RAMP1 nguyên thể với CRLR thể khảm, hoặc từ CRLR nguyên thể với RAMP1 thể khảm, được sử dụng để nhận diện các trình tự thụ thể CGRP liên quan đến sự liên kết của kháng thể. Vì tất cả các kháng thể phong bế thụ thể CGRP của người đã được thử nghiệm đều không thể hiện được hoạt tính chức năng đối với thụ thể CGRP của chuột cống, nên các thành phần thể khảm chứa các vùng trình tự của chuột cống trong nền trình tự của người. Các thể khảm dưới đây được tạo ra để phân tích liên kết bằng FACS:

Thể khảm RAMP1 số 1 (Q28 đến A34); SEQ ID số:217

Các gốc axit amin Q28 đến A34 trong RAMP1 của người được thay bằng các trình tự tương ứng từ RAMP1 của chuột cống. Đoạn này bao gồm năm gốc axit amin khác biệt giữa RAMP1 của người và RAMP1 của chuột cống.

Thể khảm RAMP1 số 2 (Q43 đến E53); SEQ ID số:218

Các gốc axit amin Q43 đến E53 trong RAMP1 của người được thay bằng các trình tự tương ứng từ RAMP1 của chuột cống. Đoạn này bao gồm sáu gốc axit amin khác biệt giữa RAMP1 của người và RAMP1 của chuột cống.

Thể khảm RAMP1 số 3 (R67 đến E78); SEQ ID số:219

Các gốc axit amin R67 đến E78 trong RAMP1 của người được thay bằng các trình tự tương ứng từ RAMP1 của chuột cống. Đoạn này bao gồm bảy gốc axit amin khác biệt giữa RAMP1 của người và RAMP1 của chuột cống.

Thể khảm CRLR số 1 (L24 đến Q33); SEQ ID số:223

Các gốc axit amin L24 đến Q33 trong CRLR của người được thay bằng các trình tự tương ứng từ CRLR của chuột cống. Đoạn này bao gồm tám gốc axit amin khác biệt giữa CRLR của người và CRLR của chuột cống.

Fig.11 thể hiện đoạn sắp xếp thẳng hàng các trình tự axit amin của RAMP1 từ khỉ đuôi dài (SEQ ID số:215), người (SEQ ID số:4), chuột cống (SEQ ID số:214) và khỉ redut (SEQ ID số:216), cùng với các trình tự của thể khảm RAMP1 số 1 (SEQ ID số:217), thể khảm RAMP1 số 2 (SEQ ID số:218) và thể khảm RAMP1 số 3 (SEQ ID số:219). Fig.12A và Fig.12B thể hiện đoạn sắp xếp thẳng hàng các trình tự axit amin của CRLR từ người (SEQ ID số:2), khỉ đuôi dài (SEQ ID số:221), khỉ redut (SEQ ID số:222), chuột cống (SEQ ID số:220), cũng như trình tự axit amin của thể khảm CRLR số 1 (SEQ ID số:223).

Các tế bào 293-6E được chuyển nhiễm một cách tạm thời với các cấu trúc ADN thể khảm CGRP R (CRLR wt + RAMP1 Q28-A34; CRLR wt + RAMP1 Q43-E53; CRLR wt + RAMP1 R67-E78; CRLR L24-Q33 + RAMP wt; CRLR wt + RAMP1 wt; đối chứng vectơ pTT5). Các tế bào được thu sau 72 giờ, được rửa bằng PBS + BSA 0,5%, và được đếm. Mỗi dòng tế bào đã được chuyển nhiễm được tái tạo huyền phù ở mức pha loãng là $5x10^5$ tế bào trong mỗi 100µl PBS/BSA. 100µl huyền phù tế bào được phân lượng nhỏ vào mỗi giếng trong đĩa 96 giếng đáy tròn (Falcon). Các tế bào được làm lắng kết ở tốc độ 1200 vòng/phút trong 5 phút. Dịch nổi bề mặt được loại ra và được thay bằng 100µl chứa 0,5µg kháng thể huCGRP R đã được tinh chế là 1H7, 2E7, 3B6, 9F5, 4H6, 12G8, 3C8, 10E4, 11D11, 32H8 hoặc 33B5. Các giếng đối chứng được xử lý bằng kháng thể kháng DNP huIgG2 (0,5µg), peptit Alexa647-CGRP (0,5µg), hoặc chỉ PBS/BSA đơn lẻ. Các tế bào được ủ trên nước đá trong 1 giờ và sau đó được rửa hai lần bằng PBS/BSA. Các tế bào trong mỗi giếng được tái tạo huyền phù trong 100µl PBS/BSA chứa kháng thể kháng hug-Fc-FITC (0,5µg) (ngoại trừ các tế bào được xử lý bằng Alexa647-CGRP). Các tế bào được ủ trên nước đá trong bóng tối trong 1 giờ và sau đó được rửa hai lần bằng PBS/BSA. Các tế bào được tái tạo huyền phù trong 200µl PBS/BSA và được phân tích bằng cách sử dụng FACS Calibur.

Mười kháng thể phong bế tiêu biểu (3B6, 9F5, 4H6, 12G8, 3C8, 10E4, 32H7, 4E4, 11D11 và 1H7) và hai kháng thể không phong bế (32H8 và 33B5) được thử nghiệm. Dữ liệu tiêu biểu (kháng thể 9F5) được thể hiện trên Fig.13A, Fig.13B và Fig.13C. Fig.13A thể hiện tình trạng liên kết vào thụ thể CGRP kiểu dại; Fig.13B thể hiện tình trạng liên kết vào các thụ thể CGRP chứa thể khảm CRLR L24-Q33, và Fig.13C thể hiện tình trạng liên kết vào các thụ thể CGRP chứa thể khảm RAMP1 Q28-A34. Phép phân tích FACS cho thấy rằng tất cả 12 kháng thể đều liên kết với đối chứng là thụ thể CGRP của người kiểu dại như dự kiến. Tất cả 12 kháng thể đều thể hiện mức liên kết giảm một cách đáng kể đối với thể khảm RAMP1 bất kỳ trong số ba thể khảm RAMP1 (Q28-A34), (Q43-E53) và (R67 – E78). Điều này có thể là kết quả của (1) mức biểu hiện của thụ thể thể khảm là thấp hơn nhiều, (2) thể khảm RAMP1 làm hỏng sự gấp nếp với CRLR của người và làm thay đổi cấu hình của phức hợp thụ thể, và/hoặc (3) ba vùng được chọn trên RAMP1 này liên quan trực tiếp đến sự liên kết của các kháng thể này vào thụ thể CGRP.

Khi phép dò tìm FACS được chặn để chỉ thu được các quần thể tế bào "biểu hiện" rất nhỏ, các kháng thể không phong bế 33B5 và 32H8 có vẻ luôn liên kết kém hơn (giá trị trung bình hình học thấp hơn) vào thể khảm RAMP1 Q43-E53 so với các kháng thể phong bế, chứng tỏ rằng sự liên kết vào vùng RAMP1 Q43-E53 có thể là quan trọng hơn đối với các kháng thể không phong bế. Mặt khác, 33B5 và 32H8 luôn liên kết tốt hơn vào thể khảm RAMP1 R67-E78 so với các kháng thể phong bế, chứng tỏ rằng trình tự RAMP1 R67-E78 có thể là quan trọng hơn đối với các kháng thể phong bế.

Tất cả các kháng thể thụ thể CGRP được thử nghiệm đều liên kết khá tốt vào thể khảm CRLR (L24-Q33), chứng tỏ rằng vị trí này là không thiết yếu đối với sự liên kết của các kháng thể phong bế.

Tóm lại, dữ liệu này cho thấy rằng ba vùng không liên tục trên RAMP1 -- (Q28-A34), (Q43 – E53) và (R67-E78) -- có thể liên quan đến quá trình liên kết kháng thể thụ thể CGRP, trong đó (R67-E78) quan trọng hơn đối với các kháng thể phong bế. Các trình tự đầu cuối N (L24-Q33) của CRLR có vẻ như không quá liên quan đến sự liên kết của các kháng thể thụ thể CGRP như được phân tích bằng phương pháp này. Phương pháp

này không loại trừ các vị trí liên kết bổ sung mà có chung các trình tự giống nhau hoặc tương tự giữa thụ thể CGRP của người và thụ thể CGRP của chuột nhắt mà là các đối tượng không được nhắm tới trong phép phân tích này.

Ví dụ 10

Nhận diện các epitop của CGRP R của người đối với các kháng thể trung hòa kháng CGRP R bằng thử nghiệm bảo vệ proteaza

Phần CRLR trong dạng hoàn thiện của phân tử dung hợp CRLR-Fc (có peptit tín hiệu bị loại bỏ; được thể hiện ở đây dưới dạng SEQ ID số:10) chứa 116 axit amin (trước nhóm liên kết glyxin) và có ba cấu trúc vòng lớn được tạo ra do sự hình thành ba cầu liên kết disulfua. Ba cầu liên kết disulfua này trong CRLR là Cys1 ở vị trí trình tự 26 (tất cả các vị trí trình tự CRLR được liệt kê trong đoạn này đều liên quan đến trình tự hoàn thiện được thể hiện dưới dạng SEQ ID số:10) liên kết vào Cys3 ở vị trí trình tự 52 (được gọi là CRLR C1-C3), Cys2 ở vị trí trình tự 43 liên kết vào Cys5 ở vị trí trình tự 83 (được gọi là CRLR C2-C5), Cys4 ở vị trí trình tự 66 liên kết vào Cys6 ở vị trí trình tự 105 (được gọi là CRLR C4-C6). Phần RAMP1 trong dạng hoàn thiện của phân tử dung hợp RAMP1-Fc chứa 91 axit amin (SEQ ID số:11) trước nhóm liên kết glyxin, phần này cũng tạo ra ba cầu liên kết disulfua nội phân tử. Ba cầu liên kết disulfua trong RAMP1 là Cys1 ở vị trí trình tự 1 (tất cả các vị trí trình tự RAMP1 được liệt kê trong đoạn này đều liên quan đến trình tự hoàn thiện được thể hiện dưới dạng SEQ ID số:11) liên kết vào Cys5 ở vị trí trình tự 56 (được gọi là RAMP1 C1-C5), Cys2 ở vị trí trình tự 14 liên kết vào Cys4 ở vị trí trình tự 46 (được gọi là RAMP1 C2-C4), Cys3 ở vị trí trình tự 31 liên kết vào Cys6 ở vị trí trình tự 78 (được gọi là RAMP1 C3-C6).

Các vùng protein thụ thể CGRP của người được liên kết bởi các kháng thể đơn dòng trung hòa kháng CGRP được nhận diện bằng cách phân đoạn hCGRP R thành các peptit bằng các proteaza đặc hiệu, và xác định trình tự của các peptit hCGRP R thu được (tức là, cả đoạn peptit chứa disulfua và đoạn peptit không chứa disulfua đối với các phần CRLR và RAMP). Sau đó, thử nghiệm bảo vệ proteaza được thực hiện để xác định sự phân giải thủy phân protein đối với hCGRP R với sự có mặt của các kháng thể đơn dòng

liên kết. Nguyên lý chung của thử nghiệm này là sự liên kết của mAb vào CGRP R có thể đem lại sự bảo vệ cho các vị trí phân cắt proteaza đặc hiệu cụ thể và thông tin này có thể được sử dụng để xác định vùng hoặc phần của CGRP R mà mAb liên kết vào đó.

Một cách vắn tắt, các sản phẩm phân giải peptit được lập bản đồ peptit bằng HPLC; các đỉnh riêng biệt được thu thập, và các peptit được nhận diện và lập bản đồ bằng phương pháp phân tích LC-MS ion hóa phun điện tử (ESI-LC-MS) trực tuyến và/hoặc bằng phương pháp giải trình tự đầu cuối N. Tất cả các phân tích HPLC dùng cho các nghiên cứu này đều được thực hiện bằng cách sử dụng cột C18 pha đảo đường kính hẹp (đường kính trong 2,1mm x chiều dài 15cm; Zorbax 300SB, 5µm, Agilent Technologies) đối với phép phân tích ngoại tuyến và sử dụng cột C18 pha đảo mao dẫn (đường kính trong 0,5mm x 25cm Vydac C18 MS, 5µm; The Separation Group) đối với LC-MS. Việc lập bản đồ peptit bằng HPLC được thực hiện bằng gradien tuyến tính từ axit trifloaxetic 0,05% (pha động A) đến axetonitril 90% trong axit trifloaxetic 0,05%. Các cột được chạy trong 90 phút ở tốc độ dòng chảy là 0,25 ml/phút đối với HPLC đường kính hẹp dùng cho các phân tích LC-MS ngoại tuyến hoặc trực tuyến, và 0,018 ml/phút đối với HPLC mao dẫn dùng cho các phân tích LC-MS trực tuyến.

Dạng CGRP R hoàn thiện của người được phân giải bằng AspN (chất này phân cắt sau axit aspartic và một số gốc axit glutamic ở đầu cuối amino) bằng cách ủ 100µg CGRP R ở nồng độ 1,0 mg/ml trong natri phosphat 0,1M (độ pH = 6,5) trong 20 giờ ở 37°C với 2µg AspN.

Kỹ thuật sắc ký HPLC được thực hiện đối với các sản phẩm phân giải bằng AspN đã tạo ra profin peptit như được thể hiện trên Fig.14 (mỗi mẫu được tiêm 30µg), phổ sắc ký được ký hiệu là A đối với CGRP R riêng lẻ (nồng độ 1mg/ml), trong khi sự phân giải đối chứng bằng lượng tương tự của kháng thể trung hòa CGRP R, dòng 12G8, cho thấy rằng kháng thể này về cơ bản có tính kháng lại AspN endoproteinaza (phổ sắc ký được ký hiệu là B; tỷ lệ CGRP R:kháng thể là 100:2; 100:7; 100:20 theo trọng lượng, một cách tương ứng). Các phân tích trình tự được thực hiện bằng kỹ thuật LC-MS/MS trực tuyến và bằng phương pháp giải trình tự Edman trên các đỉnh peptit được thu hồi từ HPLC. Các

phân tích ESI LC-MS trực tuyến đối với sản phẩm phân giải peptit được thực hiện để xác định khối lượng và trình tự chính xác của các peptit mà được tách bằng HPLC. Nhờ vậy, độ đồng nhất của một số peptit có mặt trong các đỉnh peptit từ quá trình phân giải bằng AspN được xác định (được thể hiện ở dạng các đỉnh được đánh số trên Fig.14). Bảng 14 dưới đây cho biết các vị trí của các trình tự peptit này trong thành phần tương ứng (CRLR hoặc RAMP1) của hCGRP R. Chữ cái viết hoa C theo sau bởi một con số hoặc X tượng trưng cho peptit được nhận diện là peptit CRLR; chữ cái viết hoa R theo sau bởi một con số hoặc X là peptit RAMP1 và "Fc" là đoạn Fc lớn không bị phân giải được giải phóng khỏi các phân tử dung hợp CRLR-Fc và RAMP1-Fc.

Bảng 14

Các peptit CRLR và RAMP1 được nhận diện bằng phương pháp lập bản đồ peptit đối với sản phẩm phân giải CGRP R bằng AspN

Peptit	Vị trí trình tự	Disulfua (#)	Khối lượng nguyên vẹn	Nguồn gốc
C1	E111-V122	0	1059	CRLR
C2	D33-A38	0	670	CRLR
C3	D55-M63	0	880	CRLR
C4	D68-Q71	0	571	CRLR
C5	D55-P67/D86-H110		n.d.	CRLR
C6	D8-Y24	0	1938	CRLR
C7	E25-Q32/D48-N54	1	1933	CRLR
C-X		3	n.d.	CRLR
R1	D32-A44	0	1622	RAMP1
R2	E12-V20/D45-A51	1	1939	RAMP1
R-X	C1-R86	3	10049	RAMP1
Fc			20500	RAMP1/CRLR

Fig.15 thể hiện sự so sánh giữa thử nghiệm phân giải bằng AspN (mỗi mẫu được tiêm 30µg) với CGRP R riêng lẻ (phổ sắc ký được ký hiệu là A) với một thử nghiệm được thực hiện với sự có mặt của kháng thể trung hòa 12G8 (phổ sắc ký được ký hiệu là B). Tỷ lệ trọng lượng của CGRP R:kháng thể là 1:1. Một số đỉnh (C5, C6 và C7) thể hiện mức

giảm về chiều cao đỉnh trong phổ sắc ký B so với phổ sắc ký A, trong khi hai đỉnh khác (C-X và R-X) thể hiện mức tăng về chiều cao đỉnh trong phổ sắc ký B so với phổ sắc ký A. Cũng quan sát thấy kiểu hình bản đồ peptit tương tự nếu kháng thể trung hòa kháng CGRP R khác (10E4, 3B6, 3C8 hoặc 4E4) với lượng tương tự có mặt trong mẫu phân giải như thấy được trong phổ sắc ký được ký hiệu là C. Cả C6 và C7 đều là các peptit có liên kết disulfua mà chiếm phần lớn phân tử CRLR trong khi C5 là peptit CRLR không chứa disulfua nằm ở đầu cuối N của phân tử này và áp chót đối với peptit disulfua C7. Đỉnh C-X chứa ba cầu liên kết disulfua CRLR với nhiều trình tự, chứng tỏ rằng có ít nhất hai đến ba peptit được liên kết với nhau bằng các cầu liên kết disulfua. Thực tế là đỉnh C-X có chiều cao đỉnh tăng lên trong sản phẩm phân giải CGRP R với sự có mặt của kháng thể trung hòa CGRP chứng tỏ rằng kháng thể này đã bảo vệ CGRP R khỏi quá trình phân giải bằng AspN ở một số vị trí phân cắt liên quan đến Glu25 và Asp55. Kháng thể này không thể hiện là có tác dụng bảo vệ đáng kể đối với Asp33 và Asp72 vì cường độ đỉnh của các peptit C2 và C4 không giảm đi. Do đó, kháng thể này có vẻ như liên kết với vùng CRLR mà bao gồm vùng disulfua C1-C3 của CRLR và vùng disulfua C4-C6 của CRLR cùng với vùng vòng giữa Cys53 và Cys66.

Việc lập bản đồ AspN đối với hCGRP R cũng đã nhận diện được peptit RAMP1 chứa disulfua (R2) và peptit RAMP1 không chứa disulfua (R1) (xem bảng 14 và Fig.14). Với sự có mặt của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trung hòa được đề cập trên đây (12G8, 10E4, 4E4, 3B6 hoặc 3C8), peptit R-X được thu hồi ở cường độ đỉnh cao hơn một cách đáng kể so với những gì thu được từ quá trình phân giải mà không có kháng thể trong mẫu. Các phép phân tích khối lượng và trình tự cho thấy R-x chứa chuỗi polypeptit đơn tương ứng với trình tự RAMP1 giữa Cys1 và Arg86. Các thử nghiệm này chỉ ra rằng kháng thể trung hòa CGRP R có thể bảo vệ vùng quan trọng của RAMP1 khỏi sự phân giải thủy phân protein bằng AspN.

Để đánh giá xem liệu tác dụng bảo vệ đối với sự phân giải thủy phân protein CGRP R bằng AspN có đặc hiệu với các kháng thể trung hòa (phong bế) CGRP R (so với các kháng thể không trung hòa kháng CGRP R) hay không, phương pháp phân giải

CGRP R bằng AspN được thực hiện với sự có mặt của kháng thể đơn dòng đối chứng không liên quan mà không trung hòa hoạt tính CGRP R. Các kết quả được thể hiện trên Fig.15 trong phổ sắc ký D. Kháng thể không trung hòa này không thể hiện bất kỳ tác dụng phong bế đáng kể nào đối với quá trình thủy phân protein CGRP R bằng AspN; thực vậy, profin bản đồ peptit (phổ sắc ký D) là gần như không thể phân biệt được về các khía cạnh có liên quan đến profin thu được từ quá trình phân giải CGRP R riêng lẻ (phổ sắc ký A).

Tác dụng bảo vệ khỏi quá trình thủy phân protein phụ thuộc vào nồng độ được bổ sung vào mẫu phân giải. Như thấy được trên Fig.16, lượng CGRP R cố định trong mẫu (100µg) với các lượng biến đổi của kháng thể trung hòa kháng CGRP R là 4E4 (tỷ lệ CGRP R:kháng thể tính bằng microgam lần lượt là 100:2; 100:7; 100:20 theo trọng lượng) được thực hiện đối với sự thủy phân protein bằng AspN. Profin bảo vệ có thể được quan sát thấy và khả năng bảo vệ phụ thuộc vào nồng độ kháng thể.

Tóm lại, các dữ liệu này chứng tỏ các kháng thể phong bế hoặc trung hòa kháng CGRP R được bộc lộ ở đây có thể phong bế CGRP R (đối với cả thành phần CRLR và thành phần RAMP1) khỏi sự thủy phân protein bằng AspN, chứng tỏ rằng các kháng thể phong bế liên kết vào cả CRLR và RAMP1 khi các kháng thể này liên kết vào thụ thể CGRP. Ngoài ra, tác dụng bảo vệ này phụ thuộc vào nồng độ kháng thể. Các kết quả này cũng cho thấy rằng các kháng thể trung hòa CGRP R liên kết vào các vùng chung trên CGRP R của người, là các vùng gần các vị trí phân cắt AspN.

Ví dụ 11

Kháng thể kháng RAMP1 và kháng thể kháng CRLR có bán trên thị trường dùng trong thử nghiệm chức năng cAMP

Các kháng thể có bán trên thị trường kháng lại một thành phần hoặc thành phần còn lại (RAMP1 hoặc CRLR) của thụ thể CGRP của người được sàng lọc trong thử nghiệm cAMP được điều tiết bởi thụ thể CGRP bằng cách sử dụng các tế bào HTB-10 như được mô tả trong ví dụ 4 trên đây để xác định xem liệu các kháng thể này có hoạt tính sinh học hay không. Dữ liệu được trình bày trong bảng 15 dưới đây. Các kháng thể

có hoạt tính sinh học không thể phát hiện được ("ND"), rất yếu ("VW") hoặc yếu ("W") trong khoảng nồng độ mà ở đó các kháng thể tiêu biểu được bộc lộ ở đây có hoạt tính sinh học mạnh.

Bảng 15

Hoạt tính của kháng thể có bán trên thị trường

Tên	Nguồn	Kháng nguyên hoặc epitop	Nhà cung cấp	Hoạt tính của HTB-10
Kháng thể CRLR (ab13164)	Ab đa dòng của thỏ	ECD đầu cuối N của hCRLR	Abcam Inc., Cambridge, MA	ND
Kháng thể CALCRL	Ab đa dòng của thỏ	ECD đầu cuối N của hCRLR	GenWay Biotech, Inc., San Diego, CA	ND
CRLR (N-18)	Ab đa dòng của dê	Lập bản đồ epitop gần đầu cuối N của hCRLR	Santa Cruz Biotech	VW
CRLR (H-42)	Ab đa dòng của thỏ	aa23-64 của hCRLR	Santa Cruz Biotech	ND
Kháng thể CALCRL (A01)	Ab đa dòng của chuột nhắt	aa23-133 của hCRLR	Novus Biologicals, Inc.	VW
RAMP1 (N-20)	Ab đa dòng của dê	Lập bản đồ epitop ở đầu cuối N của hCRLR	Santa Cruz Biotech	ND
Kháng thể RAMP1 (M01)	Ab đa dòng của chuột nhắt	aa27-118 của hRAMP1	Novus Biologicals, Inc., Littleton, CO	W
Kháng thể RAMP1 (1F1)	Ab đơn dòng của chuột nhắt	aa27-118 của hRAMP1	Novus Biologicals, Inc.	ND
Kháng thể RAMP1 (ab67151)	Ab đa dòng của chuột nhắt	Độ dài đầy đủ của hRAMP1	Abcam, Inc.	W
RAMP1 (FL-148)	Ab đa dòng của thỏ	hRAMP1 có độ dài đầy đủ	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA	ND

Ví dụ 12

Nhuộm hóa mô miễn dịch đối với các tế bào biểu hiện các thành phần thụ thể khác nhau

2-4x10^6 tế bào được tiêm vào mỗi miếng đệm CollaPlug (Integra LifeSciences Co., Plainsboro, NJ). Các miếng đệm CollaPlug được nhúng vào môi trường OCT (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA), được làm đông lạnh ở -20°C và được cắt thành các phần 20µm bằng cách sử dụng máy điều lạnh. Các phần được cố định bằng paraformaldehyt 4% trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng (RT) và sau đó được rửa trong dung dịch nước muối được đệm phosphat (PBS). Peroxidaza nội sinh được phong bế bằng H_2O_2 3%/PBS trong 15 phút và các phần được ủ trong dung dịch phong bế (PBS chứa huyết thanh dê thông thường 3% (Vector Labs, Burlingame, CA) và triton X-100 0,3%) trong 1 giờ. Tiếp đó, các phần được ủ trong kháng thể sơ cấp kháng thụ thể CGRP của người (32H7, 0,03 - 0,1µg/ml) ở 4°C qua đêm, được rửa trong PBS và được ủ trong kháng thể thứ cấp (đoạn Fc của dê đã được biotinyl hóa kháng IgG của người, 1:800, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) trong huyết thanh dê thông thường 1%/PBS trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Khả năng phản ứng miễn dịch được khuếch đại bằng cách sử dụng kit Vector Elite theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất (Vector Labs, Burlingame, CA) và kết quả nhuộm được làm hiện ảnh bằng cách sử dụng 3,3'-diaminobenzidin-niken làm chất sinh màu (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri). Các phần được làm rõ bằng xylen và miếng đậy được làm trơn trượt bằng Permount (Fisher Chemicals, Fair Lawn, NJ). Khả năng phản ứng miễn dịch được phân tích bằng cách sử dụng kính hiển vi Nikon E-800 và phần mềm đi kèm (Nikon, Melville, NY).

Dữ liệu từ các tế bào biểu hiện các thành phần thụ thể khác nhau (như được nhận diện dưới đây) bằng cách sử dụng kháng thể 32H7 như được mô tả trên đây cho thấy mức nhuộm rõ rệt đối với các tế bào CHO biểu hiện thụ thể CGRP tái tổ hợp của người (CRLR+RAMP1; "các tế bào CHO/CGRP R") và mức nhuộm yếu hơn đối với các tế bào SK-N-MC biểu hiện các thụ thể CGRP một cách nội sinh (do mật độ thụ thể thấp hơn nhiều). Không quan sát thấy hiện tượng nhuộm nào trong dòng tế bào CHO gốc, các tế bào CHO biểu hiện protein tái tổ hợp không liên quan (TRPM8), các tế bào CHO/CGRP

R sau khi hấp phụ trước bằng kháng nguyên 32H7 tương ứng, các tế bào CHO biểu hiện thụ thể adrenomedulin 2 tái tổ hợp của người (CRLR+RAMP3), các tế bào MCF-7 biểu hiện thụ thể amylin một cách nội sinh, các tế bào HEK biểu hiện thụ thể adrenomedulin 1 tái tổ hợp của người (CRLR+RAMP2), hoặc các tế bào HEK gốc. Dữ liệu từ các thử nghiệm này được tóm tắt trong bảng 16 dưới đây.

Bảng 16

Cường độ nhuộm hóa mô miễn dịch của các tế bào đã nêu

Dòng tế bào	Cường độ nhuộm (điểm số trực quan)
CGRP/CHO	4+
SK-N-MC	1+
CHO	0
TRPM8/CHO	0
CGRP/CHO được hấp phụ trước	0
AM2/CHO	0
MCF-7	0
AM1/HEK	0
HEK	0

Tất cả các patent và các công bố khác đã được nêu được đưa vào đây một cách rõ ràng bằng cách viện dẫn nhằm mục đích mô tả và bộc lộ, ví dụ, các phương pháp được mô tả trong các công bố này mà có thể được sử dụng cho đối tượng được bộc lộ ở đây. Các công bố này chỉ được đưa ra về nội dung bộc lộ của chúng trước ngày nộp đơn sáng chế này. Điều này không được hiểu là sự thừa nhận rằng các tác giả sáng chế không có quyền ghi lùi ngày tháng của phần bộc lộ này bởi vì sáng chế đã có trước hoặc vì lý do bất kỳ khác. Tất cả các tuyên bố về ngày tháng hoặc các mô tả về nội dung của các tài liệu này là dựa trên thông tin sẵn có đối với người nộp đơn và không cấu thành bất kỳ sự thừa nhận nào về độ chính xác của ngày tháng hoặc nội dung của các tài liệu này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết thụ thể CGRP của người chứa CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 và CDRL3, trong đó:

(a) CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có trình tự là SEQ ID số: 42, 43 và 44, một cách tương ứng, và CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có trình tự là SEQ ID số: 73, 74 và 75, một cách tương ứng;

(b) CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có trình tự là SEQ ID số: 45, 46 và 47, một cách tương ứng, và CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có trình tự là SEQ ID số: 76, 77 và 78, một cách tương ứng;

(c) CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có trình tự là SEQ ID số: 48, 49 và 50, một cách tương ứng, và CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có trình tự là SEQ ID số: 79, 80 và 81, một cách tương ứng;

(d) CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có trình tự là SEQ ID số: 51, 52 và 53, một cách tương ứng, và CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có trình tự là SEQ ID số: 82, 83 và 84, một cách tương ứng;

(e) CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có trình tự là SEQ ID số: 54, 55 và 56, một cách tương ứng, và CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có trình tự là SEQ ID số: 85, 86 và 87, một cách tương ứng;

(f) CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có trình tự là SEQ ID số: 57, 58 và 59, một cách tương ứng, và CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có trình tự là SEQ ID số: 88, 89 và 90, một cách tương ứng;

(g) CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có trình tự là SEQ ID số: 60, 55 và 56, một cách tương ứng, và CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có trình tự là SEQ ID số: 85, 86 và 87, một cách tương ứng;

(h) CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có trình tự là SEQ ID số: 45, 61 và 47, một cách tương ứng, và CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có trình tự là SEQ ID số: 76, 91 và 78, một cách tương ứng;

(i) CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có trình tự là SEQ ID số: 62, 63 và 64, một cách tương ứng, và CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có trình tự là SEQ ID số: 92, 93 và 94, một cách tương ứng;

(j) CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có trình tự là SEQ ID số: 45, 61 và 47, một cách tương ứng, và CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có trình tự là SEQ ID số: 76, 95 và 78, một cách tương ứng;

(k) CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có trình tự là SEQ ID số: 65, 55 và 56, một cách tương ứng, và CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có trình tự là SEQ ID số: 85, 86 và 87, một cách tương ứng;

(l) CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có trình tự là SEQ ID số: 42, 43 và 44, một cách tương ứng, và CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có trình tự là SEQ ID số: 73, 74 và 96, một cách tương ứng;

(m) CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có trình tự là SEQ ID số: 66, 67 và 68, một cách tương ứng, và CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có trình tự là SEQ ID số: 97, 98 và 99, một cách tương ứng;

(n) CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có trình tự là SEQ ID số: 69, 70 và 71, một cách tương ứng, và CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có trình tự là SEQ ID số: 100, 101 và 102, một cách tương ứng; hoặc

(o) CDRL1, CDRL2 và CDRL3 có trình tự là SEQ ID số: 69, 70 và 72, một cách tương ứng, và CDRH1, CDRH2 và CDRH3 có trình tự là SEQ ID số: 100, 101 và 102, một cách tương ứng.

2. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên này chứa:

(a) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 137 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 158;

(b) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 138 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 159;

(c) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 139 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 160;

(d) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 140 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 161;

(e) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 141 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 162;

(f) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 142 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 158;

(g) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 143 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 163;

(h) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 144 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 162;

(i) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 145 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 158;

(j) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 146 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 164;

(k) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 147 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 165;

(l) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 148 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 166;

(m) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 148 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 167;

(n) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 149 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 162;

(o) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 150 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 168;

(p) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 151 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 169;

(q) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 152 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 170; hoặc

(r) V_L chứa trình tự là SEQ ID số: 153 và V_H chứa trình tự là SEQ ID số: 170.

3. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo các điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên này được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể đơn dòng, đoạn Fab, đoạn Fab', đoạn F(ab')2, đoạn Fv, đoạn Fv chuỗi đơn dạng đime (diabody) và kháng thể chuỗi đơn.

4. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể hoàn toàn của người, kháng thể được làm giống như của người và kháng thể thể khảm.

5. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 4, trong đó kháng thể đơn dòng là kháng thể typ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4.

6. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 5, trong đó kháng thể đơn dòng là kháng thể IgG1 hoặc IgG2.

7. Polynucleotit đã được phân lập mà mã hóa kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6.

8. Vectơ biểu hiện chứa polynucleotit đã được phân lập theo điểm 7.

9. Dòng tế bào được biến nạp bằng vectơ biểu hiện theo điểm 8.

10. Phương pháp tạo kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, bao gồm bước tạo ra kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó từ tế bào chủ tiết kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên này.

11. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên này chứa chuỗi nhẹ của kháng thể có SEQ ID số: 17 và chuỗi nặng của kháng thể có SEQ ID số: 29.

12. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên này chứa chuỗi nhẹ của kháng thể có SEQ ID số: 17 trừ đi chuỗi tín hiệu bất kỳ và chuỗi nặng của kháng thể có SEQ ID số: 29 trừ đi chuỗi tín hiệu bất kỳ.

13. Kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc đoạn liên kết kháng nguyên này chứa:

(i) CDRL1 chứa SEQ ID số:42, CDRL2 chứa SEQ ID số:43, CDRL3 chứa SEQ ID số:44, CDRH1 chứa SEQ ID số:73, CDRH2 chứa SEQ ID số:74 và CDRH3 chứa SEQ ID số:75; hoặc

(ii) V_L chứa SEQ ID số:142 và V_H chứa SEQ ID số:158.

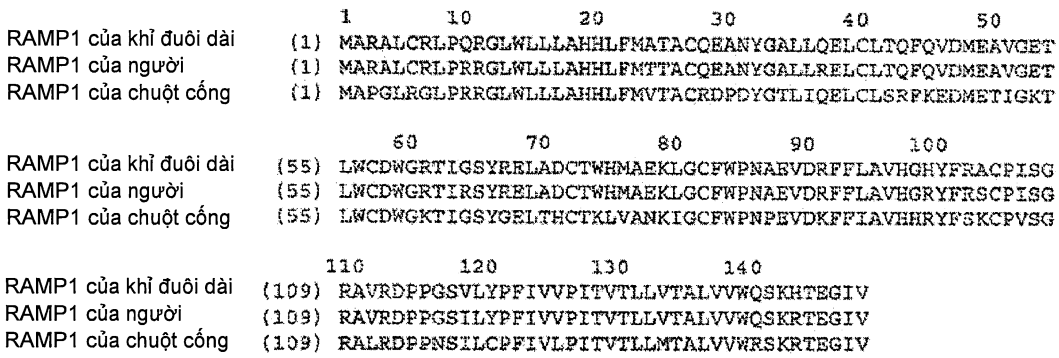

1 10 20 30 40 50
RAMP1 của khỉ đuôi dài (1) MARALCRLPQRGLWLLLAHHLFMATACQEANYGALLQELCLTQFQVDMEAVGET
RAMP1 của người (1) MARALCRLPRRGLWLLLAHHLFMTTACQEANYGALLRELCLTQFQVDMEAVGET
RAMP1 của chuột cống (1) MAPGLRGLPRRGLWLLLAHHLFMVTACRDPDYGTLIQELCLSRFKEDMETIGKT
60 70 80 90 100
RAMP1 của khỉ đuôi dài (55) LWCDWGRTIGSYRRLADCTWHMAEKLGCFWPNAEVDRFFLAVHGHYFRACPISG
RAMP1 của người (55) LWCDWGRTIRSYRELADCTWHMAEKLGCFWPNAEVDRFFLAVHGRYFRSCPISG
RAMP1 của chuột cống (55) LWCDWGKTIGSYGELTHCTKLVANKIGCFWPNPEVDKFFIAVHHRYFSKCPVSG
110 120 130 140
RAMP1 của khỉ đuôi dài (109) RAVRDPPGSVLYPFIVVPITVTLLVTALVVWQSKHTEGIV
RAMP1 của người (109) RAVRDPPGSILYPFIVVPITVTLLVTALVVWQSKRTEGIV
RAMP1 của chuột cống (109) RALRDPPNSILCPFIVLPITVTLLMTALVVWRSKRTEGIV

Fig. 1

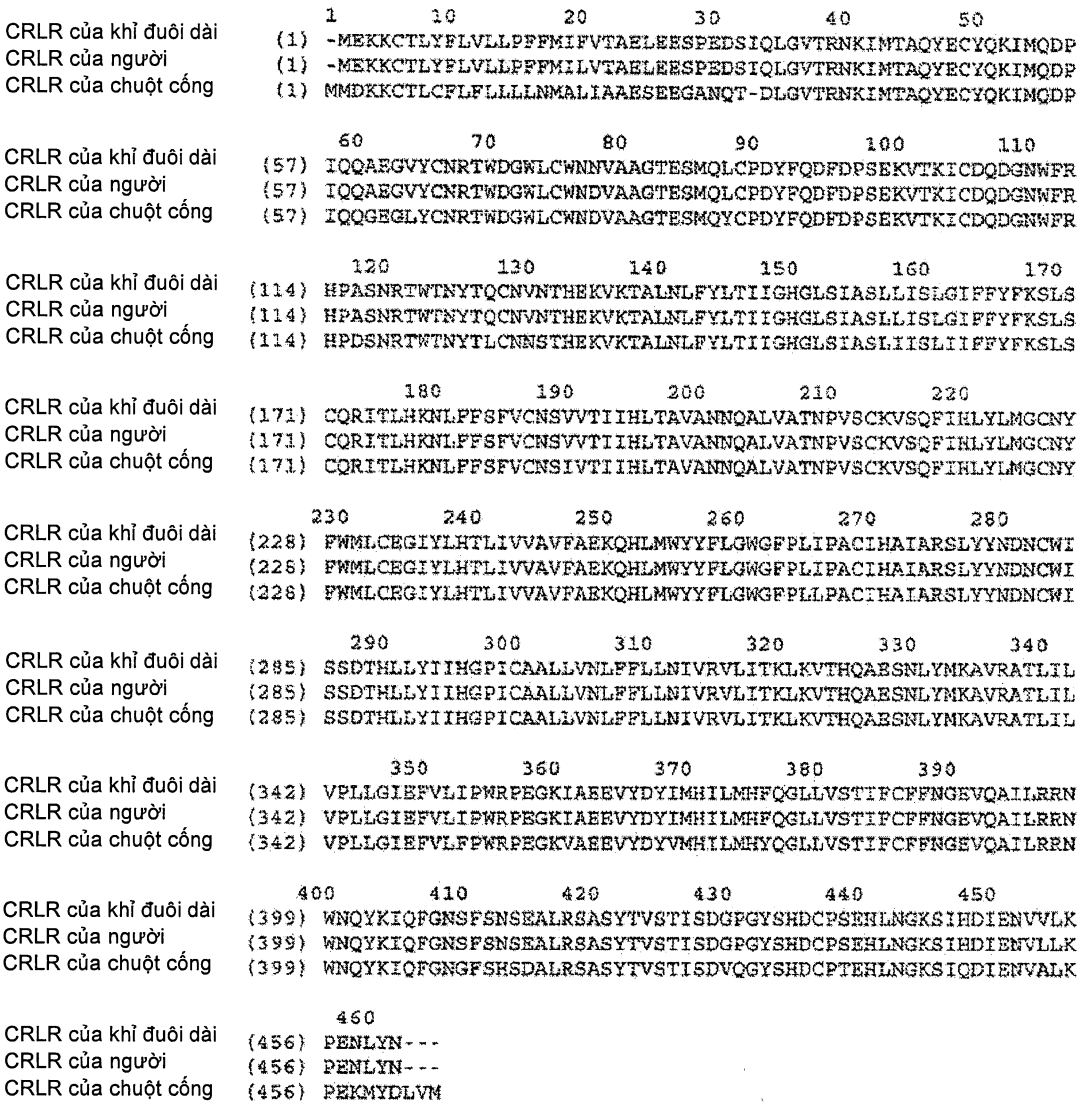

CRLR của khỉ đuôi dài
CRLR của người
CRLR của chuột cống
1 10 20 30 40 50
(1) -MEKKCTLYFLVLLPFFMIFVTAELEESPEDSIQLGVTRNKIMTAQYECYQKIMQDP
(1) -MEKKCTLYFLVLLPFFMILVTAELEESPEDSIQLGVTRNKIMTAQYECYQKIMQDP
(1) MMDKKCTLCFLFLLLLNMALIAAESEEGANQT-DLGVTRNKIMTAQYECYQKIMQDP
60 70 80 90 100 110
(57) IQQAEGVYCNRTWDGWLCWNNVAAGTESMQLCPDYFQDFDPSEKVTKICDQDGNWFR
(57) IQQAEGVYCNRTWDGWLCWNDVAAGTESMQLCPDYFQDFDPSEKVTKICDQDGNWFR
(57) IQQGEGLYCNRTWDGWLCWNDVAAGTESMQYCPDYFQDFDPSEKVTKICDQDGNWFR
120 130 140 150 160 170
(114) HPASNRTWTNYTQCNVNTHEKVKTALNLFYLTIIGHGLSIASLLISLGIFFYFKSLS
(114) HPASNRTWTNYTQCNVNTHEKVKTALNLFYLTIIGHGLSIASLLISLGIFFYFKSLS
(114) HPDSNRTWTNYTLCNNSTHEKVKTALNLFYLTIIGHGLSIASLIISLIIFFYFKSLS
180 190 200 210 220
(171) CQRITLHKNLFFSFVCNSVVTIIHLTAVANNQALVATNPVSCKVSQFIHLYLMGCNY
(171) CQRITLHKNLFFSFVCNSVVTIIHLTAVANNQALVATNPVSCKVSQFIHLYLMGCNY
(171) CQRITLHKNLFFSFVCNSIVTIIHLTAVANNQALVATNPVSCKVSQFIHLYLMGCNY
230 240 250 260 270 280
(228) FWMLCEGIYLHTLIVVAVFAEKQHLMWYYFLGWGFPLIPACIHAIARSLYYNDNCWI
(228) FWMLCEGIYLHTLIVVAVFAEKQHLMWYYFLGWGFPLIPACIHAIARSLYYNDNCWI
(228) FWMLCEGIYLHTLIVVAVFAEKQHLMWYYFLGWGFPLLPACIHAIARSLYYNDNCWI
290 300 310 320 330 340
(285) SSDTHLLYIIHGPICAALLVNLFFLLNIVRVLITKLKVTHQAESNLYMKAVRATLIL
(285) SSDTHLLYIIHGPICAALLVNLFFLLNIVRVLITKLKVTHQAESNLYMKAVRATLIL
(285) SSDTHLLYIIHGPICAALLVNLFFLLNIVRVLITKLKVTHQAESNLYMKAVRATLIL
350 360 370 380 390
(342) VPLLGIEFVLIPWRPEGKIAEEVYDYIMHILMHFQGLLVSTIFCFFNGEVQAILRRN
(342) VPLLGIEFVLIPWRPEGKIAEEVYDYIMHILMHFQGLLVSTIFCFFNGEVQAILRRN
(342) VPLLGIEFVLFPWRPEGKVAEEVYDYVMHILMHYQGLLVSTIFCFFNGEVQAILRRN
400 410 420 430 440 450
(399) WNQYKIQFGNSFSNSEALRSASYTVSTISDGPGYSHDCPSEHLNGKSIHDIENVVLK
(399) WNQYKIQFGNSFSNSEALRSASYTVSTISDGPGYSHDCPSEHLNGKSIHDIENVLLK
(399) WNQYKIQFGNGFSHSDALRSASYTVSTISDVQGYSHDCPTEHLNGKSIQDIENVALK
460
(456) PENLYN---
(456) PENLYN---
(456) PEKMYDLVM

Fig. 2

	CDR1	SEQ ID số:	CDR2	SEQ ID số:	CDR3	SEQ ID số:
Kapa K1						
2E7	RASQGIRNDLG	48	AASSLQS	49	LQYNIYPWT	50
13H2	RASQGIRKDLG	66	GASSLQS	67	LQYNSFPWT	68
Trình tự liên ứng K1	RASQGIRNDLG K	103	AASSLQS G	104	LQYNIYPWT SF	105
Kapa K4						
32H7	RASQSVSSGYLT	69	GASSRAT	70	QQYGNSLCR	71
32H7a	RASQSVSSGYLT	69	GASSRAT	70	QQYGNSLSR	72
Trình tự liên ứng K4	RASQSVSSGYLT	69	GASSRAT	70	QQYGNSLSR C	106
Trình tự liên ứng kapa K1,4	RASQSVSSGYLT GIRN D G K	107	GASSRAT A LQS	108	QQYGNSLCR L NTYPWT F S	109

Fig.3A

	CDR1	SEQ ID số:	CDR2	SEQ ID số:	CDR3	SEQ ID số:
Kapa K2						
4H6	RSSQSLLHSFGYNYLD	57	LGSNRAS	58	MQALQTPFT	59
Kapa K3						
3C8	KSSQSLLHSAGKTYLY	54	EVSNRFS	55	MQSFPLPLT	56
5F5	KSSQSLLHSDGKTYLY	60	EVSNRFS	55	MQSFPLPLT	56
12E8	KSSQSLLHSDGRNYLY	65	EVSNRFS	55	MQSFPLPLT	56
Trình tự liên ứng K3	KSSQSLLHSDGRNYLY A KT	110	EVSNRFS	55	MQSFPLPLT	56
Trình tự liên ứng kapa K2,3	RSSQSLLHSFGYNYLD K D RT Y A K	111	LGSNRAS EV F	112	MQALQTPFT SFPL L	113

Fig.3B

Lambda L1	CDR1	SEQ ID số:	CDR2	SEQ ID số:	CDR3	SEQ ID số:
1E11	SGSSSNIGNNYVS	42	DNNKRPS	43	GTWDSRLSAVV	44
4E4	SGSSSNIGNNYVS	42	DNNKRPS	43	GTWDSRLSAVV	44
9D4	SGSSSNIGNNYVS	42	DNNKRPS	43	GTWDSRLSAVV	44
12G8	SGSSSNIGNNYVS	42	DNNKRPS	43	GTWDSRLSAVV	44
Trình tự liên ứng L1	SGSSSNIGNNYVS	42	DNNKRPS	43	GTWDSRLSAVV	44

Lambda L2	CDR1	SEQ ID số:	CDR2	SEQ ID số:	CDR3	SEQ ID số:
10E4	SGSSSNIGSNTVN	62	TNNQRPS	63	AARDESLNGVV	64

Lambda L3	CDR1	SEQ ID số:	CDR2	SEQ ID số:	CDR3	SEQ ID số:
11D11	SGSSSNIGSNYVY	45	RNNQRPS	61	AAWDDSLSGWV	47
11H9	SGSSSNIGSNYVY	45	RNNQRPS	61	AAWDDSLSGWV	47
1H7	SGSSSNIGSNYVY	45	RSNQRPS	48	AAWDDSLSGWV	47
9F5	SGSSSNIGSNYVY	45	RNNQRPS	61	AAWDDSLSGWV	47
Trình tự liên ứng L3	SGSSSNIGSNYVY	45	RNNQRPS	114	AAWDDSLSGWV	47
			S			

Lambda L4	CDR1	SEQ ID số:	CDR2	SEQ ID số:	CDR3	SEQ ID số:
3B6	QG DS LRSFYAS	51	GKNNRPS	52	NSRDSSVYHLV	53

	CDR1	SEQ ID số:	CDR2	SEQ ID số:	CDR3	SEQ ID số:
Trình tự liên ứng Lam L1,2,3	SGSSSNIGNNYVS	115	DNNKRPS	116	GTWDSRLSAVV	117
	S T N		TS Q		AAR DS NG	
	Y		R			

	CDR1	SEQ ID số:	CDR2	SEQ ID số:	CDR3	SEQ ID số:
Trình tự liên ứng lambda All	SGSSSNIGNNYVS	118	DNNKRPS	119	GTWDSRLSAVV	120
	Q -D -LRSFTAN		GK N		NSR DSVYHL	
	Y		TS Q		AA NG	
			R			

Fig.4

HC 1	CDR1	SEQ ID số:	CDR2	SEQ ID số:	CDR3	SEQ ID số:
3B6	GYYMH	82	WINPNSGGTNYAQKFQG	83	DQMSIIMLRGVFPPYYYGMDV	84
10E4	DYYMY	92	WISPNSGGTNYAQKFQG	93	GGYSGYA--GLYSHYY-GMDV	94
Trình tự liên ứng HC1	GYYMH	121	WINPNSGGTNYAQKFQG	122	DQMSIIMLRGVFPPYYYGMDV	123
	D Y		S		GGY GYA-- LYSH -	

Fig.5A

HC2	CDR1	SEQ ID số:	CDR2	SEQ ID số:	CDR3	SEQ ID số:
11D11	NAWMS	76	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	95	DRTGYSISWSSYYYYYYGMDV	78
9F5	NAWMS	76	RIKSKTDGGTTDYTAPVKG	91	DRTGYSISWSSYYYYYYGMDV	78
11H9	NAWMS	76	RIKSKTDGGTTDYAAPVKG	95	DRTGYSISWSSYYYYYYGMDV	78
1H7	NAWMS	76	RIKSTTDGGTTDYAAPVKG	77	DRTGYSISWSSYYYYYYGMDV	78
Trình tự liên ứng HC2	NAWMS	76	RIKSKTDGGTTDYTAPVKG	124	DRTGYSISWSSYYYYYYGMDV	78
			T A			

Fig.5B

HC3	CDR1	SEQ ID số:	CDR2	SEQ ID số:	CDR3	SEQ ID số:
13H2	TYSMN	97	SISSSSSYRYYADSVKG	98	EGVSGSSPYSISWYDYYYGMDV	99
2E7	SYAMS	79	AISGSGGRTYYADSVKG	80	DQREVG-PYSSGWYDYYYGMDV	81
Trình tự liên ứng HC3	TYSMN	125	SISSSSSYRYYADSVKG	126	EGVSGSSPYSISWYDYYYGMDV	127
	S A S		A G GGRT		DQREVG- SG	

HC4	CDR1	SEQ ID số:	CDR2	SEQ ID số:	CDR3	SEQ ID số:
3C8	SYGMH	85	VISYDGSHESYADSVKG	86	ERKRVTMSTLYYY-FYYGMDV	87
4E4	SFGMH	73	VISFDGSIKYSVDSVKG	74	DRLNYYDSSGYYHYKYYGMAV	75
9D4	SFGMH	73	VISFDGSIKYSVDSVKG	74	DRLNYYDSSGYYHYKYYGMAV	75
1E11	SFGMH	73	VISFDGSIKYSVDSVKG	74	DRLNYYDSSGYYHYKYYGMAV	75
12E8	SYGMH	85	VISYDGSHESYADSVKG	86	ERKRVTMSTLYYY-FYYGMDV	87
5F5	SYGMH	85	VISYDGSHESYADSVKG	86	ERKRVTMSTLYYY-FYYGMDV	87
12G8	SFGMH	73	VISFDGSIKYSVDSVKG	74	DRLNYYDSSGYYHYKYYGLAV	96
Trình tự liên ứng HC4	SFGMH	128	VISFDGSIKYSVDSVKG	129	DRLNYYDSSGYYHYKYYGMAV	130
	Y		Y H YA		E KRVTM TL Y-F LD	

Fig.5C

HC5	CDR1	SEQ ID số:	CDR2	SEQ ID số:	CDR3	SEQ ID số:
4H6	DYAMS	88	FIRSRAYGGTPEYAASVKG	89	GRGIAARWDY	90

Fig.5D

HC6	CDR1	SEQ ID số:	CDR2	SEQ ID số:	CDR3	SEQ ID số:
32H7	SYGMH	100	VIWYDGSNKYYADSVKG	101	AGGIAAAGLYYYYGMDV	102

Fig.5E

	CDR1	SEQ ID số:	CDR2	SEQ ID số:	CDR3	SEQ ID số:
HC Con A	NAWMS	131	RIKSKTDGGTTDYTAPVKG	132	DRTGYSISWSS-YYYYYGMDV	133
	SYA H		A SG--S SRKYSADS		AQREVGPYSGGWHDK-- LAV	
	FG		V WFT I V		EGLNAYD--LYY -F	
			Y N		GI AA T L	
			H		KR TM	
	CDR1	SEQ ID số:	CDR2	SEQ ID số:	CDR3	SEQ ID số:
HC Con B	NAWMS	134	RIKSKTDGGTTDYTAPVKG	135	DRTGYSISWSS-YYYYYGMDV	136
	GFYLH		W NP--NSSGKNSAQKFQ		GGMSIIMLRGVFPPK-- LA	
	DYA		A SGTAH RRY VDS		AQYEGYA--LLYSHF	
	S G		V WFR S IPE		E RNVGPYS GWHD	
	A		S RY Y N		LIAAD T Y -	
			F H		GR T	
			Y		K	

Fig.5F

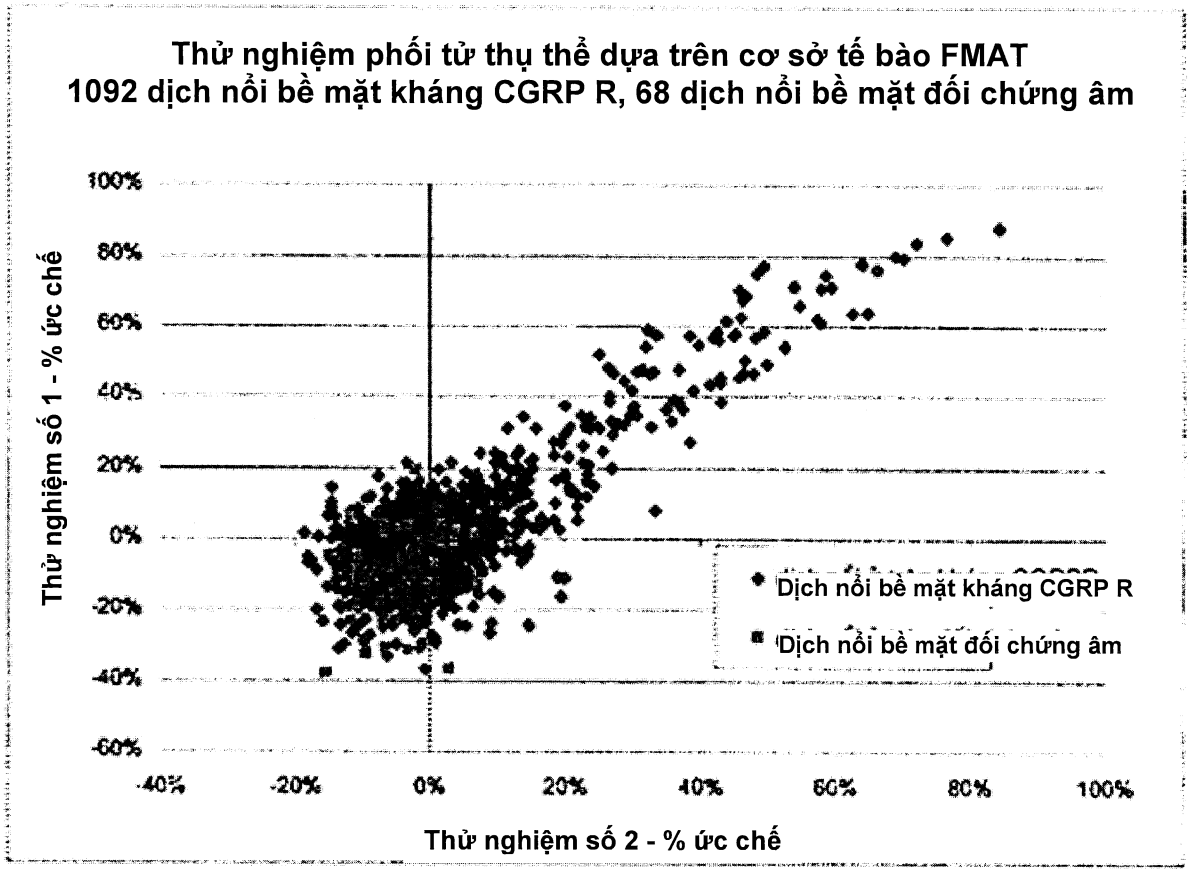

Thử nghiệm phối tử thụ thể dựa trên cơ sở tế bào FMAT
1092 dịch nổi bề mặt kháng CGRP R, 68 dịch nổi bề mặt đối chứng âm
Thử nghiệm số 1 - % ức chế
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
-40%
-60%
-40%
-20%
0%
20%
40%
60%
80%
100%
Thử nghiệm số 2 - % ức chế
Dịch nổi bề mặt kháng CGRP R
Dịch nổi bề mặt đối chứng âm

Fig.6

Hàm lượng cAMP trong tế bào biểu hiện hCGRP R được kích thích bởi hCGRP 1nM

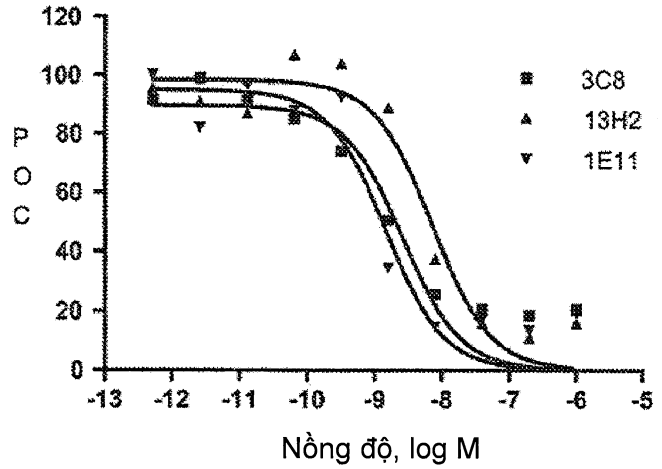


Fig.7A

^{125}I-CGRP liên kết vào thụ thể CGRP người

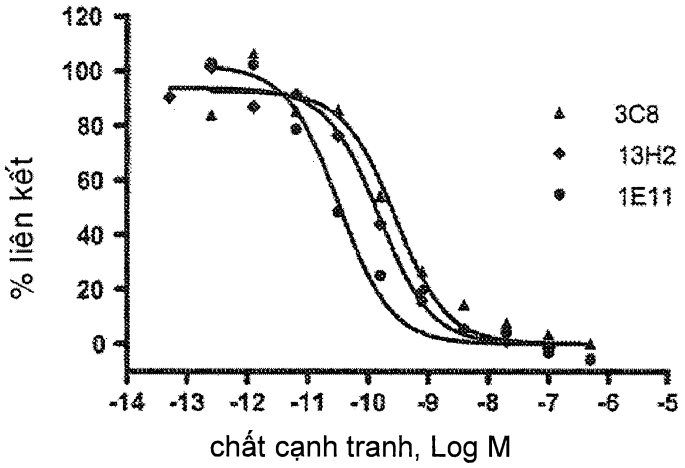


Fig.8

Hàm lượng cAMP trong tế bào hAM1-HEK

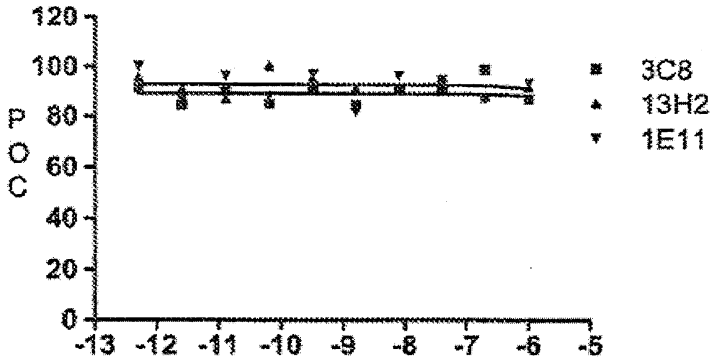


Fig.7B

Hàm lượng cAMP trong tế bào hAM2-CHO

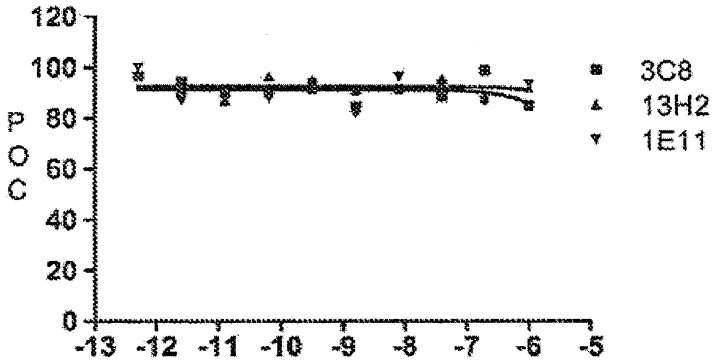


Fig.7C

Hàm lượng cAMP trong tế bào MCF-7
(biểu hiện thụ thể amylin người)

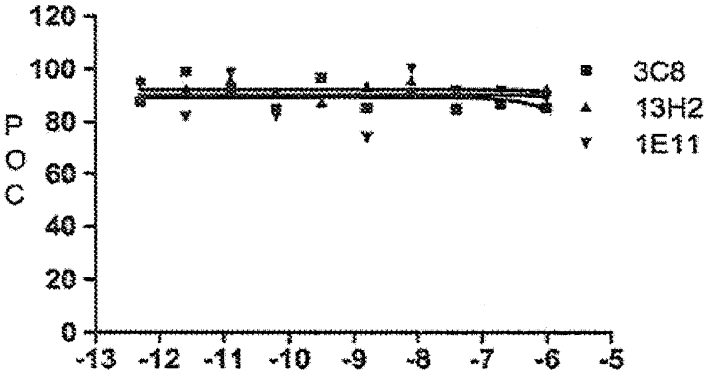


Fig.7D

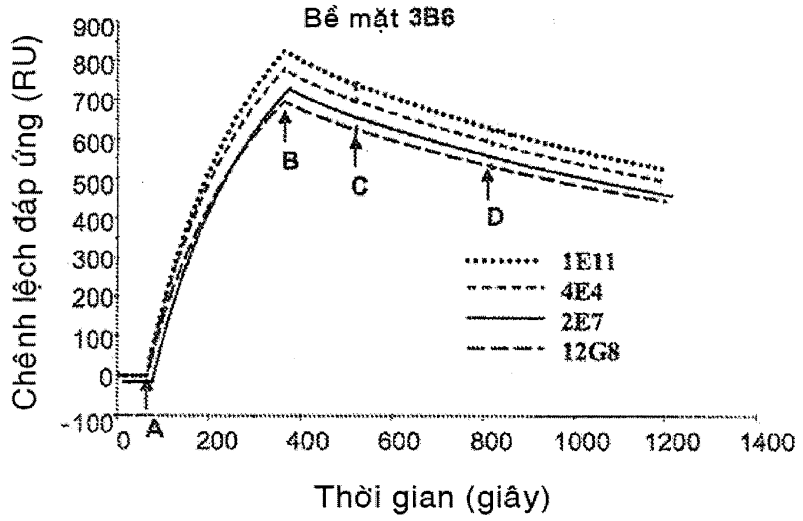

Bề mặt 3B6
Chênh lệch đáp ứng (RU)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
A
B
C
D
1E11
4E4
2E7
12G8
Thời gian (giây)

Fig.9A

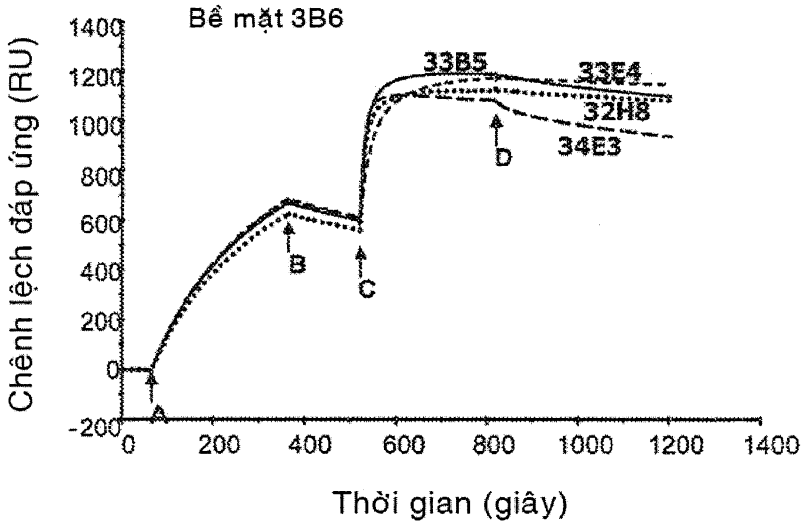

Bề mặt 3B6
Chênh lệch đáp ứng (RU)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
A
B
C
D
33B5
33E4
32H8
34E3
Thời gian (giây)

Fig.9B

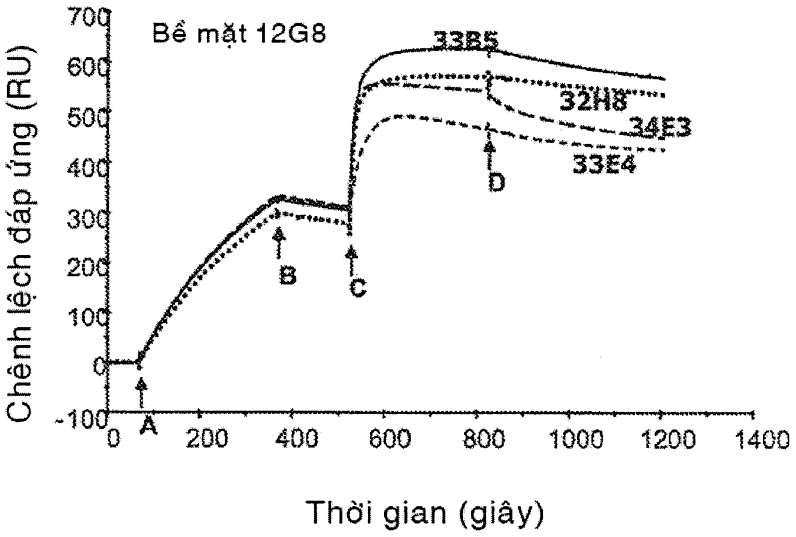

Bề mặt 12G8
33B5
32H8
34E3
33E4
Chênh lệch đáp ứng (RU)
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
A
B
C
D
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
Thời gian (giây)

Fig.9C

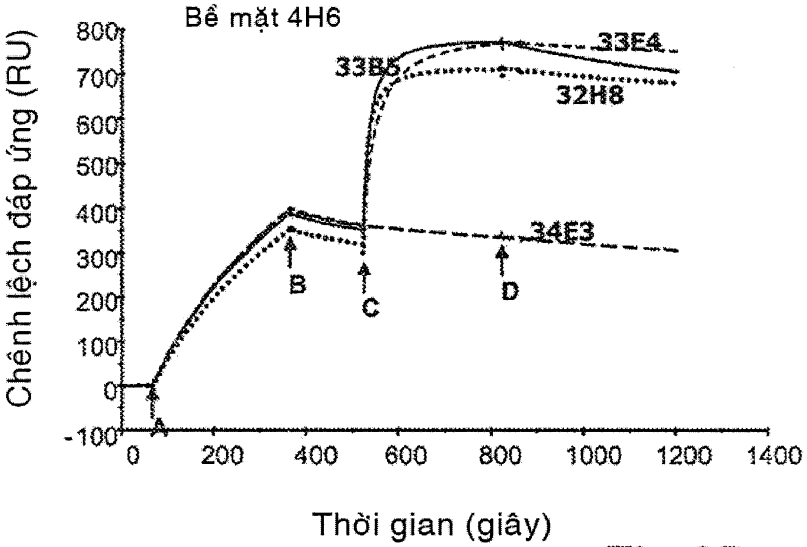

Bề mặt 4H6
33E4
33B5
32H8
34E3
Chênh lệch đáp ứng (RU)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
A
B
C
D
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
Thời gian (giây)

Fig.9D

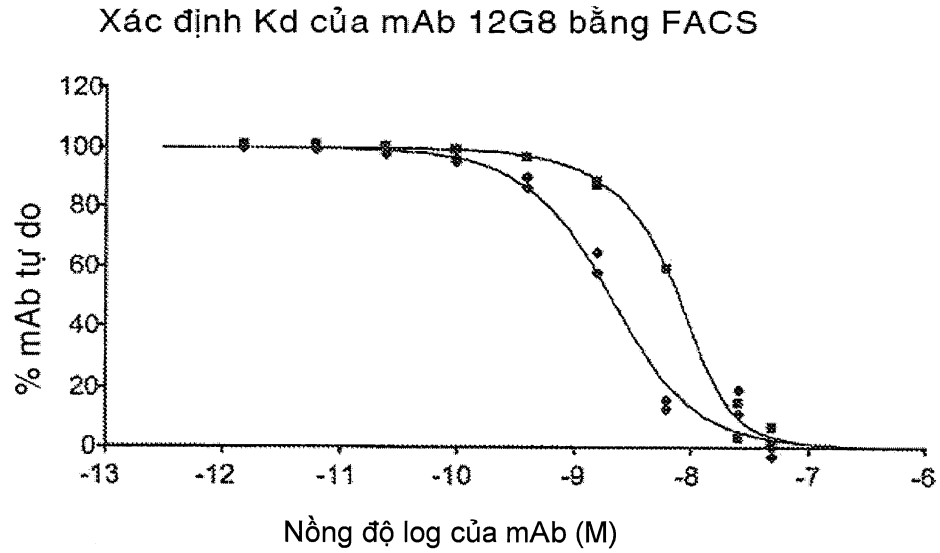
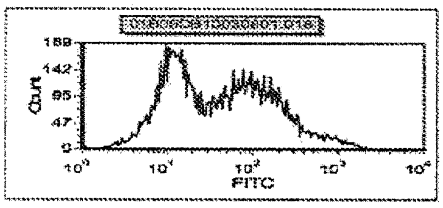
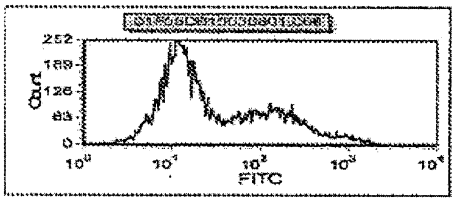


Fig.10



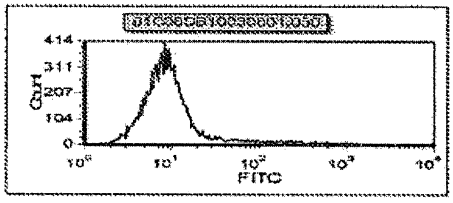
CRLR: RAMP1 kiểu dại

Fig.13A



CRLR L24-Q33: RAMP1

Fig.13B



CRLR: RAMP1 Q28-A34

Fig.13C

	1				50
RAMP1 của khỉ đuôi dài	MARALCRLPQ	RGLWLLLAHH	LFMATACQEA	NYGALLQELC	LTQFQVDMEA
RAMP1 của người	MARALCRLPR	RGLWLLLAHH	LFMTTACQEA	NYGALLRELC	LTQFQVDMEA
RAMP1 của người (Q28 – A34)	MARALCRLPR	RGLWLLLAHH	LFMTTACRDP	DYGTLLRELC	LTQFQVDMEA
RAMP1 của người (Q43 – E53)	MARALCRLPR	RGLWLLLAHH	LFMTTACQEA	NYGALLRELC	LTRFKEDMET
RAMP1 của người (R67 – E78)	MARALCRLPR	RGLWLLLAHH	LFMTTACQEA	NYGALLRELC	LTQFQVDMEA
RAMP1 của chuột cống	MAPGLRGLPR	RGLWLLLAHH	LFMVTACRDP	DYGTLIQELC	LSRFKEDMET
RAMP1 của khỉ redut	MARALCRLPQ	RGLWLLLAHH	LFMATACQEA	NYGALLQELC	LTQFQVDMEA

	51				100
RAMP1 của khỉ đuôi dài	VGETLWCDWG	RTIGSYRELA	DCTWHMAEKL	GCFWPNAEVD	RFFLAVHGHY
RAMP1 của người	VGETLWCDWG	RTIRSYRELA	DCTWHMAEKL	GCFWPNAEVD	RFFLAVHGRY
RAMP1 của người (Q28 – A34)	VGETLWCDWG	RTIRSYRELA	DCTWHMAEKL	GCFWPNAEVD	RFFLAVHGRY
RAMP1 của người (Q43 – E53)	IGKTLWCDWG	RTIRSYRELA	DCTWHMAEKL	GCFWPNAEVD	RFFLAVHGRY
RAMP1 của người (R67 – E78)	VGETLWCDWG	RTIRSYGELT	HCTKLVANKL	GCFWPNAEVD	RFFLAVHGRY
RAMP1 của chuột cống	IGKTLWCDWG	KTIGSYGELT	HCTKLVANKI	GCFWPNPEVD	KFFIAVHHRY
RAMP1 của khỉ redut	VGETLWCDWG	RTIGSYRELA	DCTWHMAEKL	GCFWPNAEVD	RFFLAVHGHY

	101				148
RAMP1 của khỉ đuôi dài	FRACPISGRA	VRDPPGSVLY	PFIVVPITVT	LLVTALVVWQ	SKHTEGIV
RAMP1 của người	FRSCPISGRA	VRDPPGSILY	PFIVVPITVT	LLVTALVVWQ	SKRTEGIV
RAMP1 của người (Q28 – A34)	FRSCPISGRA	VRDPPGSILY	PFIVVPITVT	LLVTALVVWQ	SKRTEGIV
RAMP1 của người (Q43 – E53)	FRSCPISGRA	VRDPPGSILY	PFIVVPITVT	LLVTALVVWQ	SKRTEGIV
RAMP1 của người (R67 – E78)	FRSCPISGRA	VRDPPGSILY	PFIVVPITVT	LLVTALVVWQ	SKRTEGIV
RAMP1 của chuột cống	FSKCPVSGRA	LRDPPNSILC	PFIVLPITVT	LLMTALVVWR	SKRTEGIV
RAMP1 của khỉ redut	FRACPISGRA	VRDPPGSVLY	PFIVVPITVT	LLVTALVVWQ	SKHTEGIV

Fig. 11

	1					50
CRLR của người	MEKKCTLYF	LVLLPFFMIL	VTAELEESPE	DSIQLGVTRN	KIMTAQYECY	
CRLR của khỉ đuôi dài	MEKKCTLYF	LVLLPFFMIF	VTAELEESPE	DSIQLGVTRN	KIMTAQYECY	
CRLR của khỉ redut	MEKKCTLYF	LVLLPFFMIF	VTAELEESPE	DSIQLGVTRN	KIMTAQYECY	
CRLR của chuột cống	MMDKKCTLCP	LFLLLLNMAL	IAAESEEGAN	QT-DLGVTRN	KIMTAQYECY	
CRLR của người (L24 – Q33)	MEKKCTLYF	LVLLPFFMIL	VTAESEEGAN	QT-DLGVTRN	KIMTAQYECY	
Trình tự liên ứng	MeKKCTLyF	LvLLpffMil	-tAE-EE---	----LGVTRN	KIMTAQYECY	
	51					100
CRLR của người	QKIMQDPIQQ	AEGVYCNRTW	DGWLCWNDVA	AGTESMQLCP	DYFQDFDPSE	
CRLR của khỉ đuôi dài	QKIMQDPIQQ	AEGVYCNRTW	DGWLCWNNVA	AGTESMQLCP	DYFQDFDPSE	
CRLR của khỉ redut	QKIMQDPIQQ	AEGVYCNRTW	DGWLCWNNVA	AGTESMQLCP	DYFQDFDPSE	
CRLR của chuột cống	QKIMQDPIQQ	GEGLYCNRTW	DGWLCWNDVA	AGTESMQYCP	DYFQDFDPSE	
CRLR của người (L24 – Q33)	QKIMQDPIQQ	AEGVYCNRTW	DGWLCWNDVA	AGTESMQLCP	DYFQDFDPSE	
Trình tự liên ứng	QKIMQDPIQQ	aEG-YCNRTW	DGWLCWN-VA	AGTESMQlCP	DYFQDFDPSE	
	101					150
CRLR của người	KVTKICDQDG	NWFRHPASNR	TWTNYTQCNV	NTHEKVKTAL	NLFYLTIIGH	
CRLR của khỉ đuôi dài	KVTKICDQDG	NWFRHPASNR	TWTNYTQCNV	NTHEKVKTAL	NLFYLTIIGH	
CRLR của khỉ redut	KVTKICDQDG	NWFRHPASNR	TWTNYTQCNV	NTHEKVKTAL	NLFYLTIIGH	
CRLR của chuột cống	KVTKICDQDG	NWFRHPDSNR	TWTNYTLCNN	STHEKVKTAL	NLFYLTIIGH	
CRLR của người (L24 – Q33)	KVTKICDQDG	NWFRHPASNR	TWTNYTQCNV	NTHEKVKTAL	NLFYLTIIGH	
Trình tự liên ứng	KVTKICDQDG	NWFRHPaSNR	TWTNYTqCNv	nTHEKVKTAL	NLFYLTIIGH	
	151					200
CRLR của người	GLSIASLLIS	LGIFFYFKSL	SCQRITLHKN	LFFSFVCNSV	VTIIHLTAVA	
CRLR của khỉ đuôi dài	GLSIASLLIS	LGIFFYFKSL	SCQRITLHKN	LFFSFVCNSV	VTIIHLTAVA	
CRLR của khỉ redut	GLSIASLLIS	LGIFFYFKSL	SCQRITLHKN	LFFSFVCNSI	VTIIHLTAVA	
CRLR của chuột cống	GLSIASLIIS	LIIFFYFKSL	SCQRITLHKN	LFFSFVCNSI	VTIIHLTAVA	
CRLR của người (L24 – Q33)	GLSIASLLIS	LGIFFYFKSL	SCQRITLHKN	LFFSFVCNSV	VTIIHLTAVA	
Trình tự liên ứng	GLSIASL-IS	LgIFFYFKSL	SCQRITLHKN	LFFSFVCNS-	VTIIHLTAVA	
	201					250
CRLR của người	NNQALVATNP	VSCKVSQFIH	LYLMGCNYFW	MLCEGIYLHT	LIVVAVFAEK	
CRLR của khỉ đuôi dài	NNQALVATNP	VSCKVSQFIH	LYLMGCNYFW	MLCEGIYLHT	LIVVAVFAEK	
CRLR của khỉ redut	NNQALVATNP	VSCKVSQFIH	LYLMGCNYFW	MLCEGIYLHT	LIVVAVFAEK	
CRLR của chuột cống	NNQALVATNP	VSCKVSQFIH	LYLMGCNYFW	MLCEGIYLHT	LIVVAVFAEK	
CRLR của người (L24 – Q33)	NNQALVATNP	VSCKVSQFIH	LYLMGCNYFW	MLCEGIYLHT	LIVVAVFAEK	
Trình tự liên ứng	NNQALVATNP	VSCKVSQFIH	LYLMGCNYFW	MLCEGIYLHT	LIVVAVFAEK	
	251					300
CRLR của người	QHLMWYYFLG	WGFPLIPACI	HAIARSLYYN	DNCWISSDTH	LLYIIHGPIC	
CRLR của khỉ đuôi dài	QHLMWYYFLG	WGFPLIPACI	HAIARSLYYN	DNCWISSDTH	LLYIIHGPIC	
CRLR của khỉ redut	QHLMWYYFLG	WGFPLIPACI	HAIARSLYYN	DNCWISSDTH	LLYIIHGPIC	
CRLR của chuột cống	QHLMWYYFLG	WGFPLLPACI	HAIARSLYYN	DNCWISSDTH	LLYIIHGPIC	
CRLR của người (L24 – Q33)	QHLMWYYFLG	WGFPLIPACI	HAIARSLYYN	DNCWISSDTH	LLYIIHGPIC	
Trình tự liên ứng	QHLMWYYFLG	WGFPL-PACI	HAIARSLYYN	DNCWISSDTH	LLYIIHGPIC	

Fig. 12A

	301				350
CRLR của người	AALLVNLFFL	LNIVRVLITK	LKVTHQAESN	LYMKAVRATL	ILVPLLGIEF
CRLR của khỉ đuôi dài	AALLVNLFFL	LNIVRVLITK	LKVTHQAESN	LYMKAVRATL	ILVPLLGIEF
CRLR của khỉ redut	AALLVNLFFL	LNIVRVLITK	LKVTHQAESN	LYMKAVRATL	ILVPLLGIEF
CRLR của chuột cống	AALLVNLFFL	LNIVRVLITK	LKVTHQAESN	LYMKAVRATL	ILVPLLGIEF
CRLR của người (L24 – Q33)	AALLVNLFFL	LNIVRVLITK	LKVTHQAESN	LYMKAVRATL	ILVPLLGIEF
Trình tự liên ứng	AALLVNLFFL	LNIVRVLITK	LKVTHQAESN	LYMKAVRATL	ILVPLLGIEF

	351				400
CRLR của người	VLIFWRFEGK	IAEEVYDYIM	HILMHFQGLL	VSTIFCFFNG	EVQAILRRNW
CRLR của khỉ đuôi dài	VLIFWRFEGK	IAEEVYDYIM	HILMHFQGLL	VSTIFCFFNG	EVQAILRRNW
CRLR của khỉ redut	VLIFWRFEGK	IAEEVYDYIM	HILMHFQGLL	VSTIFCFFNG	EVQAILRRNW
CRLR của chuột cống	VLFFWRFEGK	VAEEVYDYVM	HILMHYQGLL	VSTIFCFFNG	EVQAILRRNW
CRLR của người (L24 – Q33)	VLIFWRFEGK	IAEEVYDYIM	HILMHFQGLL	VSTIFCFFNG	EVQAILRRNW
Trình tự liên ứng	VLiFWRFEGK	-AEEVYDY-M	HILMH-QGLL	VSTIFCFFNG	EVQAILRRNW

	401				450
CRLR của người	NQYKIQFGNS	FSNSEALRSA	SYTVSTISDG	PGYSHDCPSE	HLNGKSIHDI
CRLR của khỉ đuôi dài	NQYKIQFGNS	FSNSEALRSA	SYTVSTISDG	PGYSHDCPSE	HLNGKSIHDI
CRLR của khỉ redut	NQYKIQFGNS	FSNSEALRSA	SYTVSTISDG	PGYSHDCPSE	HLNGKSIHDI
CRLR của chuột cống	NQYKIQFGNG	FSHSDALRSA	SYTVSTISDV	QGYSHDCPTE	HLNGKSIQDI
CRLR của người (L24 – Q33)	NQYKIQFGNS	FSNSEALRSA	SYTVSTISDG	PGYSHDCPSE	HLNGKSIHDI
Trình tự liên ứng	NQYKIQFGNs	FSnSeALRSA	SYTVSTISDg	pGYSHDCP-E	HLNGKSIhDI

	451	465
CRLR của người	ENVLLKPENL	YN---
CRLR của khỉ đuôi dài	ENVVLKPENL	YN---
CRLR của khỉ redut	ENVVLKPENL	YN---
CRLR của chuột cống	ENVALKPEKM	YDLVM
CRLR của người (L24 – Q33)	ENVLLKPENL	YN---
Trình tự liên ứng	ENV-LKPEn-	Y----

Fig. 12B

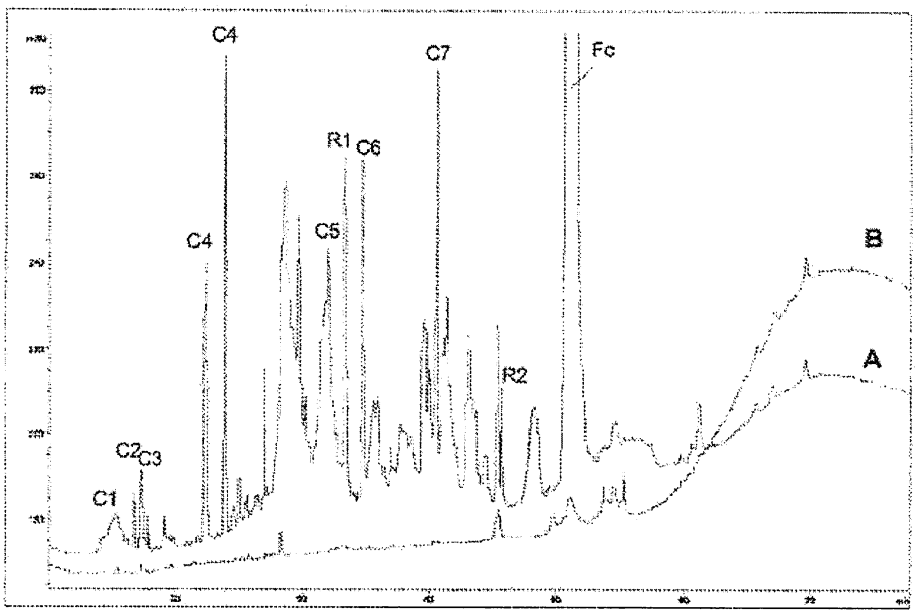

C4
C7
Fc
R1
C6
C5
C4
B
A
R2
C2
C3
C1

Fig.14

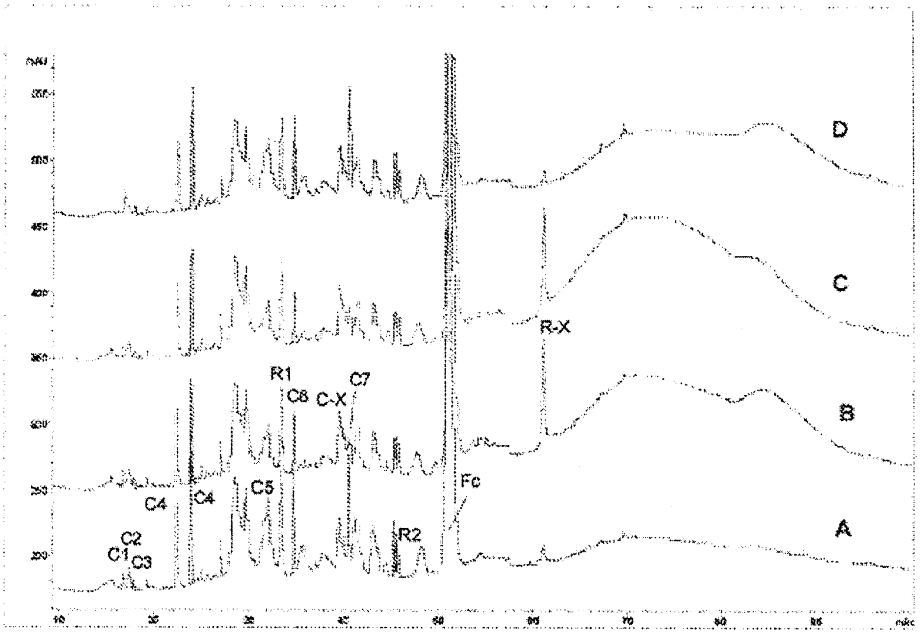

D
C
R-X
R1
C8
C-X
C7
B
Fc
C4
C4
C5
A
R2
C2
C1
C3

Fig.15

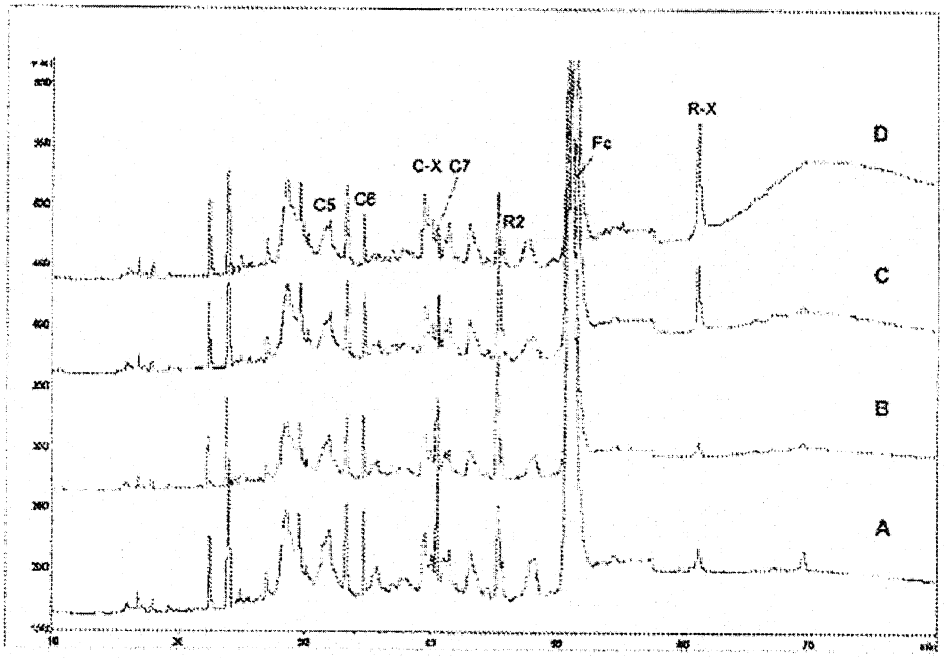


Fig.16

Cường độ nhuộm của 32H7
(0,03 – 0,1 µg/ml)

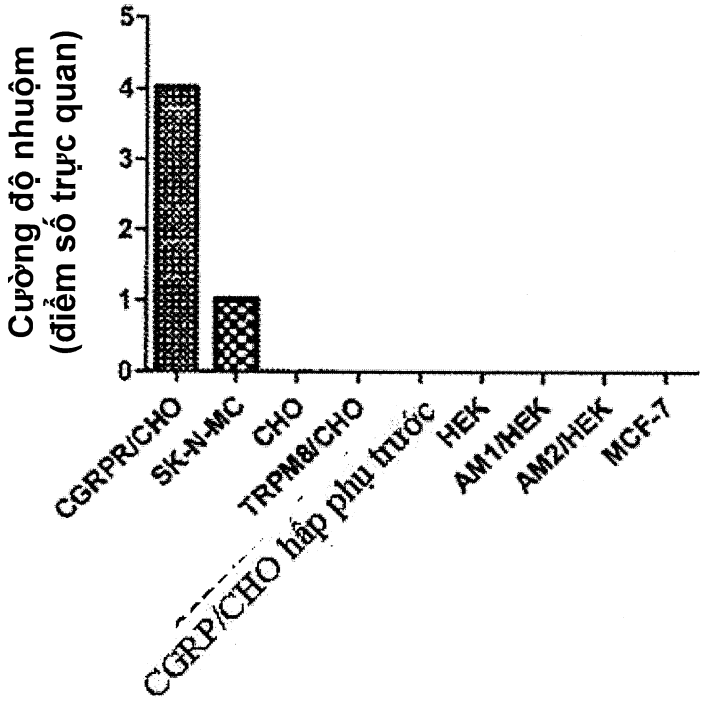


Fig.17

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> AMGEN INC.

<120> KHÁNG THỂ LIÊN KẾT THỤ THỂ PEPTIT LIÊN QUAN ĐẾN GEN CANXITONIN (CGRP) CỦA NGƯỜI VÀ POLYNUCLEOTIT PHÂN LẬP MÃ HÓA KHÁNG THỂ NÀY

<130> A-1472-WO-PCT

<140>
<141>

<150> 61/264,622
<151> 25-11-2009

<150> 61/203,569
<151> 23-12-2008

<160> 261

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 1419
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 1
atgttataca gcatatttca ttttggctta atgatggaga aaaagtgtac cctgtatttt 60

ctggttctct tgccttttt tatgattctt gttacagcag aattagaaga gagtcctgag 120

gactcaattc agttgggagt tactagaaat aaaatcatga cagctcaata tgaatgttac 180

caaaagatta tgcaagaccc cattcaacaa gcagaaggcg tttactgcaa cagaacctgg 240

gatggatggc tctgctggaa cgatgttgca gcaggaactg aatcaatgca gctctgccct 300

gattactttc aggactttga tccatcagaa aaagttacaa agatctgtga ccaagatgga 360

aactggttta gacatccagc aagcaacaga acatggacaa attataccca gtgtaatgtt 420

aacacccacg agaaagtgaa gactgcacta aatttgtttt acctgaccat aattggacac 480

ggattgtcta ttgcatcact gcttatctcg cttggcatat tcttttattt caagagccta 540

agttgccaaa ggattacctt acacaaaaat ctgttcttct catttgtttg taactctgtt
600

gtaacaatca ttcacctcac tgcagtggcc aacaaccagg ccttagtagc cacaaatcct
660

gttagttgca aagtgtccca gttcattcat ctttacctga tgggctgtaa ttacttttgg
720

atgctctgtg aaggcattta cctacacaca ctcattgtgg tggccgtgtt tgcagagaag
780

caacatttaa tgtggtatta ttttcttggc tggggatttc cactgattcc tgcttgtata
840

catgccattg ctagaagctt atattacaat gacaattgct ggatcagttc tgatacccat
900

ctcctctaca ttatccatgg cccaatttgt gctgctttac tggtgaatct ttttttcttg
960

ttaaatattg tacgcgttct catcaccaag ttaaaagtta cacaccaagc ggaatccaat
1020

ctgtacatga aagctgtgag agctactctt atcttggtgc cattgcttgg cattgaattt
1080

gtgctgattc catggcgacc tgaaggaaag attgcagagg aggtatatga ctacatcatg
1140

cacatcctta tgcacttcca gggtcttttg gtctctacca ttttctgctt ctttaatgga
1200

gaggttcaag caattctgag aagaaactgg aatcaataca aaatccaatt tggaaacagc
1260

ttttccaact cagaagctct tcgtagtgcg tcttacacag tgtcaacaat cagtgatggt
1320

ccaggttata gtcatgactg tcctagtgaa cacttaaatg gaaaaagcat ccatgatatt
1380

gaaaatgttc tcttaaaacc agaaaattta tataattga
1419

<210> 2
<211> 472
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Leu Tyr Ser Ile Phe His Phe Gly Leu Met Met Glu Lys Lys Cys

```
1               5                   10                  15

Thr Leu Tyr Phe Leu Val Leu Leu Pro Phe Phe Met Ile Leu Val Thr
            20                  25                  30

Ala Glu Leu Glu Glu Ser Pro Glu Asp Ser Ile Gln Leu Gly Val Thr
        35                  40                  45

Arg Asn Lys Ile Met Thr Ala Gln Tyr Glu Cys Tyr Gln Lys Ile Met
    50                  55                  60

Gln Asp Pro Ile Gln Gln Ala Glu Gly Val Tyr Cys Asn Arg Thr Trp
65                  70                  75                  80

Asp Gly Trp Leu Cys Trp Asn Asp Val Ala Ala Gly Thr Glu Ser Met
                85                  90                  95

Gln Leu Cys Pro Asp Tyr Phe Gln Asp Phe Asp Pro Ser Glu Lys Val
            100                 105                 110

Thr Lys Ile Cys Asp Gln Asp Gly Asn Trp Phe Arg His Pro Ala Ser
        115                 120                 125

Asn Arg Thr Trp Thr Asn Tyr Thr Gln Cys Asn Val Asn Thr His Glu
    130                 135                 140

Lys Val Lys Thr Ala Leu Asn Leu Phe Tyr Leu Thr Ile Ile Gly His
145                 150                 155                 160

Gly Leu Ser Ile Ala Ser Leu Leu Ile Ser Leu Gly Ile Phe Phe Tyr
                165                 170                 175

Phe Lys Ser Leu Ser Cys Gln Arg Ile Thr Leu His Lys Asn Leu Phe
            180                 185                 190

Phe Ser Phe Val Cys Asn Ser Val Val Thr Ile Ile His Leu Thr Ala
        195                 200                 205

Val Ala Asn Asn Gln Ala Leu Val Ala Thr Asn Pro Val Ser Cys Lys
    210                 215                 220
```

```
Val Ser Gln Phe Ile His Leu Tyr Leu Met Gly Cys Asn Tyr Phe Trp
225                 230                 235                 240

Met Leu Cys Glu Gly Ile Tyr Leu His Thr Leu Ile Val Val Ala Val
                245                 250                 255

Phe Ala Glu Lys Gln His Leu Met Trp Tyr Tyr Phe Leu Gly Trp Gly
            260                 265                 270

Phe Pro Leu Ile Pro Ala Cys Ile His Ala Ile Ala Arg Ser Leu Tyr
        275                 280                 285

Tyr Asn Asp Asn Cys Trp Ile Ser Ser Asp Thr His Leu Leu Tyr Ile
    290                 295                 300

Ile His Gly Pro Ile Cys Ala Ala Leu Leu Val Asn Leu Phe Phe Leu
305                 310                 315                 320

Leu Asn Ile Val Arg Val Leu Ile Thr Lys Leu Lys Val Thr His Gln
                325                 330                 335

Ala Glu Ser Asn Leu Tyr Met Lys Ala Val Arg Ala Thr Leu Ile Leu
            340                 345                 350

Val Pro Leu Leu Gly Ile Glu Phe Val Leu Ile Pro Trp Arg Pro Glu
        355                 360                 365

Gly Lys Ile Ala Glu Glu Val Tyr Asp Tyr Ile Met His Ile Leu Met
    370                 375                 380

His Phe Gln Gly Leu Leu Val Ser Thr Ile Phe Cys Phe Phe Asn Gly
385                 390                 395                 400

Glu Val Gln Ala Ile Leu Arg Arg Asn Trp Asn Gln Tyr Lys Ile Gln
                405                 410                 415

Phe Gly Asn Ser Phe Ser Asn Ser Glu Ala Leu Arg Ser Ala Ser Tyr
            420                 425                 430

Thr Val Ser Thr Ile Ser Asp Gly Pro Gly Tyr Ser His Asp Cys Pro
```

435 440 445

Ser Glu His Leu Asn Gly Lys Ser Ile His Asp Ile Glu Asn Val Leu
450 455 460

Leu Lys Pro Glu Asn Leu Tyr Asn
465 470

<210> 3
<211> 447
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 3
atggcccggg ccctgtgccg cctcccgcgg cgcggcctct ggctgctcct ggcccatcac
60

ctcttcatga ccactgcctg ccaggaggct aactacggtg ccctcctccg ggagctctgc
120

ctcacccagt tccaggtaga catggaggcc gtcggggaga cgctgtggtg tgactggggc
180

aggaccatca ggagctacag ggagctggcc gactgcacct ggcacatggc ggagaagctg
240

ggctgcttct ggcccaatgc agaggtggac aggttcttcc tggcagtgca tggccgctac
300

ttcaggagct gccccatctc aggcagggcc gtgcgggacc cgcccggcag catcctctac
360

cccttcatcg tggtccccat cacggtgacc ctgctggtga cggcactggt ggtctggcag
420

agcaagcgca ctgagggcat tgtgtag
447

<210> 4
<211> 148
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Met Ala Arg Ala Leu Cys Arg Leu Pro Arg Arg Gly Leu Trp Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala His His Leu Phe Met Thr Thr Ala Cys Gln Glu Ala Asn Tyr
20 25 30

Gly Ala Leu Leu Arg Glu Leu Cys Leu Thr Gln Phe Gln Val Asp Met
35 40 45

Glu Ala Val Gly Glu Thr Leu Trp Cys Asp Trp Gly Arg Thr Ile Arg
50 55 60

Ser Tyr Arg Glu Leu Ala Asp Cys Thr Trp His Met Ala Glu Lys Leu
65 70 75 80

Gly Cys Phe Trp Pro Asn Ala Glu Val Asp Arg Phe Phe Leu Ala Val
85 90 95

His Gly Arg Tyr Phe Arg Ser Cys Pro Ile Ser Gly Arg Ala Val Arg
100 105 110

Asp Pro Pro Gly Ser Ile Leu Tyr Pro Phe Ile Val Val Pro Ile Thr
115 120 125

Val Thr Leu Leu Val Thr Ala Leu Val Val Trp Gln Ser Lys Arg Thr
130 135 140

Glu Gly Ile Val
145

<210> 5
<211> 414
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 5
atggagaaaa agtgtaccct gtattttctg gttctcttgc ctttttttat gattcttgtt
60

acagcagaat tagaagagag tcctgaggac tcaattcagt tgggagttac tagaaataaa
120

atcatgacag ctcaatatga atgttaccaa aagattatgc aagaccccat tcaacaagca
180

gaaggcgttt actgcaacag aacctgggat ggatggctct gctggaacga tgttgcagca
240

ggaactgaat caatgcagct ctgccctgat tactttcagg actttgatcc atcagaaaaa
300

gttacaaaga tctgtgacca agatggaaac tggtttagac atccagcaag caacagaaca
360

tggacaaatt atacccagtg taatgttaac acccacgaga aagtgaagac tgca
414

<210> 6
<211> 138
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Glu Lys Lys Cys Thr Leu Tyr Phe Leu Val Leu Leu Pro Phe Phe
1 5 10 15

Met Ile Leu Val Thr Ala Glu Leu Glu Glu Ser Pro Glu Asp Ser Ile
20 25 30

Gln Leu Gly Val Thr Arg Asn Lys Ile Met Thr Ala Gln Tyr Glu Cys
35 40 45

Tyr Gln Lys Ile Met Gln Asp Pro Ile Gln Gln Ala Glu Gly Val Tyr
50 55 60

Cys Asn Arg Thr Trp Asp Gly Trp Leu Cys Trp Asn Asp Val Ala Ala
65 70 75 80

Gly Thr Glu Ser Met Gln Leu Cys Pro Asp Tyr Phe Gln Asp Phe Asp
85 90 95

Pro Ser Glu Lys Val Thr Lys Ile Cys Asp Gln Asp Gly Asn Trp Phe
100 105 110

Arg His Pro Ala Ser Asn Arg Thr Trp Thr Asn Tyr Thr Gln Cys Asn
115 120 125

Val Asn Thr His Glu Lys Val Lys Thr Ala
130 135

<210> 7
<211> 351
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7
atggcccggg ccctgtgccg cctcccgcgg cgcggcctct ggctgctcct ggcccatcac
60

ctcttcatga ccactgcctg ccaggaggct aactacggtg ccctcctccg ggagctctgc
120

ctcacccagt tccaggtaga catggaggcc gtcggggaga cgctgtggtg tgactggggc
180

aggaccatca ggagctacag ggagctggcc gactgcacct ggcacatggc ggagaagctg
240

ggctgcttct ggcccaatgc agaggtggac aggttcttcc tggcagtgca tggccgctac
300

ttcaggagct gccccatctc aggcagggcc gtgcgggacc cgcccggcag c
351

<210> 8
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Met Ala Arg Ala Leu Cys Arg Leu Pro Arg Arg Gly Leu Trp Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala His His Leu Phe Met Thr Thr Ala Cys Gln Glu Ala Asn Tyr
20 25 30

Gly Ala Leu Leu Arg Glu Leu Cys Leu Thr Gln Phe Gln Val Asp Met
35 40 45

Glu Ala Val Gly Glu Thr Leu Trp Cys Asp Trp Gly Arg Thr Ile Arg
50 55 60

Ser Tyr Arg Glu Leu Ala Asp Cys Thr Trp His Met Ala Glu Lys Leu
65 70 75 80

Gly Cys Phe Trp Pro Asn Ala Glu Val Asp Arg Phe Phe Leu Ala Val
85 90 95

His Gly Arg Tyr Phe Arg Ser Cys Pro Ile Ser Gly Arg Ala Val Arg
100 105 110

Asp Pro Pro Gly Ser
115

<210> 9
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Trp Val Thr His Arg Leu Ala Gly Leu Leu Ser Arg Ser Gly Gly Val
1 5 10 15

Val Arg Cys Asn Phe Val Pro Thr Asp Val Gly Pro Phe Ala Phe
20 25 30

<210> 10
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Glu Leu Glu Glu Ser Pro Glu Asp Ser Ile Gln Leu Gly Val Thr Arg
1 5 10 15

Asn Lys Ile Met Thr Ala Gln Tyr Glu Cys Tyr Gln Lys Ile Met Gln
20 25 30

Asp Pro Ile Gln Gln Ala Glu Gly Val Tyr Cys Asn Arg Thr Trp Asp
35 40 45

Gly Trp Leu Cys Trp Asn Asp Val Ala Ala Gly Thr Glu Ser Met Gln
50 55 60

Leu Cys Pro Asp Tyr Phe Gln Asp Phe Asp Pro Ser Glu Lys Val Thr
65 70 75 80

Lys Ile Cys Asp Gln Asp Gly Asn Trp Phe Arg His Pro Ala Ser Asn
85 90 95

Arg Thr Trp Thr Asn Tyr Thr Gln Cys Asn Val Asn Thr His Glu Lys
100 105 110

Val Lys Thr Ala

115

<210> 11
<211> 91
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Cys Gln Glu Ala Asn Tyr Gly Ala Leu Leu Arg Glu Leu Cys Leu Thr
1 5 10 15

Gln Phe Gln Val Asp Met Glu Ala Val Gly Glu Thr Leu Trp Cys Asp
20 25 30

Trp Gly Arg Thr Ile Arg Ser Tyr Arg Glu Leu Ala Asp Cys Thr Trp
35 40 45

His Met Ala Glu Lys Leu Gly Cys Phe Trp Pro Asn Ala Glu Val Asp
50 55 60

Arg Phe Phe Leu Ala Val His Gly Arg Tyr Phe Arg Ser Cys Pro Ile
65 70 75 80

Ser Gly Arg Ala Val Arg Asp Pro Pro Gly Ser
85 90

<210> 12
<211> 238
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 12
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
20 25 30

Ser Glu Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser
35 40 45

```
Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly
    50                  55                  60

Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly
65                  70                  75                  80

Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu
                85                  90                  95

Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
            100                 105                 110

Thr Trp Asp Ser Arg Leu Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
        115                 120                 125

Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe
    130                 135                 140

Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys
145                 150                 155                 160

Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala
                165                 170                 175

Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys
            180                 185                 190

Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
        195                 200                 205

Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu
    210                 215                 220

Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225                 230                 235
```

<210> 13
<211> 238
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 13

```
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1               5                  10                  15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala
            20                  25                  30

Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser
        35                  40                  45

Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly
    50                  55                  60

Ala Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Arg Ser Asn Gln Arg Pro Ser Gly
65                  70                  75                  80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu
                85                  90                  95

Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala
            100                 105                 110

Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
        115                 120                 125

Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe
    130                 135                 140

Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys
145                 150                 155                 160

Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala
                165                 170                 175

Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys
            180                 185                 190

Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
```

195 200 205

Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu
210 215 220

Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 14
<211> 236
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp polypeptit"

<400> 14
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
100 105 110

Tyr Asn Ile Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

```
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
    130                 135                 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145                 150                 155                 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
            180                 185                 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
        195                 200                 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
    210                 215                 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235


<210> 15
<211> 236
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 15
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1               5                   10                  15

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

Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Lys Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser
        35                  40                  45

Leu Arg Ser Phe Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
    50                  55                  60
```

```
Pro Val Leu Val Phe Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile
                85                  90                  95

Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg
            100                 105                 110

Asp Ser Ser Val Tyr His Leu Val Leu Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
        115                 120                 125

Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro
    130                 135                 140

Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile
145                 150                 155                 160

Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly
                165                 170                 175

Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser
            180                 185                 190

Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln
        195                 200                 205

Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser
    210                 215                 220

Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225                 230                 235
```

<210> 16
<211> 241
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 16

```
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1               5                  10                  15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Ile Leu Ala Gln Thr Pro Leu Ser
            20                  25                  30

Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser
        35                  40                  45

Gln Ser Leu Leu His Ser Ala Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu
    50                  55                  60

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn
65                  70                  75                  80

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
                85                  90                  95

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Phe Pro Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
    130                 135                 140

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
145                 150                 155                 160

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
                165                 170                 175

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
            180                 185                 190

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
        195                 200                 205

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
    210                 215                 220
```

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
225 230 235 240

Cys

<210> 17
<211> 238
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 17
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
20 25 30

Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser
35 40 45

Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly
50 55 60

Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly
65 70 75 80

Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Thr Thr Leu
85 90 95

Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
100 105 110

Thr Trp Asp Ser Arg Leu Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe
130 135 140

```
Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys
145                 150                 155                 160

Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala
                165                 170                 175

Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys
            180                 185                 190

Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
        195                 200                 205

Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu
    210                 215                 220

Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225                 230                 235


<210> 18
<211> 241
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 18
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1               5                   10                  15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser
            20                  25                  30

Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
        35                  40                  45

Gln Ser Leu Leu His Ser Phe Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu
    50                  55                  60

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn
65                  70                  75                  80
```

```
Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
                85                  90                  95

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly
        115                 120                 125

Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
    130                 135                 140

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
145                 150                 155                 160

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
                165                 170                 175

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
            180                 185                 190

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
        195                 200                 205

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
    210                 215                 220

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
225                 230                 235                 240

Cys
```

<210> 19
<211> 241
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 19

```
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1               5                  10                  15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Ile Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser
            20                  25                  30

Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser
        35                  40                  45

Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu
    50                  55                  60

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn
65                  70                  75                  80

Arg Phe Ser Gly Glu Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
                85                  90                  95

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Phe Pro Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
    130                 135                 140

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
145                 150                 155                 160

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
                165                 170                 175

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
            180                 185                 190

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
        195                 200                 205
```

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
210 215 220

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
225 230 235 240

Cys

<210> 20
<211> 238
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 20
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
20 25 30

Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser
35 40 45

Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly
50 55 60

Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly
65 70 75 80

Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu
85 90 95

Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
100 105 110

Thr Trp Asp Ser Arg Leu Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys
145 150 155 160

Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala
165 170 175

Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys
180 185 190

Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
195 200 205

Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu
210 215 220

Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 21
<211> 238
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 21
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gln Ser Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala
20 25 30

Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser
35 40 45

Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly
50 55 60

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

65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala
100 105 110

Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys
145 150 155 160

Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala
165 170 175

Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys
180 185 190

Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
195 200 205

Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu
210 215 220

Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 22
<211> 238
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 22
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

```
Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala
            20                  25                  30

Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser
        35                  40                  45

Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly
    50                  55                  60

Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly
65                  70                  75                  80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu
                85                  90                  95

Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Phe Tyr Cys Ala
            100                 105                 110

Ala Arg Asp Glu Ser Leu Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
        115                 120                 125

Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe
    130                 135                 140

Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys
145                 150                 155                 160

Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala
                165                 170                 175

Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys
            180                 185                 190

Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
        195                 200                 205

Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu
    210                 215                 220
```

Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 23
<211> 238
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 23
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala
20 25 30

Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser
35 40 45

Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly
50 55 60

Ala Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly
65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu
85 90 95

Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala
100 105 110

Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys
145 150 155 160

```
Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala
                165                 170                 175

Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys
            180                 185                 190

Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
        195                 200                 205

Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu
    210                 215                 220

Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225                 230                 235
```

<210> 24
<211> 241
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 24

```
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1               5                  10                  15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Thr Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser
            20                  25                  30

Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser
        35                  40                  45

Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Arg Asn Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu
    50                  55                  60

Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn
65                  70                  75                  80

Arg Phe Ser Gly Leu Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
                85                  90                  95
```

```
Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Phe Pro Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
    130                 135                 140

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
145                 150                 155                 160

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
                165                 170                 175

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
            180                 185                 190

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
        195                 200                 205

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
    210                 215                 220

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
225                 230                 235                 240

Cys
```

<210> 25
<211> 238
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 25

```
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1               5                   10                  15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val
```

20 25 30

Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser
35 40 45

Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly
50 55 60

Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly
65 70 75 80

Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu
85 90 95

Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
100 105 110

Thr Trp Asp Ser Arg Leu Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys
145 150 155 160

Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala
165 170 175

Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys
180 185 190

Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro
195 200 205

Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu
210 215 220

Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 26
<211> 236
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 26

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Arg Lys Asp Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
100 105 110

Tyr Asn Ser Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

```
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
            180                 185                 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
        195                 200                 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
    210                 215                 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235


<210> 27
<211> 235
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 27
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1               5                   10                  15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
            20                  25                  30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Val Ser Ser Gly Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
    50                  55                  60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
                85                  90                  95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
            100                 105                 110

Gly Asn Ser Leu Cys Arg Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
```

```
        115                 120                 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
    130                 135                 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145                 150                 155                 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
            180                 185                 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
        195                 200                 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
    210                 215                 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235


<210> 28
<211> 235
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 28
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1               5                   10                  15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
            20                  25                  30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        35                  40                  45

Val Ser Ser Gly Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
    50                  55                  60
```

```
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65                  70                  75                  80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
                85                  90                  95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
            100                 105                 110

Gly Asn Ser Leu Ser Arg Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
        115                 120                 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
    130                 135                 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145                 150                 155                 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
            180                 185                 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
        195                 200                 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
    210                 215                 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230                 235


<210> 29
<211> 478
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
```

<400> 29

```
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1               5                  10                  15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
            20                  25                  30

Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
        35                  40                  45

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
    50                  55                  60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Ile Lys
65                  70                  75                  80

Tyr Ser Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
                85                  90                  95

Ser Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
            100                 105                 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Leu Asn Tyr Tyr Asp Ser
        115                 120                 125

Ser Gly Tyr Tyr His Tyr Lys Tyr Tyr Gly Met Ala Val Trp Gly Gln
    130                 135                 140

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
145                 150                 155                 160

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
                165                 170                 175

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
            180                 185                 190

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
        195                 200                 205

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
```

```
    210                 215                 220

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
225                 230                 235                 240

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
                245                 250                 255

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
            260                 265                 270

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
        275                 280                 285

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
    290                 295                 300

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
305                 310                 315                 320

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
                325                 330                 335

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
            340                 345                 350

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
        355                 360                 365

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
    370                 375                 380

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
385                 390                 395                 400

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
                405                 410                 415

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
            420                 425                 430
```

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
435 440 445

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
450 455 460

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 30
<211> 479
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 30
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
20 25 30

Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35 40 45

Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Lys Ser Thr Thr Asp Gly Gly
65 70 75 80

Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
100 105 110

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Asp Arg Thr Gly Tyr Ser
115 120 125

```
Ile Ser Trp Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
    130                 135                 140

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
145                 150                 155                 160

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
                165                 170                 175

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
            180                 185                 190

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
        195                 200                 205

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
    210                 215                 220

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
225                 230                 235                 240

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
                245                 250                 255

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
            260                 265                 270

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
        275                 280                 285

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
    290                 295                 300

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
305                 310                 315                 320

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
                325                 330                 335

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
            340                 345                 350
```

```
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
        355                 360                 365

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
    370                 375                 380

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
385                 390                 395                 400

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
                405                 410                 415

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
            420                 425                 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
        435                 440                 445

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
    450                 455                 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475


<210> 31
<211> 478
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 31
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1               5                   10                  15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
            20                  25                  30

Leu Val Gln Pro Gly Glu Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
        35                  40                  45
```

```
Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
    50                  55                  60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
                85                  90                  95

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
            100                 105                 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Gln Arg Glu Val Gly Pro Tyr
        115                 120                 125

Ser Ser Gly Trp Tyr Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
    130                 135                 140

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
145                 150                 155                 160

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
                165                 170                 175

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
            180                 185                 190

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
        195                 200                 205

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
    210                 215                 220

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
225                 230                 235                 240

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
                245                 250                 255

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
```

260 265 270

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
275 280 285

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
290 295 300

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
305 310 315 320

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
325 330 335

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
340 345 350

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
355 360 365

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
370 375 380

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
385 390 395 400

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
405 410 415

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
420 425 430

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
435 440 445

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
450 455 460

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 32
<211> 478
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 32

```
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1               5                  10                  15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
            20                  25                  30

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
        35                  40                  45

Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
    50                  55                  60

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
65                  70                  75                  80

Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
                85                  90                  95

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp
            100                 105                 110

Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gln Met Ser Ile Ile Met Leu
        115                 120                 125

Arg Gly Val Phe Pro Pro Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
    130                 135                 140

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
145                 150                 155                 160

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
                165                 170                 175
```

```
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
            180                 185                 190

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
        195                 200                 205

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
    210                 215                 220

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
225                 230                 235                 240

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
                245                 250                 255

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
            260                 265                 270

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
        275                 280                 285

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
    290                 295                 300

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
305                 310                 315                 320

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
                325                 330                 335

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
            340                 345                 350

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
        355                 360                 365

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
    370                 375                 380

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
385                 390                 395                 400
```

```
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
                405                 410                 415

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
            420                 425                 430

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
        435                 440                 445

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
    450                 455                 460

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 33
<211> 477
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 33

```
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1               5                   10                  15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
            20                  25                  30

Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
        35                  40                  45

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
    50                  55                  60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser His Glu
65                  70                  75                  80

Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile
                85                  90                  95
```

```
Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
            100                 105                 110

Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Arg Lys Arg Val Thr Met Ser
        115                 120                 125

Thr Leu Tyr Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
    130                 135                 140

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
145                 150                 155                 160

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
                165                 170                 175

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
            180                 185                 190

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
        195                 200                 205

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
    210                 215                 220

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
225                 230                 235                 240

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
                245                 250                 255

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
            260                 265                 270

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
        275                 280                 285

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
    290                 295                 300

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
```

305 310 315 320

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
325 330 335

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
340 345 350

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
355 360 365

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
370 375 380

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
385 390 395 400

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
405 410 415

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
420 425 430

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
435 440 445

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
450 455 460

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 34
<211> 469
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 34
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

```
Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
            20                  25                  30

Leu Val Lys Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly
        35                  40                  45

Phe Thr Phe Gly Asp Tyr Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
    50                  55                  60

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Phe Ile Arg Ser Arg Ala Tyr Gly Gly
65                  70                  75                  80

Thr Pro Glu Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
                85                  90                  95

Asp Asp Ser Lys Thr Ile Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
            100                 105                 110

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Arg Gly Ile Ala Ala
        115                 120                 125

Arg Trp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
    130                 135                 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
145                 150                 155                 160

Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
                165                 170                 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
            180                 185                 190

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
        195                 200                 205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr
    210                 215                 220
```

```
Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr
225                 230                 235                 240

Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro
                245                 250                 255

Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
            260                 265                 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
        275                 280                 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
    290                 295                 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
305                 310                 315                 320

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu
                325                 330                 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala
            340                 345                 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
        355                 360                 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
    370                 375                 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385                 390                 395                 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
                405                 410                 415

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
            420                 425                 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
        435                 440                 445
```

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 35
<211> 479
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 35
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
20 25 30

Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35 40 45

Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly
65 70 75 80

Thr Thr Asp Tyr Thr Ala Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala
100 105 110

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Asp Arg Thr Gly Tyr Ser
115 120 125

Ile Ser Trp Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
130 135 140

```
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
145                 150                 155                 160

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
                165                 170                 175

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
            180                 185                 190

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
        195                 200                 205

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
    210                 215                 220

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
225                 230                 235                 240

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
                245                 250                 255

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
            260                 265                 270

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
        275                 280                 285

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
    290                 295                 300

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
305                 310                 315                 320

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
                325                 330                 335

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
            340                 345                 350

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
```

```
        355                 360                 365

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
    370                 375                 380

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
385                 390                 395                 400

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
                405                 410                 415

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
            420                 425                 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
        435                 440                 445

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
    450                 455                 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475


<210> 36
<211> 475
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 36
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1               5                   10                  15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
            20                  25                  30

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
        35                  40                  45

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
    50                  55                  60
```

```
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Pro Asn Ser Gly Gly Thr
65                  70                  75                  80

Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
                85                  90                  95

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp
            100                 105                 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg Gly Gly Tyr Ser Gly Tyr Ala Gly
        115                 120                 125

Leu Tyr Ser His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
    130                 135                 140

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
145                 150                 155                 160

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
                165                 170                 175

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
            180                 185                 190

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
        195                 200                 205

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn
    210                 215                 220

Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
225                 230                 235                 240

Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro
                245                 250                 255

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
            260                 265                 270
```

```
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
        275                 280                 285

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
    290                 295                 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
305                 310                 315                 320

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
                325                 330                 335

Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
            340                 345                 350

Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
        355                 360                 365

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
    370                 375                 380

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
385                 390                 395                 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
                405                 410                 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
            420                 425                 430

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
        435                 440                 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
    450                 455                 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475
```

<210> 37
<211> 479

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 37

```
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1               5                  10                  15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
            20                  25                  30

Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
        35                  40                  45

Phe Thr Phe Gly Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
    50                  55                  60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly
65                  70                  75                  80

Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
                85                  90                  95

Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
            100                 105                 110

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Thr Thr Asp Arg Thr Gly Tyr Ser
        115                 120                 125

Ile Ser Trp Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
    130                 135                 140

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
145                 150                 155                 160

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
                165                 170                 175

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
            180                 185                 190
```

```
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
        195                 200                 205

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
    210                 215                 220

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
225                 230                 235                 240

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
                245                 250                 255

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
            260                 265                 270

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
        275                 280                 285

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
    290                 295                 300

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
305                 310                 315                 320

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
                325                 330                 335

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
            340                 345                 350

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
        355                 360                 365

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
    370                 375                 380

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
385                 390                 395                 400

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
```

405 410 415

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
420 425 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
435 440 445

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
450 455 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 38
<211> 479
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 38
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
20 25 30

Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35 40 45

Phe Thr Phe Gly Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly
65 70 75 80

Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
85 90 95

Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
100 105 110

```
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Asp Arg Thr Gly Tyr Ser
        115                 120                 125

Ile Ser Trp Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
    130                 135                 140

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
145                 150                 155                 160

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
                165                 170                 175

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
            180                 185                 190

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
        195                 200                 205

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
    210                 215                 220

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
225                 230                 235                 240

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
                245                 250                 255

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
            260                 265                 270

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
        275                 280                 285

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
    290                 295                 300

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
305                 310                 315                 320
```

```
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
                325                 330                 335

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
            340                 345                 350

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
        355                 360                 365

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
    370                 375                 380

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
385                 390                 395                 400

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
                405                 410                 415

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
            420                 425                 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
        435                 440                 445

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
    450                 455                 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470                 475


<210> 39
<211> 478
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 39
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1               5                   10                  15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
```

```
            20                  25                  30

Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
        35                  40                  45

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
    50                  55                  60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Ile Lys
65                  70                  75                  80

Tyr Ser Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
                85                  90                  95

Ser Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
            100                 105                 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Leu Asn Tyr Tyr Asp Ser
        115                 120                 125

Ser Gly Tyr Tyr His Tyr Lys Tyr Tyr Gly Leu Ala Val Trp Gly Gln
    130                 135                 140

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
145                 150                 155                 160

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
                165                 170                 175

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
            180                 185                 190

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
        195                 200                 205

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
    210                 215                 220

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
225                 230                 235                 240
```

```
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
                245                 250                 255

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
            260                 265                 270

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
        275                 280                 285

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
    290                 295                 300

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
305                 310                 315                 320

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
                325                 330                 335

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
            340                 345                 350

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
        355                 360                 365

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
    370                 375                 380

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
385                 390                 395                 400

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
                405                 410                 415

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
            420                 425                 430

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
        435                 440                 445

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
```

450 455 460

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 40
<211> 479
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 40
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
20 25 30

Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35 40 45

Tyr Thr Phe Ser Thr Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Arg
65 70 75 80

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
85 90 95

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp
100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Val Ser Gly Ser Ser Pro
115 120 125

Tyr Ser Ile Ser Trp Tyr Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
130 135 140

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
145 150 155 160

```
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
                165                 170                 175

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
            180                 185                 190

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
        195                 200                 205

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
    210                 215                 220

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
225                 230                 235                 240

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
                245                 250                 255

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
            260                 265                 270

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
        275                 280                 285

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
    290                 295                 300

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
305                 310                 315                 320

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
                325                 330                 335

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
            340                 345                 350

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
        355                 360                 365
```

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
370 375 380

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
385 390 395 400

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
405 410 415

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
420 425 430

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
435 440 445

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
450 455 460

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 41
<211> 474
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 41
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
20 25 30

Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35 40 45

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys

65 70 75 80

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Lys
85 90 95

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Gly Gly Ile Ala Ala Ala Gly
115 120 125

Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
130 135 140

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
145 150 155 160

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
165 170 175

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
180 185 190

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
195 200 205

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
210 215 220

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
225 230 235 240

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
245 250 255

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
275 280 285

```
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
    290                 295                 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
305                 310                 315                 320

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
                325                 330                 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
            340                 345                 350

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
        355                 360                 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
    370                 375                 380

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
385                 390                 395                 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
                405                 410                 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
            420                 425                 430

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
        435                 440                 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
    450                 455                 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 42
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"
<400> 42
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 43
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 44
Gly Thr Trp Asp Ser Arg Leu Ser Ala Val Val
1 5 10

<210> 45
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 45
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 46
Arg Ser Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 47
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 47
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val
1 5 10

<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 48
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly
1 5 10

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 49
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 50
Leu Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 51
Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Phe Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 52
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 53
Asn Ser Arg Asp Ser Ser Val Tyr His Leu Val
1 5 10

<210> 54
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 54
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Ala Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 55
Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 56
Met Gln Ser Phe Pro Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 57
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 57
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Phe Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 58
Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 59
Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 60
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 60
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 61
Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 62
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 62
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
1 5 10

<210> 63

<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 63
Thr Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 64
Ala Ala Arg Asp Glu Ser Leu Asn Gly Val Val
1 5 10

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

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 65
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Arg Asn Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 66
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 66
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Lys Asp Leu Gly
1 5 10

<210> 67
<211> 7
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 67
Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 68
Leu Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 69
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 69
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Gly Tyr Leu Thr
1 5 10

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 70
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 71
Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Leu Cys Arg
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 72
Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Leu Ser Arg
1 5

<210> 73
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 73
Ser Phe Gly Met His
1 5

<210> 74
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 74
Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Ser Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 75
<211> 21
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 75
Asp Arg Leu Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr His Tyr Lys Tyr
1 5 10 15

Tyr Gly Met Ala Val
20

<210> 76
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 76
Asn Ala Trp Met Ser
1 5

<210> 77
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 77
Arg Ile Lys Ser Thr Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 78
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 78
Asp Arg Thr Gly Tyr Ser Ile Ser Trp Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr

1 5 10 15

Gly Met Asp Val
20

<210> 79
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 79
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 80
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 80
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 81
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 81
Asp Gln Arg Glu Val Gly Pro Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Asp Tyr Tyr
1 5 10 15

Tyr Gly Met Asp Val
20

<210> 82
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 82
Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 83
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 83
Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 84
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 84
Asp Gln Met Ser Ile Ile Met Leu Arg Gly Val Phe Pro Pro Tyr Tyr
1 5 10 15

Tyr Gly Met Asp Val
20

<210> 85
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 85
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 86
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 86
Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser His Glu Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 87
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 87
Glu Arg Lys Arg Val Thr Met Ser Thr Leu Tyr Tyr Tyr Phe Tyr Tyr
1 5 10 15

Gly Met Asp Val
20

<210> 88
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 88
Asp Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 89

<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 89
Phe Ile Arg Ser Arg Ala Tyr Gly Gly Thr Pro Glu Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 90
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 90
Gly Arg Gly Ile Ala Ala Arg Trp Asp Tyr
1 5 10

<210> 91
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 91
Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Thr Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 92
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 92
Asp Tyr Tyr Met Tyr
1 5

<210> 93
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 93
Trp Ile Ser Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 94
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 94
Gly Gly Tyr Ser Gly Tyr Ala Gly Leu Tyr Ser His Tyr Tyr Gly Met
1 5 10 15

Asp Val

<210> 95
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 95
Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 96
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 96
Asp Arg Leu Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr His Tyr Lys Tyr
1 5 10 15

Tyr Gly Leu Ala Val
20

<210> 97
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 97
Thr Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 98
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 98
Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 99
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 99
Glu Gly Val Ser Gly Ser Ser Pro Tyr Ser Ile Ser Trp Tyr Asp Tyr
1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Met Asp Val
20

<210> 100
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 100
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 101
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 101
Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 102
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"
<400> 102
Ala Gly Gly Ile Ala Ala Ala Gly Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 103
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Lys"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (8)..(8)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 103
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly
1 5 10

<210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Gly"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(1)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"
<400> 104
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Phe"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (5)..(6)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 105
Leu Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 106
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Cys"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (8)..(8)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"
<400> 106
Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Leu Ser Arg

1 5

<210> 107
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Ile"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (7)..(7)
<223> /thay thế="Arg"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Asn" hoặc "Lys"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (5)..(8)
<223> /ghi chú=""gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"
<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế="Asp"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (10)..(10)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Gly"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (12)..(12)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 107
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Gly Tyr Leu Thr
1 5 10

<210> 108
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Ala"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(1)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"
<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Leu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Gln"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (7)..(7)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (5)..(7)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 108
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Leu"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(1)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"
<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Asn"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Tyr" hoặc "Phe"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (7)..(7)
<223> /thay thế="Pro"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Trp" hoặc "Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (9)..(9)
<223> /thay thế="Thr"

<220>

<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (4)..(9)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 109
Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Leu Cys Arg
1 5

<210> 110
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế="Ala"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (10)..(10)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"
<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Lys"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (13)..(13)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (12)..(13)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 110
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Arg Asn Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 111
<211> 16
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Lys"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(1)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"
<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế="Asp" hoặc "Ala"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (10)..(10)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Arg" hoặc "Lys"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (13)..(13)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (12)..(13)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (16)..(16)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (16)..(16)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 111
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Phe Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 112
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Glu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Val"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(2)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Phe"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (6)..(6)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"
<400> 112
Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Phe"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Pro"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Leu"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (3)..(6)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Leu"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (8)..(8)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 113
Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Phe Thr
1   5

<210> 114
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (2)..(2)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 114
Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 115
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (9)..(9)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (9)..(9)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (11)..(11)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (11)..(11)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (13)..(13)
<223> /thay thế="Asn" hoặc "Tyr"

<220>

<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (13)..(13)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 115
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 116
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Thr" hoặc "Arg"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(2)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Gln"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (4)..(4)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 116
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 117
<211> 11

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(2)
<223> /thay thế="Ala"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Arg"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(3)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Asp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (5)..(6)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Asn"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (9)..(9)
<223> /thay thế="Gly"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (8)..(9)

<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu
"

<400> 117
Gly Thr Trp Asp Ser Arg Leu Ser Ala Val Val
1 5 10

<210> 118
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Gln"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(1)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế=" "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Asp"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (3)..(4)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế=" "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (7)..(7)

<223> /thay thế="Leu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Arg"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (9)..(9)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế="Phe"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (11)..(11)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Ala"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (13)..(13)
<223> /thay thế="Asn" hoặc "Tyr"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (6)..(13)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 118
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 119
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>

<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Gly" hoặc "Thr" hoặc "Arg"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Lys" hoặc "Ser"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(2)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Asn" hoặc "Gln"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (4)..(4)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 119
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 120
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Asn" hoặc "Ala"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Ser" hoặc "Ala"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)

<223> /thay thế="Arg"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(3)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Asp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (7)..(7)
<223> /thay thế="Val"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Tyr" hoặc "Asn"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (9)..(9)
<223> /thay thế="His" hoặc "Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế="Leu"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (5)..(10)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 120
Gly Thr Trp Asp Ser Arg Leu Ser Ala Val Val
1 5 10

<210> 121
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Asp"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(1)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (5)..(5)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 121
Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 122
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp peptit"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (3)..(3)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu
"

<400> 122
Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 123
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(2)
<223> /thay thế="Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(3)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (7)..(7)
<223> /thay thế="Ala"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(9)

<223> /thay thế=" "

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (5)..(9)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (11)..(11)
<223> /thay thế="Leu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (13)..(13)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (14)..(14)
<223> /thay thế="His"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (11)..(14)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (17)..(17)
<223> /thay thế=" "

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (17)..(17)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 123
Asp Gln Met Ser Ile Ile Met Leu Arg Gly Val Phe Pro Pro Tyr Tyr
1   5   10   15

Tyr Gly Met Asp Val
            20

<210> 124
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (5)..(5)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (14)..(14)
<223> /thay thế="Ala"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (14)..(14)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 124
Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Thr Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 125
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)

<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(1)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Ala"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (3)..(3)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (5)..(5)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 125
Thr Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 126
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Ala"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(1)

<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Gly"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (4)..(4)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(7)
<223> /thay thế="Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Arg"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (9)..(9)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (6)..(9)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 126
Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 127
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Asp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Gln"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Arg"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Glu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Val"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (7)..(7)
<223> /thay thế=" "

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(7)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (11)..(11)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Gly"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (11)..(12)

<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 127
Glu Gly Val Ser Gly Ser Ser Pro Tyr Ser Ile Ser Trp Tyr Asp Tyr
1   5   10   15

Tyr Tyr Gly Met Asp Val
            20

<210> 128
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (2)..(2)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 128
Ser Phe Gly Met His
1   5

<210> 129
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>

<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (4)..(4)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="His"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (8)..(8)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (11)..(11)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Ala"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (11)..(12)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 129
Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Ser Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 130
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)

<223> /thay thế="Glu"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(1)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Lys"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Arg"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Val"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (7)..(7)
<223> /thay thế="Met"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (3)..(7)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (9)..(9)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế="Leu"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (9)..(10)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (13)..(13)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (14)..(14)
<223> /thay thế=" "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (15)..(15)
<223> /thay thế="Phe"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (13)..(15)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (19)..(19)
<223> /thay thế="Leu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (20)..(20)
<223> /thay thế="Asp"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (19)..(20)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 130
Asp Arg Leu Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr His Tyr Lys Tyr
1 5 10 15

Tyr Gly Met Ala Val
20

<210> 131
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Tyr" hoặc "Phe"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Ala" hoặc "Gly"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(3)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="His"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (5)..(5)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 131
Asn Ala Trp Met Ser
1 5

<210> 132
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Ala" hoặc "Val"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(1)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Ser" hoặc "Trp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Gly" hoặc "Phe" hoặc "Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Thr" hoặc " "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế=" "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (7)..(7)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (3)..(7)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (9)..(9)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế="Arg" hoặc "Ile" hoặc "Asn" hoặc "His"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (11)..(11)
<223> /thay thế="Lys"

<220>

<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (13)..(13)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (14)..(14)
<223> /thay thế="Ala" hoặc "Val"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (15)..(15)
<223> /thay thế="Asp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (16)..(16)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (9)..(16)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 132
Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Thr Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 133
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Ala" hoặc "Glu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Gln" hoặc "Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Arg" hoặc "Leu" hoặc "Gly" hoặc "Lys"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Glu" hoặc "Asn" hoặc "Ile" hoặc "Arg"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Val" hoặc "Ala"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Gly" hoặc "Tyr" hoặc "Ala" hoặc "Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (7)..(7)
<223> /thay thế="Pro" hoặc "Asp" hoặc "Ala" hoặc "Met"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Tyr" hoặc " "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (9)..(9)
<223> /thay thế="Ser" hoặc "Thr" hoặc " "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế="Gly" hoặc "Leu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (11)..(11)
<223> /thay thế="Gly" hoặc "Leu" hoặc "Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Tyr" hoặc " "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (13)..(13)
<223> /thay thế="His"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (14)..(14)
<223> /thay thế="Asp" hoặc " "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (15)..(15)
<223> /thay thế="Lys" hoặc "Phe"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (16)..(17)
<223> /thay thế=" "

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(17)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (19)..(19)
<223> /thay thế="Leu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (20)..(20)
<223> /thay thế="Ala"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (19)..(20)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 133
Asp Arg Thr Gly Tyr Ser Ile Ser Trp Ser Ser Trp Tyr Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15

Tyr Gly Met Asp Val
20

<210> 134
<211> 5

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Gly" hoặc "Asp" hoặc "Ser" hoặc "Ala"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Phe" hoặc "Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Tyr" hoặc "Ala" hoặc "Gly"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Leu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="His"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(5)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 134
Asn Ala Trp Met Ser
1 5

<210> 135
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp peptit"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Trp" hoặc "Ala" hoặc "Val" hoặc "Ser" hoặc "Phe"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(1)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Asn" hoặc "Ser" hoặc "Trp" hoặc "Arg"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Pro" hoặc "Gly" hoặc "Phe" hoặc "Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Thr" hoặc "Arg" hoặc " "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Ala" hoặc " "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (7)..(7)
<223> /thay thế="Asn" hoặc "His" hoặc "Ser" hoặc "Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(9)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế="Gly" hoặc "Arg" hoặc "Ile" hoặc "Asn" hoặc "His" hoặc "Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (11)..(11)
<223> /thay thế="Lys" hoặc "Arg" hoặc "Pro"

<220>

<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Asn" hoặc "Tyr" hoặc "Glu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (13)..(13)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (14)..(14)
<223> /thay thế="Ala" hoặc "Val"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (15)..(15)
<223> /thay thế="Gln" hoặc "Asp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (16)..(16)
<223> /thay thế="Lys" hoặc "Ser"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (17)..(17)
<223> /thay thế="Phe"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (18)..(18)
<223> /thay thế="Gln"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (3)..(18)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 135
Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Thr Ala Pro
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 136
<211> 21
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Gly" hoặc "Ala" hoặc "Glu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (2)..(2)
<223> /thay thế="Gly" hoặc "Gln"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (3)..(3)
<223> /thay thế="Met" hoặc "Tyr" hoặc "Arg" hoặc "Leu" hoặc "Gly" hoặc "Lys"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Ser" hoặc "Glu" hoặc "Asn" hoặc "Ile" hoặc "Arg"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Ile" hoặc "Gly" hoặc "Val" hoặc "Ala"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Ile" hoặc "Tyr" hoặc "Gly" hoặc "Ala" hoặc "Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (7)..(7)
<223> /thay thế="Met" hoặc "Ala" hoặc "Pro" hoặc "Asp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Leu" hoặc "Tyr" hoặc " "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (9)..(9)
<223> /thay thế="Arg" hoặc "Ser" hoặc "Thr" hoặc " "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)

<223> /thay thế="Gly" hoặc "Leu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (11)..(11)
<223> /thay thế="Val" hoặc "Leu" hoặc "Gly" hoặc "Tyr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Tyr" hoặc "Trp" hoặc " "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (13)..(13)
<223> /thay thế="Pro" hoặc "Ser" hoặc "His"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (14)..(14)
<223> /thay thế="Pro" hoặc "Asp hoặc "His" hoặc " "

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (15)..(15)
<223> /thay thế="Lys" hoặc "Phe"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (16)..(17)
<223> /thay thế=" "

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (1)..(17)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (19)..(19)
<223> /thay thế="Leu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (20)..(20)
<223> /thay thế="Ala"

<220>
<221> đặc điểm quan trọng chưa mô tả được (misc_feature)
<222> (19)..(20)
<223> /ghi chú="gốc được đưa ra trong trình tự không có sự ưu tiên đối với gốc đó trong phần chú thích về vị trí đã nêu"

<400> 136
Asp Arg Thr Gly Tyr Ser Ile Ser Trp Ser Ser Phe Tyr Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15

Tyr Gly Met Asp Val
20

<210> 137
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 137
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Glu Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Arg Leu
85 90 95

Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 138
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 138
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Phe Arg Ser Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 139
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 139
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 140
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 140
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Thr Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Phe Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Phe Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Val Tyr His
85 90 95

Leu Val Leu Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 141

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

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 141
Asp Ile Ile Leu Ala Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Ala Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Phe Pro Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 142
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 142
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

```
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Thr Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65                  70                  75                  80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Arg Leu
                85                  90                  95

Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
            100                 105                 110
```

<210> 143
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 143

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30

Phe Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
                85                  90                  95
```

Leu Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 144
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 144
Asp Ile Ile Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Glu Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Phe Pro Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 145
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 145
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln

1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Arg Leu
85 90 95

Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 146
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 146
Gln Ser Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Leu Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Arg

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 147
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 147
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Thr Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Phe Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Glu Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 148
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 148
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Phe Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 149
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 149
Asp Ile Thr Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Arg Asn Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

```
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Leu Pro
    50                  55                  60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
                85                  90                  95

Phe Pro Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110


<210> 150
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 150
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1               5                   10                  15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
            20                  25                  30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65                  70                  75                  80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Arg Leu
                85                  90                  95

Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
            100                 105                 110
```

<210> 151
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 151
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Lys Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Trp
85 90 95

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

<210> 152
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 152
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Gly

20 25 30

Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Leu
85 90 95

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

<210> 153
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 153
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Leu

85 90 95

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

<210> 154
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 154
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Asp Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Asp Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
100 105 110

Lys

<210> 155
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 155
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asn Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 156
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 156
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

```
His Asp Ala Ser Pro Arg Thr Ala Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Tyr Trp Thr Pro
                85                  90                  95

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

<210> 157
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 157

```
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Met Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1               5                   10                  15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
            20                  25                  30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65                  70                  75                  80

Thr Gly Asp Glu Ala Asn Tyr Cys Cys Gly Thr Trp Asp Ile Gly Leu
                85                  90                  95

Ser Val Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
            100                 105                 110
```

<210> 158
<211> 130
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 158
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Ser Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Leu Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr His Tyr
100 105 110

Lys Tyr Tyr Gly Met Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser
130

<210> 159
<211> 131
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 159
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Thr Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Asp Arg Thr Gly Tyr Ser Ile Ser Trp Ser Ser Tyr
100 105 110

Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
115 120 125

Val Ser Ser
130

<210> 160
<211> 130
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 160
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Gln Arg Glu Val Gly Pro Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Asp
100 105 110

Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser
130

<210> 161
<211> 130
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 161
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

```
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asp Gln Met Ser Ile Ile Met Leu Arg Gly Val Phe Pro Pro
            100                 105                 110

Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
        115                 120                 125

Ser Ser
    130
```

<210> 162
<211> 129
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 162

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser His Glu Ser Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Arg Lys Arg Val Thr Met Ser Thr Leu Tyr Tyr Tyr Phe
100 105 110

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 163
<211> 121
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 163
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Phe Ile Arg Ser Arg Ala Tyr Gly Gly Thr Pro Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Thr Ile
65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Phe Cys Ala Arg Gly Arg Gly Ile Ala Ala Arg Trp Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 164
<211> 131
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 164
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Thr Ala
50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Asp Arg Thr Gly Tyr Ser Ile Ser Trp Ser Ser Tyr
100 105 110

Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
115 120 125

Val Ser Ser
130

<210> 165
<211> 127
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 165
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Gly Gly Tyr Ser Gly Tyr Ala Gly Leu Tyr Ser His Tyr Tyr
100 105 110

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 166
<211> 131
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 166
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

```
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
    50                  55                  60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65                  70                  75                  80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Phe Cys Thr Thr Asp Arg Thr Gly Tyr Ser Ile Ser Trp Ser Ser Tyr
            100                 105                 110

Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
        115                 120                 125

Val Ser Ser
    130
```

<210> 167
<211> 131
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 167

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
    50                  55                  60
```

```
Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65                  70                  75                  80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Thr Thr Asp Arg Thr Gly Tyr Ser Ile Ser Trp Ser Ser Tyr
            100                 105                 110

Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
        115                 120                 125

Val Ser Ser
    130
```

<210> 168
<211> 130
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 168

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

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

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Ser Val Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
```

```
Ala Arg Asp Arg Leu Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr His Tyr
            100                 105                 110

Lys Tyr Tyr Gly Leu Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
        115                 120                 125

Ser Ser
    130
```

<210> 169
<211> 131
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 169

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Thr Tyr
            20                  25                  30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Gly Val Ser Gly Ser Ser Pro Tyr Ser Ile Ser Trp Tyr
            100                 105                 110

Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
        115                 120                 125
```

Val Ser Ser
130

<210> 170
<211> 126
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 170
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Gly Gly Ile Ala Ala Ala Gly Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 171
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 171
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro His Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Arg Gln Trp Leu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 172
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 172
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Ser Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Gly Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 173
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 173
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Ser Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Val Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asn Glu Tyr Ser Ser Ala Trp Pro Leu Gly Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 174
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 174
Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Val Gly Val Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Thr Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Arg Met Thr Asn Met Asp Pro Leu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
85 90 95

Cys Ala His Arg Pro Gly Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 175

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

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 175
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtttca gcagaaacca
120

gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct
240

gaagatttag caacttatta ctgtctacag tataatattt acccgtggac gttcggccaa
300

gggaccaagg tggaaatcaa a
321

<210> 176
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 176
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aaggatttag gctggtatca gcagaaacca
120

gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgga gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct
240

gaagattttg caacttatta ctgtctacag tataatagtt tcccgtggac gttcggccaa
300

gggaccaagg tggaaatcaa a
321

<210> 177
<211> 359
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 177
aggtgcagct ggtgcagtct ggggctgagg tgaagaagtc tggggcctca gtgaaggtct
60

cctgcaaggc ttctggatac accttcaccg gctactatat gcactgggtg cgacaggccc
120

ctggacaagg gcttgagtgg atgggatgga tcaaccctaa cagtggtggc acaaactatg
180

tacagaagtt tcagggcagg gtcaccatga ccagggacac gtccatcagc acagcctaca
240

tggagctgag caggctgaga tctgacgaca cggccgtgta ttactgtgcg agaaatgagt
300

atagcagtgc ctggcccttg gggtattggg gccagggaac cctggtcacc gtctctagt
359

<210> 178
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 178
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc
60

atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagttttg ggtacaacta tttggattgg
120

tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctcctgatct atttgggttc taatcgggcc
180

tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc
240

agcagagtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactcca
300

ttcactttcg gccctgggac caaagtggat atcaaa
336

<210> 179
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 179
gatattatac tggcccagac tccactttct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc
60

atctcctgca agtctagtca gagcctcctg cacagtgctg gaaagaccta tttgtattgg
120

tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctcctgatct atgaagtttc caaccggttc
180

tctggagtgc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc
240

agccgggtgg aggctgagga tgttgggatt tattactgca tgcaaagttt tccgcttccg
300

ctcactttcg gcggagggac caaggtggag atcaaa
336

<210> 180
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 180
gatattattc tgacccagac tccactttct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc
60

atctcctgca agtctagtca gagcctcctg cacagtgatg gaaagaccta tttgtattgg
120

tacctgcaga agcccggcca gcctccacag ctcctgatct atgaagtttc caaccggttc
180

tctggagagc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc
240

agccgggtgg aggctgagga tgttgggact tattattgca tgcaaagttt tccgcttccg
300

ctcactttcg gcggagggac caaggtggag atcaaa
336

<210> 181
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 181
gatattacac tgacccagac tccactttct ctgtccgtct cccctggaca gccggcctcc
60

atctcctgca agtctagtca gagcctcctg cacagtgatg gaaggaacta tctgtattgg
120

tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctcctgatct atgaagtgtc caaccggttc
180

tctggactgc cagataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc
240

agccgggtgg aggctgagga tgttgggatt tattactgca tgcaaagttt tccgcttccg
300

ctcactttcg gcggagggac caaggtggag atcaaa
336

<210> 182
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 182
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcggctact taacctggta ccagcagaaa
120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca
180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag
240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta actcactgtg caggtttggc
300

caggggacca agctggagat caaa
324

<210> 183
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 183
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcggctact taacctggta ccagcagaaa
120

cctggccagg ctcccagact cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca
180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggacg gacttcactc tcaccatcag cagactggag
240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta actcactgag caggtttggc
300

caggggacca agctggagat caaa
324

<210> 184
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 184
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgta gggccagtca gagtgttcgc agcaatttag cctggtacca gcagaaacct
120

ggccaggctc ccaggctcct cattcatgat gcatccccca ggaccgctgg tatcccagcc
180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcaacag cctgcagtct
240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataattact ggactccgat caccttcggc
300

caagggacac gactggagat taaa
324

<210> 185
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 185
gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc
60

atcaactgca agtccagcca gagtatttta gacagctcca acaatgataa ctacttagct
120

tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aaactgctca tttactgggc atctacccgg
180

gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc
240

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttataatact
300

ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa
339

<210> 186
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 186
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgaggccc caggacagaa ggtcaccatc
60

tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc
120

ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct
180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag
240

actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gccgcctgag tgctgtggtt
300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta
330

<210> 187
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 187
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc
60

tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc
120

ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct
180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcaaccaccc tgggcatcac cggactccag
240

actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gccgcctgag tgctgtggtt
300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta
330

<210> 188
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 188
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc
60

tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagttc
120

ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct
180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag
240

actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gccgcctgag tgctgtggtt
300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta
330

<210> 189
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 189
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc
60

tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc
120

ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct
180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag
240

actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gccgcctgag tgctgtggtt
300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta
330

<210> 190
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 190
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcaatg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc
60

tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc
120

ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct
180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag
240

actggggacg aggccaatta ctgctgcgga acatgggata tcggcctgag tgtttgggtg
300

ttcggcggag ggaccaaact gaccgtccta
330

<210> 191
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 191
cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc
60

tcttgttctg gaagcagttc caatatcgga agtaatactg tgaactggta ccagcagctc
120

ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat actaataatc agcggccctc aggggtccct
180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tggactccag
240

tctgaggatg aggctgattt ttactgtgca gcgcgggatg agagcctgaa tggtgtggta
300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta
330

<210> 192
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 192
cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag agtcaccatc
60

tcttgttctg gaagcagctc caacatcggc agtaattatg tatactggta ccagcagctc
120

ccaggagcgg ccccaaact cctcatcttt aggaataatc agcggccctc aggggtccct
180

gaccgcttct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg
240

tccgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgag tggttgggtg
300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta
330

<210> 193
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 193
cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag agtcaccatc
60

tcttgttctg gaagcagctc caacatcggc agtaattatg tatactggta ccagcagctc
120

ccaggagcgg cccccaaact cctcatcttt aggagtaatc agcggccctc aggggtccct
180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg
240

tccgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgag tggttgggtg
300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta
330

<210> 194
<211> 330
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 194
cagtctgtgc tgactcagtc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag agtcaccatc
60

tcttgttctg gaagcagctc caacatcggc agtaattatg tatactggta ccagcagctc
120

ccaggagcgg cccccaaact cctcatcctt aggaataatc agcggccctc aggggtccct
180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tgaccatcag tgggctccgg
240

tccgaggatg aggctgacta ttattgtgca gcatgggatg acagcctgag tggttgggtg
300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta
330

<210> 195
<211> 324
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 195
tcttctgagc tgactcagga ccctactgtg tctgtggcct tgggacagac agtcaaaatc
60

acatgccaag gagacagcct cagaagtttt tatgcaagct ggtaccagca gaagccagga
120

caggcccctg tacttgtctt ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat cccagaccga
180

ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tcactggggc tcaggcggaa
240

gatgaggctg actattattg taattcccgg gacagcagtg tttaccatct ggtactcggc
300

ggagggacca agctgaccgt ccta
324

<210> 196
<211> 390
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 196
caggtgcagt tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta acagtggtgg cacaaactat
180

gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac
240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt atttctgtgc gagagatcaa
300

atgagtatta ttatgcttcg gggagttttt ccccccttact attacggtat ggacgtctgg
360

ggccaaggga ccacggtcac cgtctctagt
390

<210> 197
<211> 381
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 197
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactactata tgtactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcccta atagtggtgg cacaaactat
180

gcccagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtctatcag cacagcctac
240

atggagctga gtaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgt gagaggagga
300

tatagtggct acgctgggct ctactcccac tactacggta tggacgtctg gggccaaggg
360

accacggtca ccgtctctag t
381

<210> 198
<211> 354
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 198
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc
60

tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gcctactatt tacactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaccctc acagtggtgg cacaaactat
180

gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac
240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt tctactgtgc gagaggaagg
300

cagtggctgg gctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc tagt
354

<210> 199
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 199
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagttacc
60

attacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca
120

gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgtt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct
240

gaagattttg caacttatta ctgtctacag tataacactt acccgctcac tttcggcgga
300

gggaccaagg tggagatcaa g
321

<210> 200
<211> 393
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 200
gaggtacagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggGTC cctcagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcggt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct
120

ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aaactgatgg tgggacaaca
180

gactacgctg cacccgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg
240

ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtattt ctgtaccaca
300

gatcggaccg ggtatagcat cagctggtct agttactact actactacgg tatggacgtc
360

tggggccaag ggaccacggt caccgtctct agt
393

<210> 201
<211> 393
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 201
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggGTC ccttagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct
120

ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aaactgatgg tgggacaaca
180

gactacactg cacccgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg
240

ctgtatctgc aaatgaatag cctgaaagcc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca
300

gatcggaccg ggtatagcat cagctggtct agttactact actactacgg tatggacgtc
360

tggggccaag ggaccacggt caccgtctct agt
393

<210> 202
<211> 393
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 202
gaggtacagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggGTC ccttagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcggt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct
120

ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aaactgatgg tgggacaaca
180

gactacgctg cacccgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg
240

ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca
300

gatcggaccg ggtatagcat cagctggtct agttactact actactacgg tatggacgtc
360

tggggccaag ggaccacggt caccgtctct agt
393

<210> 203
<211> 393
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 203
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctgggggGTC ccttagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct
120

ccagggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca caactgatgg tgggacaaca
180

gactacgctg cacccgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg
240

ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca
300

gatcggaccg gatatagcat cagctggtct agttactact actactacgg tatggacgtc
360

tggggccaag ggaccacggt caccgtctct agt
393

<210> 204
<211> 393

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 204
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggata caccttcagt acctatagca tgaactgggt ccgccaggct
120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtagta gtagtagtta cagatattac
180

gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat
240

ctgcaaatga gtagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaaggg
300

gtgtctggca gttcgccgta tagcatcagc tggtacgact actattacgg tatggacgtc
360

tggggccaag ggaccacggt caccgtctct agt
393

<210> 205
<211> 390
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 205
gaggtgcagc tattggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggagtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctgggtt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct
120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtcg cacatactac
180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
240

ctgcaaatga atagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcaa
300

agggaggtag ggccgtatag cagtggctgg tacgactact actacggtat ggacgtctgg
360

ggccaaggga ccacggtcac cgtctctagt
390

<210> 206
<211> 387
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 206
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct
120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atttcatatg atggaagtca tgaatcctat
180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca tttccaagaa cacgctgtat
240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt atttctgtgc gagagagagg
300

aaacgggtta cgatgtctac cttatattac tacttctact acggtatgga cgtctggggc
360

caagggacca cggtcaccgt ctctagt
387

<210> 207
<211> 390
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 207
caggtgcagc tggtggaatc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctttggca tgcactgggt ccgccaggct
120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatttg atggaagtat taagtattct
180

gtagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attcaaagaa cacgctgttt
240

ctgcaaatga acagcctgcg agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgg
300

ctcaattact atgatagtag tggttattat cactacaaat actacggtat ggccgtctgg
360

ggccaaggga ccacggtcac cgtctctagt
390

<210> 208
<211> 390
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 208
caggtgcagc tggtggaatc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctttggca tgcattgggt ccgccaggct
120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatttg atggaagtat taagtactct
180

gtagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attcaaagaa cacgctgttt
240

ctgcaaatga acagcctgcg agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgg
300

ctcaattact atgatagtag tggttattat cactacaaat actacggtct ggccgtctgg
360

ggccaaggga ccacggtcac cgtctctagt
390

<210> 209
<211> 363
<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 209
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc cagggcggtc cctgagactc
60

tcctgtacag cttctggatt cacctttggt gattatgcta tgagctggtt ccgccaggct
120

ccagggaagg ggctggagtg gataggtttc attagaagca gagcttatgg tgggacacca
180

gaatacgccg cgtctgtgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc caaaaccatc
240

gcctatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtattt ctgtgctaga
300

ggacggggta ttgcagctcg ttgggactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctct
360

agt
363

<210> 210
<211> 378
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 210
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct
120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat
180

gcagactccg tgaagggccg attcatcatc tccagagata aatccaagaa cacgctgtat
240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagcgggg
300

ggtatagcag cagctggcct ctactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc
360

acggtcaccg tctctagt
378

<210> 211
<211> 351
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 211
caggtgcagt tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc
60

agctgcgctg tctatggtgg gtccttcggt ggttactact ggagctggat ccgccagccc
120

ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaggcac caagtacaac
180

ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg
240

aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt tctgtgcgag aggcgatgta
300

gtaggtttct ttgactattg gggccaggga accctggtca ccgtctctag t
351

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

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 212
cagatcacct taaaggagtc tggtcctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg
60

acctgcacct tctctgggtt ctcactcagc actagtggtg tgggtgtggc ctggatccgt
120

cagccccccg gaaaggccct ggagtggctt gcactcattt attggactga tgataagcgc
180

tacagtccat ctctgaagag caggctcacc atcaccaagg acacctccaa gaaccaggtg
240

gtccttagaa tgaccaacat ggacccttttg gacacagcca cttatttctg tgcacacaga
300

ccaggggggct ggttcgaccc ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc tagt
354

<210> 213
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: peptit tổng hợp"

<400> 213
Gly Gly Gly Gly Gly Val Asp Gly Gly Gly Gly Gly Val
1 5 10

<210> 214
<211> 148
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 214
Met Ala Pro Gly Leu Arg Gly Leu Pro Arg Arg Gly Leu Trp Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala His His Leu Phe Met Val Thr Ala Cys Arg Asp Pro Asp Tyr
20 25 30

Gly Thr Leu Ile Gln Glu Leu Cys Leu Ser Arg Phe Lys Glu Asp Met
35 40 45

Glu Thr Ile Gly Lys Thr Leu Trp Cys Asp Trp Gly Lys Thr Ile Gly
50 55 60

Ser Tyr Gly Glu Leu Thr His Cys Thr Lys Leu Val Ala Asn Lys Ile
65 70 75 80

Gly Cys Phe Trp Pro Asn Pro Glu Val Asp Lys Phe Phe Ile Ala Val
85 90 95

```
His His Arg Tyr Phe Ser Lys Cys Pro Val Ser Gly Arg Ala Leu Arg
            100                 105                 110

Asp Pro Pro Asn Ser Ile Leu Cys Pro Phe Ile Val Leu Pro Ile Thr
        115                 120                 125

Val Thr Leu Leu Met Thr Ala Leu Val Val Trp Arg Ser Lys Arg Thr
    130                 135                 140

Glu Gly Ile Val
145
```

<210> 215
<211> 148
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 215

```
Met Ala Arg Ala Leu Cys Arg Leu Pro Gln Arg Gly Leu Trp Leu Leu
1               5                   10                  15

Leu Ala His His Leu Phe Met Ala Thr Ala Cys Gln Glu Ala Asn Tyr
            20                  25                  30

Gly Ala Leu Leu Gln Glu Leu Cys Leu Thr Gln Phe Gln Val Asp Met
        35                  40                  45

Glu Ala Val Gly Glu Thr Leu Trp Cys Asp Trp Gly Arg Thr Ile Gly
    50                  55                  60

Ser Tyr Arg Glu Leu Ala Asp Cys Thr Trp His Met Ala Glu Lys Leu
65                  70                  75                  80

Gly Cys Phe Trp Pro Asn Ala Glu Val Asp Arg Phe Phe Leu Ala Val
                85                  90                  95

His Gly His Tyr Phe Arg Ala Cys Pro Ile Ser Gly Arg Ala Val Arg
            100                 105                 110

Asp Pro Pro Gly Ser Val Leu Tyr Pro Phe Ile Val Val Pro Ile Thr
        115                 120                 125
```

Val Thr Leu Leu Val Thr Ala Leu Val Val Trp Gln Ser Lys His Thr
130 135 140

Glu Gly Ile Val
145

<210> 216
<211> 148
<212> PRT
<213> Macaca mulatta

<400> 216
Met Ala Arg Ala Leu Cys Arg Leu Pro Gln Arg Gly Leu Trp Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala His His Leu Phe Met Ala Thr Ala Cys Gln Glu Ala Asn Tyr
20 25 30

Gly Ala Leu Leu Gln Glu Leu Cys Leu Thr Gln Phe Gln Val Asp Met
35 40 45

Glu Ala Val Gly Glu Thr Leu Trp Cys Asp Trp Gly Arg Thr Ile Gly
50 55 60

Ser Tyr Arg Glu Leu Ala Asp Cys Thr Trp His Met Ala Glu Lys Leu
65 70 75 80

Gly Cys Phe Trp Pro Asn Ala Glu Val Asp Arg Phe Phe Leu Ala Val
85 90 95

His Gly His Tyr Phe Arg Ala Cys Pro Ile Ser Gly Arg Ala Val Arg
100 105 110

Asp Pro Pro Gly Ser Val Leu Tyr Pro Phe Ile Val Val Pro Ile Thr
115 120 125

Val Thr Leu Leu Val Thr Ala Leu Val Val Trp Gln Ser Lys His Thr
130 135 140

Glu Gly Ile Val
145

<210> 217
<211> 148
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 217
Met Ala Arg Ala Leu Cys Arg Leu Pro Arg Arg Gly Leu Trp Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala His His Leu Phe Met Thr Thr Ala Cys Arg Asp Pro Asp Tyr
20 25 30

Gly Thr Leu Leu Arg Glu Leu Cys Leu Thr Gln Phe Gln Val Asp Met
35 40 45

Glu Ala Val Gly Glu Thr Leu Trp Cys Asp Trp Gly Arg Thr Ile Arg
50 55 60

Ser Tyr Arg Glu Leu Ala Asp Cys Thr Trp His Met Ala Glu Lys Leu
65 70 75 80

Gly Cys Phe Trp Pro Asn Ala Glu Val Asp Arg Phe Phe Leu Ala Val
85 90 95

His Gly Arg Tyr Phe Arg Ser Cys Pro Ile Ser Gly Arg Ala Val Arg
100 105 110

Asp Pro Pro Gly Ser Ile Leu Tyr Pro Phe Ile Val Val Pro Ile Thr
115 120 125

Val Thr Leu Leu Val Thr Ala Leu Val Val Trp Gln Ser Lys Arg Thr
130 135 140

Glu Gly Ile Val
145

<210> 218
<211> 148
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 218
Met Ala Arg Ala Leu Cys Arg Leu Pro Arg Arg Gly Leu Trp Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala His His Leu Phe Met Thr Thr Ala Cys Gln Glu Ala Asn Tyr
20 25 30

Gly Ala Leu Leu Arg Glu Leu Cys Leu Thr Arg Phe Lys Glu Asp Met
35 40 45

Glu Thr Ile Gly Lys Thr Leu Trp Cys Asp Trp Gly Arg Thr Ile Arg
50 55 60

Ser Tyr Arg Glu Leu Ala Asp Cys Thr Trp His Met Ala Glu Lys Leu
65 70 75 80

Gly Cys Phe Trp Pro Asn Ala Glu Val Asp Arg Phe Phe Leu Ala Val
85 90 95

His Gly Arg Tyr Phe Arg Ser Cys Pro Ile Ser Gly Arg Ala Val Arg
100 105 110

Asp Pro Pro Gly Ser Ile Leu Tyr Pro Phe Ile Val Val Pro Ile Thr
115 120 125

Val Thr Leu Leu Val Thr Ala Leu Val Val Trp Gln Ser Lys Arg Thr
130 135 140

Glu Gly Ile Val
145

<210> 219
<211> 148
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 219
Met Ala Arg Ala Leu Cys Arg Leu Pro Arg Arg Gly Leu Trp Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala His His Leu Phe Met Thr Thr Ala Cys Gln Glu Ala Asn Tyr
20 25 30

Gly Ala Leu Leu Arg Glu Leu Cys Leu Thr Gln Phe Gln Val Asp Met
35 40 45

Glu Ala Val Gly Glu Thr Leu Trp Cys Asp Trp Gly Arg Thr Ile Arg
50 55 60

Ser Tyr Gly Glu Leu Thr His Cys Thr Lys Leu Val Ala Asn Lys Leu
65 70 75 80

Gly Cys Phe Trp Pro Asn Ala Glu Val Asp Arg Phe Phe Leu Ala Val
85 90 95

His Gly Arg Tyr Phe Arg Ser Cys Pro Ile Ser Gly Arg Ala Val Arg
100 105 110

Asp Pro Pro Gly Ser Ile Leu Tyr Pro Phe Ile Val Val Pro Ile Thr
115 120 125

Val Thr Leu Leu Val Thr Ala Leu Val Val Trp Gln Ser Lys Arg Thr
130 135 140

Glu Gly Ile Val
145

<210> 220
<211> 464
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 220
Met Met Asp Lys Lys Cys Thr Leu Cys Phe Leu Phe Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Asn Met Ala Leu Ile Ala Ala Glu Ser Glu Glu Gly Ala Asn Gln Thr

```
            20                  25                  30

Asp Leu Gly Val Thr Arg Asn Lys Ile Met Thr Ala Gln Tyr Glu Cys
        35                  40                  45

Tyr Gln Lys Ile Met Gln Asp Pro Ile Gln Gln Gly Glu Gly Leu Tyr
    50                  55                  60

Cys Asn Arg Thr Trp Asp Gly Trp Leu Cys Trp Asn Asp Val Ala Ala
65                  70                  75                  80

Gly Thr Glu Ser Met Gln Tyr Cys Pro Asp Tyr Phe Gln Asp Phe Asp
                85                  90                  95

Pro Ser Glu Lys Val Thr Lys Ile Cys Asp Gln Asp Gly Asn Trp Phe
            100                 105                 110

Arg His Pro Asp Ser Asn Arg Thr Trp Thr Asn Tyr Thr Leu Cys Asn
        115                 120                 125

Asn Ser Thr His Glu Lys Val Lys Thr Ala Leu Asn Leu Phe Tyr Leu
    130                 135                 140

Thr Ile Ile Gly His Gly Leu Ser Ile Ala Ser Leu Ile Ile Ser Leu
145                 150                 155                 160

Ile Ile Phe Phe Tyr Phe Lys Ser Leu Ser Cys Gln Arg Ile Thr Leu
                165                 170                 175

His Lys Asn Leu Phe Phe Ser Phe Val Cys Asn Ser Ile Val Thr Ile
            180                 185                 190

Ile His Leu Thr Ala Val Ala Asn Asn Gln Ala Leu Val Ala Thr Asn
        195                 200                 205

Pro Val Ser Cys Lys Val Ser Gln Phe Ile His Leu Tyr Leu Met Gly
    210                 215                 220

Cys Asn Tyr Phe Trp Met Leu Cys Glu Gly Ile Tyr Leu His Thr Leu
225                 230                 235                 240
```

```
Ile Val Val Ala Val Phe Ala Glu Lys Gln His Leu Met Trp Tyr Tyr
                245                 250                 255

Phe Leu Gly Trp Gly Phe Pro Leu Leu Pro Ala Cys Ile His Ala Ile
            260                 265                 270

Ala Arg Ser Leu Tyr Tyr Asn Asp Asn Cys Trp Ile Ser Ser Asp Thr
        275                 280                 285

His Leu Leu Tyr Ile Ile His Gly Pro Ile Cys Ala Ala Leu Leu Val
    290                 295                 300

Asn Leu Phe Phe Leu Leu Asn Ile Val Arg Val Leu Ile Thr Lys Leu
305                 310                 315                 320

Lys Val Thr His Gln Ala Glu Ser Asn Leu Tyr Met Lys Ala Val Arg
                325                 330                 335

Ala Thr Leu Ile Leu Val Pro Leu Leu Gly Ile Glu Phe Val Leu Phe
            340                 345                 350

Pro Trp Arg Pro Glu Gly Lys Val Ala Glu Glu Val Tyr Asp Tyr Val
        355                 360                 365

Met His Ile Leu Met His Tyr Gln Gly Leu Leu Val Ser Thr Ile Phe
    370                 375                 380

Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val Gln Ala Ile Leu Arg Arg Asn Trp Asn
385                 390                 395                 400

Gln Tyr Lys Ile Gln Phe Gly Asn Gly Phe Ser His Ser Asp Ala Leu
                405                 410                 415

Arg Ser Ala Ser Tyr Thr Val Ser Thr Ile Ser Asp Val Gln Gly Tyr
            420                 425                 430

Ser His Asp Cys Pro Thr Glu His Leu Asn Gly Lys Ser Ile Gln Asp
        435                 440                 445

Ile Glu Asn Val Ala Leu Lys Pro Glu Lys Met Tyr Asp Leu Val Met
```

450 455 460

<210> 221
<211> 461
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 221
Met Glu Lys Lys Cys Thr Leu Tyr Phe Leu Val Leu Leu Pro Phe Phe
1 5 10 15

Met Ile Phe Val Thr Ala Glu Leu Glu Glu Ser Pro Glu Asp Ser Ile
20 25 30

Gln Leu Gly Val Thr Arg Asn Lys Ile Met Thr Ala Gln Tyr Glu Cys
35 40 45

Tyr Gln Lys Ile Met Gln Asp Pro Ile Gln Gln Ala Glu Gly Val Tyr
50 55 60

Cys Asn Arg Thr Trp Asp Gly Trp Leu Cys Trp Asn Asn Val Ala Ala
65 70 75 80

Gly Thr Glu Ser Met Gln Leu Cys Pro Asp Tyr Phe Gln Asp Phe Asp
85 90 95

Pro Ser Glu Lys Val Thr Lys Ile Cys Asp Gln Asp Gly Asn Trp Phe
100 105 110

Arg His Pro Ala Ser Asn Arg Thr Trp Thr Asn Tyr Thr Gln Cys Asn
115 120 125

Val Asn Thr His Glu Lys Val Lys Thr Ala Leu Asn Leu Phe Tyr Leu
130 135 140

Thr Ile Ile Gly His Gly Leu Ser Ile Ala Ser Leu Leu Ile Ser Leu
145 150 155 160

Gly Ile Phe Phe Tyr Phe Lys Ser Leu Ser Cys Gln Arg Ile Thr Leu
165 170 175

His Lys Asn Leu Phe Phe Ser Phe Val Cys Asn Ser Val Val Thr Ile

```
            180                 185                 190

Ile His Leu Thr Ala Val Ala Asn Asn Gln Ala Leu Val Ala Thr Asn
        195                 200                 205

Pro Val Ser Cys Lys Val Ser Gln Phe Ile His Leu Tyr Leu Met Gly
    210                 215                 220

Cys Asn Tyr Phe Trp Met Leu Cys Glu Gly Ile Tyr Leu His Thr Leu
225                 230                 235                 240

Ile Val Val Ala Val Phe Ala Glu Lys Gln His Leu Met Trp Tyr Tyr
                245                 250                 255

Phe Leu Gly Trp Gly Phe Pro Leu Ile Pro Ala Cys Ile His Ala Ile
            260                 265                 270

Ala Arg Ser Leu Tyr Tyr Asn Asp Asn Cys Trp Ile Ser Ser Asp Thr
        275                 280                 285

His Leu Leu Tyr Ile Ile His Gly Pro Ile Cys Ala Ala Leu Leu Val
    290                 295                 300

Asn Leu Phe Phe Leu Leu Asn Ile Val Arg Val Leu Ile Thr Lys Leu
305                 310                 315                 320

Lys Val Thr His Gln Ala Glu Ser Asn Leu Tyr Met Lys Ala Val Arg
                325                 330                 335

Ala Thr Leu Ile Leu Val Pro Leu Leu Gly Ile Glu Phe Val Leu Ile
            340                 345                 350

Pro Trp Arg Pro Glu Gly Lys Ile Ala Glu Glu Val Tyr Asp Tyr Ile
        355                 360                 365

Met His Ile Leu Met His Phe Gln Gly Leu Leu Val Ser Thr Ile Phe
    370                 375                 380

Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val Gln Ala Ile Leu Arg Arg Asn Trp Asn
385                 390                 395                 400
```

```
Gln Tyr Lys Ile Gln Phe Gly Asn Ser Phe Ser Asn Ser Glu Ala Leu
                405                 410                 415

Arg Ser Ala Ser Tyr Thr Val Ser Thr Ile Ser Asp Gly Pro Gly Tyr
            420                 425                 430

Ser His Asp Cys Pro Ser Glu His Leu Asn Gly Lys Ser Ile His Asp
        435                 440                 445

Ile Glu Asn Val Val Leu Lys Pro Glu Asn Leu Tyr Asn
    450                 455                 460
```

<210> 222
<211> 461
<212> PRT
<213> Macaca mulatta

<400> 222

```
Met Glu Lys Lys Cys Thr Leu Tyr Phe Leu Val Leu Leu Pro Phe Phe
1               5                   10                  15

Met Ile Phe Val Thr Ala Glu Leu Glu Glu Ser Pro Glu Asp Ser Ile
            20                  25                  30

Gln Leu Gly Val Thr Arg Asn Lys Ile Met Thr Ala Gln Tyr Glu Cys
        35                  40                  45

Tyr Gln Lys Ile Met Gln Asp Pro Ile Gln Gln Ala Glu Gly Val Tyr
    50                  55                  60

Cys Asn Arg Thr Trp Asp Gly Trp Leu Cys Trp Asn Asn Val Ala Ala
65                  70                  75                  80

Gly Thr Glu Ser Met Gln Leu Cys Pro Asp Tyr Phe Gln Asp Phe Asp
                85                  90                  95

Pro Ser Glu Lys Val Thr Lys Ile Cys Asp Gln Asp Gly Asn Trp Phe
            100                 105                 110

Arg His Pro Ala Ser Asn Arg Thr Trp Thr Asn Tyr Thr Gln Cys Asn
        115                 120                 125
```

```
Val Asn Thr His Glu Lys Val Lys Thr Ala Leu Asn Leu Phe Tyr Leu
    130                 135                 140

Thr Ile Ile Gly His Gly Leu Ser Ile Ala Ser Leu Leu Ile Ser Leu
145                 150                 155                 160

Gly Ile Phe Phe Tyr Phe Lys Ser Leu Ser Cys Gln Arg Ile Thr Leu
                165                 170                 175

His Lys Asn Leu Phe Phe Ser Phe Val Cys Asn Ser Val Val Thr Ile
            180                 185                 190

Ile His Leu Thr Ala Val Ala Asn Asn Gln Ala Leu Val Ala Thr Asn
        195                 200                 205

Pro Val Ser Cys Lys Val Ser Gln Phe Ile His Leu Tyr Leu Met Gly
    210                 215                 220

Cys Asn Tyr Phe Trp Met Leu Cys Glu Gly Ile Tyr Leu His Thr Leu
225                 230                 235                 240

Ile Val Val Ala Val Phe Ala Glu Lys Gln His Leu Met Trp Tyr Tyr
                245                 250                 255

Phe Leu Gly Trp Gly Phe Pro Leu Ile Pro Ala Cys Ile His Ala Ile
            260                 265                 270

Ala Arg Ser Leu Tyr Tyr Asn Asp Asn Cys Trp Ile Ser Ser Asp Thr
        275                 280                 285

His Leu Leu Tyr Ile Ile His Gly Pro Ile Cys Ala Ala Leu Leu Val
    290                 295                 300

Asn Leu Phe Phe Leu Leu Asn Ile Val Arg Val Leu Ile Thr Lys Leu
305                 310                 315                 320

Lys Val Thr His Gln Ala Glu Ser Asn Leu Tyr Met Lys Ala Val Arg
                325                 330                 335

Ala Thr Leu Ile Leu Val Pro Leu Leu Gly Ile Glu Phe Val Leu Ile
```

340 345 350

Pro Trp Arg Pro Glu Gly Lys Ile Ala Glu Glu Val Tyr Asp Tyr Ile
355 360 365

Met His Ile Leu Met His Phe Gln Gly Leu Leu Val Ser Thr Ile Phe
370 375 380

Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val Gln Ala Ile Leu Arg Arg Asn Trp Asn
385 390 395 400

Gln Tyr Lys Ile Gln Phe Gly Asn Ser Phe Ser Asn Ser Glu Ala Leu
405 410 415

Arg Ser Ala Ser Tyr Thr Val Ser Thr Ile Ser Asp Gly Pro Gly Tyr
420 425 430

Ser His Asp Cys Pro Ser Glu His Leu Asn Gly Lys Ser Ile His Asp
435 440 445

Ile Glu Asn Val Val Leu Lys Pro Glu Asn Leu Tyr Asn
450 455 460

<210> 223
<211> 460
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polypeptit tổng hợp"

<400> 223
Met Glu Lys Lys Cys Thr Leu Tyr Phe Leu Val Leu Leu Pro Phe Phe
1 5 10 15

Met Ile Leu Val Thr Ala Glu Ser Glu Glu Gly Ala Asn Gln Thr Asp
20 25 30

Leu Gly Val Thr Arg Asn Lys Ile Met Thr Ala Gln Tyr Glu Cys Tyr
35 40 45

Gln Lys Ile Met Gln Asp Pro Ile Gln Gln Ala Glu Gly Val Tyr Cys

```
    50                  55                  60

Asn Arg Thr Trp Asp Gly Trp Leu Cys Trp Asn Asp Val Ala Ala Gly
65                  70                  75                  80

Thr Glu Ser Met Gln Leu Cys Pro Asp Tyr Phe Gln Asp Phe Asp Pro
                85                  90                  95

Ser Glu Lys Val Thr Lys Ile Cys Asp Gln Asp Gly Asn Trp Phe Arg
            100                 105                 110

His Pro Ala Ser Asn Arg Thr Trp Thr Asn Tyr Thr Gln Cys Asn Val
        115                 120                 125

Asn Thr His Glu Lys Val Lys Thr Ala Leu Asn Leu Phe Tyr Leu Thr
    130                 135                 140

Ile Ile Gly His Gly Leu Ser Ile Ala Ser Leu Leu Ile Ser Leu Gly
145                 150                 155                 160

Ile Phe Phe Tyr Phe Lys Ser Leu Ser Cys Gln Arg Ile Thr Leu His
                165                 170                 175

Lys Asn Leu Phe Phe Ser Phe Val Cys Asn Ser Val Val Thr Ile Ile
            180                 185                 190

His Leu Thr Ala Val Ala Asn Asn Gln Ala Leu Val Ala Thr Asn Pro
        195                 200                 205

Val Ser Cys Lys Val Ser Gln Phe Ile His Leu Tyr Leu Met Gly Cys
    210                 215                 220

Asn Tyr Phe Trp Met Leu Cys Glu Gly Ile Tyr Leu His Thr Leu Ile
225                 230                 235                 240

Val Val Ala Val Phe Ala Glu Lys Gln His Leu Met Trp Tyr Tyr Phe
                245                 250                 255

Leu Gly Trp Gly Phe Pro Leu Ile Pro Ala Cys Ile His Ala Ile Ala
            260                 265                 270
```

```
Arg Ser Leu Tyr Tyr Asn Asp Asn Cys Trp Ile Ser Ser Asp Thr His
        275                 280                 285

Leu Leu Tyr Ile Ile His Gly Pro Ile Cys Ala Ala Leu Leu Val Asn
    290                 295                 300

Leu Phe Phe Leu Leu Asn Ile Val Arg Val Leu Ile Thr Lys Leu Lys
305                 310                 315                 320

Val Thr His Gln Ala Glu Ser Asn Leu Tyr Met Lys Ala Val Arg Ala
                325                 330                 335

Thr Leu Ile Leu Val Pro Leu Leu Gly Ile Glu Phe Val Leu Ile Pro
            340                 345                 350

Trp Arg Pro Glu Gly Lys Ile Ala Glu Glu Val Tyr Asp Tyr Ile Met
        355                 360                 365

His Ile Leu Met His Phe Gln Gly Leu Leu Val Ser Thr Ile Phe Cys
    370                 375                 380

Phe Phe Asn Gly Glu Val Gln Ala Ile Leu Arg Arg Asn Trp Asn Gln
385                 390                 395                 400

Tyr Lys Ile Gln Phe Gly Asn Ser Phe Ser Asn Ser Glu Ala Leu Arg
                405                 410                 415

Ser Ala Ser Tyr Thr Val Ser Thr Ile Ser Asp Gly Pro Gly Tyr Ser
            420                 425                 430

His Asp Cys Pro Ser Glu His Leu Asn Gly Lys Ser Ile His Asp Ile
        435                 440                 445

Glu Asn Val Leu Leu Lys Pro Glu Asn Leu Tyr Asn
    450                 455                 460
```

<210> 224
<211> 714
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 224
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagt ctgtgttgac gcagccgccc tcagtgtctg aggccccagg acagaaggtc
120

accatctcct gctctggaag cagctccaac attgggaata attatgtatc ctggtaccag
180

cagctcccag gaacagcccc caaactcctc atttatgaca ataataagcg accctcaggg
240

attcctgacc gattctctgg ctccaagtct ggcacgtcag ccaccctggg catcaccgga
300

ctccagactg gggacgaggc cgattattac tgcggaacat gggatagccg cctgagtgct
360

gtggttttcg gcggagggac caagctgacc gtcctaggtc agcccaaggc caaccccact
420

gtcactctgt tcccgccctc ctctgaggag ctccaagcca acaaggccac actagtgtgt
480

ctgatcagtg acttctaccc gggagctgtg acagtggcct ggaaggcaga tggcagcccc
540

gtcaaggcgg gagtggagac caccaaaccc tccaaacaga gcaacaacaa gtacgcggcc
600

agcagctacc tgagcctgac gcccgagcag tggaagtccc acagaagcta cagctgccag
660

gtcacgcatg aagggagcac cgtggagaag acagtggccc ctacagaatg ttca
714

<210> 225
<211> 714
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 225
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagt ctgtgctgac tcagccaccc tcagcgtctg ggacccccgg gcagagagtc
120

accatctctt gttctggaag cagctccaac atcggcagta attatgtata ctggtaccag
180

cagctcccag gagcggcccc caaactcctc atctttagga gtaatcagcg gccctcaggg
240

gtccctgacc gattctctgg ctccaagtct ggcacctcag cctccctggc catcagtggg
300

ctccggtccg aggatgaggc tgattattac tgtgcagcat gggatgacag cctgagtggt
360

tgggtgttcg gcggagggac caagctgacc gtcctaggtc agcccaaggc caaccccact
420

gtcactctgt tcccgccctc ctctgaggag ctccaagcca acaaggccac actagtgtgt
480

ctgatcagtg acttctaccc gggagctgtg acagtggcct ggaaggcaga tggcagcccc
540

gtcaaggcgg gagtggagac caccaaaccc tccaaacaga gcaacaacaa gtacgcggcc
600

agcagctacc tgagcctgac gcccgagcag tggaagtccc acagaagcta cagctgccag
660

gtcacgcatg aagggagcac cgtggagaag acagtggccc ctacagaatg ttca
714

<210> 226
<211> 708
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 226
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga
120

gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagaaatg atttaggctg gtttcagcag
180

aaaccaggga aagcccctaa gcgcctgatc tatgctgcat ccagtttgca aagtggggtc
240

ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagaattca ctctcacaat cagcagcctg
300

cagcctgaag atttagcaac ttattactgt ctacagtata atatttaccc gtggacgttc
360

ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacgt acggtggctg caccatctgt cttcatcttc
420

ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac
480

ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac
540

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc
600

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat
660

cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt
708

<210> 227
<211> 708
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 227
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgttctt ctgagctgac tcaggaccct actgtgtctg tggccttggg acagacagtc
120

aaaatcacat gccaaggaga cagcctcaga agtttttatg caagctggta ccagcagaag
180

ccaggacagg cccctgtact tgtcttctat ggtaaaaaca accggccctc agggatccca
240

gaccgattct ctggctccag ctcaggaaac acagcttcct tgaccatcac tggggctcag
300

gcggaagatg aggctgacta ttattgtaat tcccgggaca gcagtgttta ccatctggta
360

ctcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcagccca aggccaaccc cactgtcact
420

ctgttcccgc cctcctctga ggagctccaa gccaacaagg ccacactagt gtgtctgatc
480

agtgacttct acccgggagc tgtgacagtg gcctggaagg cagatggcag ccccgtcaag
540

gcgggagtgg agaccaccaa accctccaaa cagagcaaca acaagtacgc ggccagcagc
600

tacctgagcc tgacgcccga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg
660

catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg gcccctacag aatgttca
708

<210> 228
<211> 723
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 228
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtgata ttatactggc ccagactcca ctttctctgt ccgtcacccc tggacagccg
120

gcctccatct cctgcaagtc tagtcagagc ctcctgcaca gtgctggaaa gacctatttg
180

tattggtacc tgcagaagcc aggccagcct ccacagctcc tgatctatga agtttccaac
240

cggttctctg gagtgccaga taggttcagt ggcagcgggt cagggacaga tttcacactg
300

aaaatcagcc gggtggaggc tgaggatgtt gggatttatt actgcatgca aagttttccg
360

cttccgctca ctttcggcgg agggaccaag gtggagatca aacgtacggt ggctgcacca
420

tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg
480

tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc
540

ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac
600

agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc
660

tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag
720

tgt
723

<210> 229
<211> 714
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 229
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagt ctgtgttgac gcagccgccc tcagtgtctg cggccccagg acagaaggtc
120

accatctcct gctctggaag cagctccaac attgggaata ttatgtatc ctggtaccag
180

cagctcccag gaacagcccc caaactcctc atttatgaca ataataagcg accctcaggg
240

attcctgacc gattctctgg ctccaagtct ggcacgtcaa ccaccctggg catcaccgga
300

ctccagactg gggacgaggc cgattattac tgcggaacat gggatagccg cctgagtgct
360

gtggttttcg gcggagggac caagctgacc gtcctaggtc agcccaaggc caaccccact
420

gtcactctgt tcccgccctc ctctgaggag ctccaagcca acaaggccac actagtgtgt
480

ctgatcagtg acttctaccc gggagctgtg acagtggcct ggaaggcaga tggcagcccc
540

gtcaaggcgg gagtggagac caccaaaccc tccaaacaga gcaacaacaa gtacgcggcc
600

agcagctacc tgagcctgac gcccgagcag tggaagtccc acagaagcta cagctgccag
660

gtcacgcatg aagggagcac cgtggagaag acagtggccc ctacagaatg ttca
714

<210> 230
<211> 723
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 230
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtgata ttgtgatgac tcagtctcca ctctccctgc ccgtcacccc tggagagccg
120

gcctccatct cctgcaggtc tagtcagagc ctcctgcata gttttgggta caactatttg
180

gattggtacc tgcagaagcc agggcagtct ccacagctcc tgatctattt gggttctaat
240

cgggcctccg gggtccctga caggttcagt ggcagtggat caggcacaga ttttacactg
300

aaaatcagca gagtggaggc tgaggatgtt ggggtttatt actgcatgca agctctacaa
360

actccattca ctttcggccc tgggaccaaa gtggatatca aacgtacggt ggctgcacca
420

tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg
480

tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc
540

ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac
600

agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc
660

tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag
720

tgt
723

<210> 231
<211> 723
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 231
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtgata ttattctgac ccagactcca ctttctctgt ccgtcacccc tggacagccg
120

gcctccatct cctgcaagtc tagtcagagc ctcctgcaca gtgatggaaa gacctatttg
180

tattggtacc tgcagaagcc cggccagcct ccacagctcc tgatctatga agtttccaac
240

cggttctctg gagagccaga taggttcagt ggcagcgggt cagggacaga tttcacactg
300

aaaatcagcc gggtggaggc tgaggatgtt gggacttatt attgcatgca aagttttccg
360

cttccgctca ctttcggcgg agggaccaag gtggagatca aacgtacggt ggctgcacca
420

tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg
480

tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc
540

ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac
600

agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc
660

tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag
720

tgt
723

<210> 232
<211> 714
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 232
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagt ctgtgttgac gcagccgccc tcagtgtctg cggccccagg acagaaggtc
120

accatctcct gctctggaag cagctccaac attgggaata attatgtatc ctggtaccag
180

cagttcccag gaacagcccc caaactcctc atttatgaca ataataagcg accctcaggg
240

attcctgacc gattctctgg ctccaagtct ggcacgtcag ccaccctggg catcaccgga
300

ctccagactg gggacgaggc cgattattac tgcggaacat gggatagccg cctgagtgct
360

gtggttttcg gcggagggac caagctgacc gtcctaggtc agcccaaggc caaccccact
420

gtcactctgt tcccgccctc ctctgaggag ctccaagcca acaaggccac actagtgtgt
480

ctgatcagtg acttctaccc gggagctgtg acagtggcct ggaaggcaga tggcagcccc
540

gtcaaggcgg gagtggagac caccaaaccc tccaaacaga gcaacaacaa gtacgcggcc
600

agcagctacc tgagcctgac gcccgagcag tggaagtccc acagaagcta cagctgccag
660

gtcacgcatg aagggagcac cgtggagaag acagtggccc ctacagaatg ttca
714

<210> 233
<211> 714
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 233
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagt ctgtgctgac tcagtcaccc tcagcgtctg ggacccccgg gcagagagtc
120

accatctctt gttctggaag cagctccaac atcggcagta attatgtata ctggtaccag
180

cagctcccag gagcggcccc caaactcctc atccttagga ataatcagcg gccctcaggg
240

gtccctgacc gattctctgg ctccaagtct ggcacctcag cctccctgac catcagtggg
300

ctccggtccg aggatgaggc tgactattat tgtgcagcat gggatgacag cctgagtggt
360

tgggtgttcg gcggagggac caagctgacc gtcctaggtc agcccaaggc caaccccact
420

gtcactctgt tcccgccctc ctctgaggag ctccaagcca acaaggccac actagtgtgt
480

ctgatcagtg acttctaccc gggagctgtg acagtggcct ggaaggcaga tggcagcccc
540

gtcaaggcgg gagtggagac caccaaaccc tccaaacaga gcaacaacaa gtacgcggcc
600

agcagctacc tgagcctgac gcccgagcag tggaagtccc acagaagcta cagctgccag
660

gtcacgcatg aagggagcac cgtggagaag acagtggccc ctacagaatg ttca
714

<210> 234
<211> 714
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 234
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagt ctgtgctgac tcagccaccc tcagcgtctg ggacccccgg gcagagggtc
120

accatctctt gttctggaag cagttccaat atcggaagta atactgtgaa ctggtaccag
180

cagctcccag gaacggcccc caaactcctc atctatacta ataatcagcg gccctcaggg
240

gtccctgacc gattctctgg ctccaagtct ggcacctcag cctccctggc catcagtgga
300

ctccagtctg aggatgaggc tgatttttac tgtgcagcgc gggatgagag cctgaatggt
360

gtggtattcg gcggagggac caagctgacc gtcctaggtc agcccaaggc caaccccact
420

gtcactctgt tcccgccctc ctctgaggag ctccaagcca acaaggccac actagtgtgt
480

ctgatcagtg acttctaccc gggagctgtg acagtggcct ggaaggcaga tggcagcccc
540

gtcaaggcgg gagtggagac caccaaaccc tccaaacaga gcaacaacaa gtacgcggcc
600

agcagctacc tgagcctgac gcccgagcag tggaagtccc acagaagcta cagctgccag
660

gtcacgcatg aagggagcac cgtggagaag acagtggccc ctacagaatg ttca
714

<210> 235
<211> 714
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 235
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagt ctgtgctgac tcagccaccc tcagcgtctg ggacccccgg gcagagagtc
120

accatctctt gttctggaag cagctccaac atcggcagta attatgtata ctggtaccag
180

cagctcccag gagcggcccc caaactcctc atctttagga ataatcagcg gccctcaggg
240

gtccctgacc gcttctctgg ctccaagtct ggcacctcag cctccctggc catcagtggg
300

ctccggtccg aggatgaggc tgattattac tgtgcagcat gggatgacag cctgagtggt
360

tgggtgttcg gcggagggac caagctgacc gtcctaggtc agcccaaggc caaccccact
420

gtcactctgt tcccgccctc ctctgaggag ctccaagcca acaaggccac actagtgtgt
480

ctgatcagtg acttctaccc gggagctgtg acagtggcct ggaaggcaga tggcagcccc
540

gtcaaggcgg gagtggagac caccaaaccc tccaaacaga gcaacaacaa gtacgcggcc
600

agcagctacc tgagcctgac gcccgagcag tggaagtccc acagaagcta cagctgccag
660

gtcacgcatg aagggagcac cgtggagaag acagtggccc ctacagaatg ttca
714

<210> 236
<211> 714
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 236
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagt ctgtgctgac tcagccaccc tcagcgtctg ggacccccgg gcagagagtc
120

accatctctt gttctggaag cagctccaac atcggcagta attatgtata ctggtaccag
180

cagctcccag gagcggcccc caaactcctc atctttagga ataatcagcg gccctcaggg
240

gtccctgacc gcttctctgg ctccaagtct ggcacctcag cctccctggc catcagtggg
300

ctccggtccg aggatgaggc tgattattac tgtgcagcat gggatgacag cctgagtggt
360

tgggtgttcg gcggagggac caagctgacc gtcctaggtc agcccaaggc caaccccact
420

gtcactctgt tcccgccctc ctctgaggag ctccaagcca acaaggccac actagtgtgt
480

ctgatcagtg acttctaccc gggagctgtg acagtggcct ggaaggcaga tggcagcccc
540

gtcaaggcgg gagtggagac caccaaaccc tccaaacaga gcaacaacaa gtacgcggcc
600

agcagctacc tgagcctgac gcccgagcag tggaagtccc acagaagcta cagctgccag
660

gtcacgcatg aagggagcac cgtggagaag acagtggccc ctacagaatg ttca
714

<210> 237
<211> 723
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 237
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtgata ttacactgac ccagactcca ctttctctgt ccgtctcccc tggacagccg
120

gcctccatct cctgcaagtc tagtcagagc ctcctgcaca gtgatggaag gaactatctg
180

tattggtacc tgcagaagcc aggccagcct ccacagctcc tgatctatga agtgtccaac
240

cggttctctg gactgccaga taggttcagt ggcagcgggt cagggacaga tttcacactg
300

aaaatcagcc gggtggaggc tgaggatgtt gggatttatt actgcatgca aagttttccg
360

cttccgctca ctttcggcgg agggaccaag gtggagatca aacgtacggt ggctgcacca
420

tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg
480

tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc
540

ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac
600

agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc
660

tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag
720

tgt
723

<210> 238
<211> 714
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 238
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagt ctgtgttgac gcagccgccc tcagtgtctg cggccccagg acagaaggtc
120

accatctcct gctctggaag cagctccaac attgggaata ttatgtatc ctggtaccag
180

cagctcccag gaacagcccc caaactcctc atttatgaca ataataagcg accctcaggg
240

attcctgacc gattctctgg ctccaagtct ggcacgtcag ccaccctggg catcaccgga
300

ctccagactg gggacgaggc cgattattac tgcggaacat gggatagccg cctgagtgct
360

gtggttttcg gcggagggac caagctgacc gtcctaggtc agcccaaggc caaccccact
420

gtcactctgt tcccgccctc ctctgaggag ctccaagcca acaaggccac actagtgtgt
480

ctgatcagtg acttctaccc gggagctgtg acagtggcct ggaaggcaga tggcagcccc
540

gtcaaggcgg gagtggagac caccaaaccc tccaaacaga gcaacaacaa gtacgcggcc
600

agcagctacc tgagcctgac gcccgagcag tggaagtccc acagaagcta cagctgccag
660

gtcacgcatg aagggagcac cgtggagaag acagtggccc ctacagaatg ttca
714

<210> 239
<211> 708
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 239
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga
120

gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagaaagg atttaggctg gtatcagcag
180

aaaccaggga aagcccctaa gcgcctgatc tatggagcat ccagtttgca aagtggggtc
240

ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagaattca ctctcacaat cagcagcctg
300

cagcctgaag attttgcaac ttattactgt ctacagtata atagtttccc gtggacgttc
360

ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacgt acggtggctg caccatctgt cttcatcttc
420

ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac
480

ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac
540

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc
600

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat
660

cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt
708

<210> 240
<211> 705
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 240
atggaaaccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga
60

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
120

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcggctact taacctggta ccagcagaaa
180

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca
240

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag
300

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta actcactgtg caggtttggc
360

caggggacca agctggagat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg
420

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc
480

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc
540

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg
600

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag
660

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt
705

<210> 241
<211> 705
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 241
atggaaaccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga
60

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
120

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcggctact taacctggta ccagcagaaa
180

cctggccagg ctcccagact cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca
240

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggacg gacttcactc tcaccatcag cagactggag
300

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta actcactgag caggtttggc
360

caggggacca agctggagat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg
420

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc
480

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc
540

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg
600

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag
660

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt
705

<210> 242
<211> 1434
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 242
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagg tgcagctggt ggaatctggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg
120

agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct ttggcatgca ctgggtccgc
180

caggctccag gcaaggggct ggagtgggtg gcagttatat catttgatgg aagtattaag
240

tattctgtag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaattc aaagaacacg
300

ctgtttctgc aaatgaacag cctgcgagcc gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcgaga
360

gatcggctca attactatga tagtagtggt tattatcact acaaatacta cggtatggcc
420

gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tctagtgcct ccaccaaggg cccatcggtc
480

ttcccccctgg cgccctgctc caggagcacc tccgagagca cagcggccct gggctgcctg
540

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc
600

ggcgtgcaca ccttcccagc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg
660

gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag
720

cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg
780

tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac
840

accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acgtgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa
900

gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca
960

aagccacggg aggagcagtt caacagcacg ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg
1020

caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca
1080

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac
1140

accctgcccc catcccggga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc
1200

aaaggcttct accccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac
1260

aactacaaga ccacacctcc catgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag
1320

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat
1380

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa
1434

<210> 243
<211> 1437
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 243
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtgagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg taaagcctgg ggggtccctt
120

agactctcct gtgcagcctc tggattcact ttcagtaacg cctggatgag ctgggtccgc
180

caggctccag ggaaggggct ggagtgggtt ggccgtatta aaagcacaac tgatggtggg
240

acaacagact acgctgcacc cgtgaaaggc agattcacca tctcaagaga tgattcaaaa
300

aacacgctgt atctgcaaat gaacagcctg aaaaccgagg acacagccgt gtattactgt
360

accacagatc ggaccggata tagcatcagc tggtctagtt actactacta ctacggtatg
420

gacgtctggg gccaagggac cacggtcacc gtctctagtg cctccaccaa gggcccatcg
480

gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc
540

ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc
600

agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc
660

gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc acccagacct acacctgcaa cgtagatcac
720

aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca
780

ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag
840

gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac
900

gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag
960

acaaagccac gggaggagca gttcaacagc acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt
1020

gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc
1080

ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa accaaagggc agccccgaga accacaggtg
1140

tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg
1200

gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag
1260

aacaactaca agaccacacc tcccatgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc
1320

aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg
1380

catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa
1437

<210> 244
<211> 1434
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 244
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtgagg tgcagctatt ggagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg ggagtccctg
120

agactctcct gtgcagcctc tgggttcacc tttagcagct atgccatgag ctgggtccgc
180

caggctccag ggaaggggct ggagtgggtc tcagctatta gtggtagtgg tggtcgcaca
240

tactacgcag actccgtgaa gggccggttc accatctcca gagacaattc caagaacacg
300

ctgtatctgc aaatgaatag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaaa
360

gatcaaaggg aggtagggcc gtatagcagt ggctggtacg actactacta cggtatggac
420

gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tctagtgcct ccaccaaggg cccatcggtc
480

ttcccccctgg cgccctgctc caggagcacc tccgagagca cagcggccct gggctgcctg
540

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc
600

ggcgtgcaca ccttcccagc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg
660

gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag
720

cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg
780

tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac
840

accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acgtgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa
900

gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca
960

aagccacggg aggagcagtt caacagcacg ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg
1020

caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca
1080

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac
1140

accctgcccc catcccggga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc
1200

aaaggcttct accccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac
1260

aactacaaga ccacacctcc catgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag
1320

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat
1380

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa
1434

<210> 245
<211> 1434
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 245
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagg tgcagttggt gcagtctggg gctgaggtga agaagcctgg ggcctcagtg
120

aaggtctcct gcaaggcttc tggatacacc ttcaccggct actatatgca ctgggtgcga
180

caggcccctg gacaagggct tgagtggatg ggatggatca accctaacag tggtggcaca
240

aactatgcac agaagtttca gggcagggtc accatgacca gggacacgtc catcagcaca
300

gcctacatgg agctgagcag gctgagatct gacgacacgg ccgtgtattt ctgtgcgaga
360

gatcaaatga gtattattat gcttcgggga gtttttcccc cttactatta cggtatggac
420

gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tctagtgcct ccaccaaggg cccatcggtc
480

ttcccctgg cgccctgctc caggagcacc tccgagagca cagcggccct gggctgcctg
540

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc
600

ggcgtgcaca ccttcccagc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg
660

gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag
720

cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg
780

tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac
840

accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acgtgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa
900

gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca
960

aagccacggg aggagcagtt caacagcacg ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg
1020

caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca
1080

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac
1140

accctgcccc catcccggga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc
1200

aaaggcttct accccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac
1260

aactacaaga ccacacctcc catgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag
1320

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat
1380

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa
1434

<210> 246
<211> 1431
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 246
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg
120

agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct atggcatgca ctgggtccgc
180

caggctccag gcaaggggct ggagtgggtg gcagttattt catatgatgg aagtcatgaa
240

tcctatgcag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacatttc caagaacacg
300

ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagct gaggacacgg ctgtgtattt ctgtgcgaga
360

gagaggaaac gggttacgat gtctaccttа tattactact tctactacgg tatggacgtc
420

tggggccaag ggaccacggt caccgtctct agtgcctcca ccaagggccc atcggtcttc
480

cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc
540

aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgctct gaccagcggc
600

gtgcacacct tcccagctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg
660

accgtgccct ccagcaactt cggcacccag acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc
720

agcaacacca aggtggacaa gacagttgag cgcaaatgtt gtgtcgagtg cccaccgtgc
780

ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc
840

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac
900

cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag
960

ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc cgtgtggtca gcgtcctcac cgttgtgcac
1020

caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc
1080

cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc
1140

ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa
1200

ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac
1260

tacaagacca cacctcccat gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc
1320

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag
1380

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a
1431

<210> 247
<211> 1434
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 247
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagg tgcagctggt ggaatctggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg
120

agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct ttggcatgca ctgggtccgc
180

caggctccag gcaaggggct ggagtgggtg gcagttatat catttgatgg aagtattaag
240

tattctgtag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaattc aaagaacacg
300

ctgtttctgc aaatgaacag cctgcgagcc gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcgaga
360

gatcggctca attactatga tagtagtggt tattatcact acaaatacta cggtatggcc
420

gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tctagtgcct ccaccaaggg cccatcggtc
480

ttcccccctgg cgccctgctc caggagcacc tccgagagca cagcggccct gggctgcctg
540

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc
600

ggcgtgcaca ccttcccagc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg
660

gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag
720

cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg
780

tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac
840

accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acgtgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa
900

gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca
960

aagccacggg aggagcagtt caacagcacg ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg
1020

caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca
1080

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac
1140

accctgcccc catcccggga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc
1200

aaaggcttct accccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac
1260

aactacaaga ccacacctcc catgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag
1320

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat
1380

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa
1434

<210> 248
<211> 1407
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 248
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtgagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg taaagccagg gcggtccctg
120

agactctcct gtacagcttc tggattcacc tttggtgatt atgctatgag ctggttccgc
180

caggctccag ggaaggggct ggagtggata ggtttcatta gaagcagagc ttatggtggg
240

acaccagaat acgccgcgtc tgtgaaaggc agattcacca tctcaagaga tgattccaaa
300

accatcgcct atctgcaaat gaacagcctg aaaaccgagg acacagccgt gtatttctgt
360

gctagaggac ggggtattgc agctcgttgg gactactggg gccagggaac cctggtcacc
420

gtctctagtg cctccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc
480

acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg
540

acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta
600

cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc
660

acccagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca
720

gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg
780

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag
840

gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtccagtt caactggtac
900

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccac gggaggagca gttcaacagc
960

acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag
1020

tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa
1080

accaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg
1140

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc
1200

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacacc tcccatgctg
1260

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag
1320

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag
1380

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa
1407

<210> 249
<211> 1431
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 249
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg
120

agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct atggcatgca ctgggtccgc
180

caggctccag gcaaggggct ggagtgggtg gcagttattt catatgatgg aagtcatgaa
240

tcctatgcag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacatttc caagaacacg
300

ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagct gaggacacgg ctgtgtattt ctgtgcgaga
360

gagaggaaac gggttacgat gtctaccttа tattactact tctactacgg tatggacgtc
420

tggggccaag ggaccacggt caccgtctct agtgcctcca ccaagggccc atcggtcttc
480

cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc
540

aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgctct gaccagcggc
600

gtgcacacct tcccagctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg
660

accgtgccct ccagcaactt cggcacccag acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc
720

agcaacacca aggtggacaa gacagttgag cgcaaatgtt gtgtcgagtg cccaccgtgc
780

ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc
840

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac
900

cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag
960

ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc cgtgtggtca gcgtcctcac cgttgtgcac
1020

caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc
1080

cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc
1140

ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa
1200

ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac
1260

tacaagacca cacctcccat gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc
1320

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag
1380

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a
1431

<210> 250
<211> 1434
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 250
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagg tgcagctggt ggaatctggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg
120

agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct ttggcatgca ctgggtccgc
180

caggctccag gcaaggggct ggagtgggtg gcagttatat catttgatgg aagtattaag
240

tattctgtag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaattc aaagaacacg
300

ctgtttctgc aaatgaacag cctgcgagcc gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcgaga
360

gatcggctca attactatga tagtagtggt tattatcact acaaatacta cggtatggcc
420

gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tctagtgcct ccaccaaggg cccatcggtc
480

ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc tccgagagca cagcggccct gggctgcctg
540

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc
600

ggcgtgcaca ccttcccagc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg
660

gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag
720

cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg
780

tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac
840

accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acgtgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa
900

gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca
960

aagccacggg aggagcagtt caacagcacg ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg
1020

caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca
1080

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac
1140

accctgcccc catcccggga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc
1200

aaaggcttct accccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac
1260

aactacaaga ccacacctcc catgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag
1320

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat
1380

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa
1434

<210> 251
<211> 1437

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 251
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtgagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg taaagcctgg ggggtccctt
120

agactctcct gtgcagcctc tggattcact ttcagtaacg cctggatgag ctgggtccgc
180

caggctccag ggaaggggct ggagtgggtt ggccgtatta aaagcaaaac tgatggtggg
240

acaacagact acactgcacc cgtgaaaggc agattcacca tctcaagaga tgattcaaaa
300

aacacgctgt atctgcaaat gaatagcctg aaagccgagg acacagccgt gtattactgt
360

accacagatc ggaccgggta tagcatcagc tggtctagtt actactacta ctacggtatg
420

gacgtctggg gccaagggac cacggtcacc gtctctagtg cctccaccaa gggcccatcg
480

gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc
540

ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc
600

agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc
660

gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc acccagacct acacctgcaa cgtagatcac
720

aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca
780

ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag
840

gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac
900

gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag
960

acaaagccac gggaggagca gttcaacagc acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt
1020

gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc
1080

ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa accaaagggc agccccgaga accacaggtg
1140

tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg
1200

gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag
1260

aacaactaca agaccacacc tcccatgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc
1320

aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg
1380

catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa
1437

<210> 252
<211> 1425
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 252
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagg tgcagctggt gcagtctggg gctgaggtga agaagcctgg ggcctcagtg
120

aaggtctcct gcaaggcttc tggatacacc ttcaccgact actatatgta ctgggtgcga
180

caggcccctg gacaagggct tgagtggatg ggatggatca gccctaatag tggtggcaca
240

aactatgccc agaagtttca gggcagggtc accatgacca gggacacgtc tatcagcaca
300

gcctacatgg agctgagtag gctgagatct gacgacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga
360

ggaggatata gtggctacgc tgggctctac tcccactact acggtatgga cgtctggggc
420

caagggacca cggtcaccgt ctctagtgcc tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg
480

gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac
540

tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac
600

accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg
660

ccctccagca acttcggcac ccagacctac acctgcaacg tagatcacaa gcccagcaac
720

accaaggtgg acaagacagt tgagcgcaaa tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca
780

ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcctc ttccccccaa aacccaagga caccctcatg
840

atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccccgag
900

gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg
960

gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac
1020

tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc
1080

gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc
1140

ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc
1200

taccccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag
1260

accacacctc ccatgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg
1320

gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg
1380

cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaa
1425

<210> 253
<211> 1437
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 253
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtgagg tacagctggt ggagtctggg ggaggcttgg taaagcctgg ggggtccctc
120

agactctcct gtgcagcctc tggattcact ttcggtaacg cctggatgag ctgggtccgc
180

caggctccag ggaaggggct ggagtgggtt ggccgtatta aaagcaaaac tgatggtggg
240

acaacagact acgctgcacc cgtgaaaggc agattcacca tctcaagaga tgattcaaaa
300

aacacgctgt atctgcaaat gaacagcctg aaaaccgagg acacagccgt gtatttctgt
360

accacagatc ggaccgggta tagcatcagc tggtctagtt actactacta ctacggtatg
420

gacgtctggg gccaagggac cacggtcacc gtctctagtg cctccaccaa gggcccatcg
480

gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc
540

ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc
600

agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc
660

gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc acccagacct acacctgcaa cgtagatcac
720

aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca
780

ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag
840

gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac
900

gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag
960

acaaagccac gggaggagca gttcaacagc acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt
1020

gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc
1080

ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa accaaagggc agccccgaga accacaggtg
1140

tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg
1200

gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag
1260

aacaactaca agaccacacc tcccatgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc
1320

aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg
1380

catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa
1437

<210> 254
<211> 1437
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"
<400> 254
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtgagg tacagctggt ggagtctggg ggaggcttgg taaagcctgg ggggtccctt
120

agactctcct gtgcagcctc tggattcact ttcggtaacg cctggatgag ctgggtccgc
180

caggctccag ggaaggggct ggagtgggtt ggccgtatta aaagcaaaac tgatggtggg
240

acaacagact acgctgcacc cgtgaaaggc agattcacca tctcaagaga tgattcaaaa
300

aacacgctgt atctgcaaat gaacagcctg aaaaccgagg acacagccgt gtattactgt
360

accacagatc ggaccgggta tagcatcagc tggtctagtt actactacta ctacggtatg
420

gacgtctggg gccaagggac cacggtcacc gtctctagtg cctccaccaa gggcccatcg
480

gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc
540

ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc
600

agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc
660

gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc acccagacct acacctgcaa cgtagatcac
720

aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca
780

ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag
840

gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac
900

gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag
960

acaaagccac gggaggagca gttcaacagc acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt
1020

gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc
1080

ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa accaaagggc agccccgaga accacaggtg
1140

tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg
1200

gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag
1260

aacaactaca agaccacacc tcccatgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc
1320

aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg
1380

catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa
1437

<210> 255
<211> 1431
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 255
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg
120

agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct atggcatgca ctgggtccgc
180

caggctccag gcaaggggct ggagtgggtg gcagttattt catatgatgg aagtcatgaa
240

tcctatgcag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacatttc caagaacacg
300

ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagct gaggacacgg ctgtgtattt ctgtgcgaga
360

gagaggaaac gggttacgat gtctacctta tattactact tctactacgg tatggacgtc
420

tggggccaag ggaccacggt caccgtctct agtgcctcca ccaagggccc atcggtcttc
480

cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc
540

aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgctct gaccagcggc
600

gtgcacacct tcccagctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg
660

accgtgccct ccagcaactt cggcacccag acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc
720

agcaacacca aggtggacaa gacagttgag cgcaaatgtt gtgtcgagtg cccaccgtgc
780

ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc
840

ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac
900

cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag
960

ccacgggagg agcagttcaa cagcacgttc cgtgtggtca gcgtcctcac cgttgtgcac
1020

caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc
1080

cccatcgaga aaaccatctc caaaaccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc
1140

ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa
1200

ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac
1260

tacaagacca cacctcccat gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc
1320

accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag
1380

gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a
1431

<210> 256
<211> 1434
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"
<400> 256
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagg tgcagctggt ggaatctggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg
120

agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct ttggcatgca ttgggtccgc
180

caggctccag gcaaggggct ggagtgggtg gcagttatat catttgatgg aagtattaag
240

tactctgtag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaattc aaagaacacg
300

ctgtttctgc aaatgaacag cctgcgagcc gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcgaga
360

gatcggctca attactatga tagtagtggt tattatcact acaaatacta cggtctggcc
420

gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tctagtgcct ccaccaaggg cccatcggtc
480

ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc tccgagagca cagcggccct gggctgcctg
540

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc
600

ggcgtgcaca ccttcccagc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg
660

gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc cagacctaca cctgcaacgt agatcacaag
720

cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg
780

tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac
840

accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acgtgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa
900

gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca
960

aagccacggg aggagcagtt caacagcacg ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg
1020

caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa aggcctccca
1080

gcccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac
1140

accctgcccc catcccggga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc
1200

aaaggcttct accccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac
1260

aactacaaga ccacacctcc catgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag
1320

ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat
1380

gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa
1434

<210> 257
<211> 1437
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 257
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtgagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcctgg tcaagcctgg ggggtccctg
120

agactctcct gtgcagcctc tggatacacc ttcagtacct atagcatgaa ctgggtccgc
180

caggctccag ggaaggggct ggagtgggtc tcatccatta gtagtagtag tagttacaga
240

tattacgcag actcagtgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaactca
300

ctgtatctgc aaatgagtag cctgagagcc gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcgaga
360

gaaggggtgt ctggcagttc gccgtatagc atcagctggt acgactacta ttacggtatg
420

gacgtctggg gccaagggac cacggtcacc gtctctagtg cctccaccaa gggcccatcg
480

gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc
540

ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc
600

agcggcgtgc acaccttccc agctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc
660

gtggtgaccg tgccctccag caacttcggc acccagacct acacctgcaa cgtagatcac
720

aagcccagca acaccaaggt ggacaagaca gttgagcgca aatgttgtgt cgagtgccca
780

ccgtgcccag caccacctgt ggcaggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag
840

gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac
900

gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag
960

acaaagccac gggaggagca gttcaacagc acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtt
1020

gtgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc
1080

ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa accaaagggc agccccgaga accacaggtg
1140

tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg
1200

gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag
1260

aacaactaca agaccacacc tcccatgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc
1320

aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg
1380

catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa
1437

<210> 258
<211> 1422
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="mô tả trình tự nhân tạo: polynucleotit tổng hợp"

<400> 258
atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg
60

cgctgtcagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg
120

agactctcct gtgcagcgtc tggattcacc ttcagtagct atggcatgca ctgggtccgc
180

caggctccag gcaaggggct ggagtgggtg gcagttatat ggtatgatgg aagtaataaa
240

tactatgcag actccgtgaa gggccgattc atcatctcca gagataaatc caagaacacg
300

ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcgaga
360

gcgggggta tagcagcagc tggcctctac tactactacg gtatggacgt ctggggccaa
420

gggaccacgg tcaccgtctc tagtgcctcc accaagggcc catcggtctt ccccctggcg
480

ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac
540

ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc
600

ttcccagctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc
660

tccagcaact tcggcaccca gacctacacc tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc
720

aaggtggaca agacagttga gcgcaaatgt tgtgtcgagt gcccaccgtg cccagcacca
780

cctgtggcag gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc
840

tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccccgaggtc
900

cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag
960

gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg
1020

ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag
1080

aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca
1140

tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac
1200

cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc
1260

acacctccca tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac
1320

aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac
1380

aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa
1422

<210> 259
<211> 981
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 259
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag
60

agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg
120

tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca
180

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg cacccagacc
240

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc
300

aaatgttgtg tcgagtgccc accgtgccca gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc
360

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacgtgc
420

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc
480

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt
540

gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc
600

aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg
660

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac
720

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg
780

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac
840

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac
900

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc
960

tccctgtctc cgggtaaatg a
981

<210> 260
<211> 324
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 260
cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct
60

ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag
120

tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac
180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag
240

aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag
300

agcttcaaca ggggagagtg ttag
324

<210> 261
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 261
ggtcagccca aggccaaccc cactgtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagctccaa
60

gccaacaagg ccacactagt gtgtctgatc agtgacttct acccgggagc tgtgacagtg
120

gcctggaagg cagatggcag ccccgtcaag gcgggagtgg agaccaccaa accctccaaa
180

cagagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcccga gcagtggaag
240

tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg
300

gcccctacag aatgttcata g
321