



(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) 
1-0021415

(51)⁷ **C07K 16/24, A61K 39/395, C12N 15/24,** (13) **B**
A61K 47/68, 39/00

(21) 1-2012-01093

(22) 26.10.2010

(86) PCT/US2010/054148 26.10.2010

(87) WO2011/056600 12.05.2011

(30) 61/254,982 26.10.2009 US

61/381,287 09.09.2010 US

(45) 25.07.2019 376

(43) 26.11.2012 296

(73) Amgen Inc. (US)

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

(72) TOWNE, Jennifer, E. (US), CHENG, Janet, D. (US), O'NEILL, Jason, C. (US), ZHANG, Yu (US), SUN, Yu (CN), CERNE, Heather (US), PIPER, Derek, E. (US), KETCHUM, Randal, R. (US)

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

(54) **PROTEIN LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN LIÊN KẾT VỚI IL-23 CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PROTEIN NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 của người. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên, phân tử axit nucleic phân lập được mã hóa một hoặc cả hai vùng thay đổi của protein liên kết kháng nguyên, vectơ phân lập được chứa phân tử axit nucleic, tế bào chủ phân lập được chứa phân tử axit nucleic và/hoặc vectơ, và phương pháp sản xuất protein liên kết kháng nguyên này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23, cụ thể là IL-23 nguyên gốc của người. Sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic phân lập được mã hóa một hoặc cả hai vùng thay đổi của protein liên kết kháng nguyên, vector phân lập được chứa phân tử axit nucleic, tế bào chủ phân lập được chứa phân tử axit nucleic và/hoặc vector. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất protein liên kết kháng nguyên và được phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Interleukin 23 (IL-23), một xytokin heterodime, là chất kích thích xytokin gây viêm hiệu nghiệm. IL-23 có liên quan đến xytokin heterodime interleukin 12 (IL-12), cả hai đều có chung cấu trúc dưới phân tử p40. Trong IL-23, cấu trúc dưới phân tử p19 độc nhất được liên kết cộng hóa trị với cấu trúc dưới phân tử p40. Trong IL-12, cấu trúc dưới phân tử độc nhất là p35 (Oppmann et al., Immunity, 2000, 13: 713-715). Protein IL-23 heterodime được tiết ra. Giống như IL-12, IL-23 được biểu hiện bởi các tế bào trình diện kháng nguyên (như tế bào đuôi gai và đại thực bào) để đáp ứng lại tác nhân kích thích hoạt hóa như sự nổi CD40, chất chủ vận thụ thể giống Toll và tác nhân gây bệnh. IL-23 liên kết thụ thể heterodime bao gồm cấu trúc dưới phân tử IL-12R β 1 (có chung với thụ thể IL-12) và cấu trúc dưới phân tử độc nhất của thụ thể, là IL-23R. Thụ thể IL-12 bao gồm IL-12R β 1 và IL-12R β 2. IL-23 liên kết thụ thể heterodime của nó và truyền tín hiệu qua JAK2 và Tyk2 để hoạt hóa STAT1, 3, 4 và 5 (Parham et al., J. Immunol. 2002, 168:5699-708). Cấu trúc dưới phân tử của thụ thể được đồng biểu hiện chủ yếu ở các tế bào T ghi nhớ hoặc đã hoạt hóa và tế bào ăn mồi tự nhiên, và với lượng nhỏ hơn ở tế bào đuôi gai, bạch cầu đơn nhân to, đại thực bào, tế bào tiêu thần kinh đệm, tế bào keratin và nguyên bào sợi hoạt dịch. IL-23 và IL-12 tác động lên các tập hợp tế bào T khác nhau và đóng vai trò khác nhau đáng kể *in vivo*.

IL-23 tác động lên các tế bào T ghi nhớ và đã hoạt hóa và làm tăng tỷ lệ sống sót và sự mở rộng tập hợp tế bào T, Th17. Các tế bào Th17 sản xuất xytokin gây viêm bao gồm IL-6, IL-17, TNF α , IL-22 và GM-CSF. IL-23 cũng tác động lên tế bào ăn mồi tự nhiên, tế bào đuôi gai và đại thực bào để kích thích sự biểu hiện xytokin gây viêm. Không giống như

IL-23, IL-12 kích thích sự biệt hóa của tế bào T CD4⁺ nguyên thủy (naive CD4⁺ T cell) thành tế bào tác động sản xuất IFN γ Th1 trưởng thành, và kích thích chức năng tế bào ăn mồi tự nhiên (NK) và tế bào T gây độc tế bào bằng cách kích thích việc sản xuất IFN γ . Các tế bào Th1 được điều tiết bởi IL-12 trước đây được cho là phân nhóm của tế bào T gây bệnh ở nhiều bệnh tự miễn, tuy nhiên, nhiều nghiên cứu trên động vật gần đây ở mẫu bệnh viêm ruột, bệnh vẩy nến, bệnh viêm khớp và bệnh đa xơ cứng, trong đó sự đóng góp cụ thể của IL-12 so với IL-23 được đánh giá, đã khẳng định chắc chắn rằng IL-23, chứ không phải là IL-12, là yếu tố điều tiết then chốt trong bệnh tự miễn/bệnh viêm (Ahern et al., *Immun. Rev.* 2008 226:147-159; Cua et al., *Nature* 2003 421:744-748; Yago et al., *Arthritis Res and Ther.* 2007 9(5): R96). IL-12 được tin là đóng vai trò thiết yếu trong việc phát triển các đáp ứng miễn dịch bảo vệ bẩm sinh và miễn dịch thích ứng đối với nhiều tác nhân gây bệnh và virus nội bào và trong việc kiểm soát miễn dịch khối u. Xem tài liệu Kastelein, et al., *Annual Review of Immunology*, 2007, 25: 221-42; Liu, et al., *Rheumatology*, 2007, 46(8): 1266-73; Bowman et al., *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2006 19:245-52; Fieschi and Casanova, *Eur. J. Immunol.* 2003 33:1461-4; Meeran et al., *Mol. Cancer Ther.* 2006 5: 825-32; Langowski et al., *Nature* 2006 442: 461-5. Như vậy, sự ức chế đặc hiệu IL-23 (không ức chế IL-12 hoặc cấu trúc dưới phân tử p40 có chung) cần phải có profin độ an toàn tiềm năng vượt trội so với tác dụng ức chế kép của IL-12 và IL-23.

Do vậy, việc sử dụng chất đối kháng đặc hiệu IL-23 mà ức chế IL-23 của người (như kháng thể liên kết với ít nhất cấu trúc dưới phân tử p19 độc nhất hoặc liên kết với cả cấu trúc dưới phân tử p19 và cấu trúc dưới phân tử p40 của IL-23) và không ức chế IL-12 cần phải tạo ra hiệu quả ngang bằng hoặc lớn hơn so với chất đối kháng IL-12 hoặc chất đối kháng p40 mà không có nguy cơ tiềm ẩn nào liên quan đến sự ức chế IL-12. Kháng thể của chuột, kháng thể được làm giống với kháng thể của người và kháng thể biểu hiện thể thực khuẩn được chọn để ức chế IL-23 tái tổ hợp đã được mô tả; ví dụ xem patent Mỹ 7,491,391, WO1999/05280, WO2007/0244846, WO2007/027714, WO2007/076524, WO2007/147019, WO2008/103473, WO2008/103432, WO2009/043933 và WO2009/082624. Tuy nhiên, cần phải có chất trị liệu hoàn toàn của người mà có thể ức chế IL-23 nguyên gốc của người. Chất trị liệu này đặc hiệu ở mức độ cao đối với đích, đặc biệt là *in vivo*. Tác dụng ức chế đích *in vivo* hoàn toàn có thể giúp tạo ra chế phẩm với liều thấp hơn, việc dùng liều ít thường xuyên hơn và/hoặc hiệu quả hơn, từ đó giúp giảm chi phí và tăng hiệu quả. Sáng chế đề xuất chất đối kháng IL-23 như vậy.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23, cụ thể là IL-23 nguyên gốc của người. Protein liên kết kháng nguyên IL-23 của người có thể làm giảm, ức chế, cản trở và/hoặc điều biến ít nhất một trong số các đáp ứng sinh học liên quan đến IL-23, và như vậy, hữu dụng để làm thuyên giảm tác động của bệnh hoặc rối loạn liên quan đến IL-23. Protein liên kết kháng nguyên IL-23 có thể được sử dụng, ví dụ, để làm giảm, ức chế, cản trở và/hoặc điều biến sự truyền tín hiệu IL-23, sự hoạt hóa IL-23 của tế bào Th17, sự hoạt hóa IL-23 của tế bào NK hoặc sự kích thích sản xuất xytokin gây viêm.

Sáng chế còn đề xuất hệ biểu hiện, bao gồm dòng tế bào, để sản xuất protein liên kết kháng nguyên IL-23 và phương pháp chẩn đoán và điều trị bệnh liên quan đến IL-23 của người.

Một số protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 được đề xuất chứa ít nhất một vùng thay đổi chuỗi nặng chứa CDRH1, CDRH2 và CDRH3 được chọn từ nhóm bao gồm: CDRH1 mà khác biệt bởi không nhiều hơn một đột biến thế, đột biến cài xen hoặc đột biến khuyết axit amin so với CDRH1 thể hiện trong bảng 3; CDRH2 mà khác biệt bởi không nhiều hơn ba, hai hoặc một đột biến thế, đột biến cài xen và/hoặc đột biến khuyết axit amin so với CDRH2 thể hiện trong bảng 3; CDRH3 mà khác biệt bởi không nhiều hơn ba, hai hoặc một đột biến thế, đột biến cài xen và/hoặc đột biến khuyết axit amin so với CDRH3 thể hiện trong bảng 3; và chứa ít nhất một vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa CDRL1, CDRL2 và CDRL3 được chọn từ nhóm bao gồm: CDRL1 mà khác biệt bởi không nhiều hơn ba, hai hoặc một đột biến thế, đột biến cài xen và/hoặc đột biến khuyết axit amin so với CDRL1 thể hiện trong bảng 3; CDRL2 mà khác biệt bởi không nhiều hơn một đột biến thế, đột biến cài xen hoặc đột biến khuyết axit amin so với CDRL2 thể hiện trong bảng 3; CDRL3 mà khác biệt bởi không nhiều hơn một đột biến thế, đột biến cài xen hoặc đột biến khuyết axit amin so với CDRL3 thể hiện trong bảng 3. Theo một phương án, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được chứa: CDRH1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 91, 94, 97, 100 và 103; CDRH2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 92, 95, 98, 101, 104, 107 và 110; CDRH3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 93, 96, 99, 102 và 105; CDRL1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 62, 65, 68, 71 và 74; CDRL2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 63, 66, 69, 72, 75 và 78; và CDRL3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 64, 67, 70 và 73. Theo

phương án khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được chứa: CDRH1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 91, 106, 109, 112 và 115; CDRH2 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 113, 116, 118, 120, 121 và 122; CDRH3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 108, 111, 114, 117 và 119; CDRL1 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 77, 80, 83, 85, 86, 87, 88, 89 và 90; CDRL2 là SEQ ID NO: 81; và CDRL3 được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 76, 79, 82 và 84. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được chứa ít nhất một vùng thay đổi chuỗi nặng và ít nhất một vùng thay đổi chuỗi nhẹ. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được nêu trên mà chứa ít nhất hai vùng thay đổi chuỗi nặng và ít nhất hai vùng thay đổi chuỗi nhẹ. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được trong đó protein liên kết kháng nguyên này được gắn với nhóm đánh dấu.

Sáng chế còn đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23 được chọn từ nhóm bao gồm: a) protein liên kết kháng nguyên có CDRH1 nêu trong SEQ ID NO: 129, CDRH2 nêu trong SEQ ID NO: 132, CDRH3 nêu trong SEQ ID NO: 136, và CDRL1 nêu trong SEQ ID NO: 123, CDRL2 nêu trong SEQ ID NO: 81 và CDRL3 nêu trong SEQ ID NO: 76; b) protein liên kết kháng nguyên có CDRH1 nêu trong SEQ ID NO: 131, CDRH2 nêu trong SEQ ID NO: 134, CDRH3 nêu trong SEQ ID NO: 137, và CDRL1 nêu trong SEQ ID NO: 124, CDRL2 nêu trong SEQ ID NO: 126 và CDRL3 nêu trong SEQ ID NO: 128; c) protein liên kết kháng nguyên có CDRH1 nêu trong SEQ ID NO: 130, CDRH2 nêu trong SEQ ID NO: 133, CDRH3 nêu trong SEQ ID NO: 99, và CDRL1 nêu trong SEQ ID NO: 68, CDRL2 nêu trong SEQ ID NO: 69 và CDRL3 nêu trong SEQ ID NO: 67; và d) protein liên kết kháng nguyên có CDRH1 nêu trong SEQ ID NO: 91, CDRH2 nêu trong SEQ ID NO: 135, CDRH3 nêu trong SEQ ID NO: 138, và CDRL1 nêu trong SEQ ID NO: 125, CDRL2 nêu trong SEQ ID NO: 127 và CDRL3 nêu trong SEQ ID NO: 64.

Sáng chế còn đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23 chứa ít nhất một vùng thay đổi chuỗi nặng và ít nhất một vùng thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm: vùng thay đổi chuỗi nặng chứa các gốc axit amin 31-35, 50-65 và 99-113 nêu trong SEQ ID NO: 31; và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin 23-36, 52-58 và 91-101 nêu trong SEQ ID NO: 1; vùng thay đổi chuỗi nặng chứa các gốc axit amin 31-35, 50-65 và 99-110 nêu trong SEQ ID NO: 34 và vùng thay đổi chuỗi nặng chứa các gốc

axit amin 31-35, 50-66 và 99-110 nêu trong SEQ ID NO: 36; và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin 23-36, 52-62 và 97-105 nêu trong SEQ ID NO: 4; vùng thay đổi chuỗi nặng chứa các gốc axit amin 31-35, 50-66 và 99-114 nêu trong SEQ ID NO: 38; và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin 23-34, 50-61 và 94-106 nêu trong SEQ ID NO: 7; vùng thay đổi chuỗi nặng chứa các gốc axit amin 31-35, 50-66 và 99-114 nêu trong SEQ ID NO: 40; và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin 24-34, 50-56 và 94-106 nêu trong SEQ ID NO: 9; vùng thay đổi chuỗi nặng chứa các gốc axit amin 31-35, 50-66 và 99-114 nêu trong SEQ ID NO: 42; và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin 23-34, 50-61 và 94-106 nêu trong SEQ ID NO: 11; vùng thay đổi chuỗi nặng chứa các gốc axit amin 31-35, 50-65 và 98-107 nêu trong SEQ ID NO: 44; và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin 24-34, 50-56 và 89-97 nêu trong SEQ ID NO: 13; vùng thay đổi chuỗi nặng chứa các gốc axit amin 31-37, 52-67 và 100-109 nêu trong SEQ ID NO: 46 hoặc SEQ ID NO: 153; và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin 24-34, 50-56 và 89-97 nêu trong SEQ ID NO: 15; vùng thay đổi chuỗi nặng chứa các gốc axit amin 31-37, 52-67 và 100-109 nêu trong SEQ ID NO: 48; và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin 24-34, 50-56 và 89-97 nêu trong SEQ ID NO: 17; vùng thay đổi chuỗi nặng chứa các gốc axit amin 31-37, 52-67 và 101-109 nêu trong SEQ ID NO: 50; và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin 24-34, 50-56 và 89-97 nêu trong SEQ ID NO: 19; vùng thay đổi chuỗi nặng chứa các gốc axit amin 31-35, 50-65 và 98-107 nêu trong SEQ ID NO: 52; và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin 24-34, 50-56 và 98-107 nêu trong SEQ ID NO: 21; vùng thay đổi chuỗi nặng chứa các gốc axit amin 31-37, 52-67 và 100-109 nêu trong SEQ ID NO: 54; và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin 24-34, 50-56 và 89-97 nêu trong SEQ ID NO: 23; vùng thay đổi chuỗi nặng chứa các gốc axit amin 31-37, 52-67 và 100-109 nêu trong SEQ ID NO: 56; và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin 24-34, 50-56 và 89-97 nêu trong SEQ ID NO: 25; và vùng thay đổi chuỗi nặng chứa các gốc axit amin 31-37, 52-57 và 100-109 nêu trong SEQ ID NO: 58; và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin 24-34, 50-56 và 89-97 nêu trong SEQ ID NO: 27.

Sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23 chứa vùng thay đổi chuỗi nặng và vùng thay đổi chuỗi nhẹ, trong đó trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng khác biệt bởi không nhiều hơn 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 đột biến thế, đột biến thêm và/hoặc đột biến khuyết axit amin so với trình tự vùng thay đổi chuỗi nặng thể hiện trong bảng 2; và trong đó trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ khác biệt bởi

không nhiều hơn 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 đột biến thế, đột biến thêm và/hoặc đột biến khuyết axit amin so với trình tự vùng thay đổi chuỗi nhẹ thể hiện trong bảng 1.

Sáng chế còn đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23 được chọn từ nhóm bao gồm: a) vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 140 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 30; b) vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 141 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 61; c) vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 142 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 4; và d) vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 143 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 139.

Sáng chế còn đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được chứa vùng thay đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% so với SEQ ID NO: 31, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56 và 58; và vùng thay đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90% so với SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 và 27. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên phân lập được chứa vùng thay đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58 và 153, và vùng thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 và 27. Theo một phương án khác nữa, protein liên kết kháng nguyên phân lập được chứa vùng thay đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 31, 34, 36, 38, 40 và 42, và vùng thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9 và 11.

Sáng chế còn đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23 chứa vùng thay đổi chuỗi nặng và vùng thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm: a) vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 31 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 1; b) vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 34 hoặc 36 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 4; c) vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 38 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 7; d) vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 40 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 9; e) vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 42 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 11; f) vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 44 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 13; g) vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 46 hoặc

SEQ ID NO: 153 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 15; h) vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 48 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 17; i) vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 50 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 19; j) vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 52 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 21; k) vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 54 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 23; l) vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 56 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 25; và m) vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 58 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 27.

Sáng chế còn đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23 của người, trong đó phần rập nổi bao phủ tạo thành khi protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 của người chứa các vị trí gốc tiếp xúc 30, 31, 32, 49, 50, 52, 53, 56, 92 và 94 nêu trong SEQ ID NO: 15, trong đó các vị trí gốc tiếp xúc có giá trị chênh lệch lớn hơn hoặc bằng $10 \text{ \AA}^2$ khi xác định theo diện tích bề mặt tiếp xúc dung môi. Theo một phương án, các vị trí gốc tiếp xúc bao gồm các gốc 31-35, 54, 58-60, 66 và 101-105 nêu trong SEQ ID NO: 46.

Sáng chế còn đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23 của người, trong đó phần rập nổi bao phủ tạo thành khi protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 của người chứa các vị trí gốc tiếp xúc 31-34, 51, 52, 55, 68, 93 và 98 nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó các vị trí gốc tiếp xúc có giá trị chênh lệch lớn hơn hoặc bằng $10 \text{ \AA}^2$ khi xác định theo diện tích bề mặt tiếp xúc dung môi. Theo một phương án, các vị trí gốc tiếp xúc bao gồm các gốc 1, 26, 28, 31, 32, 52, 53, 59, 76, 101, 102 và 104-108 nêu trong SEQ ID NO: 31.

Sáng chế còn đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23 của người, trong đó khi protein liên kết kháng nguyên này liên kết với IL-23 của người, thì protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ các gốc 32-35, 54, 58-60, 66 và 101-105 nêu trong SEQ ID NO: 46, khi xác định theo kỹ thuật tinh thể học tia X. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ các gốc 31-35, 54, 56, 58-60, 66 và 101-105 nêu trong SEQ ID NO: 46.

Sáng chế còn đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23 của người, trong đó khi protein liên kết kháng nguyên này liên kết với IL-23 của người, thì

protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ các gốc 30-32, 49, 52, 53, 91-94 và 96 nêu trong SEQ ID NO: 15, khi xác định theo kỹ thuật tinh thể học tia X. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ các gốc 30-32, 49, 50, 52, 53, 56, 91-94 và 96 nêu trong SEQ ID NO: 15.

Sáng chế còn đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23 của người, trong đó khi protein liên kết kháng nguyên này liên kết với IL-23 của người, thì protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ các gốc 26-28, 31, 53, 59, 102 và 104-108 nêu trong SEQ ID NO: 31, khi xác định theo kỹ thuật tinh thể học tia X. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ các gốc 1, 26-28, 30-32, 52, 53, 59, 100 và 102-108 nêu trong SEQ ID NO: 31.

Sáng chế còn đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23 của người, trong đó khi protein liên kết kháng nguyên này liên kết với IL-23 của người, thì protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ các gốc 31-34, 51, 52, 55, 68 và 93 nêu trong SEQ ID NO: 1 khi xác định theo kỹ thuật tinh thể học tia X. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ các gốc 29, 31-34, 51, 52, 55, 68, 93 và 100 nêu trong SEQ ID NO: 1.

Sáng chế còn đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được nêu trên, trong đó protein liên kết kháng nguyên này là kháng thể. Theo một phương án, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được, trong đó kháng thể là kháng thể đơn dòng, kháng thể tái tổ hợp, kháng thể của người, kháng thể được làm giống với kháng thể của người, kháng thể khảm, kháng thể đa đặc hiệu hoặc mảnh kháng thể của chúng. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được, trong đó mảnh kháng thể là mảnh Fab, mảnh Fab', mảnh F(ab')₂, mảnh Fv, đoạn Fv chuỗi đơn dạng dime (diabody) hoặc phân tử kháng thể chuỗi đơn. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được, trong đó protein liên kết kháng nguyên này là kháng thể của người. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được, trong đó protein liên kết kháng nguyên này là kháng thể đơn dòng. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được, trong đó protein liên kết kháng nguyên này thuộc typ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được, trong đó protein liên kết kháng nguyên này thuộc typ IgG1 hoặc IgG2.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic phân lập được mã hóa protein liên kết kháng nguyên nêu trên. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic phân lập được, trong đó ít nhất một vùng thay đổi chuỗi nặng được mã hóa bởi phân tử axit nucleic được phân lập được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 32, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59 và 152 và ít nhất một vùng thay đổi chuỗi nhẹ được mã hóa bởi phân tử axit nucleic phân lập được được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 và 28. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic trong đó phân tử axit nucleic này được liên kết có điều khiển với trình tự kiểm soát. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất vector chứa phân tử axit nucleic nêu trên. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa phân tử axit nucleic nêu trên. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa vector nêu trên. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất polynucleotit phân lập được thích hợp để sử dụng làm mẫu dò lai, đoạn môi PCR hoặc đoạn môi xác định trình tự mà là một mảnh của phân tử axit nucleic nêu trên hoặc phần bổ thể của nó.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất protein liên kết kháng nguyên nêu trên, bao gồm bước tạo ra protein liên kết kháng nguyên này từ tế bào chủ tiết ra protein liên kết kháng nguyên này.

Sáng chế còn đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23 của người, trong đó phần rập nổi bao phủ tạo thành khi protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 của người chứa vị trí gốc tiếp xúc nằm trong các gốc 46-58, vị trí gốc tiếp xúc nằm trong các gốc 112-120 và vị trí gốc tiếp xúc nằm trong các gốc 155-163 của cấu trúc dưới phân tử IL-23p19 của người nêu trong SEQ ID NO: 145, trong đó vị trí gốc tiếp xúc này có giá trị chênh lệch lớn hơn hoặc bằng $10 \text{ \AA}^2$ khi xác định theo diện tích bề mặt tiếp xúc dung môi. Sáng chế đề xuất một phương án trong đó phần rập nổi bao phủ tạo thành khi protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 của người chứa một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai hoặc mười ba vị trí gốc tiếp xúc nằm trong các gốc 46-58, một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín hoặc mười vị trí gốc tiếp xúc nằm trong các gốc 112-120, và một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám hoặc chín vị trí gốc tiếp xúc nằm trong các gốc 155-163 của cấu trúc dưới phân tử IL-23p19 của người nêu trong SEQ ID NO: 145. Sáng chế đề xuất phương án khác trong đó phần rập nổi bao phủ tạo thành khi protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 của người chứa vị trí gốc tiếp xúc nằm trong các gốc 121-125 của cấu trúc dưới phân tử IL-23p40 của người nêu trong SEQ ID

NO: 147. Sáng chế đề xuất phương án liên quan trong đó phần rập nổi bao phủ tạo thành khi protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 của người chứa một, hai, ba, bốn hoặc năm vị trí gốc tiếp xúc nằm trong các gốc 121-125 của cấu trúc dưới phân tử IL-23p40 của người nêu trong SEQ ID NO: 147. Sáng chế đề xuất phương án khác trong đó phần rập nổi bao phủ tạo thành khi protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 của người chứa các vị trí gốc tiếp xúc 46, 47, 49, 50, 53, 112-116, 118, 120, 155, 156, 159, 160 và 163 nêu trong SEQ ID NO: 145. Sáng chế đề xuất phương án khác trong đó phần rập nổi bao phủ tạo thành khi protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 của người chứa các vị trí gốc tiếp xúc 46, 47, 49, 50, 53, 112-118, 120, 155, 156, 159, 160 và 163 nêu trong SEQ ID NO: 145. Sáng chế đề xuất phương án khác trong đó phần rập nổi bao phủ tạo thành khi protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 của người chứa các gốc 46, 47, 49, 50, 53-55, 57, 58, 112-116, 118-120, 155, 156, 159, 160, 162 và 163 nêu trong SEQ ID NO: 145. Sáng chế đề xuất phương án liên quan trong đó phần rập nổi bao phủ tạo thành khi protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 của người chứa vị trí gốc tiếp xúc 122 của cấu trúc dưới phân tử IL-23p40 của người nêu trong SEQ ID NO: 147. Sáng chế đề xuất phương án liên quan khác trong đó phần rập nổi bao phủ tạo thành khi protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 của người chứa các vị trí gốc tiếp xúc 122 và 124 của cấu trúc dưới phân tử IL-23p40 của người nêu trong SEQ ID NO: 147. Sáng chế đề xuất phương án liên quan khác nữa trong đó phần rập nổi bao phủ tạo thành khi protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 của người chứa các vị trí gốc tiếp xúc 121-123 và 125 của cấu trúc dưới phân tử IL-23p40 của người nêu trong SEQ ID NO: 147. Sáng chế đề xuất phương án liên quan khác nữa trong đó phần rập nổi bao phủ tạo thành khi protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 của người chứa các vị trí gốc tiếp xúc 121-123, 125 và 283 của cấu trúc dưới phân tử IL-23p40 của người nêu trong SEQ ID NO: 147.

Sáng chế còn đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23 của người, trong đó khi protein liên kết kháng nguyên này liên kết với IL-23 của người, thì protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ gốc nằm trong các gốc 46-58, kể từ gốc nằm trong các gốc 112-123 và kể từ gốc nằm trong các gốc 155-163 của cấu trúc dưới phân tử IL-23p19 của người nêu trong SEQ ID NO: 145, khi xác định theo kỹ thuật tinh thể học tia X. Theo một phương án, khi protein liên kết kháng nguyên này liên kết với IL-23 của người, thì protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín, mười, mười một, mười hai hoặc

mười ba gốc nằm trong các gốc 46-58, kể từ một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám, chín hoặc mười gốc nằm trong các gốc 112-123 và kể từ một, hai, ba, bốn, năm, sáu, bảy, tám hoặc chín gốc nằm trong các gốc 155-163 của cấu trúc dưới phân tử IL-23p19 của người nêu trong SEQ ID NO: 145. Theo phương án khác, khi protein liên kết kháng nguyên này liên kết với IL-23 của người, thì protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ các gốc 46-50, 113-116, 120, 156, 159, 160 và 163 nêu trong SEQ ID NO: 145. Theo phương án khác, khi protein liên kết kháng nguyên này liên kết với IL-23 của người, thì protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ các gốc 46-50, 112-120, 156, 159, 160 và 163 nêu trong SEQ ID NO: 145. Theo phương án liên quan, khi protein liên kết kháng nguyên này liên kết với IL-23 của người, thì protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ các gốc 46-50, 53, 112-120, 156, 159, 160 và 163 nêu trong SEQ ID NO: 145. Theo phương án khác, khi protein liên kết kháng nguyên này liên kết với IL-23 của người, thì protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ các gốc 46-50, 53-55, 58, 113-116, 120, 121, 156, 159, 160, 162 và 163 nêu trong SEQ ID NO: 145. Theo phương án liên quan, khi protein liên kết kháng nguyên này liên kết với IL-23 của người, thì protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ các gốc 46-51, 53-55, 57, 58, 112-116, 118-121, 123, 155, 156, 159, 160, 162 và 163 nêu trong SEQ ID NO: 145. Theo phương án khác, khi protein liên kết kháng nguyên này liên kết với IL-23 của người, thì protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ gốc nằm trong các gốc 121-125 của cấu trúc dưới phân tử IL-23p40 của người nêu trong SEQ ID NO: 147, khi xác định theo kỹ thuật tinh thể học tia X. Theo phương án liên quan, khi protein liên kết kháng nguyên này liên kết với IL-23 của người, thì protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ các gốc 122 và 124 nêu trong SEQ ID NO: 147. Theo phương án khác, khi protein liên kết kháng nguyên này liên kết với IL-23 của người, thì protein liên kết kháng nguyên này ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ các gốc 121-123 và 125 nêu trong SEQ ID NO: 147.

Sáng chế còn đề xuất protein liên kết kháng nguyên phân lập được nêu trên, trong đó protein liên kết kháng nguyên này có ít nhất một đặc tính được chọn từ nhóm bao gồm: a) làm giảm hoạt tính IL-23 của người; b) làm giảm sự sản xuất xytokin gây viêm; c) liên kết với IL-23 của người với $K_D \leq 5 \times 10^{-8}$ M; d) có tốc độ $K_{off} \leq 5 \times 10^{-6}$ 1/s; và e) có $IC_{50} \leq 400$ pM.

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa ít nhất một protein liên kết kháng nguyên nêu trên và tá được được dụng. Theo một phương án, được phẩm được đề xuất còn chứa nhóm đánh dấu hoặc nhóm tác động. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất được phẩm trong đó nhóm đánh dấu được chọn từ nhóm bao gồm chất đánh dấu đồng vị, chất đánh dấu có từ tính, gốc có hoạt tính oxy hóa-khử, chất nhuộm quang học, nhóm được biotinyl hóa và epitop polypeptit đã xác định trước được nhận diện bằng chất chỉ thị thứ cấp. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất được phẩm trong đó nhóm tác động được chọn từ nhóm bao gồm chất đồng vị phóng xạ, nuclit phóng xạ, độc tố, nhóm trị liệu và nhóm hóa trị liệu.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh liên quan đến IL-23 ở bệnh nhân, trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho bệnh nhân cần điều trị hoặc ngăn ngừa lượng hữu hiệu của ít nhất một protein liên kết kháng nguyên phân lập được nêu trên. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp trong đó tình trạng bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh viêm, bệnh thấp khớp, bệnh tự miễn, bệnh ung thư và bệnh dạ dày-ruột. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp trong đó tình trạng bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh đa xơ cứng, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh ung thư, bệnh vẩy nến, bệnh viêm ruột, bệnh Crohn, bệnh viêm loét đại tràng, bệnh luput ban đỏ hệ thống, bệnh viêm khớp vẩy nến, bệnh viêm cơ tim tự miễn; bệnh đái tháo đường typ 1 và bệnh viêm cột sống dính khớp. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp trong đó protein liên kết kháng nguyên phân lập được được sử dụng ở dạng riêng lẻ hoặc ở dạng trị liệu kết hợp.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp làm giảm hoạt tính IL-23 ở bệnh nhân, trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng lượng hữu hiệu của ít nhất một protein liên kết kháng nguyên nêu trên. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm hoạt tính IL-23, trong đó hoạt tính IL-23 này kích thích sự sản xuất xytokin gây viêm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A: Kết quả của thử nghiệm về chất chỉ thị STAT-luxiferaza sử dụng IL-23 tái tổ hợp của người. Tất cả các kháng thể đều ức chế hoàn toàn IL-23 tái tổ hợp của người.

Fig.1B: Kết quả của thử nghiệm về chất chỉ thị STAT-luxiferaza sử dụng IL-23 nguyên gốc của người. Chỉ một nửa số kháng thể mà ức chế hoàn toàn IL-23 tái tổ hợp của người là có thể ức chế hoàn toàn IL-23 nguyên gốc của người.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất hợp phần, bộ kit và phương pháp liên quan đến protein liên kết kháng nguyên IL-23, bao gồm phân tử đối kháng IL-23, như kháng thể kháng IL-23, mảnh và dẫn xuất của nó, ví dụ, kháng thể kháng IL-23 đối kháng, mảnh hoặc dẫn xuất của nó. Sáng chế còn đề xuất polynucleotit, và dẫn xuất và mảnh của nó, chứa trình tự axit nucleic mã hoá cho toàn bộ hoặc một phần của polypeptit mà liên kết với IL-23, ví dụ, polynucleotit mã hóa toàn bộ hoặc một phần của kháng thể kháng IL-23, mảnh hoặc dẫn xuất của nó, plasmit và vector chứa axit nucleic này, và tế bào hoặc dòng tế bào chứa polynucleotit và/hoặc vector và plasmit này. Phương pháp được đề xuất bao gồm, ví dụ, phương pháp sản xuất, nhận diện hoặc phân lập protein liên kết kháng nguyên IL-23, như kháng thể kháng IL-23, phương pháp xác định xem phân tử này có liên kết với IL-23 hay không, phương pháp xác định xem phân tử này có đối kháng IL-23 hay không, phương pháp sản xuất hợp phần, như dược phẩm, chứa protein liên kết kháng nguyên IL-23 và phương pháp sử dụng protein liên kết kháng nguyên IL-23 cho đối tượng, ví dụ, phương pháp điều trị tình trạng bệnh được điều tiết bởi IL-23 và phương pháp đối kháng hoạt tính sinh học của IL-23, *in vivo* hoặc *in vitro*.

Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật dùng trong bản mô tả này có các nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật. Ngoài ra, trừ khi văn cảnh có yêu cầu khác, thuật ngữ dạng số ít cũng bao gồm cả dạng số nhiều và thuật ngữ dạng số nhiều cũng bao gồm cả dạng số ít. Tương tự, các danh pháp và kỹ thuật được sử dụng liên quan đến 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 axit nucleic và phép lai nêu trong bản mô tả này là đã biết rõ và thường được sử dụng trong lĩnh vực. Các phương pháp và kỹ thuật theo sáng chế thường được thực hiện theo các phương pháp thông thường đã biết rõ trong lĩnh vực và đã được mô tả trong các tài liệu tham khảo tổng quát và chuyên sâu hơn được viện dẫn và thảo luận trong bản mô tả này, trừ khi có quy định khác. Xem tài liệu, ví dụ, Sambrook et al., *Molecular Cloning: Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) và Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), và Harlow and Lane *Antibodies: Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Phản ứng enzyme và kỹ thuật tinh chế được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như thường được thực hiện trong lĩnh vực hoặc như được nêu trong bản mô tả này.

Các thuật ngữ và kỹ thuật và quy trình phòng thí nghiệm được sử dụng liên quan đến hóa học phân tích, hóa hữu cơ tổng hợp và hóa y học và hóa dược nêu trong bản mô tả này là đã biết rõ và thường được sử dụng trong lĩnh vực. Kỹ thuật tiêu chuẩn có thể được sử dụng để tổng hợp hóa chất, phân tích hóa chất, điều chế, bào chế và đưa dược phẩm vào cơ thể và điều trị bệnh nhân.

Tất cả các patent và các tài liệu công bố khác được thể hiện được đưa vào bản mô tả này một cách rõ ràng bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của chúng nhằm mục đích mô tả và bộc lộ, ví dụ, các phương pháp được mô tả trong các tài liệu công bố này mà có thể được sử dụng liên quan đến thông tin nêu trong bản mô tả này.

Trình tự polynucleotit và protein của cấu trúc dưới phân tử p19 của IL-23 của người (SEQ ID NO: 144 và 145), cấu trúc dưới phân tử p40 có chung (SEQ ID NO: 146 và 147), cấu trúc dưới phân tử heterodime của thụ thể IL-23 của người IL-12R β 1 (SEQ ID NO: 150 và 151) và IL-23R (SEQ ID NO: 148 và 149) là đã biết trong lĩnh vực, ví dụ xem, số nộp lưu GenBank AB030000; M65272, NM_005535, NM_144701, như là các dạng từ các loài động vật có vú khác. Protein thụ thể IL-23 và IL-23 tái tổ hợp bao gồm protein chuỗi đơn và Fc cũng như tế bào biểu hiện thụ thể IL-23 đã được mô tả hoặc có sẵn từ các nguồn có trên thị trường. (xem, ví dụ, Oppmann et al., Immunity, 2000, 13: 713-715; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota; United States Biological, Swampscott, Massachusetts; WO2007/076524). IL-23 nguyên gốc của người có thể được thu nhận từ tế bào của người như tế bào đuôi gai bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực, bao gồm các phương pháp nêu trong bản mô tả này.

IL-23 là cytokin heterodime chứa cấu trúc dưới phân tử p19 độc nhất được liên kết cộng hóa trị với cấu trúc dưới phân tử p40 có chung. Cấu trúc dưới phân tử p19 có bốn xoắn ốc α , “A”, “B”, “C” và “D” trong motif lên-lên-xuống-xuống được kết nối bởi ba thòng lọng bên trong xoắn ốc giữa xoắn ốc A và xoắn ốc B, giữa xoắn ốc B và xoắn ốc C và giữa xoắn ốc C và xoắn ốc D, xem tài liệu Oppmann et al., Immunity, 2000, 13: 713-715 và Beyer, et al., J Mol Biol, 2008, 382(4): 942-55. Xoắn ốc A và xoắn ốc D của 4 cytokin bó xoắn ốc được tin là tham gia vào việc liên kết thụ thể. Cấu trúc dưới phân tử p40 có ba miền kẹp phiên beta, D1, D2 và D3 (Lupardus and Garcia, J. Mol. Biol., 2008, 382:931-941).

Thuật ngữ “polynucleotit” bao gồm cả axit nucleic sợi đơn và axit nucleic sợi kép và bao gồm ADN hệ gen, ARN, mRNA, cADN hoặc điểm bắt đầu tổng hợp hoặc tổ hợp bất kỳ

của chúng mà không liên quan đến trình tự thường được tìm thấy trong tự nhiên. Polynucleotit được phân lập chứa trình tự cụ thể có thể bao gồm, ngoài trình tự cụ thể đã nêu, trình tự mã hóa cho lên tới mười hoặc thậm chí lên tới hai mươi protein khác hoặc một phần của chúng, hoặc có thể bao gồm trình tự điều hòa được liên kết có điều khiển mà kiểm soát sự biểu hiện của vùng mã hóa của trình tự axit nucleic đã nêu, và/hoặc có thể bao gồm trình tự vector. Nucleotit chứa polynucleotit có thể là ribonucleotit hoặc deoxyribonucleotit hoặc dạng được cải biến của một trong hai loại nucleotit này. Dạng cải biến bao gồm dạng cải biến bazơ như dẫn xuất bromouridin và inosin, dạng cải biến riboza như 2',3'-dideoxyriboza, và dạng cải biến liên kết liên nucleotit như phosphorothioat, phosphorodithioat, phosphoroselenoat, phosphorodiselenoat, phosphoroanilothioat, phosphoraniladat và phosphoroamidat.

Thuật ngữ “oligonucleotit” có nghĩa là polynucleotit chứa 100 nucleotit hoặc ít hơn. Theo một số phương án, oligonucleotit có chiều dài nằm trong khoảng từ 10 đến 60 bazơ. Theo các phương án khác, oligonucleotit có chiều dài là 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc từ 20 đến 40 nucleotit. Oligonucleotit có thể là sợi đơn hoặc sợi kép, ví dụ, để sử dụng trong việc tạo cấu trúc gen đột biến. Oligonucleotit có thể là oligonucleotit có nghĩa hoặc đối nghĩa. Oligonucleotit có thể chứa chất đánh dấu có thể phát hiện được, như chất đánh dấu phóng xạ, chất đánh dấu huỳnh quang, hapten hoặc chất đánh dấu kháng nguyên, để dùng trong thử nghiệm phát hiện. Oligonucleotit có thể được sử dụng, ví dụ, làm đoạn mồi PCR, đoạn mồi tách dòng hoặc mẫu dò lai.

Thuật ngữ “polypeptit” hoặc “protein” có nghĩa là đại phân tử có trình tự axit amin của protein nguyên gốc, tức là protein được sản xuất bởi tế bào có trong tự nhiên và không tái tổ hợp; hoặc được sản xuất bởi tế bào tái tổ hợp hoặc được thiết kế di truyền, và bao gồm phân tử có trình tự axit amin của protein nguyên gốc, hoặc phân tử có một hoặc nhiều đột biến khuyết, đột biến cài xen và/hoặc đột biến thế gốc axit amin của trình tự tự nhiên. Thuật ngữ này còn bao gồm polyme axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin là thể tương tự hóa học của axit amin và polyme có trong tự nhiên tương ứng. Thuật ngữ “polypeptit” và “protein” bao hàm protein liên kết kháng nguyên IL-23 (như kháng thể) và trình tự có một hoặc nhiều đột biến khuyết, đột biến thêm và/hoặc đột biến thế gốc axit amin của trình tự protein liên kết kháng nguyên. Thuật ngữ “mảnh polypeptit” chỉ polypeptit có đột biến khuyết đầu tận amino, đột biến khuyết đầu tận carboxyl và/hoặc đột biến khuyết bên trong so với protein nguyên gốc nguyên chiều dài. Mảnh này cũng có thể chứa axit amin được cải

biến so với protein nguyên gốc. Theo một số phương án nhất định, mảnh có chiều dài nằm trong khoảng từ khoảng 5 đến 500 axit amin. Ví dụ, mảnh có thể có chiều dài ít nhất 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 hoặc 450 axit amin. Mảnh polypeptit hữu dụng bao gồm mảnh có chức năng miễn dịch của kháng thể, bao gồm miền liên kết. Trong trường hợp protein liên kết kháng nguyên IL-23, như kháng thể, mảnh hữu dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều vùng CDR, miền thay đổi của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, một phần của chuỗi kháng thể, một phần của vùng thay đổi bao gồm ít hơn ba CDR, và dạng tương tự.

“Axit amin” có nghĩa thông thường của nó trong lĩnh vực. Hai mươi axit amin có trong tự nhiên và tên viết tắt của chúng tuân theo cách sử dụng thông thường. Xem tài liệu Immunology-A Synthesis, 2nd Edition, (E. S. Golub and D. R. Gren, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, Mass. (1991). Chất đồng phân lập thể (ví dụ, D-axit amin) của hai mươi axit amin thông thường, axit amin không tự nhiên như axit amin được thể hai lần tại vị trí alpha, N-alkyl axit amin và các axit amin không thông thường khác cũng có thể là thành phần thích hợp của polypeptit. Ví dụ về axit amin không thông thường bao gồm: 4-hydroxyprolin, [gamma]-carboxyglutamat, [epsilon]-N,N,N-trimetyllysin, [epsilon]-N-axetyllysin, O-phosphoserin, N-axetylserin, N-formylmethionin, 3-metylhistidin, 5-hydroxylysin, [sigma]-N-metylarginin, và các axit amin và axit imino tương tự khác (ví dụ, 4-hydroxyprolin). Trong ký hiệu polypeptit được sử dụng trong bản mô tả này, chiều bên tay trái là chiều đầu tận amino và chiều bên tay phải là chiều đầu tận carboxyl, theo cách dùng tiêu chuẩn và thông thường.

Thuật ngữ “protein được phân lập” chỉ protein, như protein liên kết kháng nguyên (ví dụ về nó có thể là kháng thể), được tinh chế ra khỏi các protein hoặc polypeptit hoặc các chất tạp nhiễm khác mà sẽ cản trở ứng dụng trị liệu, chẩn đoán, phòng ngừa, nghiên cứu hoặc ứng dụng khác của nó. Trong bản mô tả này, “tinh khiết về cơ bản” có nghĩa là loại phân tử được mô tả là loại có mặt chiếm ưu thế, tức là tính trên cơ sở mol nó chiếm ưu thế hơn so với bất kỳ loại riêng lẻ nào khác trong cùng hỗn hợp. Theo một số phương án nhất định, phân tử tinh khiết về cơ bản là hợp phần trong đó loại phân tử mục tiêu chiếm ít nhất 50% (tính trên cơ sở mol) của tất cả các loại đại phân tử có mặt. Theo các phương án khác, hợp phần tinh khiết về cơ bản chiếm ít nhất 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 99% của tất cả các loại đại phân tử có mặt trong hợp phần. Theo một số phương án nhất định, chất đồng nhất về cơ bản được tinh chế đến mức độ không thể phát hiện được loại chất tạp nhiễm trong hợp

phần bằng phương pháp phát hiện thông thường, và như vậy hợp phần này chỉ chứa duy nhất loại đại phân tử có thể phát hiện được.

“Biến thể” của polypeptit (ví dụ, protein liên kết kháng nguyên như kháng thể) chứa trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin được cài xen, được làm khuyết và/hoặc được thế vào trình tự axit amin so với trình tự polypeptit khác. Biến thể bao gồm protein dung hợp. “Dẫn xuất” của polypeptit là polypeptit được biến đổi hóa học theo cách khác với biến thể cài xen, khuyết hoặc thế, ví dụ, bằng cách liên hợp với gốc hóa học khác.

Thuật ngữ “có trong tự nhiên” hoặc “nguyên gốc” trong bản mô tả này liên quan đến vật liệu sinh học như polypeptit, axit nucleic, tế bào chủ, và dạng tương tự, chỉ vật liệu tìm thấy được trong tự nhiên, như IL-23 nguyên gốc của người. Theo một số khía cạnh khác, sáng chế đề xuất protein tái tổ hợp liên kết kháng nguyên mà liên kết với IL-23 nguyên gốc. Theo nghĩa này, “protein tái tổ hợp” là protein được sản xuất bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp, tức là, thông qua sự biểu hiện axit nucleic tái tổ hợp nêu trong bản mô tả này. Các phương pháp và kỹ thuật dùng để sản xuất protein tái tổ hợp là đã biết rõ trong lĩnh vực.

Thuật ngữ “kháng thể” chỉ globulin miễn dịch nguyên vẹn thuộc isotyp bất kỳ, hoặc mảnh 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 khảm, kháng thể được làm giống với kháng thể 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. Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “kháng thể” bao gồm, ngoài kháng thể chứa hai chuỗi nặng nguyên chiều dài và hai chuỗi nhẹ nguyên chiều dài, dẫn xuất, biến thể, mảnh và thể đột biến của chúng, ví dụ về chúng được mô tả dưới đây. Kháng thể nguyên vẹn thường chứa ít nhất hai chuỗi nặng nguyên chiều dài và hai chuỗi nhẹ nguyên chiều dài, nhưng trong một số ví dụ có thể chứa ít chuỗi hơn, như kháng thể có trong tự nhiên ở lạc đà mà có thể chỉ chứa chuỗi nặng. Kháng thể có thể có nguồn gốc từ chỉ một nguồn, hoặc có thể là “khảm”, tức là các phần khác nhau của kháng thể có thể có nguồn gốc từ hai kháng thể khác nhau như nêu dưới đây. Protein liên kết kháng nguyên, kháng thể hoặc mảnh liên kết có thể được tạo ra ở tế bào lai bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp hoặc bằng cách phân cắt kháng thể nguyên vẹn bằng enzym hoặc hóa học.

Thuật ngữ “mảnh chức năng” (hoặc đơn giản là “mảnh”) của kháng thể hoặc chuỗi globulin miễn dịch (chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ) trong bản mô tả này là protein liên kết kháng nguyên chứa một phần (bất kể phần này được thu nhận hoặc được tổng hợp như thế

nào) của kháng thể mà thiếu ít nhất một số trong số các axit amin có mặt trong chuỗi nguyên chiều dài nhưng có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên. Mảnh này có hoạt tính sinh học ở chỗ chúng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích và có thể cạnh tranh với protein liên kết kháng nguyên khác, bao gồm kháng thể nguyên vẹn, để liên kết đặc hiệu với epitop được nêu. Theo một khía cạnh, mảnh này giữ lại ít nhất một CDR có mặt trong chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng nguyên chiều dài, và theo một số phương án chứa một chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ hoặc một phần của chúng. Mảnh có hoạt tính sinh học có thể được sản xuất bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp, hoặc có thể được sản xuất bằng cách phân cắt protein liên kết kháng nguyên, bao gồm kháng thể nguyên vẹn, bằng enzym hoặc hóa học. Mảnh bao gồm, nhưng không giới hạn ở, mảnh có chức năng miễn dịch như Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, kháng thể miễn và kháng thể chuỗi đơn, và có thể có nguồn gốc từ động vật có vú bất kỳ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, người, chuột nhắt, chuột đuôi dài (chuột Rattus), lạc đà hoặc thỏ. Sáng chế cũng dự định rằng phần chức năng của protein liên kết kháng nguyên nêu trong bản mô tả này, ví dụ, một hoặc nhiều CDR, có thể được liên kết cộng hóa trị với protein thứ hai hoặc với phân tử nhỏ để tạo ra chất trị liệu nhắm đến đích cụ thể trong cơ thể, có đặc tính trị liệu chức năng kép, hoặc có thời gian bán hủy trong huyết thanh kéo dài.

Thuật ngữ “cạnh tranh” khi được sử dụng liên quan đến protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, protein liên kết kháng nguyên trung hòa hoặc kháng thể trung hòa) 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 mảnh có chức năng miễn dịch của chúng) 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, protein IL-23 hoặc mảnh của chúng). Nhiều loại thử nghiệm liên kết cạnh tranh có thể được sử dụng, ví dụ: thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) trực tiếp hoặc gián tiếp pha rắn, thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA) trực tiếp hoặc gián tiếp pha rắn, thử nghiệm cạnh tranh kiểu bánh kẹp (sandwich) (xem, ví dụ, Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 92:242-253); EIA biotin-avidin trực tiếp pha rắn (xem, ví dụ, Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619), thử nghiệm có đánh dấu trực tiếp pha rắn, thử nghiệm kiểu bánh kẹp có đánh dấu trực tiếp pha rắn (xem, ví dụ, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA có đánh dấu trực tiếp pha rắn sử dụng chất đánh dấu I-125 (xem, ví dụ, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15); EIA biotin-avidin trực tiếp pha rắn (xem, ví dụ, Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-

552) và RIA có đánh dấu trực tiếp (Moldenhauer et al., 1990, Scand. J. Immunol. 32:77-82). Thông thường, thử nghiệm này bao gồm việc sử dụng kháng nguyên đã được tinh chế liên kết vào bề mặt rắn hoặc tế bào mang protein liên kết kháng nguyên thử nghiệm không được đánh dấu và protein liên kết kháng nguyên tham chiếu đã được đánh dấu.

Sự ức chế cạnh tranh được xác định bằng cách xác định lượng chất đánh dấu liên kết vào bề mặt rắn hoặc tế bào trong điều kiện có mặt protein liên kết kháng nguyên thử nghiệm. Thông thường, protein liên kết kháng nguyên thử nghiệm có mặt với lượng dư. Protein liên kết kháng nguyên được nhận diện bằng thử nghiệm cạnh tranh (protein liên kết kháng nguyên cạnh tranh) bao gồm protein liên kết kháng nguyên mà liên kết với cùng epitop như protein liên kết kháng nguyên tham chiếu và protein liên kết kháng nguyên mà liên kết với epitop liền kề đủ gần với epitop liên kết bởi protein liên kết kháng nguyên tham chiếu sao cho xuất hiện sự cản trở về mặt không gian. Thông thường, khi protein liên kết kháng nguyên cạnh tranh có mặt với lượng dư, nó sẽ ức chế sự liên kết đặc hiệu của protein liên kết kháng nguyên tham chiếu với kháng nguyên chung đi ít nhất 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% hoặc 75%. Trong một số trường hợp, sự liên kết bị ức chế đi ít nhất 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% hoặc hơn.

Thuật ngữ "epitop" hoặc "phần quyết định kháng nguyên" chỉ vị trí trên kháng nguyên mà liên kết với protein liên kết kháng nguyên. Epitop có thể được tạo ra từ các axit amin tiếp giáp hoặc từ các axit amin không tiếp giáp được đặt cạnh nhau bởi sự gấp cuộn bậc ba của protein. Epitop được tạo ra từ các axit amin tiếp giáp thường được giữ lại khi tiếp xúc với dung môi làm biến tính, trong khi epitop được tạo ra bởi sự gấp cuộn bậc ba thường bị mất khi xử lý bằng dung môi làm biến tính. Phần quyết định epitop có thể bao gồm nhóm phân tử bề mặt có hoạt tính hóa học như axit amin, chuỗi bên của đường, nhóm phosphoryl hoặc sulfonyl, và có thể có các đặc tính cấu trúc ba chiều đặc hiệu và/hoặc các đặc tính tích điện đặc hiệu. Epitop thường chứa ít nhất 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 axit amin ở cấu trúc không gian độc nhất. Epitop có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực.

Protein liên kết kháng nguyên IL-23

“Protein liên kết kháng nguyên” trong bản mô tả này có nghĩa là protein liên kết đặc hiệu với kháng nguyên đích cụ thể; kháng nguyên được nêu trong bản mô tả này là IL-23, cụ thể là IL-23 của người, bao gồm IL-23 nguyên gốc của người. Protein liên kết kháng

nguyên nêu trong bản mô tả này tương tác với ít nhất một phần của cấu trúc dưới phân tử p19 độc nhất của IL-23, liên kết theo cách có thể phát hiện được với IL-23; nhưng không liên kết ở bất kỳ mức độ quan trọng nào với IL-12 (ví dụ, cấu trúc dưới phân tử p40 và/hoặc p35 của IL-12), do đó “không ức chế IL-12”. Do vậy, protein liên kết kháng nguyên nêu trong bản mô tả này có khả năng gây ảnh hưởng đến hoạt tính IL-23 mà không có nguy cơ tiềm ẩn nào về việc có thể xảy ra sự ức chế IL-12 hoặc cấu trúc dưới phân tử p40 có chung. Protein liên kết kháng nguyên có thể gây ảnh hưởng đến khả năng của IL-23 trong việc tương tác với thụ thể của nó, ví dụ bằng cách gây ảnh hưởng đến sự liên kết với thụ thể, như bằng cách cản trở sự kết hợp với thụ thể. Cụ thể, protein liên kết kháng nguyên này làm giảm, ức chế, cản trở hoặc điều biến hoàn toàn hoặc một phần một hoặc nhiều hoạt tính sinh học của IL-23. Sự ức chế hoặc sự trung hòa này phá vỡ đáp ứng sinh học trong điều kiện có mặt protein liên kết kháng nguyên so với đáp ứng khi không có mặt protein liên kết kháng nguyên và có thể xác định được bằng cách sử dụng các thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực và được nêu trong bản mô tả này. Protein liên kết kháng nguyên nêu trong bản mô tả này ức chế sự sản xuất xytokin gây viêm gây ra bởi IL-23, ví dụ sự sản xuất IL-22 gây ra bởi IL-23 trong tế bào máu toàn phần và sự biểu hiện IFN γ gây ra bởi IL-23 ở tế bào NK và tế bào máu toàn phần. Sự giảm hoạt tính sinh học có thể là khoảng 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% hoặc hơn.

Protein liên kết kháng nguyên có thể bao gồm một phần mà liên kết với kháng nguyên và, tùy ý, phần giàn giáo hoặc khung mà cho phép phần liên kết kháng nguyên tuân theo một cấu trúc không gian mà thúc đẩy sự liên kết protein liên kết kháng nguyên với kháng nguyên. Ví dụ về protein liên kết kháng nguyên bao gồm kháng thể, mảnh kháng thể (ví dụ, phần liên kết kháng nguyên của kháng thể), dẫn xuất kháng thể và thể tương tự kháng thể. Protein liên kết kháng nguyên có thể bao gồm giàn giáo protein thay thế hoặc giàn giáo nhân tạo có CDR hoặc dẫn xuất CDR được ghép vào. Giàn giáo này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, giàn giáo có nguồn gốc từ kháng thể chứa đột biến được đưa vào, ví dụ, để làm ổn định cấu trúc ba chiều của protein liên kết kháng nguyên cũng như giàn giáo tổng hợp hoàn toàn chứa, ví dụ, polyme tương thích sinh học. Xem tài liệu, ví dụ, Korndorfer et al., *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, (2003) Volume 53, Issue 1:121-129; Roque et al., *Biotechnol. Prog.*, 2004, 20:639-654. Ngoài ra, chất giả kháng thể peptit (PAM: peptide antibody mimetic) có thể được sử dụng, cũng như giàn giáo dựa trên cơ sở chất giả kháng thể sử dụng thành phần fibronectin làm giàn giáo.

Protein liên kết kháng nguyên nhất định nêu trong bản mô tả này là kháng thể hoặc có nguồn gốc từ kháng thể. Protein liên kết kháng nguyên này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể đơn dòng, kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể nhỏ (minibody), kháng thể miễn, kháng thể tổng hợp, chất giả kháng thể, kháng thể khảm, kháng thể được làm giống với kháng thể của người, kháng thể của người, thể dung hợp kháng thể, thể liên hợp kháng thể, kháng thể chuỗi đơn, và mảnh của chúng, một cách tương ứng. Trong một số ví dụ, protein liên kết kháng nguyên là mảnh có tính miễn dịch của kháng thể (ví dụ, Fab, Fab', F(ab')₂ hoặc scFv). Các cấu trúc khác được mô tả và được định nghĩa thêm trong bản mô tả này.

Protein liên kết kháng nguyên nhất định được đề xuất có thể chứa một hoặc nhiều CDR nêu trong bản mô tả này (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6 CDR hoặc hơn). Trong một số ví dụ, protein liên kết kháng nguyên này chứa (a) cấu trúc polypeptit và (b) một hoặc nhiều CDR được cài xen và/hoặc được kết hợp vào cấu trúc polypeptit. Cấu trúc polypeptit này có thể có nhiều dạng khác nhau. Ví dụ, nó có thể là, hoặc chứa, khung của kháng thể có trong tự nhiên, hoặc mảnh hoặc biến thể của chúng, hoặc có thể là tổng hợp hoàn toàn về bản chất. Ví dụ về các cấu trúc polypeptit khác được mô tả thêm dưới đây.

Protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế được mô tả là “liên kết đặc hiệu” với kháng nguyên đích của nó khi hằng số cân bằng phân ly (K_D) $\leq 10^{-8}$ M. Protein liên kết kháng nguyên liên kết đặc hiệu với kháng nguyên với “ái lực cao” khi $K_D \leq 5 \times 10^{-9}$ M, và với “ái lực rất cao” khi $K_D \leq 5 \times 10^{-10}$ M. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 của người với $K_D \leq 5 \times 10^{-12}$ M, và theo phương án khác nữa, nó liên kết với $K_D \leq 5 \times 10^{-13}$ M. Theo phương án khác của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên có $K_D \leq 5 \times 10^{-12}$ M và K_{off} khoảng $\leq 5 \times 10^{-6}$ 1/s. Theo phương án khác, $K_{off} \leq 5 \times 10^{-7}$ 1/s.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên có thời gian bán hủy ít nhất là một ngày *in vitro* hoặc *in vivo* (ví dụ, khi dùng cho người). Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên có thời gian bán hủy ít nhất là ba ngày. Theo phương án khác, kháng thể hoặc một phần của chúng có thời gian bán hủy là bốn ngày hoặc dài hơn. Theo phương án khác, kháng thể hoặc một phần của chúng có thời gian bán hủy là tám ngày hoặc dài hơn. Theo phương án khác, kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của chúng được tạo dẫn xuất hoặc được biến đổi sao cho nó có thời gian bán hủy dài hơn so với kháng thể chưa được tạo dẫn xuất hoặc chưa được biến đổi. Theo phương án khác, protein liên kết

kháng nguyên chứa đột biến điểm để làm tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh, như được mô tả trong WO00/09560.

Theo phương án trong đó protein liên kết kháng nguyên được sử dụng cho ứng dụng trị liệu, protein liên kết kháng nguyên này có thể làm giảm, ức chế, cản trở hoặc điều biến một hoặc nhiều hoạt tính sinh học của IL-23, kích thích sự sản xuất cytokin gây viêm. IL-23 có nhiều tác dụng sinh học khác nhau, có thể được xác định bằng nhiều thử nghiệm khác nhau ở các loại tế bào khác nhau; ví dụ về thử nghiệm này là đã biết và được nêu trong bản mô tả này.

Một số protein liên kết kháng nguyên được đề xuất có cấu trúc thường gắn liền với kháng thể có trong tự nhiên. Đơn vị cấu trúc của kháng thể này thường chứa một hoặc nhiều tetrame, mỗi tetrame được tạo ra từ hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mặc dù một số loài động vật có vú còn sản xuất kháng thể có chỉ một chuỗi nặng. Trong kháng thể bình thường, mỗi cặp hoặc cặp đôi bao gồm một chuỗi “nhẹ” nguyên chiều dài (theo một số phương án nhất định, khoảng 25 kDa) và một chuỗi “nặng” nguyên chiều dài (theo một số phương án nhất định, khoảng 50-70 kDa). Mỗi chuỗi globulin miễn dịch riêng lẻ được tạo ra từ một số “miền globulin miễn dịch”, mỗi miền được tạo ra từ khoảng 90 đến 110 axit amin và biểu hiện kiểu gấp cuộn đặc trưng. Các miền này là đơn vị cơ bản tạo ra polypeptit kháng thể. Phần đầu tận amino của mỗi chuỗi thường chứa vùng thay đổi chịu trách nhiệm nhận diện kháng nguyên. Phần đầu tận carboxy được bảo toàn hơn về mặt tiến hóa so với đầu còn lại của chuỗi và được gọi là “vùng không đổi” hoặc “vùng C”. Chuỗi nhẹ của người thường được phân loại thành chuỗi nhẹ kappa và lambda, và mỗi chuỗi chứa một vùng thay đổi và một vùng không đổi (CL1). Chuỗi nặng thường được phân loại thành chuỗi mu, delta, gamma, alpha hoặc epsilon, và chúng xác định isotyp của kháng thể là IgM, IgD, IgG, IgA, và IgE, một cách tương ứng. IgG có một số typ phụ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Typ phụ IgM bao gồm IgM1 và IgM2. Typ phụ IgA bao gồm IgA1 và IgA2. Ở người, isotyp IgA và IgD chứa bốn chuỗi nặng và bốn chuỗi nhẹ; isotyp IgG và IgE chứa hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ; và isotyp IgM chứa năm chuỗi nặng và năm chuỗi nhẹ. Vùng không đổi chuỗi nặng (CH) thường chứa một hoặc nhiều miền mà có thể chịu trách nhiệm cho chức năng tác động. Số lượng miền vùng không đổi chuỗi nặng phụ thuộc vào isotyp. Mỗi chuỗi nặng IgG, ví dụ, chứa ba miền vùng CH được gọi là CH1, CH2 và CH3. Kháng thể được đề xuất có thể thuộc isotyp và typ phụ bất kỳ trong số các isotyp và typ phụ này, ví dụ, protein liên kết kháng nguyên IL-23 thuộc typ phụ IgG1, IgG2

hoặc IgG4. Nếu IgG4 được ưu tiên, cũng có thể mong muốn đưa đột biến điểm (CPSCP->CPPCF) vào vùng bản lề như được mô tả trong tài liệu Bloom et al., 1997, Protein Science 6:407) để làm giảm xu hướng tạo thành liên kết disulfua trong chuỗi H mà có thể dẫn đến sự không đồng nhất trong kháng thể IgG4. Kháng thể nêu trong bản mô tả này thuộc một typ có thể được biến đổi thành typ khác bằng cách sử dụng phương pháp chuyển đổi lớp phụ. Xem tài liệu, ví dụ, Lantto et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:303-316.

Trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng nguyên chiều dài, vùng thay đổi và vùng không đổi được kết nối bằng vùng “J” có khoảng 12 axit amin hoặc nhiều hơn, trong đó chuỗi nặng còn chứa vùng “D” có khoảng 10 axit amin hoặc nhiều hơn. Xem tài liệu, ví dụ, Fundamental Immunology, 2nd ed., Ch. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press. Vùng thay đổi của mỗi cặp chuỗi nhẹ/chuỗi nặng thường tạo thành vị trí liên kết kháng nguyên.

Vùng thay đổi

Các vùng (hoặc miền) thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ khác nhau nêu trong bản mô tả này được thể hiện trong bảng 1 và 2. Mỗi vùng thay đổi có thể được gán, ví dụ, vào vùng không đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trên. Ngoài ra, mỗi trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được tạo thành như vậy có thể được kết hợp để tạo thành cấu trúc protein liên kết kháng nguyên hoàn chỉnh.

Sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên chứa ít nhất một vùng thay đổi chuỗi nặng (VH) được chọn từ nhóm bao gồm VH1, VH2, VH3, VH4, VH5, VH6, VH7, VH8, VH9, VH10, VH11, VH12, VH13, VH14, VH15 và VH16 và/hoặc ít nhất một vùng thay đổi chuỗi nhẹ (VL) được chọn từ nhóm bao gồm VL1, VL2, VL3, VL4, VL5, VL6, VL7, VL8, VL9, VL10, VL11, VL12, VL13, VL14, VL15 và VL16 được thể hiện trong bảng 1 và 2 dưới đây.

Mỗi vùng thay đổi chuỗi nặng được liệt kê trong bảng 2 có thể được kết hợp với vùng thay đổi chuỗi nhẹ bất kỳ trong số các vùng thay đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong bảng 1 để tạo thành protein liên kết kháng nguyên. Trong một số ví dụ, protein liên kết kháng nguyên chứa ít nhất một vùng thay đổi chuỗi nặng và/hoặc một vùng thay đổi chuỗi nhẹ trong số các vùng được liệt kê trong bảng 1 và 2. Trong một số ví dụ, protein liên kết kháng nguyên chứa ít nhất hai vùng thay đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng thay đổi chuỗi nhẹ khác nhau trong số các vùng được liệt kê trong bảng 1 và 2. Các tổ hợp khác nhau của các

vùng thay đổi chuỗi nặng có thể được kết hợp với tổ hợp bất kỳ trong số các tổ hợp khác nhau của các vùng thay đổi chuỗi nhẹ.

Trong các trường hợp khác, protein liên kết kháng nguyên chứa hai vùng thay đổi chuỗi nhẹ giống nhau và/hoặc hai vùng thay đổi chuỗi nặng giống nhau. Ví dụ, protein liên kết kháng nguyên có thể là kháng thể hoặc mảnh có chức năng miễn dịch chứa hai vùng thay đổi chuỗi nhẹ và hai vùng thay đổi chuỗi nặng ở dạng tổ hợp của các cặp vùng thay đổi chuỗi nhẹ và các cặp vùng thay đổi chuỗi nặng được liệt kê trong bảng 1 và 2. Ví dụ về protein liên kết kháng nguyên chứa hai vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ giống nhau bao gồm: kháng thể A VH14/ VL14; kháng thể B VH9/ VL9; kháng thể C VH10/ VL10; kháng thể D VH15/ VL15; kháng thể E VH1/ VL1; kháng thể F VH11/ VL11; kháng thể G VH12/ VL12; kháng thể H VH13/ VL13; kháng thể I VH8/ VL8; kháng thể J VH3/ VL3; kháng thể K VH7/ VL7; kháng thể L VH4/ VL4; kháng thể M VH5/ VL5 và kháng thể N VH6/ VL6.

Một số protein liên kết kháng nguyên được đề xuất chứa vùng thay đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin khác với trình tự của vùng thay đổi chuỗi nặng và/hoặc vùng thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ bảng 1 và 2 ở chỉ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 gốc axit amin, trong đó mỗi sai khác trình tự này độc lập là đột biến khuyết, đột biến cài xen hoặc đột biến thế của một axit amin. Vùng thay đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong một số protein liên kết kháng nguyên, chứa trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự là ít nhất 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin được nêu trong bảng 1 và 2. Protein liên kết kháng nguyên khác, ví dụ, kháng thể hoặc mảnh có chức năng miễn dịch, còn chứa dạng vùng chuỗi nặng biến thể và/hoặc dạng vùng chuỗi nhẹ biến thể như được nêu trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “độ đồng nhất” chỉ mối quan hệ giữa các trình tự của hai hoặc nhiều phân tử polypeptit hoặc hai hoặc nhiều polynucleotit, được xác định bằng cách sắp hàng và so sánh các trình tự này. “Độ đồng nhất tính theo phần trăm” có nghĩa là tỷ lệ phần trăm các gốc giống nhau giữa các axit amin hoặc các nucleotit trong các phân tử được so sánh và được tính dựa trên kích thước của phân tử nhỏ nhất trong số các phân tử được so sánh.

Bảng 1
Trình tự vùng chuỗi nhẹ biến thể tiêu biểu

	FR1	CDRL1	FR2	CDRL2	FR3	CDRL3	FR4
V _{L1}	QSVLTQPPSVSGAPGQRTVITSC	TGSSSNVTGAGYD	/HWYQQVPGTAPKLLIY	GSGNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDSSLSGWWFGGGTRLTVL		
	SEQ ID NO: 1						
V _{L2}	QSVLTQPPSVSGAPGQRTVITSC	TGSSSNIGAGYD	/HWYQQVPGTAPKLLIY	GNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDSSLSGWWFGGGTKLTVL		
	SEQ ID NO: 3						
V _{L3}	QAVLTQPPSSLSASPGASASLTCT	TLRSGINVGTYRIWY	QQKPGSPQYLLRYKSDSDK	QQGSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYC	MIWHSSASVFGGGTKLTVL		
	SEQ ID NO: 4						
V _{L4}	QAVLTQPPSSLSASPGASASLTCT	TLRSGINVGTYRIWY	QQKPGSPQYLLRYKSDSDK	QQGSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYC	MIWHSSASVFGGGTKLTVL		
	SEQ ID NO: 4						
V _{L5}	QPVLTPPSSASASLGASVTLTCT	LSNGYSYIKVDWY	QQRPGKGPRFVMRVGTGGI	VGSKGDGIPDRFSLGSLNRYLT	TIKNIQEEDSDYHCGADHGS	GSNFVYVFGTGT	TKTVTL
	SEQ ID NO: 7						
V _{L6}	QPVLTPPSSASASLGASVTLTCT	LSNGYSYIKVDWY	QQRPGKGPRFVMRVGTGGI	VGSKGEGIPDRFSLGSLNRYLT	TIKNIQEEDSDYHCGADHGS	GSNNFVYVFGTGT	TKTVTL
	SEQ ID NO: 9						
V _{L7}	QPELTQPPSSASASLGASVTLTCT	LSNGYSYIKVDWY	QRLPGKGPRFVMRVGTGGT	VGSKGEGIPDRFSLGSLNRS	LT	TIKNIQEEDSDYHCGADHGS	GSNFVYVFGTGT
	SEQ ID NO: 11						
V _{L8}	DIQLTPSPSSVSASVGDRVTITC	RASQIGIAGWLA	WYQQKPGKAPKLLIYAASSL	QSGVPSRFSGSGTDFTL	TISSLPQEDFATYYC	QQADSFPPTFGG	TKVEIK
	SEQ ID NO: 13						
V _{L9}	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC	RASQVISSWLA	WYQQKPGKAPSLLIYAASSL	QSGVPSRFSGSGTDFTL	TISSLPQEDFATYYC	QQANSFPPTFGP	GTKVDFK
	SEQ ID NO: 15						
V _{L10}	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC	RASQSGSSWFA	WYQQKPGKAPKLLIYAASSL	QSGVPSRFSGSGTDFTL	TISSLPQEDFATYYC	QQANSFPPTFGP	GTKVDIK
	SEQ ID NO: 17						
V _{L11}	DSQMTQSPSSVSASVGDRVTITC	RASQGISSWFA	WYQQKPGQAPNLLIYAASSL	QSGVPSRFSGSGGTEFTL	TISSLPQEDFATYYC	QQANSFPPTFGP	GTKVDIK
	SEQ ID NO: 19						
V _{L12}	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC	RAGQVISSWLA	WYQQKPGKAPKLLIYAASSL	QSGVPSRFSGSGGTDFTL	TISSLPQDDFATYYC	QQATSFPPLTFGGG	TKVEIK
	SEQ ID NO: 21						
V _{L13}	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC	RASQGFSGWLA	WYQQKPGKAPKLLIYAASSL	QSGVPSRFSGSGGTDFTL	TISSLPQEDFATYYC	QQANSFPPTFGP	GTKVDIK
	SEQ ID NO: 23						
V _{L14}	DIQLTPSPSSVSASVGDRVTITC	RASQVISSWFA	WYQQKPGKAPNLLIYAASSL	QSGVPSRFSGSGGTDFTL	TISSLPADFATYFC	QQANSFPPTFGP	TKVDVK
	SEQ ID NO: 25						
V _{L15}	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC	RASQGISSWFA	WYQQKPGKAPKLLIYAASSL	QSGVPSRFSGSGGTDFTL	TISSLPQEDFATYYC	QQANSFPPTFGP	GTKVDIK
	SEQ ID NO: 27						
V _{L16}	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQGIRNDL	GWYQQKPGKAPKRLIYAASSL	QSGVPSRFSGSGGTEFTL	TISSLPQEDFATYYC	LQHNSVPPTFGQ	GTKVEIE
	SEQ ID NO: 29						

Bảng 2
Trình tự vùng chuỗi nặng biến thể tiêu biểu

	FR1	CDRH1	FR2	CDRH2	FR3	CDRH3	FR4
V _H 1	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVA/VIWDGSEYAYDSV/KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DRGYTSSWYPDAFDI WGQGTMTVTVSS SEQ ID NO: 31						
V _H 2	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVA/VIIYDGSNKYYADSV/KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DRGYTSSWYPDAFDI WGQGTMTVTVSS SEQ ID NO: 33						
V _H 3	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVA/VISFDGSLKYYADSV/KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR ERTTILSGSYFDI WGQGTMTVTVSS SEQ ID NO: 34						
V _H 4	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSYAMHWVRQAPGKGLEWLSVISHDGSIKYYADSV/KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR ERTTILSGSYFDI WGQGTMTVTVSS SEQ ID NO: 36						
V _H 5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYSMNWVRQAPGKGLEWVS/YISSRSSTIYADSV/KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR RIIAAAGGFHYIYALDI WGQGTMTVTVSS SEQ ID NO: 38						
V _H 6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYSMNWVRQAPGKGLEWVS/YISSSSSTRYHADSV/KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR RIIAAAGPWGYIYAMDVI WGQGTMTVTVSS SEQ ID NO: 40						
V _H 7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSFGFTFSYSMNWVRQAPGKGLEWVS/YISSRSSTIYADSV/KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR RIIAAAGPWGYIYAMDVI WGQGTMTVTVSS SEQ ID NO: 42						
V _H 8	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISYYIYWSWIRPAGKGLEWIGLIYTSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR DRGYIYGVDI WGQGTMTVTVSS SEQ ID NO: 44						
V _H 9	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISGGGYIYWSWIRQHPGKGLEWIGHIHYSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAK NRGFYIYGMDI WGQGTMTVTVSS SEQ ID NO: 46						
V _H 10	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISGGGYIYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYSGSYNPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR DRGHYIYGMDI WGQGTMTVTVSS SEQ ID NO: 48						
V _H 11	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISGGGYIYWSWIRQHPGKGLEWIGHIYIYSGSYNPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR DRGHYIYGMDI WGQGTMTVTVSS SEQ ID NO: 50						
V _H 12	QVQLQESGPGRLVKPSETLSLTCTVSGDSISYFWSWIRQPPGKGLEWLGYYIYSGSYNPNPSLKSRTISIDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCT DRGSYYGSDI WGQGTMTVTVSS SEQ ID NO: 52						
V _H 13	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISGGGYIYWTWIRQHPGKGLEWIGHIYIYSGNTYYNPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR NRGYIYGMDI WGQGTMTVTVSS SEQ ID NO: 54						
V _H 14	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISGGGYIYWSWIRQHPGKGLEWIGHIYIYSGSYNPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAK NRGFYIYGMDI WGQGTMTVTVSS SEQ ID NO: 56						
V _H 15	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISGGGYIYWSWIRQHPGKGLEWIGHIYIYSGSYNPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR DRGHYIYGMDI WGQGTMTVTVSS SEQ ID NO: 58						
V _H 16	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVA/IIYDGSNKYYADSV/KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE NTIYYIYGMDI WGQGTMTVTVSS SEQ ID NO: 60						

Đối với các phép tính này, khoảng trống trong các đoạn sắp 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 có thể được sử dụng để tính toán độ đồng nhất của các axit nucleic hoặc polypeptit được sắp hàng bao gồm các phương pháp được bộc lộ 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., eds.), 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.

Khi tính toán độ đồng nhất tính theo phần trăm, các trình tự được so sánh được sắp hàng theo cách tạo ra khả năng bắt cặp lớn nhất giữa các trình tự. Chương trình máy tính dùng để xác định độ đồng nhất tính theo phần trăm là gói chương trình GCG, 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 hàng hai polypeptit hoặc polynucleotit mà cần xác định độ đồng nhất trình tự tính theo phần trăm cho chúng. Các trình tự được sắp hàng để bắt cặp tối ưu các axit amin hoặc nucleotit tương ứng của chúng (“nhịp bắt cặp”, được xác định bởi thuật toán). Điểm phạt mở khoảng trống (được tính là 3x đường chéo trung bình, trong đó “đường chéo trung bình” là giá trị trung bình của đường chéo của ma trận so sánh được sử dụng; “đường chéo” là điểm số hoặc con số được gán cho mỗi bắt cặp axit amin hoàn hảo bởi ma trận so sánh cụ thể) và điểm phạt mở rộng khoảng trống (thường bằng 1/10 lần điểm phạt mở khoảng trống), cũng như ma trận so sánh như PAM 250 hoặc BLOSUM 62 được sử dụng kết hợp với thuật toán. Theo các phương án nhất định, 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 để xác định độ đồng nhất tính theo phần trăm cho các polypeptit hoặc các trình tự nucleotit 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 từ tài liệu Henikoff et al., 1992, nêu trên; điểm phạt mở khoảng trống: 12 (nhưng không có điểm phạt

cho các khoảng trống đầu mút), điểm phạt chiều dài khoảng trống: 4, ngưỡng của độ tương tự: 0. Một số sơ đồ sắp hàng nhất định để sắp hàng hai trình tự axit amin có thể tạo ra sự bất cặp của chỉ một vùng ngắn của hai trình tự và vùng nhỏ được sắp hàng này có thể có độ đồng nhất trình tự rất cao mặc dù không có mối quan hệ đáng kể giữa hai trình tự nguyên chiều dài. Như vậy, phương pháp sắp hàng được chọn (chương trình GAP) có thể được điều chỉnh nếu mong muốn để tạo ra đoạn sắp hàng trải dài ít nhất 50 axit amin tiếp giáp của polypeptit đích.

Vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nêu trong bản mô tả này chứa trình tự liên ứng có nguồn gốc từ nhóm các protein liên kết kháng nguyên liên quan. Trình tự axit amin của vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được phân tích về độ tương tự. Bốn nhóm nổi bật lên, một nhóm có vùng thay đổi chuỗi nhẹ kappa, (V_H9/ V_L9, V_H10/ V_L10, V_H11/ V_L11, V_H13/ V_L13, V_H14/ V_L14 và V_H15/ V_L15) và ba nhóm có vùng thay đổi chuỗi nhẹ lambda: nhóm lambda 1 (V_H5/ V_L5, V_H6/ V_L6 và V_H7/ V_L7), nhóm lambda 2 (V_H3/ V_L3 và V_H4/ V_L4) và nhóm lambda 3 (V_H1/ V_L1 và V_H2/ V_L2). Dòng mầm chuỗi nhẹ được thể hiện bao gồm VK1/A30 và VK1/L19. Dòng mầm chuỗi nhẹ lambda được thể hiện bao gồm VL1/1e, VL3/3p, VL5/5c và VL9/9a. Dòng mầm chuỗi nặng được thể hiện bao gồm VH3/3-30, VH3/3-30,3, VH3/3-33, VH3/3-48, VH4/4-31 và VH4/4-59. Trong bản mô tả này, “trình tự liên ứng” chỉ trình tự axit amin có các axit amin bảo toàn chung giữa các trình tự và các axit amin thay đổi mà khác nhau giữa các trình tự axit amin được nêu. Trình tự liên ứng có thể được xác định bằng cách phân tích phát sinh loài tiêu chuẩn đối với vùng thay đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng tương ứng với protein liên kết kháng nguyên IL-23 nêu trong bản mô tả này.

Trình tự liên ứng vùng thay đổi chuỗi nhẹ đối với nhóm kappa là DX₁QX₂TQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGX₃X₄SX₅WX₆AWYQQKPGX₇APX₈LLIYAASSLQSGVPSRFSGSX₉SGTX₁₀FTLTISLQPX₁₁DFATYX₁₂CQQANSFPFTFGPGTKV DX₁₃K (SEQ ID NO: 30) trong đó X₁ được chọn từ I hoặc S; X₂ được chọn từ M hoặc L; X₃ được chọn từ G hoặc V và X₄ được chọn từ S, F hoặc I; X₅ được chọn từ S hoặc G; X₆ được chọn từ F hoặc L; X₇ được chọn từ K hoặc Q; X₈ được chọn từ K, N hoặc S; X₉ được chọn từ G hoặc V; X₁₀ được chọn từ D hoặc E, X₁₁ được chọn từ E hoặc A; X₁₂ được chọn từ Y hoặc F; và X₁₃ được chọn từ I, V hoặc F.

Trình tự liên ứng vùng thay đổi chuỗi nhẹ đối với nhóm lambda 1 là QPX₁LTQPPSASASLGASVTLTCTLX₂SGYSDYKVDWYQX₃RPGKGPRFVMRVGTG GX₄VGSKGX₅GIPDRFSVLGSGLNRX₆LTIKNIQEEDESDYHCGADHGSX₇NFVYVF

GTGKVTVL (SEQ ID NO: 61) trong đó X_1 được chọn từ V hoặc E; X_2 được chọn từ N hoặc S; X_3 được chọn từ Q hoặc L và X_4 được chọn từ I hoặc T; X_5 được chọn từ D hoặc E; X_6 được chọn từ Y hoặc S; và X_7 được chọn từ S hoặc N.

Trình tự liên ứng vùng thay đổi chuỗi nhẹ đối với nhóm lambda 3 là QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSN X_1 GAGYDVHWYQQ X_2 PGTAPKLLIYGS X_3 NRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGWWFGGGTX X_4 RLTVL (SEQ ID NO: 139) trong đó X_1 được chọn từ T hoặc I; X_2 được chọn từ V hoặc L; X_3 được chọn từ G hoặc N và X_4 được chọn từ R hoặc K.

Trình tự liên ứng vùng thay đổi chuỗi nặng đối với nhóm kappa là QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSIX X_1 SGGYW X_2 WIR.QHPGKGLEWIG X_3 IX X_4 YSG X_5 X_6 YYNPSLKSR X_7 TX X_8 SVDTS X_9 NQFSL X_{10} LSSVTAADTAVYYCAX X_{11} X_{12} RG X_{13} YYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 140) trong đó X_1 được chọn từ N hoặc S; X_2 được chọn từ S hoặc T; X_3 được chọn từ Y hoặc H và X_4 được chọn từ Y hoặc H; X_5 được chọn từ S hoặc N; X_6 được chọn từ S hoặc T; X_7 được chọn từ V hoặc I; X_8 được chọn từ I hoặc M; X_9 được chọn từ K hoặc Q; X_{10} được chọn từ K hoặc S; X_{11} được chọn từ R hoặc K; X_{12} được chọn từ D hoặc N; và X_{13} được chọn từ H, F hoặc Y.

Trình tự liên ứng vùng thay đổi chuỗi nặng đối với nhóm lambda 1 là EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCX X_1 X_2 SGFTFSX X_3 X_4 SMNWVRQAPGKGLEWVSYISS X_5 SSTX X_6 YX X_7 ADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRIAAAGX X_8 X_9 X_{10} YYYAX X_{11} DVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 141) trong đó X_1 được chọn từ A hoặc V; X_2 được chọn từ A hoặc V; X_3 được chọn từ T hoặc S và X_4 được chọn từ Y hoặc F; X_5 được chọn từ S hoặc R; X_6 được chọn từ R hoặc I; X_7 được chọn từ H, Y hoặc I; X_8 được chọn từ P hoặc G; X_9 được chọn từ W hoặc F; X_{10} được chọn từ G hoặc H và X_{11} được chọn từ M hoặc L.

Trình tự liên ứng vùng thay đổi chuỗi nặng đối với nhóm lambda 2 là QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYX X_1 MHWVRQAPGKGLEW X_2 X_3 VIS X_4 DGSX X_5 KYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERTTLSGSYFDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 142) trong đó X_1 được chọn từ G hoặc A; X_2 được chọn từ V hoặc L; X_3 được chọn từ A hoặc S và X_4 được chọn từ F hoặc H và X_5 được chọn từ L hoặc I.

Trình tự liên ứng vùng thay đổi chuỗi nặng đối với nhóm lambda 3 là QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNX₁YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGYX₂SSWYPDAFDIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO: 143) trong đó X₁ được chọn từ E hoặc K và X₂ được chọn từ T hoặc S.

Vùng quyết định bổ thể

Vùng quyết định bổ thể hoặc “CDR” được cài vào trong khung trong vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong đó chúng tạo thành vùng chịu trách nhiệm liên kết và nhận diện kháng nguyên. Miền thay đổi của chuỗi globulin miễn dịch của cùng một loài, ví dụ, thường có cấu trúc tổng thể tương tự; chứa vùng khung (FR) tương đối bảo toàn được kết nối bởi các vùng CDR siêu biến. Protein liên kết kháng nguyên có thể có 1, 2, 3, 4, 5, 6 CDR hoặc nhiều hơn. Vùng thay đổi nêu trên, ví dụ, thường chứa ba CDR. CDR từ vùng thay đổi chuỗi nặng và vùng thay đổi chuỗi nhẹ thường được sắp hàng theo vùng khung để tạo thành cấu trúc liên kết đặc hiệu trên kháng nguyên đích (ví dụ, IL-23). Từ đầu tận N đến đầu tận C, cả vùng thay đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có trong tự nhiên đều thường tuân theo thứ tự của các yếu tố như sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4. Vùng CDR và FR của miền thay đổi chuỗi nhẹ và miền thay đổi chuỗi nặng tiêu biểu được in đậm trong bảng 1 và 2. Đã biết rằng ranh giới của vùng CDR và FR có thể thay đổi so với vùng được in đậm. Hệ thống đánh số đã được đặt ra để gán số cho các axit amin chiếm giữ các vị trí trong mỗi miền này. Vùng quyết định bổ thể và vùng khung của một protein liên kết kháng nguyên được nêu có thể được xác định bằng cách sử dụng các hệ thống này. Hệ thống đánh số được nêu trong tài liệu Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication No. 91-3242, 1991, hoặc Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342:878-883. Các hệ thống đánh số khác dùng cho các axit amin trong chuỗi globulin miễn dịch bao gồm IMGT® (hệ thống thông tin quốc tế ImMunoGeneTics; Lefranc et al, Dev. Comp. Immunol. 2005, 29:185-203); và AHo (Honegger and Pluckthun, J. Mol. Biol. 2001, 309(3):657-670). CDR nêu trong bản mô tả này có thể không chỉ được sử dụng để xác định miền liên kết kháng nguyên của cấu trúc kháng thể truyền thống, mà còn có thể được cài vào trong các cấu trúc polypeptit khác như được nêu trong bản mô tả này.

Protein liên kết kháng nguyên nêu trong bản mô tả này là polypeptit mà một hoặc nhiều CDR có thể được ghép, cài xen, cài và/hoặc kết hợp vào đó. Protein liên kết kháng nguyên có thể có, ví dụ, một chuỗi nặng CDR1 (“CDRH1”), và/hoặc một chuỗi nặng CDR2 (“CDRH2”), và/hoặc một chuỗi nặng CDR3 (“CDRH3”), và/hoặc một chuỗi nhẹ CDR1 (“CDRL1”), và/hoặc một chuỗi nhẹ CDR2 (“CDRL2”), và/hoặc một chuỗi nhẹ CDR3 (“CDRL3”). Một số protein liên kết kháng nguyên có cả CDRH3 và CDRL3. Các phương án cụ thể thường sử dụng tổ hợp của các CDR không lặp lại, ví dụ, protein liên kết kháng nguyên thường không được tạo ra với hai vùng CDRH2 trong một vùng thay đổi chuỗi nặng, v.v.. Protein liên kết kháng nguyên có thể chứa một hoặc nhiều trình tự axit amin mà giống hoặc khác với trình tự axit amin của một hoặc nhiều CDR được thể hiện trong bảng 3 ở chỉ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 hoặc 15 gốc axit amin, trong đó mỗi sai khác trình tự này độc lập là đột biến khuyết, đột biến cài xen hoặc đột biến thế của một axit amin. CDR trong một số protein liên kết kháng nguyên chứa trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự là ít nhất 80%, 85%, 90%, 91%, 92, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự CDR được liệt kê trong bảng 3. Trong một số protein liên kết kháng nguyên, CDR được cài vào trong vùng “khung”, định hướng (các) CDR sao cho thu được các đặc tính liên kết kháng nguyên thích hợp của (các) CDR này.

Bảng 3

Trình tự CDRH và CDRL tiêu biểu

Trình tự CDRL tiêu biểu		
CDRL1	CDRL2	CDRL3
TGSSSNTGAGYDVH SEQ ID NO: 62	GSGNRPS SEQ ID NO: 63	QSYDSSLSGWV SEQ ID NO: 64
TGSSSNIGAGYDVH SEQ ID NO: 65	GSNNRPS SEQ ID NO: 66	MIWHSSASV SEQ ID NO: 67
TLRSGINVGTYRIY SEQ ID NO: 68	YKSDSDKQQGS SEQ ID NO: 69	GADHGSGSNFVYV SEQ ID NO: 70
TLNSGYSDYKV SEQ ID NO: 71	VGTGGIVGSKGD SEQ ID NO: 72	GADHGSGNNFVYV SEQ ID NO: 73
TLSSGYSDYKV SEQ ID NO: 74	VGTGGIVGSKGE SEQ ID NO: 75	QQANSFPFT SEQ ID NO: 76
RASQGFSGWLA	VGTGGTVGSKGE	QQATSFPLT

SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 79
RASQVISSWLA SEQ ID NO: 80	AASSLQS SEQ ID NO: 81	QQADSFPT SEQ ID NO: 82
RASQVISSWFA SEQ ID NO: 83		LQHNSYPPT SEQ ID NO: 84
RASQGSSSWFA SEQ ID NO: 85		
RASQGISSWFA SEQ ID NO: 86		
RAGQVISSWLA SEQ ID NO: 87		
RASQGIAGWLA SEQ ID NO: 88		
RASQGIRNDLG SEQ ID NO: 89		
Trình tự CDRH tiêu biểu		
CDRH1	CDRH2	CDRH3
SYGMH SEQ ID NO: 91	VIWYDGSNEYADSV KG SEQ ID NO: 92	DRGYTSSWYPDAF DI SEQ ID NO: 93
SYAMH SEQ ID NO: 94	VIWYDGSNKYYADSV KG SEQ ID NO: 95	DRGYSSSWYPDAF DI SEQ ID NO: 96
TYSMN SEQ ID NO: 97	VISFDGSLKYYADSV KG SEQ ID NO: 98	ERTTLSGSYFDY SEQ ID NO: 99
SYSMN SEQ ID NO: 100	VISHDGSIKYYADSVK G SEQ ID NO: 101	RIAAAGGFHYYYAL DV SEQ ID NO: 102
SFSMN SEQ ID NO: 103	YISSRSSTIYIADSVKG SEQ ID NO: 104	RIAAAGPWGYYYA MDV SEQ ID NO: 105
SGGYYWT SEQ ID NO: 106	YISSSSSTRYHADSVK G SEQ ID NO: 107	NRGYYYGMDV SEQ ID NO: 108

SGGYYWS SEQ ID NO: 109	YISSRSSTIYYADSVK G SEQ ID NO: 110	NRGFYYGMDV SEQ ID NO: 111
SYFWS SEQ ID NO: 112	YIYYSGNTYYNPSLKS SEQ ID NO: 113	DRGHYYGMDV SEQ ID NO: 114
TTYWS SEQ ID NO: 115	HHYSGNTYYNPSLKS SEQ ID NO: 116	DRGSYYGSDY SEQ ID NO: 117
	YIYYSGSTYYNPSLKS SEQ ID NO: 118	DRGYYYGVVDV SEQ ID NO: 119
	YIYYSGSSYYNPSLKS SEQ ID NO: 120	ENTVTIYYNYGMD V SEQ ID NO: 6
	YIYYSGSTNYNPSLKS SEQ ID NO: 121	
	LIYTSGSTNYNPSLKS SEQ ID NO: 122	
	LIWYDGSNKYYADSV KG SEQ ID NO: 90	

Sáng chế đề xuất vùng CDR1 chứa các gốc axit amin 23-34 nêu trong SEQ ID NO: 7 và 11; các gốc axit amin 24-34 nêu trong SEQ ID NO: 9, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 và 29; các gốc axit amin 23-36 nêu trong SEQ ID NO: 1, 3 và 4; các gốc axit amin 31-35 nêu trong SEQ ID NO: 31, 33, 34, 38, 40, 44, 52 và 60 và các gốc axit amin 31-37 nêu trong SEQ ID NO: 46, 48, 50, 54, 56 và 58.

Sáng chế đề xuất vùng CDR2 chứa các gốc axit amin 50-56 nêu trong SEQ ID NO: 9, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 và 29; các gốc axit amin 50-61 nêu trong SEQ ID NO: 7 và 11; các gốc axit amin 52-62 nêu trong SEQ ID NO: 4; các gốc axit amin 50-65 nêu trong SEQ ID NO: 31, 33, 44 và 52; các gốc axit amin 50-66 nêu trong SEQ ID NO: 36, 38, 40, 42 và 60; các gốc axit amin 52-58 nêu trong SEQ ID NO: 1 và 3 và các gốc axit amin 52-67 nêu trong SEQ ID NO: 46, 48, 50, 54, 56 và 58.

Sáng chế cũng đề xuất vùng CDR3 chứa các gốc axit amin 89-97 nêu trong SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 và 29; các gốc axit amin 91-101 nêu trong SEQ ID NO: 1 và 3; các gốc axit amin 94-106 nêu trong SEQ ID NO: 7, 9 và 11; các gốc axit amin 98-107

nêu trong SEQ ID NO: 44 và 52; các gốc axit amin 97-105 nêu trong SEQ ID NO: 4; các gốc axit amin 99-110 nêu trong SEQ ID NO: 34 và 36; các gốc axit amin 99-112 nêu trong SEQ ID NO: 112; các gốc axit amin 99-113 nêu trong SEQ ID NO: 31 và 33; các gốc axit amin 99-114 nêu trong SEQ ID NO: 38, 40 và 42; các gốc axit amin 100-109 nêu trong SEQ ID NO: 46, 48, 54, 56 và 58; và các gốc axit amin 101-019 nêu trong SEQ ID NO: 50.

CDR nêu trong bản mô tả này chứa trình tự liên ứng có nguồn gốc từ nhóm các trình tự liên quan. Như nêu trên, bốn nhóm trình tự vùng thay đổi được xác định, là nhóm kappa và ba nhóm lambda. Trình tự liên ứng CDRL1 từ nhóm kappa chứa RASQX₁X₂SX₃WX₄A (SEQ ID NO: 123) trong đó X₁ được chọn từ G hoặc V; X₂ được chọn từ I, F hoặc S; X₃ được chọn từ S hoặc G và X₄ được chọn từ F hoặc L. Trình tự liên ứng CDRL1 từ nhóm lambda 1 chứa TLX₁SGYSDYKVD (SEQ ID NO: 124) trong đó X₁ được chọn từ N hoặc S. Trình tự liên ứng CDRL1 từ nhóm lambda 3 chứa TGSSSNX₁GAGYDVH (SEQ ID NO: 125) trong đó X₁ được chọn từ I hoặc T.

Trình tự liên ứng CDRL2 từ nhóm lambda 1 chứa VGTGGX₁VGSKGX₂ (SEQ ID NO: 126) trong đó X₁ được chọn từ I hoặc T và X₂ được chọn từ D hoặc E. Trình tự liên ứng CDRL2 từ nhóm lambda 3 chứa GSX₁NRPS (SEQ ID NO: 127) trong đó X₁ được chọn từ N hoặc G.

Trình tự liên ứng CDRL3 chứa GADHGSGX₁NFVYV (SEQ ID NO: 128) trong đó X₁ là S hoặc N.

Trình tự liên ứng CDRH1 từ nhóm kappa chứa SGGYYWX₁ (SEQ ID NO: 129) trong đó X₁ được chọn từ S hoặc T. Trình tự liên ứng CDRH1 từ nhóm lambda 1 chứa X₁X₂SMN (SEQ ID NO: 131) trong đó X₁ được chọn từ S hoặc T và X₂ được chọn từ Y hoặc F. Trình tự liên ứng CDRH1 từ nhóm lambda 2 chứa SYX₁MH (SEQ ID NO: 130) trong đó X₁ được chọn từ G hoặc A.

Trình tự liên ứng CDRH2 từ nhóm kappa chứa X₁IX₂YSGX₃X₄YYNPSLKS (SEQ ID NO: 132) trong đó X₁ được chọn từ Y hoặc H; X₂ được chọn từ Y hoặc H; X₃ được chọn từ S hoặc N và X₄ được chọn từ T hoặc S. Trình tự liên ứng từ nhóm lambda 1 chứa YISSX₁SSTX₂YX₃ADSVKG (SEQ ID NO: 134) trong đó X₁ được chọn từ R hoặc S, X₂ được chọn từ I hoặc R, X₃ được chọn từ I, H hoặc Y. Trình tự liên ứng từ nhóm lambda 2 chứa VISX₁DGSX₂KYYADSVKG (SEQ ID NO: 133) trong đó X₁ là F hoặc H và X₂ là L.

hoặc T. Trình tự liên ứng CDRH2 từ nhóm lambda 3 chứa VIWYDGSNX₁YYADSVKG (SEQ ID NO: 135) trong đó X₁ được chọn từ K hoặc E.

Trình tự liên ứng CDRH3 từ nhóm kappa chứa X₁RGX₂YYGMDV (SEQ ID NO: 136) trong đó X₁ được chọn từ N hoặc D và X₂ được chọn từ H, Y hoặc F. Trình tự liên ứng CDRH3 từ nhóm lambda 1 chứa RIAAAGX₁X₂X₃YYYAX₄DV (SEQ ID NO: 137) trong đó X₁ được chọn từ G hoặc P; X₂ được chọn từ F hoặc W; X₃ được chọn từ H hoặc G và X₄ được chọn từ L và M. Trình tự liên ứng CDRH3 từ nhóm lambda 3 chứa DRGYX₁SSWYPDAFDI (SEQ ID NO: 138) trong đó X₁ được chọn từ S hoặc T.

Kháng thể đơn dòng

Protein liên kết kháng nguyên được đề xuất bao gồm kháng thể đơn dòng liên kết với IL-23. Kháng thể đơn dòng có thể được sản xuất bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, ví dụ, bằng cách làm bất tử tế bào lách thu được từ động vật chuyển gen sau khi kết thúc quá trình gây miễn dịch. Tế bào lách có thể được làm bất tử bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, ví dụ, bằng cách dung hợp chúng với tế bào u tuỷ để sản xuất tế bào lai. Tế bào u tuỷ để sử dụng trong phương pháp dung hợp tạo ra tế bào lai tốt hơn là không sản xuất kháng thể, có hiệu quả dung hợp cao và không có enzym mà làm cho chúng không có khả năng sinh trưởng trong môi trường chọn lọc nhất định mà chỉ hỗ trợ sự sinh trưởng của tế bào dung hợp mong muốn (tế bào lai). Ví dụ về dòng tế bào thích hợp để sử dụng trong quy trình dung hợp 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; ví dụ về dòng tế bào được sử dụng trong quy trình dung hợp chuột đuôi dài bao gồm R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F và 4B210. Các dòng tế bào khác hữu dụng để dung hợp tế bào là U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 và UC729-6.

Trong một số trường hợp, dòng tế bào lai được tạo ra bằng cách gây miễn dịch động vật (ví dụ, động vật chuyển gen có trình tự globulin miễn dịch ở người) bằng chất sinh miễn dịch IL-23; thu tế bào lách từ động vật được gây miễn dịch; dung hợp tế bào lách thu được vào dòng tế bào u tuỷ, nhờ đó tạo ra tế bào lai; thiết lập dòng tế bào lai từ tế bào lai, và nhận diện dòng tế bào lai sản xuất kháng thể liên kết với polypeptit IL-23 mà không ức chế IL-12. Các dòng tế bào lai này, và kháng thể đơn dòng kháng IL-23 được sản xuất bởi chúng, là các khía cạnh của sáng chế này.

Kháng thể đơn dòng được tiết ra bởi dòng tế bào lai có thể được tinh chế bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Tế bào lai hoặc mAb (kháng thể đơn dòng) có thể được sàng lọc tiếp để xác định mAb có đặc tính cụ thể, như khả năng ức chế hoạt tính gây ra bởi IL-23.

Kháng thể khảm và kháng thể được làm giống với kháng thể của người

Kháng thể khảm và kháng thể được làm giống với kháng thể của người dựa trên trình tự nêu trên cũng được đề xuất. Kháng thể đơn dòng để sử dụng làm chất trị liệu có thể được cải biến theo các cách khác nhau trước khi sử dụng. Một ví dụ là kháng thể khảm, là kháng thể được tạo ra từ các đoạn protein từ các kháng thể khác nhau mà được liên kết cộng hóa trị để tạo ra chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của globulin miễn dịch chức năng hoặc phần có chức năng miễn dịch của chúng. Tương tự, một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ giống với hoặc tương đồng với trình tự tương ứng trên kháng thể có nguồn gốc từ loài cụ thể hoặc thuộc lớp hoặc phân lớp kháng thể cụ thể, trong đó phần còn lại của (các) chuỗi giống với hoặc tương đồng với trình tự tương ứng trên kháng thể có nguồn gốc từ loài khác hoặc thuộc lớp hoặc phân lớp kháng thể khác. Về các phương pháp liên quan đến kháng thể khảm, xem, tài liệu, ví dụ, patent Mỹ số 4,816,567; và Morrison et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855. Quy trình ghép CDR được nêu trong tài liệu, ví dụ, trong patent Mỹ số 6,180,370, 5,693,762, 5,693,761, 5,585,089 và 5,530,101.

Một loại kháng thể khảm hữu dụng là kháng thể “được làm giống với kháng thể của người”. Thông thường, kháng thể được làm giống với kháng thể của người được tạo ra từ kháng thể đơn dòng mà được sản xuất ban đầu trong động vật không phải là người. Các gốc axit amin nhất định trong kháng thể đơn dòng này, thường từ phần không nhận diện 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. Quá trình làm giống với kháng thể của người có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau bằng cách thay thế ít nhất một phần của vùng thay đổi của động vật gặm nhấm cho vùng tương ứng của 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 số phương án nhất định, vùng không đổi từ loài không phải là người có thể được sử dụng cùng với (các) vùng thay đổi của người để sản xuất kháng thể lai.

Kháng thể hoàn toàn của người

Kháng thể hoàn toàn của người cũng được đề xuất. Các phương pháp sản xuất kháng thể hoàn toàn của người đặc hiệu đối với kháng nguyên nhất định mà không cần cho người tiếp xúc với kháng nguyên ("kháng thể hoàn toàn của người") là đã có sẵn. Một phương pháp cụ thể được đề xuất để thực hiện việc sản xuất kháng thể hoàn toàn của người là phương pháp "làm giống với kháng thể của người" đối với hệ miễn dịch thể dịch của chuột nhắt. Việc đưa locut globulin miễn dịch (Ig) của người vào chuột nhắt có gen Ig nội sinh đã được làm bất hoạt là một phương pháp sản xuất kháng thể đơn dòng (mAb) hoàn toàn của người ở chuột nhắt, là loài động vật mà có thể gây miễn dịch bằng kháng nguyên mong muốn bất kỳ. Việc sử dụng kháng thể hoàn toàn của người có thể giúp giảm thiểu đáp ứng gây miễn dịch và dị ứng mà có thể đôi khi xảy ra khi sử dụng mAb của chuột nhắt hoặc có nguồn gốc từ chuột nhắt làm chất trị liệu cho người.

Kháng thể hoàn toàn của người có thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch động vật chuyển gen (thường là chuột nhắt) mà có khả năng sản xuất kho kháng thể của người khi không sản xuất globulin miễn dịch nội sinh. Kháng nguyên dùng cho mục đích này thường có sáu hoặc nhiều axit amin tiếp giáp, và tùy ý được liên hợp với chất mang, như hapten. Xem tài liệu, ví dụ, 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. Trong một ví dụ về phương pháp này, động vật chuyển gen được tạo ra bằng cách làm mất hiệu lực locut globulin miễn dịch nội sinh của chuột nhắt mà mã hóa cho chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch của chuột trong đó, và cài xen vào hệ gen của chuột nhắt mảnh lớn của ADN hệ gen của người chứa locut mã hóa cho protein chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người. Động vật được cải biến một phần, mà có ít hơn phần bổ thể đầy đủ của locut globulin miễn dịch của người, sau đó 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, động vật chuyển gen sản xuất kháng thể đặc hiệu miễn dịch đối với chất sinh miễn dịch này, nhưng có trình tự axit amin của người chứ không phải của chuột, bao gồm vùng thay đổi. Để biết chi tiết hơn về các phương pháp này, xem tài liệu, ví dụ, WO96/33735 và WO94/02602. Các phương pháp khác liên quan đến chuột nhắt chuyển gen để sản xuất kháng thể của người được mô tả trong patent Mỹ số 5,545,807; 6,713,610; 6,673,986; 6,162,963; 5,545,807; 6,300,129; 6,255,458; 5,877,397; 5,874,299 và 5,545,806; trong WO91/10741, WO90/04036, và trong EP 546073B1 và EP 546073A1.

Chuột nhất chuyển gen nêu trên chứa minilocus gen globulin miễn dịch của người mà mã hoá cho trình tự globulin miễn dịch chuỗi nặng ([mu] và [gamma]) và chuỗi nhẹ [kappa] của người chưa được tái sắp xếp, cùng với các đột biến được nhắm đích mà làm bất hoạt locus chuỗi [mu] và [kappa] nội sinh (Lonberg et al., 1994, Nature 368:856-859). Theo đó, chuột nhất thể hiện sự biểu hiện giảm của [kappa] hoặc IgM của chuột và để đáp ứng với sự gây miễn dịch, và gen chuyển chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người được đưa vào trải qua quá trình chuyển đổi lớp và đột biến soma để tạo ra kháng thể đơn dòng [kappa] IgG của người có ái lực cao (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). Quá trình chuẩn bị chuột nhất như vậy 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; Tuailon 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 14:845-85. 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; WO93/1227; WO92/22646 và WO92/03918. Các công nghệ được sử dụng để sản xuất kháng thể của người trong chuột nhất chuyển gen được bộc lộ trong WO98/24893 và tài liệu Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15:146-156. Ví dụ, các chủng chuột nhất chuyển gen HCo7 và HCo12 có thể được sử dụng để sản xuất kháng thể kháng IL-23.

Bằng cách sử dụng công nghệ tế bào lai, mAb của người đặc hiệu kháng nguyên với tính đặc hiệu mong muốn có thể được tạo ra và được chọn từ chuột nhất chuyển gen như các dạng nêu trên. Các kháng thể này có thể được tách dòng và được biểu hiện bằng cách sử dụng vector và tế bào chủ thích hợp, hoặc các kháng thể có thể được thu từ các tế bào lai được nuôi cấy.

Kháng thể hoàn toàn của người cũng có thể có nguồn gốc từ thư viện biểu hiện thể thực khuẩn (như nêu trong Hoogenboom et al., 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581; WO99/10494). Kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn bắt chước sự chọn lọc miễn dịch thông qua việc biểu hiện kho kháng thể trên bề mặt thể thực khuẩn dạng

sợi và tiếp đó chọn lọc thể thực khuẩn theo sự liên kết của chúng với kháng nguyên được chọn.

Protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu kép hoặc chức năng kép

Kháng thể hoặc protein liên kết kháng nguyên “đặc hiệu kép”, “đặc hiệu hai lần” hoặc “chức năng kép” là kháng thể hoặc protein liên kết kháng nguyên lai, một cách tương ứng, có hai vị trí liên kết kháng nguyên khác nhau, như một hoặc nhiều CDR hoặc một hoặc nhiều vùng thay đổi như nêu trên. Trong một số trường hợp, chúng là kháng thể lai nhân tạo có hai cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ khác nhau và hai vị trí liên kết khác nhau. Protein liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu hoặc “kháng thể đa đặc hiệu” là protein liên kết kháng nguyên hoặc kháng thể nhắm đích nhiều hơn một kháng nguyên hoặc epitop. Protein liên kết kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu kép là loại protein liên kết kháng nguyên và kháng thể đa đặc hiệu và có thể được sản xuất bằng nhiều phương pháp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dung hợp tế bào lai hoặc liên kết mảnh Fab'. Xem tài liệu, ví dụ, Songsivilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553.

Mảnh có tính miễn dịch

Protein liên kết kháng nguyên còn bao gồm mảnh có tính miễn dịch của kháng thể (ví dụ, Fab, Fab', F(ab')₂ hoặc scFv). “Mảnh Fab” chứa một chuỗi nhẹ (vùng thay đổi chuỗi nhẹ (V_L) và vùng không đổi tương ứng (C_L) của nó) và một chuỗi nặng (vùng thay đổi chuỗi nặng (V_H) và vùng không đổi thứ nhất (C_{H1})). Chuỗi nặng của phân tử Fab không thể tạo thành liên kết disulfua với phân tử chuỗi nặng khác. “Mảnh Fab” chứa một chuỗi nhẹ và một phần của một chuỗi nặng mà còn chứa vùng giữa các miền C_{H1} và C_{H2}, sao cho liên kết disulfua liên chuỗi có thể được tạo thành giữa hai chuỗi nặng của hai mảnh Fab' để tạo thành phân tử F(ab')₂. “Mảnh F(ab')₂” như vậy được tạo ra từ hai mảnh Fab' mà được giữ với nhau bởi liên kết disulfua giữa hai chuỗi nặng. “Mảnh Fv” chứa vùng thay đổi chuỗi nhẹ và vùng thay đổi chuỗi nặng của một nhánh đơn lẻ của kháng thể. Kháng thể chuỗi đơn “scFv” là phân tử Fv trong đó vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được nối bởi nhóm liên kết linh động để tạo thành chuỗi polypeptit đơn lẻ mà tạo thành vùng liên kết kháng nguyên. Kháng thể chuỗi đơn được thảo luận chi tiết trong WO88/01649, patent Mỹ số 4,946,778 và số 5,260,203; 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; Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt et al., 2001,

Biomol. Eng. 18:95-108 và Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40. Vùng “Fc” chứa hai mảnh chuỗi nặng chứa miền C_{H1} và C_{H2} của kháng thể. Hai mảnh chuỗi nặng này được giữ với nhau bởi hai hoặc nhiều liên kết disulfua và bởi tương tác kỵ nước của miền C_{H3} .

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể miễn, mảnh globulin miễn dịch có chức năng miễn dịch chỉ chứa vùng thay đổi chuỗi nặng hoặc vùng thay đổi chuỗi nhẹ. Trong một số trường hợp, hai hoặc nhiều vùng V_H được liên kết cộng hóa trị với nhóm liên kết peptit để tạo ra kháng thể miễn hóa trị hai. Hai vùng V_H của kháng thể miễn hóa trị hai có thể nhắm đích cùng một kháng nguyên hoặc các kháng nguyên khác nhau. Đoạn Fv chuỗi đơn dạng dime (diabody) là kháng thể hóa trị hai chứa hai chuỗi polypeptit, trong đó mỗi chuỗi polypeptit chứa miền V_H và miền V_L được kết nối bằng nhóm liên kết mà quá ngắn để cho phép bắt cặp giữa hai miền trên cùng một chuỗi, do đó cho phép mỗi miền bắt cặp với miền bổ thể trên chuỗi polypeptit khác (xem, ví dụ, Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, 1993 và Poljak et al., Structure 2:1121-23, 1994). Tương tự, đoạn Fv chuỗi đơn dạng trime (tribody) và đoạn Fv chuỗi đơn dạng tetrame (tetrabody) là kháng thể chứa ba và bốn chuỗi polypeptit, một cách tương ứng, và tạo thành ba và bốn vị trí liên kết kháng nguyên, một cách tương ứng, mà có thể là giống nhau hoặc khác nhau. Kháng thể maxi (maxibody) chứa scFv hóa trị hai được gắn theo cách cộng hóa trị với vùng Fc của IgG₁, (xem tài liệu, ví dụ, Fredericks et al, 2004, Protein Engineering, Design & Selection, 17:95-106; Powers et al., 2001, Journal of Immunological Methods, 251:123-135; Shu et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7995-7999; Hayden et al., 1994, Therapeutic Immunology 1:3-15).

Các dạng khác

Sáng chế còn đề xuất dạng biến thể của protein liên kết kháng nguyên nêu trên, một trong số các protein liên kết kháng nguyên này có, ví dụ, một hoặc nhiều đột biến thể axit amin bảo thủ trong một hoặc nhiều chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, vùng thay đổi hoặc CDR được liệt kê trong bảng 1 và 2.

Axit amin có trong tự nhiên có thể được chia thành các lớp dựa trên đặc tính của chuỗi bên phổ biến: kỵ nước (norloxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile); ưa nước trung tính (Cys, Ser, Thr, Asn, Gln); axit (Asp, Glu); bazơ (His, Lys, Arg); gốc gây ảnh hưởng đến sự định hướng chuỗi (Gly, Pro); và thơm (Trp, Tyr, Phe).

Đột biến thể axit amin bảo thủ có thể bao gồm sự trao đổi thành phần của một trong số các lớp này với thành phần khác của cùng lớp đó. Đột biến thể axit amin bảo thủ có thể bao gồm gốc axit amin không có trong tự nhiên, mà thường được đưa vào bằng cách tổng hợp peptit hóa học chứ không phải bằng cách tổng hợp trong hệ sinh học. Chúng bao gồm thể giả peptit và các dạng đảo ngược hoặc nghịch đảo khác của gốc axit amin. Sự biến đổi bản chất về đặc tính chức năng và/hoặc sinh hóa của protein liên kết kháng nguyên nêu trong bản mô tả này có thể thu được bằng cách tạo ra đột biến thể trong trình tự axit amin của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mà khác đáng kể về tác dụng của chúng đối với việc duy trì (a) cấu trúc của khung phân tử trong vùng thể, ví dụ, ở dạng cấu trúc không gian dạng phiến hoặc xoắn ốc, (b) điện tích hoặc độ kỵ nước của phân tử tại vị trí đích, hoặc (c) độ lớn của chuỗi bên.

Đột biến thể không bảo thủ có thể bao gồm sự trao đổi thành phần của một trong số các lớp nêu trên cho thành phần từ lớp khác. Gốc được thể như vậy có thể được đưa vào vùng kháng thể mà tương đồng với kháng thể của người, hoặc vào vùng không tương đồng của phân tử này.

Khi tạo ra các thay đổi này, theo một số phương án nhất định, chỉ số ưa/kỵ nước (hydropathic) của axit amin có thể được xem xét. Profin ưa/kỵ nước của protein được tính bằng cách gán cho mỗi axit amin một giá trị bằng số ("chỉ số ưa/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 ưa/kỵ nước dựa trên cơ sở đặc tính về độ kỵ nước và điện tích của nó. Đó là: isoloxin (+4,5); valin (+4,2); loxin (+3,8); phenylalanin (+2,8); xystein/xystin (+2,5); methionin (+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 profin ưa/kỵ nước trong việc tạo ra chức năng sinh học có tính tương tác cho protein là đã biết trong lĩnh vực (xem, ví dụ, Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-131). Đã biết rằng axit amin nhất định có thể được thể cho axit amin khác có điểm số hoặc chỉ số ưa/kỵ nước tương tự và vẫn giữ được hoạt tính sinh học tương tự. Khi tạo ra các thay đổi dựa trên chỉ số ưa/kỵ nước, theo một số phương án nhất định, đột biến thể axit amin có chỉ số ưa/kỵ nước nằm trong khoảng ± 2 được bao gồm. Theo một số khía cạnh, đột biến thể axit amin có chỉ số ưa/kỵ nước nằm trong khoảng ± 1 được bao gồm, và theo các

khía cạnh khác, đột biến thể axit amin có chỉ số ưa/nhớt nước nằm trong khoảng $\pm 0,5$ được bao gồm.

Trong lĩnh vực này, cũng cần hiểu rằng đột biến thể của các axit amin tương tự có thể được tạo ra một cách hiệu quả dựa trên cơ sở độ ưa nước, đặc biệt là khi protein hoặc peptit có chức năng sinh học được tạo ra từ đó được dự định để sử dụng trong phương án miễn dịch, như trong trường hợp này. Theo một số phương án nhất định, độ ưa nước trung bình cục bộ lớn nhất của protein, bị chi phối bởi độ ưa nước của axit amin liền kề của nó, tương quan với tính sinh miễn dịch của nó và sự liên kết hoặc tính sinh miễn dịch của kháng nguyên, tức là, có tương quan với đặc tính sinh học của protein.

Giá trị độ ưa nước sau đây được gán cho các gốc axit amin: arginin (+3,0); lysin (+3,0); aspartat (+3,0 $\pm$ 1); glutamat (+3,0 $\pm$ 1); serin (+0,3); asparagin (+0,2); glutamin (+0,2); glyxin (0); threonin (-0,4); prolin (-0,5 $\pm$ 1); alanin (-0,5); histidin (-0,5); xystein (-1,0); methionin (-1,3); valin (-1,5); loxin (-1,8); isoloxin (-1,8); tyrosin (-2,3); phenylalanin (-2,5) và tryptophan (-3,4). Khi tạo ra các thay đổi dựa trên cơ sở giá trị độ ưa nước tương tự, theo một số phương án nhất định, đột biến thể axit amin có giá trị độ ưa nước nằm trong khoảng ± 2 được bao gồm, theo các phương án khác, đột biến thể axit amin có giá trị độ ưa nước nằm trong khoảng ± 1 được bao gồm, và theo các phương án khác nữa, đột biến thể axit amin có giá trị độ ưa nước nằm trong khoảng $\pm 0,5$ được bao gồm. Trong một số trường hợp, cũng có thể nhận diện epitop từ trình tự axit amin bậc một dựa trên cơ sở độ ưa nước. Vùng này còn được gọi là “vùng lõi epitop.”

Ví dụ về đột biến thể axit amin bảo thủ được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4

Đột biến thể axit amin bảo thủ

Gốc	Thế	Gốc	Thế	Gốc	Thế	Gốc	Thế
Ala	Ser	Gln	Asn	Leu	Ile, Val	Thr	Ser
Arg	Lys	Glu	Asp	Lys	Arg, Gln, Glu	Trp	Tyr
Asn	Gln, His	Gly	Pro	Met	Leu, Ile	Tyr	Trp, Phe
Asp	Glu	His	Asn, Gln	Phe	Met, Leu, Tyr	Val	Ile, Leu

Cys	Ser		Ile	Leu, Val		Ser	Thr		Thr	Ser
-----	-----	--	-----	-------------	--	-----	-----	--	-----	-----

Gốc = Gốc ban đầu, Thế = Đột biến thế tiêu biểu

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định các biến thể thích hợp của các polypeptit nêu trong bản mô tả này bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định vùng thích hợp của phân tử mà có thể thay đổi được mà không phá hủy hoạt tính bằng cách nhắm đích vùng không được cho là quan trọng đối với hoạt tính. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể xác định gốc và phần của phân tử mà được bảo toàn trong số các polypeptit tương tự. Theo các phương án khác, thậm chí 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 làm hỏng hoạt tính sinh học hoặc không gây ảnh hưởng bất lợi đến cấu trúc polypeptit.

Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật có thể xem xét các nghiên cứu cấu trúc-chức năng trong đó nhận diện các gốc trong các polypeptit tương tự mà quan trọng đối với hoạt tính hoặc cấu trúc. Với việc so sánh như vậy, 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 protein tương tự. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật có thể lựa chọn đột biến thế axit amin tương tự về mặt hóa học cho gốc axit amin quan trọng được dự đoán.

Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật cũng có thể phân tích cấu trúc ba chiều và trình tự axit amin liên quan đến cấu trúc đó ở các polypeptit tương tự. Với thông tin này, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật có thể dự đoán sự sắp hàng của các gốc axit amin của kháng thể với cấu trúc ba chiều của nó. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật có thể lựa chọn không tạo ra sự thay đổi gốc thành các gốc axit amin được dự đoán là ở trên bề mặt của protein, vì các gốc này có thể có liên quan đến sự tương tác quan trọng với phân tử khác. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật có thể tạo ra biến thể thử nghiệm chứa một đột biến thế axit amin tại mỗi gốc axit amin mong muốn. Biến thể này sau đó có thể được sàng lọc bằng cách sử dụng các thử nghiệm về hoạt tính IL-23, (xem phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây), nhờ đó thu được thông tin về axit amin nào có thể được thay đổi và axit amin nào không được thay đổi. Nói cách khác, dựa trên thông tin thu được từ thử nghiệm thông thường này, người có hiểu biết trung bình

về lĩnh vực kỹ thuật có thể dễ dàng xác định được vị trí axit amin mà cần tránh đột biến thể tiếp theo, dù ở dạng riêng lẻ hay ở dạng kết hợp với các đột biến khác.

Nhiều công bố khoa học đã được đưa ra về việc dự đoán cấu trúc bậc hai. Xem tài liệu, Moulton, 1996, *Curr. Opin. 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, các chương trình máy tính hiện tại đã có sẵn trên thị trường để hỗ trợ việc dự đoán cấu trúc bậc hai. Một phương pháp dự đoán cấu trúc bậc hai là dựa trên việc lập mô hình độ tương đồng. Ví dụ, hai polypeptit hoặc protein mà có độ đồng nhất trình tự lớn hơn 30%, hoặc độ tương tự lớn hơn 40% thường có cấu trúc liên kết tương tự. Sự phát triển gần đây của cơ sở dữ liệu cấu trúc protein (PDB) cung cấp khả năng dự đoán nâng cao về cấu trúc bậc hai, bao gồm số lượng nếp gấp có thể có trong cấu trúc polypeptit hoặc protein. Xem tài liệu, Holm et al., 1999, *Nucl. Acid. Res.* 27:244-247. Đã có gợi ý (Brenner et al., 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:369-376) rằng polypeptit hoặc protein được nêu có số lượng nếp gấp giới hạn, và khi số lượng cấu trúc tới hạn được phân giải, thì sự dự đoán cấu trúc sẽ trở nên chính xác hơn rất nhiều.

Các phương pháp khác để dự đoán cấu trúc bậc hai bao gồm “xâu chuỗi” (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 kết tiến hóa” (xem tài liệu Holm, 1999, nêu trên; và Brenner, 1997, nêu trên).

Theo một số phương án, đột biến thể axit amin được tạo ra sao cho: (1) làm giảm độ miễn cảm với sự thủy phân protein, (2) làm giảm độ miễn cảm với sự oxy hóa, (3) thay đổi ái lực liên kết để tạo thành phức hợp protein, (4) thay đổi ái lực liên kết phối tử hoặc kháng nguyên, và/hoặc (4) tạo ra hoặc biến đổi các đặc tính chức năng hoặc lý hóa khác trên polypeptit này, như duy trì cấu trúc của khung phân tử trong vùng thể, ví dụ, ở dạng cấu trúc không gian dạng phiến hoặc xoắn ốc; duy trì hoặc thay đổi điện tích hoặc độ kỵ nước của phân tử tại vị trí đích, hoặc duy trì hoặc thay đổi độ lớn của chuỗi bên.

Ví dụ, một hoặc nhiều đột biến thể axit amin (theo một số phương án nhất định là đột biến thể axit amin bảo thủ) có thể được tạo ra trong trình tự có trong tự nhiên. Đột biến thể có thể được tạo ra trong phần kháng thể nằm ngoài (các) miền tạo thành vị trí tiếp xúc nội

phân tử). Theo các phương án này, đột biến thể axit amin bảo thủ có thể được sử dụng mà gần như không làm thay đổi các đặc tính cấu trúc của trình tự gốc (ví dụ, một hoặc nhiều axit amin thay thế mà không phá vỡ cấu trúc bậc hai đặc trưng cho protein liên kết kháng nguyên gốc hoặc nguyên gốc). Ví dụ về cấu trúc bậc hai và bậc ba của polypeptit được công nhận trong tình trạng kỹ thuật 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.

Các biến thể khác bao gồm biến thể xystein trong đó một hoặc nhiều gốc xystein trong trình tự axit amin gốc hoặc nguyên gốc được làm khuyết hoặc được thế bằng axit amin khác (ví dụ, serin). Biến thể xystein là hữu dụng, không kể những thứ khác, khi kháng thể (ví dụ) cần phải được tái gấp cuộn thành cấu trúc không gian có hoạt tính sinh học. Biến thể xystein có thể có ít gốc xystein hơn protein nguyên gốc, và thường có số lượng chẵn để giảm thiểu các tương tác gây ra do các xystein không bắt cặp.

Vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và CDR được đề xuất có thể được sử dụng để tạo ra protein liên kết kháng nguyên chứa vùng liên kết kháng nguyên mà có thể liên kết đặc hiệu với polypeptit IL-23. “Vùng liên kết kháng nguyên” có nghĩa là protein, hoặc một phần của protein, mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể, như vùng chứa gốc axit amin mà tương tác với kháng nguyên và tạo ra cho protein liên kết kháng nguyên này tính đặc hiệu và ái lực của nó đối với kháng nguyên đích. Vùng liên kết kháng nguyên có thể bao gồm một hoặc nhiều CDR, và một số vùng liên kết kháng nguyên nhất định còn bao gồm một hoặc nhiều vùng “khung”. Ví dụ, một hoặc nhiều CDR được liệt kê trong bảng 3 có thể được kết hợp vào phân tử (ví dụ, polypeptit) theo cách cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị để tạo ra phân kết dính miễn dịch. Phân kết dính miễn dịch có thể kết hợp (các) CDR làm 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 cho phép phân kết dính miễn dịch liên kết đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể đang quan tâm (ví dụ, polypeptit IL-23).

Các protein liên kết kháng nguyên khác bao gồm thể giả (ví dụ, “thể giả peptit” hoặc “chất giả peptit”) dựa trên cơ sở vùng thay đổi và CDR nêu trong bản mô tả này. Các thể tương tự này có thể là peptit, chất không phải peptit hoặc tổ 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. Thể giả peptit có cấu trúc tương tự với peptit hữu dụng để trị liệu có thể được sử dụng để tạo ra tác dụng trị liệu hoặc phòng ngừa tương tự. Hợp chất này thường được phát triển với sự trợ giúp của việc lập mô hình phân tử bằng máy vi tính. Thông thường, thể giả peptit là protein có cấu trúc tương tự với protein liên kết kháng nguyên thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn, như khả năng liên kết với IL-23, nhưng thể giả peptit có một hoặc nhiều liên kết peptit tùy ý được thay thế bằng liên kết được chọn từ, ví dụ: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}-\text{CH}-$ (cis và trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ và $-\text{CH}_2\text{SO}-$, bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực. Việc thể hệ thống một hoặc nhiều axit amin của trình tự liên ứng bằng D-axit amin thuộc cùng loại (ví dụ, D-lysin thay cho L-lysin) có thể được sử dụng theo một số phương án nhất định để tạo ra protein ổn định hơn. Ngoài ra, peptit bị giới hạn chứa trình tự liên ứng hoặc biến thể trình tự liên ứng giống về cơ bản có thể được tạo ra bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực (Rizo and Gierasch, 1992, Ann. Rev. Biochem. 61:387), ví dụ, bằng cách bổ sung các gốc xystein bên trong có khả năng tạo thành cầu disulfua nội phân tử mà làm đóng vòng peptit.

Dẫn xuất của protein liên kết kháng nguyên nêu trong bản mô tả này cũng được đề xuất. Protein liên kết kháng nguyên được tạo dẫn xuất có thể chứa phân tử hoặc chất bất kỳ mà tạo ra đặc tính mong muốn cho protein liên kết kháng nguyên hoặc mảnh của chúng, như thời gian bán hủy tăng trong ứng dụng cụ thể. Protein liên kết kháng nguyên được tạo dẫn xuất có thể chứa, ví dụ, gốc có thể phát hiện được (hoặc đánh dấu) (ví dụ, phân tử có hoạt tính phóng xạ, đo màu, có tính kháng nguyên hoặc có tính enzym, hạt có thể phát hiện được (như hạt có từ tính hoặc có mật độ điện từ dày đặc (ví dụ, vàng)), hoặc phân tử liên kết với phân tử khác (ví dụ, biotin hoặc streptavidin)), gốc có tính trị liệu hoặc chẩn đoán (ví dụ, gốc có hoạt tính phóng xạ, gây độc tế bào hoặc có hoạt tính dược lý), hoặc phân tử làm tăng độ phù hợp của protein liên kết kháng nguyên đối với ứng dụng cụ thể (ví dụ, sử dụng cho đối tượng, như người, hoặc ứng dụng *in vivo* hoặc *in vitro* khác). Ví dụ về phân tử có thể được sử dụng để tạo dẫn xuất protein liên kết kháng nguyên bao gồm albumin (ví dụ, albumin huyết thanh của người) và polyetylen glycol (PEG). Dẫn xuất đã được liên kết albumin và PEGyl hóa của protein liên kết kháng nguyên có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết rõ trong lĩnh vực. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên được liên hợp hoặc được liên kết theo cách khác với transthyretin (TTR) hoặc biến thể TTR. TTR hoặc biến thể TTR có thể được biến đổi hóa học bằng, ví dụ, hóa chất được

chọn từ nhóm bao gồm dextran, poly(n-vinyl pyrrolidon), polyetylen glycol, propylen glycol homopolyme, copolyme polypropylen oxit/etylen oxit, polyol được polyoxyetyl hóa và rượu polyvinyl.

Dẫn xuất khác bao gồm các thể liên hợp cộng hóa trị hoặc kết tụ của protein liên kết kháng nguyên IL-23 với protein hoặc polypeptit khác, như bằng cách biểu hiện protein dung hợp tái tổ hợp chứa các polypeptit khác loại được dung hợp vào đầu tận N hoặc đầu tận C của protein liên kết kháng nguyên IL-23. Ví dụ, peptit được liên hợp có thể là polypeptit tín hiệu (hoặc dẫn đầu) khác loại, ví dụ, trình tự dẫn đầu yếu tố alpha nấm men, hoặc peptit như đuôi epitop. Protein liên kết kháng nguyên IL-23-chứa protein dung hợp có thể chứa peptit được thêm vào để tạo thuận lợi cho quá trình tinh chế hoặc xác định protein liên kết kháng nguyên IL-23 này (ví dụ, poly-His). Protein liên kết kháng nguyên IL-23 còn có thể được liên kết với peptit FLAG như nêu trong tài liệu Hopp et al., 1988, *Bio/Technology* 6:1204 và patent Mỹ số 5,011,912. Peptit FLAG có tính kháng nguyên cao và cung cấp epitop được liên kết thuận nghịch bởi kháng thể đơn dòng (mAb) đặc hiệu, cho phép thử nghiệm nhanh chóng và tinh chế dễ dàng protein tái tổ hợp được biểu hiện. Chất phản ứng hữu dụng để tạo ra protein dung hợp trong đó peptit FLAG được dung hợp vào polypeptit nhất định đã có sẵn trên thị trường (Sigma, St. Louis, MO).

Oligome chứa một hoặc nhiều protein liên kết kháng nguyên IL-23 có thể được sử dụng làm chất đối kháng IL-23. Oligome có thể là dạng dime, trime hoặc oligome bậc cao được liên kết cộng hóa trị hoặc được liên kết không theo cách cộng hóa trị. Oligome chứa hai hoặc nhiều protein liên kết kháng nguyên IL-23 được dự định sử dụng, với một ví dụ là homodime. Oligome khác bao gồm heterodime, homotrime, heterotrime, homotetrame, heterotetrame, v.v.. Oligome chứa nhiều protein liên kết IL-23 được kết nối thông qua tương tác cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị giữa các gốc peptit được dung hợp vào protein liên kết kháng nguyên IL-23 cũng được bao gồm. Peptit này có thể là nhóm liên kết peptit (nhóm đệm), hoặc peptit có đặc tính thúc đẩy sự oligome hóa. Các nhóm liên kết peptit thích hợp được mô tả trong patent Mỹ số 4,751,180 và 4,935,233. Khóa kéo loxin và các polypeptit nhất định có nguồn gốc từ kháng thể nằm trong số các peptit có thể thúc đẩy sự oligome hóa của protein liên kết kháng nguyên IL-23 được gắn vào đó. Ví dụ về miền khóa kéo loxin thích hợp để sản xuất protein oligome tan được mô tả trong WO94/10308; Hoppe et al., 1994, *FEBS Letters* 344:191; và Fanslow et al., 1994, *Semin. Immunol.* 6:267-278. Theo một phương án, protein dung hợp tái tổ hợp chứa mảnh protein liên kết kháng

nguyên IL-23 hoặc dẫn xuất được dung hợp vào peptit khóa kéo loxin được biểu hiện ở tế bào chủ thích hợp, và mảnh protein liên kết kháng nguyên IL-23 oligome tan được hoặc dẫn xuất tạo thành được thu hồi từ phần dịch nổi nuôi cấy.

Oligome này có thể chứa từ 2 đến 4 protein liên kết kháng nguyên IL-23. Các gốc protein liên kết kháng nguyên IL-23 của oligome có thể có dạng bất kỳ trong số các dạng nêu trên, ví dụ, biến thể hoặc mảnh. Tốt hơn là, oligome chứa protein liên kết kháng nguyên IL-23 mà có hoạt tính liên kết IL-23. Oligome có thể được tạo ra bằng cách sử dụng polypeptit có nguồn gốc từ globulin miễn dịch. Việc tạo protein dung hợp chứa các polypeptit khác loại nhất định 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", in *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11.

Sáng chế cũng bao gồm dime chứa hai protein dung hợp được tạo ra bằng cách dung hợp protein liên kết kháng nguyên IL-23 với vùng Fc của kháng thể. Dime có thể được tạo ra bằng cách, ví dụ, cài xen phần dung hợp gen mã hóa cho protein dung hợp vào vector biểu hiện thích hợp, biểu hiện phần dung hợp gen trong tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện tái tổ hợp, và cho phép protein dung hợp được biểu hiện lắp ghép theo cách rất giống phân tử kháng thể, trên đó liên kết disulfua liên chuỗi tạo thành giữa các gốc Fc để tạo ra dime. Polypeptit Fc này bao gồm dạng tự nhiên và đột biến của polypeptit có nguồn gốc từ vùng Fc của kháng thể. Dạng cắt cụt của polypeptit chứa vùng bản lề thúc đẩy sự dime hóa cũng được bao gồm. Protein dung hợp chứa gốc Fc (và oligome được tạo thành từ đó) mang lại lợi ích là tinh chế dễ dàng bằng kỹ thuật sắc ký ái lực trên cột Protein A hoặc Protein G. Một polypeptit Fc thích hợp, được mô tả trong WO93/10151 và patent Mỹ số 5,426,048 và 5,262,522, là polypeptit chuỗi đơn kéo dài từ vùng bản lề đầu tận N đến đầu tận C nguyên gốc của vùng Fc của kháng thể IgG1 của người. Polypeptit Fc hữu dụng khác là Fc đột biến 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 Fc đột biến này giống với trình tự axit amin của trình tự Fc nguyên gốc được mô tả trong WO93/10151, trừ việc axit amin 19 được thay đổi từ Leu thành Ala, axit amin 20 được thay đổi từ Leu thành Glu và axit amin 22 được thay đổi từ Gly thành Ala. Fc đột biến có ái lực giảm đối với thụ thể Fc.

Glycosyl hóa

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

Quá trình glycosyl hóa polypeptit thường là liên kết N hoặc liên kết O. Glycosyl hóa liên kết N chỉ việc gắn gốc hydrat cacbon vào chuỗi bên của gốc asparagin. Trình tự tri-peptit asparagin-X-serin và asparagin-X-threonin, trong đó X là axit amin bất kỳ ngoại trừ prolin, là trình tự nhận biết việc gắn gốc hydrat cacbon vào chuỗi bên asparagin bằng enzym. Như vậy, sự có mặt của một trong số các trình tự tri-peptit này trong polypeptit tạo ra vị trí glycosyl hóa tiềm năng. Glycosyl hóa liên kết O chỉ việc gắn một trong số các đường N-acetylgalactosamin, galactosa hoặc xyloza vào axit hydroxyamino, phổ biến nhất là serin hoặc threonin, mặc dù 5-hydroxyprolin hoặc 5-hydroxylysin cũng có thể được sử dụng.

Việc bổ sung vị trí glycosyl hóa vào protein liên kết kháng nguyên thường được thực hiện bằng cách thay đổi trình tự axit amin sao cho nó chứa một hoặc nhiều trình tự tri-peptit nêu trên (đối với vị trí glycosyl hóa liên kết N). Sự thay đổi cũng có thể được tạo ra bằng cách bổ sung hoặc thế bằng một hoặc nhiều gốc serin hoặc threonin vào trình tự bất đầu (đối với vị trí glycosyl hóa liên kết O). Để 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 cho polypeptit đích ở gốc đã chọn trước sao cho codon được tạo ra sẽ dịch mã thành axit amin mong muốn.

Phương pháp khác để làm tăng số lượng gốc hydrat cacbon trên protein liên kết kháng nguyên là bằng cách cộng hợp glycosit vào protein theo phương pháp hóa học hoặc bằng enzym. Phương pháp này có lợi ở chỗ chúng không cần đến việc sản xuất protein trong tế bào chủ mà có khả năng glycosyl hóa để glycosyl hóa liên kết N và O. Tùy thuộc vào phương pháp cộng hợp được sử dụng, (các) đường có thể gắn vào (a) arginin và histidin, (b) nhóm carboxyl tự do, (c) nhóm sulfhydryl tự do như nhóm của xystein, (d) nhóm hydroxyl tự do như nhóm của serin, threonin hoặc hydroxyprolin, (e) gốc thơm như gốc của phenylalanin, tyrosin hoặc tryptophan, hoặc (f) nhóm amit của glutamin. Các phương pháp này được mô tả trong WO87/05330 và trong tài liệu Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev, Biochem., pp. 259-306.

Việc loại bỏ gốc hydrat cacbon có mặt trên protein liên kết kháng nguyên bắt đầu có thể được thực hiện theo phương pháp hóa học hoặc enzym. Việc khử glycosyl hóa học cần đến bước cho protein tiếp xúc với hợp chất axit triflometansulfonic hoặc hợp chất tương đương. Việc xử lý này dẫn đến sự phân cắt hầu hết hoặc tất cả các đường ngoại trừ đường liên kết (N-axetylglucosamin hoặc N-axetylgalactosamin), trong khi giữ polypeptit nguyên vẹn. Sự khử glycosyl hóa học được mô tả trong tài liệu Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 và Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Sự phân cắt gốc hydrat cacbon trên polypeptit bằng enzym có thể được thực hiện bằng cách sử dụng một số endo- và exo-glycosidaza như được mô tả trong tài liệu Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Sự glycosyl hóa tại vị trí glycosyl hóa tiềm năng có thể được ngăn ngừa bằng cách sử dụng hợp chất tunicamycin như nêu trong tài liệu Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Tunicamycin phong bế sự tạo thành liên kết protein-N-glycosit.

Do đó, các khía cạnh của sáng chế bao gồm biến thể glycosyl hóa của protein liên kết kháng nguyên trong đó số lượng và/hoặc loại vị trí glycosyl hóa được biến đổi so với trình tự axit amin của polypeptit gốc. Theo một số phương án nhất định, biến thể protein liên kết kháng nguyên có số lượng vị trí glycosyl hóa liên kết N nhiều hơn hoặc ít hơn so với polypeptit gốc. Đột biến thể mà loại bỏ hoặc thay đổi trình tự này sẽ ngăn cản việc bổ sung chuỗi hydrat cacbon liên kết N có mặt trong polypeptit gốc. Ví dụ, sự glycosyl hóa có thể được làm giảm bởi việc làm khuyết Asn hoặc bằng cách thay thế Asn bằng axit amin khác. Kháng thể thường có vị trí glycosyl hóa liên kết N trong vùng Fc.

Chất đánh dấu và nhóm tác động

Protein liên kết kháng nguyên có thể chứa một hoặc nhiều chất đánh dấu. Thuật ngữ “chất đánh dấu” hoặc “nhóm đánh dấu” chỉ chất đánh dấu có thể phát hiện được bất kỳ. Nhìn chung, chất đánh dấu thuộc nhiều lớp khác nhau, tùy thuộc vào thử nghiệm trong đó chúng cần được phát hiện: a) chất đánh dấu đồng vị mà có thể là chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ hoặc chất đồng vị nặng; b) chất đánh dấu có từ tính (ví dụ, hạt từ tính); c) gốc có hoạt tính oxy hóa-khử; d) chất nhuộm quang học; nhóm có tính enzym (ví dụ, peroxidaza cải ngựa, β -galactosidaza, luxiferaza, phosphataza kiềm); e) nhóm được biotinyl hóa; và f) epitop polypeptit đã xác định trước được nhận diện bằng chất chỉ thị thứ cấp (ví dụ, trình tự cặp khóa kéo loxin, vị trí liên kết đối với kháng thể bậc hai, miền liên kết kim loại, đuôi epitop, v.v.). Theo một số phương án, nhóm đánh dấu được cộng hợp với protein liên kết

kháng nguyên qua nhánh đệm có chiều dài khác nhau để làm giảm sự cản trở không gian tiềm ẩn. Các phương pháp đánh dấu protein khác nhau là đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ về nhóm đánh dấu thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các nhóm sau: chất đồng vị phóng xạ hoặc nuclit phóng xạ (ví dụ, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), nhóm huỳnh quang (ví dụ, FITC, rhodamin, lanthanit photpho), nhóm có tính enzym (ví dụ, peroxidaza cải ngựa, β -galactosidaza, luxiferaza, phosphataza kiềm), nhóm phát quang hóa học, nhóm biotinyt hoặc epitop polypeptit đã xác định trước được nhận diện bằng chất chỉ thị thứ cấp (ví dụ, trình tự cặp khóa kéo loxin, vị trí liên kết đối với kháng thể bậc hai, miền liên kết kim loại, đuôi epitop). Theo một số phương án, nhóm đánh dấu được cộng hợp với protein liên kết kháng nguyên qua nhánh đệm có chiều dài khác nhau để làm giảm sự cản trở không gian tiềm ẩn. Các phương pháp khác nhau để đánh dấu protein là đã biết trong lĩnh vực và có thể được sử dụng khi thích hợp.

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

Polynucleotit mã hóa protein liên kết kháng nguyên IL-23

Polynucleotit mã hóa protein liên kết kháng nguyên nêu trong bản mô tả này, hoặc một phần của chúng, cũng được đề xuất, bao gồm polynucleotit mã hóa một hoặc cả hai chuỗi của kháng thể, hoặc mảnh, dẫn xuất, thể đột biến hoặc biến thể của chúng, polynucleotit mã hóa vùng thay đổi chuỗi nặng hoặc chỉ CDR, polynucleotit thích hợp để sử dụng làm mẫu dò lai, đoạn môi PCR hoặc đoạn môi xác định trình tự để nhận diện, phân tích, gây đột biến hoặc khuếch đại polynucleotit mã hóa polypeptit, axit nucleic đối nghĩa để ức chế sự biểu hiện của polynucleotit, và trình tự bổ thể của chúng. Polynucleotit có thể có chiều dài bất kỳ. Chúng có thể có chiều dài là, ví dụ, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 85, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1000, 1500, 3000, 5000 axit nucleic hoặc hơn, bao gồm tất cả các giá trị ở giữa, và/hoặc có thể bao gồm một hoặc nhiều trình tự khác, ví dụ, trình tự điều hòa và/hoặc là phần của polynucleotit lớn hơn, ví dụ,

vector. Polynucleotit có thể là sợi đơn hoặc sợi kép và có thể bao gồm axit nucleic ARN và/hoặc ADN và biến thể nhân tạo của chúng (ví dụ, axit nucleic peptit).

Polynucleotit mã hóa protein liên kết kháng nguyên, hoặc một phần của chúng (ví dụ, kháng thể nguyên chiều dài, chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, miền thay đổi, hoặc CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 hoặc CDRL3) có thể được phân lập từ tế bào B của chuột nhất được gây miễn dịch bằng IL-23 hoặc mảnh có tính miễn dịch của chúng. Polynucleotit có thể được phân lập bằng các phương pháp thông thường như phản ứng chuỗi polymeraza (PCR). Kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn là ví dụ khác về kỹ thuật đã biết trong đó dẫn xuất của kháng thể và các protein liên kết kháng nguyên khác có thể được tạo ra. Trong một nghiên cứu, polypeptit mã là thành phần của protein liên kết kháng nguyên đang quan tâm được biểu hiện ở hệ biểu hiện tái tổ hợp thích hợp bất kỳ, và polypeptit được biểu hiện được để cho lắp ghép để tạo thành phân tử protein liên kết kháng nguyên. Kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn cũng được sử dụng để thu nhận protein liên kết kháng nguyên có các đặc tính khác nhau (tức là, ái lực thay đổi đối với kháng nguyên mà chúng liên kết với) thông qua việc làm xáo trộn chuỗi, xem tài liệu Marks et al., 1992, BioTechnology 10:779.

Do sự thoái hóa của mã di truyền, nên mỗi trong số các trình tự polypeptit nêu trong bản mô tả cũng được mã hóa bởi số lượng lớn các trình tự polynucleotit khác bên cạnh các trình tự được đề xuất. Ví dụ, miền thay đổi chuỗi nặng nêu trong bản mô tả này có thể được mã hóa bởi trình tự polynucleotit SEQ ID NO: 32, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57 hoặc 59. Miền thay đổi chuỗi nhẹ có thể được mã hóa bởi trình tự polynucleotit SEQ ID NO: 2, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 hoặc 28. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật hiểu rõ rằng bản mô tả này cung cấp mô tả bằng văn bản và bộc lộ đầy đủ để có thể thực hiện sáng chế đối với mỗi trình tự nucleotit thoái hóa mã hóa cho từng protein liên kết kháng nguyên.

Khía cạnh khác đề xuất polynucleotit lai với phân tử polynucleotit khác trong điều kiện lai cụ thể. Các phương pháp lai axit nucleic, các thông số cơ bản ảnh hưởng đến việc lựa chọn điều kiện lai và hướng dẫn có được điều kiện thích hợp là đã biết trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, Sambrook, Fritsch, and Maniatis (2001, Molecular Cloning: Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. và Current Protocols in Molecular Biology, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc.. Như được nêu trong bản mô tả này, điều kiện lai nghiêm ngặt vừa phải sử dụng dung dịch rửa

trước chứa 5x natri clorua/natri xitrat (SSC), 0,5% SDS, 1,0 mM EDTA (pH=8,0), đệm lai chứa khoảng 50% formamit, 6x SSC, và nhiệt độ lai là 55°C (hoặc dung dịch lai tương tự khác, như dung dịch chứa khoảng 50% formamit, với nhiệt độ lai là 42°C), và điều kiện rửa là 60°C, trong 0,5x SSC, 0,1% SDS. Điều kiện lai nghiêm ngặt là lai trong 6x SSC ở 45°C, sau đó rửa một hoặc nhiều lần trong 0,1x SSC, 0,2% SDS ở 68°C. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật có thể điều chỉnh điều kiện lai và/hoặc rửa để làm tăng hoặc làm giảm độ nghiêm ngặt của việc lai sao cho polynucleotit chứa trình tự axit nucleic có độ đồng nhất là ít nhất 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với nhau, bao gồm tất cả các giá trị ở giữa, thường vẫn lai với nhau.

Các thay đổi có thể được đưa vào bằng cách gây đột biến cho polynucleotit, nhờ đó dẫn đến sự thay đổi trong trình tự axit amin của polypeptit (ví dụ, protein liên kết kháng nguyên hoặc dẫn xuất protein liên kết kháng nguyên) mà nó mã hoá. Đột biến có thể được đưa vào bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực, như gây đột biến định hướng vị trí và gây đột biến ngẫu nhiên. Polypeptit đột biến có thể được biểu hiện và được chọn lọc về đặc tính mong muốn. Đột biến có thể được đưa vào polynucleotit mà không làm thay đổi đáng kể hoạt tính sinh học của polypeptit mà nó mã hoá. Ví dụ, đột biến thế tại gốc axit amin không thiết yếu. Theo cách khác, một hoặc nhiều đột biến có thể được đưa vào polynucleotit mà làm thay đổi theo cách chọn lọc hoạt tính sinh học của polypeptit mà nó mã hoá. Ví dụ, đột biến này có thể làm thay đổi về mặt định tính hoặc định lượng hoạt tính sinh học, như làm tăng, làm giảm hoặc loại bỏ hoạt tính này và làm thay đổi tính đặc hiệu kháng nguyên của protein liên kết kháng nguyên.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất polynucleotit thích hợp để sử dụng làm đoạn mồi hoặc mẫu dò lai dùng để phát hiện trình tự axit nucleic. Polynucleotit có thể chỉ chứa một phần của trình tự axit nucleic mã hóa cho polypeptit nguyên chiều dài, ví dụ, mảnh mà có thể được sử dụng làm mẫu dò hoặc đoạn mồi hoặc mảnh mã hóa cho phần có hoạt tính (ví dụ, phần liên kết IL-23) của polypeptit. Mẫu dò dựa trên trình tự của một axit nucleic có thể được sử dụng để phát hiện axit nucleic đó hoặc các axit nucleic tương tự, ví dụ, thể phiên mã mã hóa cho polypeptit. Mẫu dò có thể chứa nhóm đánh dấu, ví dụ, chất đồng vị phóng xạ, hợp chất huỳnh quang, enzym hoặc đồng yếu tố enzym. Mẫu dò này có thể được sử dụng để nhận diện tế bào biểu hiện polypeptit.

Phương pháp biểu hiện protein liên kết kháng nguyên

Protein liên kết kháng nguyên nêu trong bản mô tả này có thể được tạo ra bằng kỹ thuật bất kỳ trong số các kỹ thuật thông thường. Ví dụ, protein liên kết kháng nguyên IL-23 có thể được sản xuất bằng hệ biểu hiện tái tổ hợp, bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, *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).

Hệ biểu hiện và cấu trúc biểu hiện dưới dạng plasmit, vector biểu hiện, catxet phiên mã hoặc biểu hiện chứa ít nhất một polynucleotit nêu trên cũng được đề xuất trong bản mô tả này, cũng như tế bào chủ chứa hệ biểu hiện hoặc cấu trúc biểu hiện này. Trong bản mô tả này, “vector” có nghĩa là phân tử hoặc thực thể bất kỳ (ví dụ, axit nucleic, plasmit, thể thực khuẩn hoặc virus) thích hợp để sử dụng cho việc truyền thông tin mã hóa protein vào tế bào chủ. Ví dụ về vector bao gồm, nhưng không giới hạn ở, plasmit, vector virus, vector động vật có vú không phải thể bổ sung và vector biểu hiện, ví dụ, vector biểu hiện tái tổ hợp. Vector biểu hiện, như vector biểu hiện tái tổ hợp, hữu dụng để biến nạp tế bào chủ và chứa trình tự axit nucleic điều khiển và/hoặc kiểm soát (cùng với tế bào chủ) sự biểu hiện của một hoặc nhiều vùng mã hóa khác loại được liên kết theo cách có điều khiển với nó. Cấu trúc biểu hiện có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trình tự tác động lên hoặc kiểm soát sự phiên mã, sự dịch mã, và, nếu intron có mặt, thì tác động lên sự tách intron ra khỏi ARN của vùng mã hóa được liên kết có điều khiển với nó. “Được liên kết có điều khiển” có nghĩa là các thành phần mà có thuật ngữ này đi kèm ở trong một mối quan hệ cho phép chúng thực hiện các chức năng vốn có của chúng. Ví dụ, trình tự kiểm soát, ví dụ, trình tự khởi đầu, trong vector mà “được liên kết có điều khiển” với trình tự mã hóa protein được sắp xếp sao cho hoạt tính bình thường của trình tự kiểm soát dẫn đến sự phiên mã trình tự mã hóa protein gây ra sự biểu hiện tái tổ hợp của protein được mã hóa.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất tế bào chủ mà vector biểu hiện, như vector biểu hiện tái tổ hợp, được đưa vào đó. Tế bào chủ có thể là tế bào nhân sơ bất kỳ (ví dụ, *E. coli*) hoặc tế bào nhân chuẩn bất kỳ (ví dụ, tế bào nấm men, tế bào côn trùng hoặc tế bào động vật có vú (ví dụ, tế bào CHO)). ADN của vector có thể được đưa vào tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn bằng các kỹ thuật biến nạp hoặc chuyển nhiễm thông thường. Để chuyển nhiễm ổn định các tế bào động vật có vú, đã biết là, tùy thuộc vào vector biểu hiện và kỹ thuật chuyển nhiễm được dùng, chỉ có phần nhỏ tế bào là có thể kết hợp ADN ngoại lai vào hệ

gen của chúng. Để nhận diện và lựa chọn thể kết hợp này, gen mã hoá cho yếu tố đánh dấu có thể chọn lọc được (ví dụ, về tính kháng đối với chất kháng sinh) thường được đưa vào tế bào chủ cùng với gen quan tâm. Yếu tố đánh dấu có thể chọn lọc được được ưu tiên bao gồm yếu tố tạo ra tính kháng thuốc, như G418, hygromycin và metotrexat. Tế bào được chuyển nhiễm ổn định với polynucleotit được đưa vào có thể được nhận diện bằng cách chọn lọc thuốc (ví dụ, tế bào mà kết hợp yếu tố đánh dấu có thể chọn lọc được sẽ sống sót, trong khi các tế bào còn lại bị chết), trong số các phương pháp khác.

Protein liên kết kháng nguyên có thể được biểu hiện ở dòng tế bào lai (ví dụ, cụ thể là kháng thể có thể được biểu hiện ở tế bào lai) hoặc ở dòng tế bào không phải là tế bào lai. Cấu trúc biểu hiện mã hóa protein liên kết kháng nguyên có thể được sử dụng để biến nạp tế bào chủ động vật có vú, côn trùng hoặc vi sinh vật. Việc biến nạp có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp đã biết bất kỳ để đưa polynucleotit vào tế bào chủ, bao gồm, ví dụ, bao gói polynucleotit trong virus hoặc thể thực khuẩn và tải nạp tế bào chủ với cấu trúc này bằng phương pháp chuyển nhiễm đã biết trong lĩnh vực, như được nêu ví dụ trong patent Mỹ số 4,399,216; 4,912,040; 4,740,461; 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 đưa polynucleotit khác loại vào tế bào động vật có vú là đã biết rõ trong lĩnh vực và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chuyển nhiễm được điều tiết bởi dextran, kết tủa canxi phosphat, chuyển nhiễm được điều tiết bởi polybren, dung hợp thể nguyên sinh, xung điện, bao nang (các) polynucleotit trong liposom, trộn axit nucleic với lipid tích điện dương, và vi tiêm trực tiếp ADN vào nhân.

Cấu trúc biểu hiện tái tổ hợp thường chứa polynucleotit mã hóa polypeptit. Polypeptit có thể chứa một hoặc nhiều thành phần trong số các thành phần sau: một hoặc nhiều CDR nêu trong bản mô tả này; vùng thay đổi chuỗi nhẹ; vùng thay đổi chuỗi nặng; vùng không đổi chuỗi nhẹ; vùng không đổi chuỗi nặng (ví dụ, CH_1 , CH_2 và/hoặc CH_3); và/hoặc phần gập khác của protein liên kết kháng nguyên IL-23. Các trình tự axit nucleic này được cài xen vào vector biểu hiện thích hợp bằng cách sử dụng kỹ thuật nối thích hợp. Theo một phương án, vùng không đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ được gắn vào đầu tận C của vùng thay đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ nêu trong bản mô tả này và được nối vào vector biểu hiện. Vector này thường được chọn để có chức năng trong tế bào chủ cụ thể được sử dụng (tức là, vector này tương thích với bộ máy tế bào chủ, cho phép sự khuếch đại và/hoặc biểu hiện gen có thể xảy ra). Theo một số phương án, vector được sử dụng trong đó có sử dụng

thử nghiệm bổ thể mảnh protein sử dụng chất chỉ thị protein, như dihydrofolat reductaza (xem, ví dụ, patent Mỹ số 6,270,964). Vector biểu hiện thích hợp có thể được mua, ví dụ, từ Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA) hoặc BD Biosciences (San Jose, CA). Các vector hữu dụng khác để tách dòng và biểu hiện kháng thể và mảnh của chúng bao gồm vector được bộc lộ trong tài liệu Bianchi and McGrew, 2003, Biotech. Biotechnol. Bioeng. 84:439-44. Các vector biểu hiện thích hợp khác được thảo luận, ví dụ, trong tài liệu Methods Enzymol., vol. 185 (D. V. Goeddel, ed.), 1990, New York: Academic Press.

Thông thường, vector biểu hiện được sử dụng trong tế bào chủ bất kỳ chứa trình tự để duy trì plasmit và để tách dòng và biểu hiện trình tự nucleotit ngoại sinh. Trình tự này, được gọi chung là “trình tự kẹp sườn” theo một số phương án nhất định thường chứa một hoặc nhiều trình tự trong số các trình tự nucleotit sau: trình tự khởi đầu, một hoặc nhiều trình tự tăng cường, điểm bắt đầu sao chép, trình tự kết thúc phiên mã, trình tự intron hoàn toàn chứa vị trí tách intron cho và nhận, trình tự mã hóa trình tự dẫn đầu để tiết polypeptit, vị trí liên kết ribosom, trình tự polyadenyl hóa, vùng đa liên kết (polylinker) để cài xen polynucleotit mã hóa polypeptit cần biểu hiện, và yếu tố đánh dấu có thể chọn lọc được. Vector biểu hiện được đề xuất có thể được tạo cấu trúc từ vector bắt đầu như vector có trên thị trường. Vector này có thể có hoặc có thể không chứa tất cả các trình tự kẹp sườn mong muốn. Khi một hoặc nhiều trình tự kẹp sườn nêu trong bản mô tả này không có sẵn trong vector, thì chúng có thể được thu nhận một cách riêng lẻ và được nối vào vector. Các phương pháp dùng để thu nhận trình tự kẹp sườn này là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật.

Tùy ý, vector có thể chứa trình tự mã hoá “đuôi”, tức là, phân tử oligonucleotit được bố trí ở đầu 5' hoặc 3' của trình tự mã hóa protein liên kết kháng nguyên IL-23; trình tự oligonucleotit mã hoá polyHis (như hexaHis), hoặc “đuôi” khác như FLAG®, HA (virus cúm hemagglutinin), hoặc myc, mà có tồn tại các kháng thể đối với chúng trên thị trường. Đuôi này thường được dung hợp vào polypeptit khi biểu hiện polypeptit, và có thể đóng vai trò làm phương tiện để tinh chế ái lực hoặc phát hiện protein liên kết kháng nguyên IL-23 từ tế bào chủ. Việc tinh chế ái lực có thể được thực hiện, ví dụ, bằng kỹ thuật sắc ký cột bằng cách sử dụng kháng thể kháng đuôi làm chất nền ái lực. Tùy ý, đuôi sau đó có thể được loại bỏ ra khỏi protein liên kết kháng nguyên IL-23 được tinh chế bằng các phương pháp khác nhau như sử dụng peptidaza để phân cắt.

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

Trình tự kẹp sườn hữu dụng trong vector có thể được thu nhận bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực. Thông thường, trình tự kẹp sườn hữu dụng trong bản mô tả này đã được xác định trước bằng cách lập bản đồ và/hoặc bằng cách phân giải bằng endonucleaza giới hạn, và do đó có thể được phân lập từ nguồn mô thích hợp bằng cách sử dụng endonucleaza giới hạn thích hợp. Trong một số trường hợp, trình tự nucleotit đầy đủ của trình tự kẹp sườn có thể là đã biết. Trong bản mô tả này, trình tự kẹp sườn có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các phương pháp nêu trong bản mô tả này để tổng hợp hoặc tách dòng axit nucleic.

Dù tất cả hoặc chỉ một phần của trình tự kẹp sườn là đã biết, nó có thể được thu nhận bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và/hoặc bằng cách sàng lọc thư viện hệ gen bằng mẫu dò thích hợp như mảnh oligonucleotit và/hoặc trình tự kẹp sườn từ cùng loài hoặc loài khác. Khi trình tự kẹp sườn là chưa biết, thì mảnh 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. Việc phân lập có thể được thực hiện bằng cách phân giải bằng endonucleaza giới hạn để tạo ra mảnh ADN thích hợp, sau đó phân lập bằng cách tinh chế gel agarosa, sắc ký cột Qiagen® (Qiagen, Chatsworth, CA), hoặc các phương pháp khác đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật. Việc chọn lọc enzym thích hợp để thực hiện mục đích này là dễ dàng được biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật.

Điểm bắt đầu sao chép thường là một phần của vector biểu hiện sinh vật nhân sơ mua trên thị trường, và điểm bắt đầu này hỗ trợ trong việc khuếch đại vector trong tế bào chủ. Nếu vector được chọn không chứa điểm bắt đầu sao chép, thì nó có thể được tổng hợp hóa học dựa trên trình tự đã biết, và được nối vào vector. Ví dụ, điểm bắt đầu sao chép từ plasmid pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) là thích hợp đối với hầu hết các vi khuẩn gram âm, và các điểm bắt đầu ở virus khác (ví dụ, SV40, virus polioma, adenovirus, virus

gây viêm miệng mụn nước (VSV) hoặc virus gây u nhú như HPV hoặc BPV) là hữu dụng cho việc tách dòng vector ở tế bào động vật có vú. Thông thường, điểm bắt đầu sao chép không cần thiết đối với vector biểu hiện ở động vật có vú (ví dụ, điểm bắt đầu SV40 thường được dùng chỉ vì nó còn chứa trình tự khởi đầu sớm ở virus).

Trình tự kết thúc phiên mã thường nằm ở phía 3' so với đầu của vùng mã hóa polypeptit và làm nhiệm vụ kết thúc sự phiên mã. Thông thường, trình tự kết thúc phiên mã trong tế bào nhân sơ là mảnh giàu G-C theo sau bởi trình tự poly-T. Mặc dù trình tự này được tách dòng dễ dàng từ thư viện hoặc thậm chí là mua được trên thị trường dưới dạng một phần của vector, nhưng nó cũng có thể được tổng hợp dễ dàng bằng cách sử dụng các phương pháp tổng hợp axit nucleic nêu trong bản mô tả này.

Yếu tố đánh dấu có thể chọn lọc được mã hoá cho protein cần thiết đối với sự sống sót và sinh trưởng của tế bào chủ được cho sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy chọn lọc. Gen đánh dấu chọn lọc tiêu biểu mã hóa cho protein mà (a) tạo ra tính kháng đối với chất kháng sinh hoặc độc tố khác, ví dụ, ampicillin, tetracyclin hoặc kanamycin cho tế bào chủ nhân sơ; (b) bổ sung cho sự thiếu hụt sinh dưỡng thụ động của tế bào; hoặc (c) cung cấp chất dinh dưỡng quan trọng không sẵn có từ phức hợp hoặc môi trường xác định. Yếu tố đánh dấu có thể chọn lọc được cụ thể là gen kháng kanamycin, gen kháng ampicillin và gen kháng tetracyclin. Theo cách có lợi, gen kháng neomycin cũng có thể được sử dụng để chọn lọc ở cả tế bào chủ nhân sơ và nhân chuẩn.

Các gen có thể chọn lọc được khác có thể được sử dụng để khuếch đại gen mà sẽ được biểu hiện. Khuếch đại là quá trình trong đó gen cần để sản xuất protein quan trọng đối với sự sinh trưởng hoặc sống sót của tế bào được lặp lại nối tiếp trong nhiễm sắc thể của thể hệ tế bào tái tổ hợp kế tiếp. Ví dụ về yếu tố đánh dấu có thể chọn lọc được thích hợp đối với tế bào động vật có vú bao gồm gen dihydrofolat reductaza (DHFR) và gen thymidin kinaza không chứa trình tự khởi đầu. Thể biến nạp tế bào động vật có vú được đặt dưới áp lực chọn lọc trong đó chỉ các thể biến nạp mới được làm thích nghi duy nhất để sống sót nhờ gen có thể chọn lọc được có mặt trong vector. Áp lực chọn lọc được đặt ra bằng cách nuôi cấy tế bào được biến nạp trong điều kiện trong đó nồng độ của chất chọn lọc được làm tăng liên tục, nhờ đó dẫn đến sự khuếch đại của cả gen có thể chọn lọc được và ADN mã hoá cho gen khác, như protein liên kết kháng nguyên mà liên kết với IL-23. Kết quả là, lượng tăng của polypeptit như protein liên kết kháng nguyên được tổng hợp từ ADN được khuếch đại.

Vị trí liên kết ribosom thường cần thiết cho sự bắt đầu dịch mã của mRNA và đặc trưng bởi trình tự Shine-Dalgarno (sinh vật nhân sơ) hoặc trình tự Kozak (sinh vật nhân chuẩn). Thành phần này thường nằm ở phía 3' so với trình tự khởi đầu và phía 5' so với trình tự mã hóa của polypeptit cần biểu hiện.

Trong một số trường hợp, như khi sự glycosyl hóa được mong muốn trong hệ biểu hiện tế bào chủ nhân chuẩn, có thể thao tác các trình tự pre- hoặc pro- khác nhau để cải thiện sự glycosyl hóa hoặc hiệu suất. Ví dụ, có thể thay đổi vị trí phân cắt peptidaza của peptit tín hiệu cụ thể, hoặc bổ sung trình tự pro- mà cũng có thể gây ảnh hưởng đến sự glycosyl hóa. Sản phẩm protein cuối cùng có thể có, tại vị trí -1 (so với axit amin thứ nhất của protein trưởng thành), một hoặc nhiều axit amin bổ sung liên quan đến việc biểu hiện, mà không thể loại bỏ được hoàn toàn. Ví dụ, sản phẩm protein cuối cùng có thể có một hoặc hai gốc axit amin được tìm thấy tại vị trí phân cắt peptidaza, gắn với đầu tận amino. Theo cách khác, việc sử dụng một số vị trí phân cắt enzyme có thể tạo ra dạng hơi cắt cụt của polypeptit mong muốn, nếu enzyme này cắt ở vùng bên trong polypeptit trưởng thành.

Sự biểu hiện và tách dòng thường bao gồm trình tự khởi đầu được nhận biết bởi sinh vật chủ và liên kết có điều khiển với phân tử mã hóa protein liên kết kháng nguyên IL-23. Trình tự khởi đầu là trình tự không được phiên mã nằm ngược dòng (tức là phía 5') so với codon mở đầu của gen cấu trúc (thường trong khoảng từ 100 đến 1000 bp) mà kiểm soát sự phiên mã của gen cấu trúc. Trình tự khởi đầu thường được nhóm vào một trong số hai lớp: trình tự khởi đầu cảm ứng và trình tự khởi đầu cơ định. Trình tự khởi đầu cảm ứng gây ra mức phiên mã tăng từ ADN dưới sự kiểm soát của chúng để đáp ứng với thay đổi nhất định về điều kiện nuôi cấy, như sự có mặt hoặc vắng mặt của chất dinh dưỡng hoặc sự thay đổi về nhiệt độ. Mặt khác, trình tự khởi đầu cơ định phiên mã một cách đồng nhất gen mà chúng được liên kết có điều khiển vào đó, tức là, hầu như không hoặc không có sự kiểm soát đối với sự biểu hiện gen. Số lượng lớn các trình tự khởi đầu, được nhận biết bởi các tế bào chủ tiềm năng, là đã biết. Trình tự khởi đầu thích hợp được liên kết có điều khiển với ADN mã hóa vùng thay đổi chuỗi nặng hoặc vùng thay đổi chuỗi nhẹ của protein liên kết kháng nguyên IL-23 bằng cách loại bỏ trình tự khởi đầu này ra khỏi ADN nguồn bằng cách phân giải bằng enzyme giới hạn và cài xen trình tự khởi đầu mong muốn vào vector.

Trình tự khởi đầu thích hợp để sử dụng với vật chủ nấm men cũng đã biết rõ trong lĩnh vực. Trình tự tăng cường của nấm men được sử dụng một cách thuận lợi với trình tự khởi đầu của nấm men. Trình tự khởi đầu thích hợp để sử dụng với tế bào chủ động vật có

vú là đã biết rõ và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các trình tự thu được từ hệ gen của virus như virus polioma, virus đậu gà, adenovirus (như Adenovirus 2), virus gây u nhú ở bò, virus gây sarkôm ở gia cầm, virus cự bào, retrovirus, virus gây viêm gan B và virus Simian 40 (SV40). Các trình tự khởi đầu của động vật có vú thích hợp khác bao gồm trình tự khởi đầu khác loại của động vật có vú, ví dụ, trình tự khởi đầu sốc nhiệt và trình tự khởi đầu actin.

Các trình tự khởi đầu khác có thể được quan tâm bao gồm, nhưng không giới hạn ở: trình tự khởi đầu sớm 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 chứa trong đoạn lặp dài đầu 3' của virus Rous sarcoma (Yamamoto et al., 1980, *Cells* 22:787-797); trình tự khởi đầu thymidin kinaza herpes (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); trình tự khởi đầu và trình tự điều hòa từ gen metallothionin (Prinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42); và trình tự khởi đầu sinh vật 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 tac (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25). Cũng được quan tâm là vùng kiểm soát phiên mã động vật nêu dưới đây, có tính đặc hiệu mô và được sử dụng ở động vật chuyển gen: vùng kiểm soát gen elastaza I hoạt động ở 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 ở tế bào beta tuyến tụy (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); vùng kiểm soát gen globulin miễn dịch hoạt động ở tế bào dạng lympho (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 virus gây u vú ở chuột nhắt hoạt động ở tế bào tinh hoàn, tế bào vú, tế bào dạng lympho và tế bào mast (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495); vùng kiểm soát gen albumin hoạt động ở gan (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); vùng kiểm soát gen alpha-feto-protein hoạt động ở gan (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 253:53-58); vùng kiểm soát gen alpha 1-antitrypsin hoạt động ở gan (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); vùng kiểm soát gen beta-globin hoạt động ở tế bào tủy (Mogam et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94); vùng kiểm soát gen protein cơ bản myelin hoạt động ở tế bào thần kinh đệm ít gai trong não (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712); vùng kiểm soát gen myosin chuỗi nhẹ 2 hoạt động ở cơ

xương (Sani, 1985, Nature 314:283-286); và vùng kiểm soát gen hormon giải phóng hướng sinh dục hoạt động ở vùng dưới đồi (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

Trình tự tăng cường có thể được cài xen vào vector để làm tăng sự phiên mã bởi sinh vật nhân chuẩn bậc cao. Trình tự tăng cường là yếu tố hoạt động cis của ADN, thường có chiều dài khoảng 10-300 bp, tác động lên trình tự khởi đầu để làm tăng sự phiên mã. Trình tự tăng cường tương đối độc lập với hướng và vị trí, được tìm thấy tại các vị trí cả 5' và 3' so với đơn vị phiên mã. Một số trình tự tăng cường có sẵn từ gen 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 virus được sử dụng. Trình tự tăng cường SV40, trình tự tăng cường trình tự khởi đầu sớm của virus cự bào, trình tự tăng cường của virus polioma và trình tự tăng cường của adenovirus đã biết trong lĩnh vực là các yếu tố tăng cường tiêu biểu để hoạt hóa trình tự khởi đầu của sinh vật nhân chuẩn. Mặc dù trình tự tăng cường có thể được đặt trong vector ở 5' hoặc 3' so với trình tự mã hóa, nhưng nó thường nằm ở vị trí 5' kể từ trình tự khởi đầu. Trình tự mã hóa cho trình tự tín hiệu nguyên gốc hoặc khác loại thích hợp (trình tự dẫn đầu hoặc peptit tín hiệu) có thể được kết hợp vào vector biểu hiện để thúc đẩy việc tiết kháng thể ngoại bào. Việc lựa chọn peptit tín hiệu hoặc trình tự dẫn đầu phụ thuộc vào loại tế bào chủ trong đó kháng thể cần được tạo ra, và trình tự tín hiệu khác loại có thể thay thế trình tự tín hiệu nguyên gốc. Ví dụ về peptit tín hiệu có chức năng ở tế bào chủ động vật có vú bao gồm: trình tự tín hiệu đối với interleukin-7 được bộc lộ trong patent Mỹ số 4,965,195; trình tự tín hiệu đối với thụ thể interleukin-2 được bộc lộ trong tài liệu Cosman et al., 1984, Nature 312:768; peptit tín hiệu thụ thể interleukin-4 được bộc lộ trong patent EP số 0367 566; peptit tín hiệu thụ thể interleukin-1 typ I được bộc lộ trong patent Mỹ số 4,968,607; peptit tín hiệu thụ thể interleukin-1 typ II được bộc lộ trong patent EP số 0 460 846.

Sau khi vector được tạo cấu trúc, vector hoàn chỉnh có thể được cài xen vào tế bào chủ thích hợp để khuếch đại và/hoặc biểu hiện polypeptit. Việc biến nạp vector biểu hiện đối với protein liên kết kháng nguyên vào tế bào chủ được chọn có thể được thực hiện bằng các phương pháp đã biết bao gồm chuyển nhiễm, gây nhiễm, đồng kết tủa canxi phosphat, xung điện, vi tiêm, chuyển nhiễm lipid, chuyển nhiễm được điều tiết bởi DEAE-dextran, hoặc các kỹ thuật đã biết khác. Phương pháp được chọn 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 về lĩnh vực kỹ thuật, và được nêu, ví dụ, trong tài liệu

Sambrook et al., *Molecular Cloning: Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001).

Tế bào chủ, khi được nuôi cấy trong điều kiện thích hợp, tổng hợp protein mà sau đó có thể được thu từ môi trường nuôi cấy (nếu tế bào chủ tiết nó vào môi trường) hoặc trực tiếp từ tế bào chủ sản xuất nó (nếu nó không được tiết ra). Việc chọn lọc tế bào chủ thích hợp phụ thuộc vào các yếu tố khác nhau, như mức biểu hiện mong muốn, sự cải biến polypeptit mong muốn hoặc cần thiết đối với hoạt tính (như glycosyl hóa hoặc phosphoryl hóa) và sự dễ gấp cuộn thành phân tử có hoạt tính sinh học.

Các dòng tế bào động vật có vú có sẵn làm vật chủ để biểu hiện là đã biết rõ trong lĩnh vực và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dòng tế bào bắt tử có sẵn từ Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC: American Type Culture Collection), bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), tế bào HeLa, tế bào thận chuột đồng sơ sinh (BHK), tế bào thận khí (COS), tế bào caxinom tế bào gan người (ví dụ, Hep G2) và các dòng tế bào khác. Theo một số phương án nhất định, dòng tế bào có thể được chọn bằng cách xác định dòng tế bào có mức biểu hiện cao và tạo ra chủ yếu protein liên kết kháng nguyên có đặc tính liên kết IL-23. Theo phương án khác, dòng tế bào từ dòng tế bào B mà không tạo ra kháng thể của bản thân nó nhưng có khả năng tạo và tiết ra kháng thể khác loại cũng có thể được chọn.

Sử dụng protein liên kết kháng nguyên IL-23 của người nhằm mục đích chẩn đoán và trị liệu

Protein liên kết kháng nguyên hữu dụng để phát hiện IL-23 trong mẫu sinh học và nhận diện tế bào hoặc mô sản xuất IL-23. Protein liên kết kháng nguyên liên kết đặc hiệu với IL-23 có thể được sử dụng trong chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh liên quan đến IL-23 ở bệnh nhân cần chẩn đoán và/hoặc điều trị. Theo một khía cạnh, protein liên kết kháng nguyên IL-23 có thể được sử dụng trong thử nghiệm chẩn đoán, ví dụ, thử nghiệm liên kết để phát hiện và/hoặc định lượng IL-23 được biểu hiện ở máu, huyết thanh, tế bào hoặc mô. Ngoài ra, protein liên kết kháng nguyên IL-23 có thể được sử dụng để làm giảm, ức chế, cản trở hoặc điều biến một hoặc nhiều hoạt tính sinh học của IL-23 trong tế bào hoặc mô. Do đó, protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 có thể có ứng dụng trị liệu trong việc làm thuyên giảm bệnh liên quan đến IL-23.

Chỉ định

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng protein liên kết kháng nguyên IL-23 để sử dụng trong việc ngăn ngừa hoặc điều trị triệu chứng các bệnh lý y tế, như các bệnh nêu trong bản mô tả này. Protein liên kết kháng nguyên IL-23 hữu dụng để điều trị các tình trạng bệnh trong đó IL-23 có liên quan hoặc đóng vai trò góp phần gây bệnh hoặc rối loạn tiềm ẩn hoặc theo cách khác góp phần gây ra triệu chứng tiêu cực.

Tình trạng bệnh được điều trị hiệu quả bằng protein liên kết kháng nguyên IL-23 đóng vai trò trong đáp ứng viêm. Bệnh viêm này bao gồm bệnh nha chu; bệnh về phổi như bệnh hen; bệnh về da như bệnh vẩy nến, bệnh viêm da dị ứng, bệnh viêm da tiếp xúc; bệnh thấp khớp như bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh xơ cứng hệ thống tiến triển (bệnh cứng bì); bệnh luput ban đỏ toàn thân; bệnh viêm khớp cột sống bao gồm bệnh viêm cột sống dính khớp, bệnh viêm khớp vẩy nến, bệnh viêm khớp đường ruột và bệnh viêm khớp phản ứng. Cũng được dự định là bệnh viêm màng bồ đào bao gồm bệnh Vogt-Koyanagi-Harada, bệnh viêm màng bồ đào trước và sau tự phát và bệnh viêm màng bồ đào liên quan đến bệnh viêm khớp cột sống. Việc sử dụng protein liên kết kháng nguyên IL-23 cũng được dự định để điều trị bệnh tự miễn bao gồm bệnh đa xơ cứng; bệnh viêm cơ tim tự miễn; bệnh đái tháo đường typ 1 và bệnh viêm tuyến giáp tự miễn.

Tình trạng thoái hóa của hệ dạ dày-ruột có thể điều trị hoặc ngăn ngừa được bằng protein liên kết kháng nguyên IL-23. Bệnh dạ dày-ruột bao gồm bệnh viêm ruột: bệnh Crohn, bệnh viêm loét đại tràng và bệnh Celiac.

Sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng protein liên kết kháng nguyên IL-23 để điều trị bệnh vật chủ chống lại mảnh ghép, và biến chứng như sự từ chối mảnh ghép gây ra do cấy ghép cơ quan rắn, như tim, gan, da, thận, phổi hoặc các cơ quan cấy ghép khác, bao gồm tủy xương cấy ghép.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp sử dụng protein liên kết kháng nguyên IL-23 để điều trị các bệnh ung thư khác nhau bao gồm các dạng khác nhau của ung thư bao gồm bệnh ung thư ruột kết, bệnh ung thư dạ dày, bệnh ung thư tuyến tiền liệt, bệnh ung thư tế bào thận, bệnh ung thư cổ và buồng trứng, và bệnh ung thư phổi (SCLC và NSCLC). Cũng được bao gồm là khối u rắn, bao gồm sacôm, sacôm xương, và caxinom, như caxinom tuyến và caxinom tế bào vảy, bệnh ung thư thực quản, bệnh ung thư dạ dày, caxinom túi mật, bệnh bạch cầu, bao gồm bệnh bạch cầu tủy bào cấp tính, bệnh bạch cầu tủy bào mạn tính, bệnh

bạch cầu dạng tủy bào, bệnh bạch cầu lympho mạn tính hoặc cấp tính và bệnh bạch cầu tế bào long, và bệnh đa u tủy.

Phương pháp chẩn đoán

Protein liên kết kháng nguyên nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng cho mục đích chẩn đoán để phát hiện, chẩn đoán hoặc theo dõi bệnh và/hoặc tình trạng bệnh liên quan đến IL-23. Ví dụ về các phương pháp có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của IL-23 bao gồm thử nghiệm miễn dịch, như thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA) và thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA).

Để sử dụng trong chẩn đoán, protein liên kết kháng nguyên thường được đánh dấu bằng nhóm đánh dấu có thể phát hiện được. Nhóm đánh dấu thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở: chất đồng vị phóng xạ hoặc nuclit phóng xạ (ví dụ, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), nhóm huỳnh quang (ví dụ, FITC, rhodamin, lanthanit photpho), nhóm có tính enzym (ví dụ, peroxidaza cải ngựa, β -galactosidaza, luxiferaza, phosphataza kiềm), nhóm phát quang hóa học, nhóm biotiny, hoặc epitop polypeptit đã xác định trước được nhận diện bằng chất chỉ thị thứ cấp (ví dụ, trình tự cặp khóa kéo loxin, vị trí liên kết với kháng thể bậc hai, miễn liên kết kim loại, đuôi epitop). Theo một số phương án, nhóm đánh dấu được cộng hợp với protein liên kết kháng nguyên qua nhánh đệm có chiều dài khác nhau để làm giảm sự cản trở không gian tiềm ẩn. Các phương pháp khác để đánh dấu protein là đã biết trong lĩnh vực và cũng có thể được sử dụng.

Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp chẩn đoán khác để nhận diện tế bào hoặc các tế bào biểu hiện IL-23. Theo 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 với IL-23 được phát hiện. Theo phương án cụ thể khác, sự liên kết của protein liên kết kháng nguyên với IL-23 được phát hiện *in vivo*. Theo phương án cụ thể khác, protein liên kết kháng nguyên IL-23 được phân lập và xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor (ed. 1991 and periodic supplements); John E. Coligan, ed., 1993, *Current Protocols In Immunology* New York: John Wiley & Sons.

Các phương pháp khác để phát hiện sự có mặt của phân tử thử nghiệm mà cạnh tranh để liên kết IL-23 với protein liên kết kháng nguyên cũng được đề xuất. 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 một lượng IL-23 với sự có mặt hoặc vắng mặt của phân tử thử nghiệm. Sự tăng lên của lượng protein liên kết kháng nguyên tự do (tức là, protein liên kết kháng nguyên không liên kết với IL-23) sẽ cho thấy rằng phân tử thử nghiệm có khả năng cạnh tranh để liên kết IL-23 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 với sự có mặt và vắng mặt của protein liên kết kháng nguyên.

Phương pháp điều trị: Dược phẩm, đường dùng

Dược phẩm chứa lượng hữu hiệu để trị liệu của một hoặc nhiều protein liên kết kháng nguyên và tá dược, chất pha loãng, chất mang, chất làm tan, chất nhũ hóa, chất bảo quản và/hoặc chất phụ trợ được dụng được đề xuất. Ngoài ra, phương pháp điều trị bệnh nhân bằng cách sử dụng dược phẩm này cũng được đề xuất. Thuật ngữ "bệnh nhân" bao gồm bệnh nhân là người. Thuật ngữ "điều trị" và "việc điều trị" bao hàm việc làm giảm nhẹ hoặc ngăn ngừa ít nhất một triệu chứng hoặc khía cạnh khác của bệnh, hoặc việc làm giảm mức độ trầm trọng của bệnh, và dạng tương tự. Thuật ngữ "lượng hữu hiệu để trị liệu" hoặc "lượng hữu hiệu" chỉ lượng protein liên kết kháng nguyên IL-23 được xác định để tạo ra đáp ứng trị liệu bất kỳ ở động vật có vú. Lượng hữu hiệu để trị liệu này được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật.

Protein liên kết kháng nguyên không cần phải tác động đến sự chữa trị hoàn toàn, hoặc diệt trừ mọi triệu chứng hoặc sự biểu hiện của bệnh, để trở thành chất trị liệu khả thi. Như đã được công nhận trong lĩnh vực phù hợp, thuốc được dùng làm chất trị liệu có thể làm giảm mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh được nêu, nhưng không cần phải diệt bỏ mọi biểu hiện của bệnh để được coi là chất trị liệu hữu dụng. Tương tự, việc điều trị phòng ngừa không cần phải có hiệu quả hoàn toàn trong việc ngăn ngừa sự khởi phát của tình trạng bệnh để trở thành chất phòng ngừa khả thi. Chỉ đơn giản là làm giảm ảnh hưởng của bệnh (ví dụ, bằng cách làm giảm số lượng hoặc mức độ trầm trọng của các triệu chứng của nó, hoặc bằng cách làm tăng công hiệu của thuốc điều trị khác, hoặc bằng cách tạo ra tác dụng có lợi khác), hoặc làm giảm khả năng mà bệnh sẽ xuất hiện hoặc xấu đi ở đối tượng, là đủ. Một số phương pháp nhất định nêu trong bản mô tả này bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân chất đối kháng IL-23 (như protein liên kết kháng nguyên nêu trong bản mô tả này) với lượng và trong khoảng thời gian đủ để kích thích sự cải thiện được duy trì trên đường cơ sở của chỉ thị phản ánh mức độ trầm trọng của bệnh cụ thể.

Như được hiểu trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan, dược phẩm chứa phân tử theo sáng chế được sử dụng cho bệnh nhân theo cách phù hợp với chỉ định. Dược phẩm có thể được sử dụng bằng kỹ thuật thích hợp bất kỳ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ngoài đường tiêu hóa, cục bộ hoặc xông hít. Nếu được tiêm, dược phẩm có thể được sử dụng, ví dụ, qua đường trong khớp, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong thương tổn, trong màng bụng hoặc dưới da, bằng cách tiêm liều nhanh (bolus) hoặc truyền liên tục. Việc sử dụng tại chỗ, ví dụ tại vị trí bị bệnh hoặc tổn thương được dự định, như là đưa vào cơ thể qua da và giải phóng duy trì từ mảnh ghép. Việc đưa vào cơ thể bằng cách xông hít bao gồm, ví dụ, xông hít qua mũi hoặc qua đường miệng, sử dụng dụng cụ phun sương, xông hít chất đối kháng ở dạng sol khí, và dạng tương tự. Các phương án khác bao gồm thuốc nhỏ mắt; chế phẩm dùng qua đường miệng bao gồm viên tròn, xi rô, viên ngậm hoặc viên nhai; và chế phẩm dùng cục bộ như thuốc xức, gel, thuốc phun và thuốc mỡ.

Việc sử dụng protein liên kết kháng nguyên trong các quy trình *ex vivo* cũng được dự định. Ví dụ, máu hoặc dịch cơ thể khác của bệnh nhân có thể được cho tiếp xúc với protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23 *ex vivo*. Protein liên kết kháng nguyên có thể được cho liên kết với chất nền không tan thích hợp hoặc vật liệu đỡ dạng rắn.

Thuận lợi là, protein liên kết kháng nguyên được sử dụng dưới dạng hợp phần chứa một hoặc nhiều thành phần khác như chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng chấp nhận được về mặt sinh lý. Tùy ý, hợp phần này chứa thêm một hoặc nhiều chất có hoạt tính sinh lý để trị liệu kết hợp. Dược phẩm có thể chứa protein liên kết kháng nguyên IL-23 cùng với một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm chất đệm, chất chống oxy hóa như axit ascorbic, polypeptit có phân tử lượng thấp (như polypeptit có ít hơn 10 axit amin), protein, axit amin, hydrat cacbon như glucoza, sucroza hoặc dextrin, chất chelat hóa như EDTA, glutathion, chất làm ổn định và tá dược. Nước muối đệm trung tính hoặc hỗn hợp nước muối với albumin huyết thanh cùng loài là ví dụ về chất pha loãng thích hợp. Theo tiêu chuẩn công nghiệp thích hợp, chất bảo quản như rượu benzyl cũng có thể được thêm vào. Hợp phần có thể được bào chế dưới dạng chế phẩm đông khô bằng cách sử dụng dung dịch tá dược thích hợp (ví dụ, sucroza) làm chất pha loãng. Thành phần thích hợp không độc đối với người nhận ở liều và hàm lượng được sử dụng. Ví dụ khác về thành phần có thể được sử dụng trong dược phẩm được nêu trong tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences bất kỳ, bao gồm 21st Ed. (2005), Mack Publishing Company, Easton, PA.

Bộ kit để sử dụng bởi người hành nghề y khoa chứa protein liên kết kháng nguyên IL-23 và chất đánh dấu hoặc hướng dẫn sử dụng khác để điều trị tình trạng bệnh bất kỳ trong số các tình trạng bệnh nêu trong bản mô tả này. Theo một phương án, bộ kit chứa chế phẩm vô trùng của một hoặc nhiều protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23, có thể là ở dạng hợp phần như nêu trên, và có thể trong một hoặc nhiều lọ.

Liều và tần suất sử dụng có thể thay đổi theo các yếu tố như đường dùng, protein liên kết kháng nguyên cụ thể được sử dụng, bản chất và mức độ trầm trọng của bệnh cần điều trị, tình trạng bệnh là cấp tính hay mạn tính, và kích thước và tình trạng chung của đối tượng. Liều thích hợp có thể được xác định bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan, ví dụ trong thử nghiệm lâm sàng mà có thể bao gồm các nghiên cứu gia tăng liều.

Liều thông thường có thể dao động trong khoảng từ khoảng 0,1 $\mu\text{g/kg}$ lên đến khoảng 30 mg/kg hoặc hơn, phụ thuộc vào các yếu tố nêu trên. Theo các phương án cụ thể, liều có thể dao động trong khoảng từ 0,1 $\mu\text{g/kg}$ lên đến khoảng 30 mg/kg , tùy ý từ 1 $\mu\text{g/kg}$ lên đến khoảng 30 mg/kg , tùy ý từ 10 $\mu\text{g/kg}$ lên đến khoảng 10 mg/kg , tùy ý từ khoảng 0,1 mg/kg đến 5 mg/kg , hoặc tùy ý từ khoảng 0,3 mg/kg đến 3 mg/kg .

Tần suất dùng liều phụ thuộc vào các thông số dược động của protein liên kết kháng nguyên IL-23 của người cụ thể trong chế phẩm được sử dụng. Thông thường, bác sĩ lâm sàng cho sử dụng hợp phần này đến khi đạt được liều tạo ra tác dụng mong muốn. Do đó, hợp phần có thể được sử dụng dưới dạng liều đơn hoặc dưới dạng hai hoặc nhiều liều (có thể có hoặc có thể không chứa cùng lượng của phân tử mong muốn) theo thời gian, hoặc dưới dạng dịch truyền liên tục qua dụng cụ cấy ghép hoặc ống thông. Liều thích hợp có thể được xác định bằng cách sử dụng dữ liệu đáp ứng thích hợp. Protein liên kết kháng nguyên IL-23 theo sáng chế có thể được sử dụng, ví dụ, một lần hoặc nhiều hơn một lần, ví dụ, một cách đều đặn trong một khoảng thời gian. Theo các phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên IL-23 được sử dụng trong khoảng thời gian ít nhất là một tháng hoặc dài hơn, ví dụ, trong một, hai hoặc ba tháng hoặc thậm chí là vô thời hạn. Để điều trị tình trạng bệnh mạn tính, việc điều trị lâu dài thường có hiệu quả nhất. Tuy nhiên, để điều trị tình trạng bệnh cấp tính, có thể chỉ cần sử dụng trong thời gian ngắn, ví dụ từ một đến sáu tuần, là đủ. Thông thường, protein liên kết kháng nguyên được sử dụng cho đến khi bệnh nhân biểu hiện mức độ cải thiện về mặt y học so với đường cơ sở đối với chỉ thị hoặc các chỉ thị được chọn.

Protein liên kết kháng nguyên IL-23 được dự định sử dụng cho bệnh nhân với lượng và trong khoảng thời gian đủ để kích thích sự cải thiện, tốt hơn là sự cải thiện được duy trì, về ít nhất một chỉ thị mà phản ánh mức độ trầm trọng của bệnh được điều trị. Các chỉ thị khác mà phản ánh mức độ bị ốm, bệnh hoặc tình trạng bệnh của bệnh nhân có thể được đánh giá để xác định xem lượng và thời gian điều trị có đủ hay không. Các chỉ thị này bao gồm, ví dụ, chỉ thị đã được công nhận về mặt lâm sàng của mức độ trầm trọng của bệnh, triệu chứng hoặc biểu hiện của bệnh đang xem xét. Theo một phương án, sự cải thiện được coi là được duy trì nếu đối tượng thể hiện sự cải thiện ở ít nhất hai lần cách nhau từ 2 đến 4 tuần. Mức độ cải thiện thường được xác định bởi bác sĩ, là người có thể đưa ra quyết định dựa trên các dấu hiệu, triệu chứng, sinh thiết hoặc kết quả xét nghiệm khác, và cũng là người có thể áp dụng bảng câu hỏi được sử dụng cho đối tượng, như bảng câu hỏi về chất lượng cuộc sống được xây dựng cho bệnh đang xem xét.

Các phương án cụ thể của phương pháp và hợp phần theo sáng chế bao gồm việc sử dụng protein liên kết kháng nguyên IL-23 và một hoặc nhiều chất đối kháng IL-23 khác, ví dụ, hai hoặc nhiều protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế, hoặc protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế và một hoặc nhiều chất đối kháng IL-23 khác. Sáng chế còn đề xuất protein liên kết kháng nguyên IL-23 được sử dụng ở dạng riêng lẻ hoặc ở dạng kết hợp với chất khác hữu dụng để điều trị tình trạng bệnh mà bệnh nhân mắc phải. Ví dụ về các chất này bao gồm cả thuốc có protein và thuốc không có protein. Chất này chứa gốc trị liệu có đặc tính kháng viêm (ví dụ, chất kháng viêm không steroid, steroid, chất điều biến miễn dịch và/hoặc chất ức chế cytokin khác như chất gây đối kháng, ví dụ, IFN- γ , GM-CSF, IL-6, IL-8, IL-17, IL-22 và TNF), hoặc là protein liên kết kháng nguyên IL-23 và một hoặc nhiều biện pháp điều trị khác (ví dụ, phẫu thuật, siêu âm hoặc điều trị có hiệu quả làm giảm viêm). Khi nhiều thuốc trị liệu được sử dụng đồng thời, thì liều có thể được điều chỉnh một cách thích hợp, như đã được công nhận hoặc đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan. Chất hữu dụng mà có thể được kết hợp với protein liên kết kháng nguyên IL-23 bao gồm chất được dùng để điều trị, ví dụ, bệnh Crohn hoặc bệnh viêm loét đại tràng, như aminosalixylat (ví dụ, mesalamin), corticosteroid (bao gồm predison), chất kháng sinh như metronidazol hoặc xiprofloxacxin (hoặc các chất kháng sinh khác hữu dụng để điều trị, ví dụ, bệnh nhân bị đường rò), và chất ức chế miễn dịch như azathioprin, 6-mercaptopurin, metotrexat, tacrolimus và cyclosporin. (Các) chất này có thể được sử dụng qua đường miệng hoặc qua đường khác, ví dụ qua thuốc đạn hoặc thuốc thụt. Chất mà có thể được kết hợp với protein

liên kết IL-23 trong điều trị bệnh vẩy nến bao gồm corticosteroid, calcipotrien và các dẫn xuất vitamin D khác, axetretin và các dẫn xuất axit retinoic khác, metotrexat, tacrolimus và cyclosporin dùng cục bộ hoặc toàn thân. Chất này có thể được sử dụng đồng thời, liên tiếp, xen kẽ hoặc theo chế độ khác bất kỳ mà cho phép tổng thời gian trị liệu là có hiệu quả.

Ngoài bệnh nhân là người, protein liên kết kháng nguyên IL-23 có thể được sử dụng để điều trị động vật không phải là người, như vật nuôi (chó, mèo, gia cầm, động vật linh trưởng, v.v.), động vật nuôi ở trang trại (ngựa, cừu, lợn, gia cầm, v.v.). Trong các trường hợp này, liều thích hợp có thể được xác định theo thể trọng của động vật. Ví dụ, liều nằm trong khoảng từ 0,2 đến 1 mg/kg có thể được sử dụng. Theo cách khác, liều được xác định theo diện tích bề mặt của động vật, ví dụ liều nằm trong khoảng từ 0,1 đến 20 mg/m², hoặc tốt hơn nữa là từ 5 đến 12 mg/m². Đối với động vật nhỏ, như chó hoặc mèo, liều thích hợp là 0,4 mg/kg. Protein liên kết kháng nguyên IL-23 (tốt hơn là được tạo cấu trúc từ gen có nguồn gốc từ loài nhận) được sử dụng bằng cách tiêm hoặc đường thích hợp khác một hoặc nhiều lần mỗi tuần đến khi tình trạng bệnh của động vật được cải thiện, hoặc có thể được sử dụng vô thời hạn.

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

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Tạo kháng thể IL-23 của người

Công nghệ XenoMouseTM (Amgen, Thousand Oaks, CA) được sử dụng để phát triển kháng thể đơn dòng của người mà nhận diện và ức chế hoạt tính IL-23 nguyên gốc của người trong khi không ức chế IL-12 của người. Kháng thể này còn nhận diện và ức chế IL-23 tái tổ hợp của khỉ đuôi dài nhưng không nhận diện IL-23 của chuột nhắt hoặc chuột đuôi dài.

Các kháng thể được chọn lọc để nhận diện và ức chế hoàn toàn IL-23 nguyên gốc của người thu được từ tế bào đuôi gai có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân to của người (MoDC) bằng cách sử dụng thử nghiệm về chất chỉ thị STAT-luxiferaza nêu dưới đây. Các bạch cầu đơn nhân to của người được phân lập từ các tế bào đơn nhân máu ngoại vi từ người hiến

tăng khỏe mạnh bằng cách chọn lọc âm tính (Monocyte Isolation Kit II, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). MoDC được tạo ra bằng cách nuôi cấy bạch cầu đơn nhân to với GM-CSF của người (50 ng/mL) và IL-4 của người (100 ng/mL) trong 7 ngày trong môi trường RPMI 1640 hoàn toàn với 10% huyết thanh thai bò. MoDC sau đó được rửa hai lần bằng PBS, sau đó được kích thích bằng CD40L của người (1 μ g/mL) thêm 48 giờ nữa. Phần dịch nổi MoDC được kích thích bởi CD40L chứa IL-23, IL-12 và IL-12/23p40. ELISA được sử dụng để xác định lượng của IL-12p70 (R&D Systems, Minneapolis, MN), IL-23 (eBiosciences, San Diego, CA) và IL-12/23p40 (R&D Systems). Thử nghiệm STAT-luxiferaza đáp ứng với IL-23 và không đáp ứng với IL-12 hoặc với IL-12/23p40 tự do, do đó thử nghiệm này có thể được sử dụng với phần dịch nổi thô để đánh giá hoạt tính IL-23. Để sử dụng trong thử nghiệm tế bào NK nêu dưới đây, phần dịch nổi thô chứa IL-23 nguyên gốc của người được tinh chế bằng cách sử dụng cột ái lực IL-23, sau đó là sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Nồng độ được xác định bằng cách sử dụng ELISA đặc hiệu IL-23 (eBiosciences).

Phần dịch nổi chứa kháng thể đã được tinh chế còn được thử nghiệm dựa vào IL-23 tái tổ hợp của người (rhIL-23) và IL-23 tái tổ hợp của khỉ đuôi dài (cynoIL-23) trong thử nghiệm STAT-luxiferaza. Trong số các kháng thể được thử nghiệm mà ức chế hoàn toàn IL-23 tái tổ hợp của người, chỉ có một nửa số kháng thể đó là nhận diện và ức chế hoàn toàn IL-23 nguyên gốc của người. Sự nhận diện và ức chế hoàn toàn IL-23 tái tổ hợp của người không phải là dự đoán cho, cũng như không liên quan đến, sự nhận diện và ức chế hoàn toàn IL-23 nguyên gốc của người. Như được thể hiện trên Fig. 1A và Fig. 1B, trong phần dịch nổi chứa kháng thể mà ức chế hoàn toàn IL-23 tái tổ hợp của người, chỉ có một nửa số kháng thể là ức chế hoàn toàn IL-23 nguyên gốc của người. Các kháng thể mà nhận diện và ức chế hoàn toàn IL-23 nguyên gốc của người được chọn để xác định đặc điểm tiếp.

Ví dụ 2

Thử nghiệm chức năng

a) Thử nghiệm STAT-luxiferaza

Đã biết rằng IL-23 liên kết với thụ thể dạng heterodime của nó và truyền tín hiệu qua JAK2 và Tyk2 để hoạt hóa STAT 1, 3, 4 và 5. Trong thử nghiệm này, các tế bào được chuyển nhiễm với gen chỉ thị STAT/luxiferaza được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế hoạt tính sinh học gây ra bởi IL-23 của các kháng thể IL-23.

Tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc biểu hiện thụ thể IL-23 của người được chuyển nhiễm tạm thời với gen chỉ thị STAT-luxiferaza qua đêm. Các kháng thể IL-23 được pha loãng theo dãy (12 điểm của các mẫu pha loãng theo dãy 1:4, bắt đầu từ 37,5 $\mu\text{g/mL}$) vào đĩa có 96 lỗ. IL-23 nguyên gốc của người (phương pháp điều chế được mô tả trong ví dụ 1) được thêm vào mỗi lỗ với nồng độ là 2 ng/mL và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 15-20 phút. Các tế bào đã được chuyển nhiễm tạm thời được thêm vào (8×10^3 tế bào) đến thể tích cuối là 100 μL /lỗ và được ủ trong 5 giờ ở 37°C, 10% CO₂. Sau khi ủ, các tế bào được dung giải bằng cách sử dụng 100 μL đệm Glo Lysis cho mỗi lỗ (1x) (Promega, Madison, Wisconsin) ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. 50 μL dịch dung giải tế bào được cho vào đĩa có 96 lỗ khác cùng với 50 μL cơ chất luxiferaza Bright-Glo (Promega) và được đọc trên máy đo độ sáng.

Phân tích thống kê có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad PRISM (phần mềm GraphPad, La Jolla, CA). Kết quả có thể được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD).

Như được thấy trong bảng 5, tất cả các kháng thể IL-23 đều ức chế hiệu nghiệm và hoàn toàn gen chỉ thị STAT/luxiferaza gây ra bởi IL-23 nguyên gốc của người theo cách phụ thuộc liều. Các kháng thể này cũng ức chế hiệu nghiệm và hoàn toàn IL-23 tái tổ hợp của người (rhuIL-23) và IL-23 tái tổ hợp của khỉ đuôi dài (cynoIL-23). Tất cả các kháng thể đều có giá trị IC₅₀ trong khoảng picomol.

Bảng 5. Giá trị IC₅₀ trung bình (pM) đối với các kháng thể IL-23 trong thử nghiệm STAT-luxiferaza

Kháng thể	huIL-23 nguyên gốc		rhuIL-23		cynoIL-23	
	IC ₅₀ +/-SD	Lần lặp	IC ₅₀ +/-SD	Lần lặp	IC ₅₀ +/-SD	Lần lặp
A	114+/-70	3	190+/-99	3	379+/-213	3
B	45+/-5	4	100+/-59	4	130+/-60	3
C	107+/-31	3	211+/-93	3	376+/-89	3
D	65+/-5	3	107+/-30	3	184+/-77	3
E	140+/-52	3	142+/-52	3	188+/-59	3
F	86+/-47	4	187+/-116	4	366+/-219	4
G	156+/-74	5	296+/-133	5	421+/-174	5

H	192+/-35	4	253+/-184	4	1024+/-533	4
I	208+/-33	3	338+/-140	3	650+/-42	3
J	83+/-54	2	36+/-6	2	56+/-2	2
K	71+/-38	3	43+/-20	3	61+/-10	3
L	113+/-80	3	23+/-7	3	47+/-1	3
M	34+/-11	2	40+/-8	2	56+/-6	2
N	361+/-164	3	145	1	238	1

b) Thử nghiệm tế bào NK

Đã biết rằng IL-23 tác động lên tế bào ăn mồi tự nhiên để kích thích sự biểu hiện của xytokin gây viêm, như interferon γ (IFN γ). Trong thử nghiệm này, các tế bào ăn mồi tự nhiên (NK) sơ cấp của người được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế hoạt tính IFN γ gây ra bởi IL-23 của các kháng thể IL-23 ở các tế bào biểu hiện thụ thể nguyên gốc đối với IL-23 của người.

Các tế bào NK được phân lập từ nhiều người hiến tặng bằng cách chọn lọc âm tính (bộ kit phân lập tế bào NK (NK Cell Isolation Kit), Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Các tế bào NK đã được tinh chế (1×10^6 tế bào/mL) được cho vào các đĩa có 6 lỗ trong môi trường RPMI 1640 hoàn toàn với 10% huyết thanh thai bò có bổ sung IL-2 tái tổ hợp của người (10 ng/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN), đến thể tích cuối là 10 mL/lỗ. Các tế bào được nuôi cấy trong 7 ngày ở 37°C, 5% CO₂. Các tế bào NK được hoạt hóa bởi IL-2 sau đó được kích thích bằng rhuIL-23 hoặc cynoIL-23 (10 ng/mL) và IL-18 tái tổ hợp của người (20 ng/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN) trong điều kiện có mặt các mẫu pha loãng theo dãy (11 điểm của các mẫu pha loãng theo dãy 1:3, bắt đầu từ 3 μ g/mL) của các kháng thể IL-23 trong 24 giờ. Nồng độ IFN γ được xác định trong phần dịch nổi bằng kỹ thuật ELISA IFN γ (R&D Systems, Minneapolis, MN) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phân tích thống kê có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad PRISM. Kết quả có thể được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD).

Như được thấy trong bảng 6, tất cả các kháng thể đều ức chế hiệu nghiệm sự biểu hiện IFN γ gây ra bởi rhuIL-23 và cynoIL-23 ở các tế bào NK theo cách phụ thuộc liều. Tất cả các kháng thể đều có giá trị IC₅₀ trong khoảng picomol. Thử nghiệm này được thực hiện trên tập con kháng thể bằng cách sử dụng IL-23 nguyên gốc của người (30 μ g/mL, phương

pháp điều chế được mô tả trong ví dụ 1) và rhuIL-18 (40 ng/mL, R&D Systems) và thu được các kết quả được thể hiện trong bảng 6. Phù hợp với sự chọn lọc kháng thể đặc hiệu IL-23, các kháng thể kháng IL-23 này không gây tác động lên việc sản xuất IFN γ được kích thích bởi IL-12 trong các tế bào NK bằng việc sử dụng thử nghiệm nêu trên, trong khi đó kháng thể trung hòa đặc hiệu IL-12p35, mAb219 (R&D Systems, Minneapolis, MN) ức chế hiệu nghiệm IL-12 tái tổ hợp của người.

Bảng 6. Giá trị IC₅₀ trung bình (pM) đối với các kháng thể IL-23 trong thử nghiệm tế bào NK

Kháng thể	huIL-23 nguyên gốc		rhuIL-23		cynoIL-23	
	IC ₅₀ +/-SD	Lần lặp	IC ₅₀ +/-SD	Lần lặp	IC ₅₀ +/-SD	Lần lặp
A			42+/-12	2	31+/-21	2
B	85+/-30	2	48+/-30	3	19+/-8	2
C			32+/-19	4	29+/-16	2
D			37+/-21	2	29+/-19	2
E	158+/-50	2	57+/-14	3	21+/-3	2
F			25+/-15	2	21+/-17	2
G	152+/-72	2	45+/-30	3	23+/-8	2
H			29+/-28	2	33+/-17	2
I			69	1	52	1
J			4+/-3	2	5+/-3	2
K			7+/-2	2	8+/-6	2
L			3+/-1	2	4+/-1	2
M			8	1	12	1

c) Thử nghiệm máu toàn phần của người

Máu toàn phần của người được thu từ nhiều người hiến tặng khỏe mạnh bằng cách sử dụng Refludan® (Bayer Pittsburgh, PA) làm chất chống đông. Nồng độ cuối của Refludan® trong máu toàn phần là 10 μ g/mL. Hỗn hợp kích thích gồm rhuIL-23 hoặc cynoIL-23 (nồng độ cuối là 1 ng/mL) + rhuIL-18 (nồng độ cuối là 20 ng/mL) + rhuIL-2 (nồng độ cuối là 5 ng/mL) trong RPMI 1640 + 10% FBS được thêm vào đĩa có 96 lỗ, thể tích cuối là 20 μ L/lỗ. Các kháng thể IL-23 được pha loãng theo dãy (11 điểm của các mẫu pha loãng theo dãy 1:3,

bắt đầu từ 3µg/mL) được thêm vào với thể tích là 20 µL/lỗ và được ủ với hỗn hợp kích thích trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Máu toàn phần sau đó được thêm vào (120 µL/lỗ) và thể tích cuối được điều chỉnh đến 200 µL/lỗ bằng RPMI 1640 + 10% FBS. Nồng độ cuối của máu toàn phần là 60%. Các đĩa được ủ trong 24 giờ ở 37°C, 5% CO₂. Phần dịch nổi không chứa tế bào được thu lại và lượng IFN γ được xác định từ phần dịch nổi này bằng kỹ thuật ELISA IFN γ (R&D Systems) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phân tích thống kê có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm GraphPad PRISM. Kết quả có thể được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn (SD).

Như được thấy trong bảng 7, tất cả các kháng thể đều ức chế hiệu nghiệm sự biểu hiện IFN γ gây ra bởi rhuIL-23 và cynoIL-23 ở các tế bào máu toàn phần theo cách phụ thuộc liều. Tất cả các kháng thể đều có giá trị IC₅₀ trong khoảng picomol.

Bảng 7. Giá trị IC₅₀ trung bình (pM) đối với các kháng thể IL-23 trong thử nghiệm IFN γ ở máu toàn phần của người

	rhuIL-23		cynoIL-23	
Kháng thể	IC ₅₀ +/-SD	Lần lặp	IC ₅₀ +/-SD	Lần lặp
B	117+/-94	7	161+/-95	6
E	29+/-8	3	54+/-33	3
G	53+/-13	3	93+/-44	3
F	66+/-13	3	166+/-189	3
D	88+/-6	3	110+/-14	3
C	97+/-31	3	186+/-194	3

d) Thử nghiệm IL-22

Đã biết rằng IL-23 là chất kích thích xytokin gây viêm hiệu nghiệm. IL-23 tác động lên các tế bào T ghi nhớ và đã hoạt hóa và tăng cường tỷ lệ sống sót và mở rộng của các tế bào Th17 sản xuất xytokin gây viêm bao gồm IL-22. Trong thử nghiệm này, máu toàn phần của người được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế việc sản xuất IL-22 gây ra bởi IL-23 của các kháng thể IL-23.

Thử nghiệm máu toàn phần được thực hiện theo cùng cách như nêu trên với thay đổi là sử dụng rhuIL-23 hoặc cynoIL-23 ở nồng độ là 1 ng/mL và rhuIL-18 ở nồng độ là 10

ng/mL để kích thích sự sản xuất IL-22. Nồng độ IL-22 được xác định bằng kỹ thuật ELISA IL-22 (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Như được thấy trong bảng 8, các kháng thể ức chế hiệu nghiệm sự sản xuất IL-22 gây ra bởi rhuIL-23 và cynoIL-23 ở các tế bào máu toàn phần theo cách phụ thuộc liều. Tất cả các kháng thể đều có giá trị IC_{50} nằm trong khoảng picomol.

Bảng 8. Giá trị IC_{50} trung bình (pM) đối với các kháng thể IL-23 trong thử nghiệm IL-22 ở máu toàn phần của người

Kháng thể	rhuIL-23		cynoIL-23	
	$IC_{50} \pm SD$	Lần lặp	$IC_{50} \pm SD$	Lần lặp
B	117 $\pm$ 68	4	113 $\pm$ 65	3
E	87 $\pm$ 109	3	56 $\pm$ 60	3
G	83 $\pm$ 59	3	66 $\pm$ 45	3

Ví dụ 3

Xác định hằng số phân ly cân bằng (K_D) đối với kháng thể kháng IL-23 bằng cách sử dụng công nghệ KinExA

Ái lực liên kết của rhuIL-23 với các kháng thể IL-23 được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm loại trừ theo động lực (thử nghiệm KinExA, Sapidyn Instruments, Inc., Boise, ID). Các hạt chảy nhanh Sepharosa 4 được hoạt hóa bởi huyết thanh người bình thường (NHS) (Amersham Biosciences, một bộ phận của GE Healthcare, Uppsala, Thụy Điển), được phủ trước bằng rhuIL-23 và được phong bế bằng đệm Tris 1m với 10 mg/mL BSA. 50 pM kháng thể IL-23 được ủ với rhuIL-23 (12 điểm của các mẫu pha loãng 1:2, bắt đầu từ 800 pM) ở nhiệt độ trong phòng trong 72 giờ trước khi nó được cho chạy qua các hạt Sepharosa đã được phủ rhuIL-23. Lượng kháng thể liên kết với hạt được định lượng bởi kháng thể kháng Fc của người ở dê được đánh dấu huỳnh quang (Cy5) (Jackson Immuno Research, West Grove, Pa.). Tín hiệu liên kết tỷ lệ với lượng kháng thể tự do ở trạng thái cân bằng.

Hằng số phân ly cân bằng (K_D) và tốc độ kết hợp (K_{on}) được thu nhận từ việc khớp đường cong bằng cách sử dụng phần mềm KinExA Pro. Tốc độ phân ly (K_{off}) được thu nhận từ: $K_D = K_{off}/K_{on}$

Như được thấy trong bảng 9, các kháng thể có ái lực cao để liên kết với IL-23 của người. Tất cả đều có giá trị K_D trong khoảng pM từ thấp đến tiệm cận khoảng.

Bảng 9. K_D (pM), tốc độ K_{on} (1/MS) và K_{off} (1/s)

Kháng thể	K_D (pM)	K_{on} (1/MS)	K_{off} (1/s)
E	0,131	9,12E+05	1,4E-07
D	0,126	1,72E+06	2,2E-07
B	3,99	1,17E+06	4,7E-06
C	2,56	1,36E+06	4,1E-06
F	2,62	5,69E+05	1,5E-06
L	1,08	3,34E+06	3,7E-06
G	2,00	4,00E+05	8,1E-07

Ví dụ 4

Xác định cấu trúc bằng cách sử dụng kỹ thuật tinh thể học tia X

Một cách để xác định cấu trúc của phức hợp kháng thể-kháng nguyên là bằng cách sử dụng kỹ thuật tinh thể học tia X, ví dụ xem tài liệu Harlow and Lane Antibodies: Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), p.23. Cấu trúc tinh thể của IL-23 đã được xác định (xem tài liệu Lupardus and Garcia, J Mol Biol, 2008, 382: 931-941) và cấu trúc tinh thể của phức hợp IL-23/Fab đã được mô tả (xem tài liệu Beyer et al. J Mol Biol, 2008. 382(4): 942-55). Việc xác định cấu trúc của IL-23 với các mảnh Fab của kháng thể được yêu cầu bảo hộ trong đơn này được thu nhận bằng cách sử dụng kỹ thuật tinh thể học tia X.

Protein dùng để kết tinh

IL-23 heterodime của người thu được bằng cách tái tổ hợp được dùng cho các nghiên cứu kết tinh (xem Beyer et al., nêu trên). Trình tự của cấu trúc dưới phân tử p19 của người chứa các gốc 20-189 nêu trong SEQ ID NO: 145, trình tự tín hiệu nêu trong SEQ ID NO: 154 và đuôi 6-His đầu tận C nêu trong SEQ ID NO: 155. Trình tự của cấu trúc dưới phân tử p40 của người được gây đột biến từ asparagin thành glutamin tại vị trí 222 nêu trong SEQ ID NO: 147 để ngăn cản quá trình glycosyl hóa tại vị trí này (Beyer, et al., nêu trên).

Fab có nguồn gốc từ kháng thể B và kháng thể E được biểu hiện trên giàn giáo IgG1 mà kết hợp vị trí phân cắt caspaza. Fab được xử lý bằng cách phân cắt bằng proteaza.

Tạo phức và kết tinh

Phức hợp IL-23 - Fab kháng thể B được tạo ra bằng cách trộn lượng mol dư 2X của Fab kháng thể B với IL-23 heterodime của người nêu trên. Phức hợp này được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký loại theo kích cỡ để loại bỏ Fab kháng thể B dư và được cô đến khoảng 12 mg/mL để kết tinh. Phức hợp IL-23 - Fab kháng thể B kết tinh trong 0,1 M Hepes pH = 7, 8% PEG 8000.

Phức hợp IL-23 - Fab kháng thể E được tạo ra bằng cách trộn lượng mol dư 2X của Fab kháng thể E với IL-23 heterodime của người nêu trên. Phức hợp này được metyl hóa bằng cách sử dụng bộ kit metyl hóa JBS (JBS Methylation Kit) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Jena Bioscience, Jena, Đức). Phức hợp này sau đó được xử lý bằng PNGase để khử glycosyl ở protein. Sau các bước xử lý này, phức hợp được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký loại theo kích cỡ để loại bỏ Fab kháng thể E dư và được cô đến 13,5 mg/mL để kết tinh. Phức hợp IL-23 - Fab kháng thể E kết tinh trong 0,1 M Tris pH = 8,5, 0,2 M magie clorua, 15% PEG 4000.

Thu thập dữ liệu và xác định cấu trúc

Các tinh thể IL-23 - Fab kháng thể B phát triển trong nhóm không gian $P2_1$ với kích thước ô mạng đơn vị là $a=70,93$, $b=71,27$, $c=107,37$ Å, $\beta=104,98^\circ$ và nhiễu xạ đến độ phân giải 2,0 Å. Cấu trúc IL-23 - Fab kháng thể B được phân giải bằng cách thay thế phân tử bằng chương trình MOLREP (CCP4, The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1994. 50(Pt 5): p. 760-3) bằng cách sử dụng cấu trúc IL-23 (Beyer et al. nêu trên) làm mô hình tra cứu ban đầu. Với việc giữ IL-23 cố định, miền thay đổi kháng thể được dùng làm mô hình tra cứu. Với việc giữ miền thay đổi kháng thể IL-23 cố định, miền không đổi kháng thể được dùng làm mô hình tra cứu. Cấu trúc hoàn thiện được cải thiện bằng nhiều vòng xây dựng mô hình bằng Quanta và tinh chỉnh bằng cns (Brunger, et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1998, 54(Pt 5): p. 905-21).

Khoảng cách giữa các nguyên tử protein được tính toán bằng cách sử dụng chương trình PyMOL (DeLano, W.L. PyMOL Graphics System. Palo Alto, 2002) (Schrodinger, LLC; New York, NY)). Các axit amin được chọn nếu ít nhất một nguyên tử nằm trong ngưỡng khoảng cách cần thiết đối với protein đối tác.

Ranh giới của các xoắn ốc A, B, C và D của cấu trúc dưới phân tử p19 của IL-23 khi liên kết với Fab kháng thể B bao gồm các gốc xoắn ốc A 28-47, các gốc xoắn ốc B 86-105, các gốc xoắn ốc C 119-134 và các gốc xoắn ốc D 154-187 nêu trong SEQ ID NO: 145.

Các vùng tương tác trên cấu trúc dưới phân tử IL-23p19 khi liên kết với Fab kháng thể B bao gồm các gốc nằm trong Ser46-Glu58, Glu112-Glu123 và Pro155-Phe163 nêu trong SEQ ID NO: 145.

Các gốc axit amin của cấu trúc dưới phân tử IL-23p19 với các nguyên tử ở khoảng cách 4 Å hoặc nhỏ hơn kể từ Fab kháng thể B bao gồm Ser46, Ala47, His48, Pro49, Leu50, His53, Met54, Asp55, Glu58, Pro113, Ser114, Leu115, Leu116, Pro120, Val121, Trp156, Leu159, Leu160, Arg162 và Phe163 nêu trong SEQ ID NO: 145. Các gốc axit amin của IL-23p19 với các nguyên tử nằm trong khoảng cách từ 4 Å đến 5 Å kể từ Fab kháng thể B bao gồm Val51, Arg57, Glu112, Asp118, Ser119, Gln123, Pro155 nêu trong SEQ ID NO: 145.

Các gốc axit amin của cấu trúc dưới phân tử IL-23p40 với các nguyên tử ở khoảng cách 4 Å hoặc nhỏ hơn kể từ Fab kháng thể B bao gồm Glu 122 và Lys 124 nêu trong SEQ ID NO: 147.

Các gốc axit amin chuỗi nặng của Fab kháng thể B với các nguyên tử ở khoảng cách 4 Å hoặc nhỏ hơn kể từ IL-23 heterodime bao gồm Gly32, Gly33, Tyr34, Tyr35, His54, Asn58, Thr59, Tyr60, Lys66, Arg101, Gly102, Phe103, Tyr104 và Tyr105 nêu trong SEQ ID NO: 46. Các gốc axit amin chuỗi nặng của Fab kháng thể B với các nguyên tử ở khoảng cách 5 Å hoặc nhỏ hơn kể từ IL-23 heterodime bao gồm Ser31, Gly32, Gly33, Tyr34, Tyr35, His54, Ser56, Asn58, Thr59, Tyr60, Lys66, Arg101, Gly102, Phe103, Tyr104 và Tyr105 nêu trong SEQ ID NO: 46.

Các gốc axit amin chuỗi nhẹ của Fab kháng thể B với các nguyên tử ở khoảng cách 4 Å hoặc nhỏ hơn kể từ IL-23 heterodime bao gồm Ser30, Ser31, Trp32, Tyr49, Ser52, Ser53, Ala91, Asn92, Ser93, Phe94, và Phe96 nêu trong SEQ ID NO: 15. Các gốc axit amin chuỗi nhẹ của Fab kháng thể B với các nguyên tử ở khoảng cách 5 Å hoặc nhỏ hơn kể từ IL-23 heterodime bao gồm Ser30, Ser31, Trp32, Tyr49, Ala50, Ser52, Ser53, Ser56, Ala91, Asn92, Ser93, Phe94 và Phe96 nêu trong SEQ ID NO: 15

Các tinh thể phức hợp IL-23 - Fab kháng thể E phát triển trong nhóm không gian P222₁ với kích thước ô mạng đơn vị là a=61,60, b=97,59, c=223,95 Å và nhiễu xạ đến độ phân giải 3,5 Å. Cấu trúc phức hợp IL-23 - Fab kháng thể E được phân giải bằng cách thay

thể phân tử bằng chương trình Phaser (CCP4, nêu trên) bằng cách sử dụng cấu trúc IL-23, miễn thay đổi kháng thể và miễn không đổi kháng thể làm ba mô hình tra cứu ban đầu, như được mô tả ở trên. Cấu trúc hoàn thiện được cải thiện bằng nhiều vòng xây dựng mô hình bằng Quanta và tinh chỉnh bằng cxx (Brunger, et al., nêu trên). Miễn không đổi của Fab kháng thể E được xóa khỏi cấu trúc được tinh chỉnh cuối cùng do mật độ điện tử cho phần protein đó rất nhỏ.

Các vùng tương tác trên cấu trúc dưới phân tử IL-23p19 được xác định khi liên kết với Fab kháng thể E bao gồm các gốc nằm trong Ser46-His53, Glu112-Val120 và Trp156-Phe163 nêu trong SEQ ID NO: 145.

Các gốc axit amin của IL-23p19 với các nguyên tử ở khoảng cách 4 Å hoặc nhỏ hơn kể từ Fab kháng thể E bao gồm Ser46, Ala47, His48, Pro49, Leu50, Glu112, Pro113, Ser114, Leu115, Leu116, Pro117, Asp118, Ser119, Pro120, Trp156, Leu159, Leu160 và Phe163 nêu trong SEQ ID NO: 145. Các gốc axit amin của IL-23p19 với các nguyên tử nằm trong khoảng cách từ 4 Å đến 5 Å kể từ Fab kháng thể E bao gồm His53 nêu trong SEQ ID NO: 145.

Các gốc axit amin của IL-23p40 với các nguyên tử ở khoảng cách 4 Å hoặc nhỏ hơn kể từ Fab kháng thể E bao gồm Lys121, Glu 122, Pro123 và Asn 125 nêu trong SEQ ID NO: 147.

Các gốc axit amin chuỗi nặng của Fab kháng thể E với các nguyên tử ở khoảng cách 4 Å hoặc nhỏ hơn kể từ IL-23 heterodime bao gồm Gly26, Phe27, Thr28, Ser31, Tyr53, Tyr59, Tyr102, Ser104, Ser105, Trp106, Tyr107 và Pro108 nêu trong SEQ ID NO: 31. Các gốc axit amin chuỗi nặng của Fab kháng thể E với các nguyên tử ở khoảng cách 5 Å hoặc nhỏ hơn kể từ IL-23 heterodime bao gồm Gln1, Gly26, Phe27, Thr28, Ser30, Ser31, Tyr32, Trp52, Tyr53, Tyr59, Arg100, Tyr102, Thr103, Ser104, Ser105, Trp106, Tyr107 và Pro108 nêu trong SEQ ID NO: 31.

Các gốc axit amin chuỗi nhẹ của Fab kháng thể E với các nguyên tử ở khoảng cách 4 Å hoặc nhỏ hơn kể từ IL-23 heterodime bao gồm Ala31, Gly32, Tyr33, Asp34, Tyr51, Gly52, Asn55, Lys68 và Tyr93 nêu trong SEQ ID NO: 1. Các gốc axit amin chuỗi nhẹ của Fab kháng thể B với các nguyên tử ở khoảng cách 5 Å hoặc nhỏ hơn kể từ IL-23 heterodime bao gồm Thr29, Ala31, Gly32, Tyr33, Asp34, Tyr51, Gly52, Asn55, Lys68, Tyr93 và Trp100 nêu trong SEQ ID NO: 1.

Ví dụ 5

Xác định các gốc tiếp xúc phức hợp IL-23 - kháng thể qua chênh lệch diện tích bề mặt có thể tiếp cận dung môi

Các gốc tiếp xúc trong paratop (phần kháng thể nhận biết kháng nguyên) và phần kháng nguyên liên kết nó liên kết mà được liên kết bởi paratop này trong phức hợp IL-23 - Fab kháng thể B của người và trong phức hợp IL-23 - Fab kháng thể E của người được xác định bằng cách sử dụng chênh lệch diện tích bề mặt có thể tiếp cận dung môi. Việc tính toán diện tích bề mặt có thể tiếp cận dung môi được thực hiện bằng cách sử dụng Molecular Operating Environment (Chemical Computing Group, Montreal, Quebec).

Chênh lệch diện tích bề mặt có thể tiếp cận dung môi của các gốc paratop trong phức hợp IL-23 - Fab kháng thể B được tính toán bằng cách thiết đặt các gốc Fab kháng thể B làm tập hợp mong muốn. Thông tin cấu trúc thu được trong ví dụ 4 về phức hợp IL-23 - Fab kháng thể B được sử dụng và diện tích bề mặt có thể tiếp cận dung môi của các gốc axit amin của Fab kháng thể B trong điều kiện có mặt IL-23 heterodime được tính toán và đại diện cho “diện tích liên kết” của tập hợp.

Diện tích bề mặt có thể tiếp cận dung môi của mỗi gốc Fab kháng thể B khi không có kháng nguyên IL-23 được tính toán và đại diện cho “diện tích tự do” của tập hợp.

“Diện tích liên kết” sau đó được trừ ra khỏi “diện tích tự do”, tạo ra “chênh lệch diện tích tiếp xúc bề mặt” cho mỗi gốc trong tập hợp. Các gốc Fab kháng thể B mà không có sự thay đổi về diện tích bề mặt, hay chênh lệch bằng không, không có vị trí tiếp xúc với các gốc của kháng nguyên IL-23 khi được tạo phức hợp. Các gốc Fab kháng thể B mà có giá trị chênh lệch $\geq 10 \text{ \AA}^2$ được coi là tiếp xúc đáng kể với các gốc trong kháng nguyên IL-23 sao cho các gốc Fab kháng thể B bị bắt giữ ít nhất một phần đến hoàn toàn khi Fab kháng thể B được liên kết vào IL-23 của người. Tập hợp các gốc Fab kháng thể B này tạo thành “phần ráp nối bao phủ”, các gốc liên quan đến cấu trúc của giao diện khi Fab kháng thể B được liên kết vào IL-23 của người, xem bảng 10 và 11. Các gốc Fab kháng thể B trong phần ráp nối bao phủ này có thể không liên quan đến các tương tác liên kết với các gốc của kháng nguyên IL-23, nhưng việc gây đột biến một gốc bất kỳ trong phần ráp nối bao phủ này có thể gây ra sự khác biệt lớn mà gây ảnh hưởng đến sự liên kết của Fab kháng thể B với IL-23 của người. Ngoại trừ Tyr49, tất cả các gốc này đều nằm trong các vùng CDR của chuỗi nhẹ

và chuỗi nặng Fab kháng thể B. Các gốc này cũng nằm ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn của kháng nguyên IL-23 khi liên kết với Fab kháng thể B, như nêu trong ví dụ 4.

Bảng 10: Chênh lệch diện tích bề mặt có thể tiếp cận dung môi đối với chuỗi nhẹ Fab kháng thể B

Gốc Số AHO	Vị trí gốc SEQ ID NO: 15	Chênh lệch diện tích bề mặt tiếp xúc dung môi (Å ²)
Ser32	Ser30	44,9
Ser33	Ser31	41,1
Trp40	Trp32	79,0
Tyr57	Tyr49	40,7
Ala58	Ala50	20,3
Ser68	Ser52	43,6
Ser69	Ser53	38,9
Ser72	Ser56	19,1
Asn110	Asn92	34,0
Phe135	Phe94	51,4

Bảng 11: Chênh lệch diện tích bề mặt có thể tiếp cận dung môi đối với chuỗi nặng Fab kháng thể B

Gốc Số AHO	Vị trí gốc SEQ ID NO: 46	Chênh lệch diện tích bề mặt tiếp xúc dung môi (Å ²)
Ser33	Ser31	18,2
Gly34	Gly32	49,5
Gly38	Gly33	33,8
Tyr39	Tyr34	51,4
Tyr40	Tyr35	30,7
His59	His54	29,5
Asn67	Asn58	66,7
Thr68	Thr59	26,0
Tyr69	Tyr60	59,4
Lys75	Lys66	32,6

Arg110	Arg101	47,2
Gly111	Gly102	21,7
Phe112	Phe103	35,5
Tyr133	Tyr104	83,0
Tyr134	Tyr105	91,7

Chênh lệch diện tích bề mặt có thể tiếp cận dung môi của các gốc trong phức hợp IL-23 - Fab kháng thể E được tính toán như nêu trên. Các gốc Fab kháng thể E mà có giá trị chênh lệch $\geq 10 \text{ \AA}^2$ được coi là tiếp xúc đáng kể với các gốc trong kháng nguyên IL-23 và các gốc Fab kháng thể E này bị bắt giữ ít nhất một phần đến hoàn toàn khi Fab kháng thể E được liên kết vào IL-23 của người. Tập hợp các gốc Fab kháng thể E này tạo thành phần ráp nối bao phủ, các gốc liên quan đến cấu trúc của giao diện khi Fab kháng thể E được liên kết vào IL-23 của người, xem bảng 12 và 13. Các gốc Fab kháng thể E trong phần ráp nối bao phủ này có thể không liên quan đến các tương tác liên kết với các gốc của kháng nguyên IL-23, nhưng việc gây đột biến một gốc bất kỳ trong phần ráp nối bao phủ này có thể gây ra sự khác biệt lớn mà gây ảnh hưởng đến sự liên kết của Fab kháng thể E với IL-23 của người. Đối với hầu hết các phần, các gốc của phần ráp nối bao phủ này nằm trong các vùng CDR của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ Fab kháng thể E. Các gốc này cũng nằm ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn của kháng nguyên IL-23 khi liên kết với Fab kháng thể E, như nêu trong ví dụ 4.

Bảng 12: Chênh lệch diện tích bề mặt có thể tiếp cận dung môi đối với chuỗi nhẹ Fab kháng thể E

Gốc Số AHO	Vị trí gốc SEQ ID NO: 1	Chênh lệch diện tích bề mặt tiếp xúc dung môi ($\text{\AA}^2$)
Ala33	Ala31	11,6
Gly34	Gly32	51,2
Tyr39	Tyr33	47,2
Asp40	Asp34	36,8
Tyr57	Tyr51	16,1
Gly58	Gly52	11,1
Asn69	Asn55	29,4

Lys82	Lys68	20,1
Tyr109	Tyr93	27,3
Ser135	Ser98	11,3

Bảng 13: Chênh lệch diện tích bề mặt có thể tiếp cận dung môi đối với chuỗi nặng Fab kháng thể E

Gốc Số AHO	Vị trí gốc SEQ ID NO: 31	Chênh lệch diện tích bề mặt tiếp xúc dung môi (Å ²)
Gln1	Gln1	41,1
Gly27	Gly26	24,6
Thr30	Thr28	82,2
Ser33	Ser31	40,7
Tyr39	Tyr32	30,7
Trp59	Trp52	11,3
Tyr60	Tyr53	44,7
Tyr69	Tyr59	42,4
Lys86	Lys76	17,4
Gly111	Gly101	12,8
Tyr112	Tyr102	103,1
Ser114	Ser104	21,0
Ser115	Ser105	91,4
Trp131	Trp106	145,0
Tyr132	Tyr107	71,6
Pro133	Pro108	20,4

Chênh lệch diện tích bề mặt có thể tiếp cận dung môi của một phần của IL-23 heterodime liên kết bởi paratop của Fab kháng thể B được tính toán bằng cách thiết đặt các gốc IL-23 heterodime làm tập hợp mong muốn. Thông tin cấu trúc thu được trong ví dụ 4 về phức hợp IL-23 - Fab kháng thể B được sử dụng và diện tích bề mặt có thể tiếp cận dung môi của các gốc axit amin của IL-23 heterodime trong điều kiện có mặt Fab kháng thể B được tính toán và đại diện cho diện tích liên kết của tập hợp.

Diện tích bề mặt có thể tiếp cận dung môi của gốc của mỗi gốc IL-23 heterodime khi không có Fab kháng thể B được tính toán và đại diện cho diện tích tự do của tập hợp.

Như nêu trên, diện tích liên kết được trừ ra khỏi diện tích tự do, tạo ra chênh lệch diện tích bề mặt tiếp xúc dung môi cho mỗi gốc IL-23. Các gốc IL-23 heterodime mà không có sự thay đổi về diện tích bề mặt, hay chênh lệch bằng không, không có vị trí tiếp xúc với các gốc của Fab kháng thể B khi được tạo phức hợp. Các gốc IL-23 heterodime mà có giá trị chênh lệch $\geq 10 \text{ \AA}^2$ được coi là tiếp xúc đáng kể với các gốc của Fab kháng thể B và các gốc IL-23 heterodime bị bắt giữ ít nhất một phần đến hoàn toàn khi IL-23 heterodime của người được liên kết vào Fab kháng thể B. Tập hợp các gốc IL-23 heterodime này tạo thành phần ráp nối bao phủ, các gốc liên quan đến cấu trúc của giao diện khi IL-23 heterodime của người được liên kết vào Fab kháng thể E, xem bảng 14. Các gốc IL-23 heterodime trong phần ráp nối bao phủ này có thể không liên quan đến các tương tác liên kết với các gốc trên Fab kháng thể B, nhưng việc gây đột biến một gốc bất kỳ trong phần ráp nối bao phủ này có thể gây ra sự khác biệt lớn mà gây ảnh hưởng đến sự liên kết của Fab kháng thể B với IL-23 của người. Các gốc này cũng nằm ở khoảng cách 4 Å hoặc ngắn hơn kể từ Fab kháng thể B, như nêu trong ví dụ 4.

Bảng 14: Chênh lệch diện tích bề mặt có thể tiếp cận dung môi đối với các gốc IL-23 heterodime

Gốc p19 (SEQ ID NO: 145)	Chênh lệch diện tích bề mặt tiếp xúc dung môi ($\text{\AA}^2$)
Ser46	26,5
Ala47	12,7
Pro49	59,6
Leu50	122,2
His53	47,8
Met54	13,9
Asp55	20,5
Arg57	14,6
Glu58	96,5
Glu112	29,7
Pro113	64,8

Ser114	30,0
Leu115	31,4
Leu116	60,0
Asp118	14,4
Ser119	19,7
Pro120	64,7
Pro155	19,4
Typ156	61,9
Leu159	72,8
Leu160	27,0
Arg162	14,4
Phe163	67,5
gốc p40 (SEQ ID NO: 147)	
Glu122	29,1
Lys124	60,9

Chênh lệch diện tích bề mặt có thể tiếp cận dung môi của một phần của IL-23 heterodime liên kết bởi paratop của Fab kháng thể E được tính toán như nêu trên. Các gốc IL-23 heterodime mà có giá trị chênh lệch $\geq 10 \text{ \AA}^2$ được coi là tiếp xúc đáng kể với các gốc của Fab kháng thể E và các gốc IL-23 heterodime bị bắt giữ ít nhất một phần đến hoàn toàn khi heterodime IL-23 của người được liên kết vào Fab kháng thể E. Tập hợp các gốc IL-23 heterodime này tạo thành phần rập nổi bao phủ, các gốc liên quan đến cấu trúc của giao diện khi IL-23 heterodime của người được liên kết vào Fab kháng thể E, xem bảng 15. Các gốc IL-23 heterodime trong phần rập nổi bao phủ này có thể không phải tất cả đều liên quan đến các tương tác liên kết với các gốc trên Fab kháng thể E, nhưng việc gây đột biến một gốc bất kỳ trong phần rập nổi bao phủ này có thể gây ra sự khác biệt lớn mà gây ảnh hưởng đến sự liên kết của Fab kháng thể E với IL-23 của người. Các gốc này cũng nằm ở khoảng cách 5 Å hoặc ngắn hơn kể từ Fab kháng thể E, như nêu trong ví dụ 4.

Bảng 15: Chênh lệch diện tích bề mặt có thể tiếp cận dung môi đối với các gốc IL-23 heterodime

Gốc p19 (SEQ ID NO:	Chênh lệch diện tích bề mặt tiếp
---------------------	----------------------------------

145)	xúc dung môi (Å ²)
Ser46	18,7
Ala47	14,9
Pro49	79,8
Leu50	99,5
His53	61,2
Glu112	62,8
Pro113	45,7
Ser114	69,5
Leu115	50,3
Leu116	127,2
Pro117	54,1
Asp118	37,0
Pro120	18,8
Pro155	16,9
Trp156	140,7
Leu159	21,8
Leu160	17,0
Phe163	56,6
Gốc p40 (SEQ ID NO: 147)	
Lys121	86,2
Glu122	21,8
Pro123	22,1
Asn125	26,7
Arg283	22,6

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23, trong đó protein liên kết kháng nguyên này chứa ít nhất một vùng thay đổi chuỗi nặng chứa: CDRH1 nêu trong SEQ ID NO: 91, CDRH2 nêu trong SEQ ID NO: 92 và CDRH3 nêu trong SEQ ID NO: 93; và ít nhất một vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa: CDRL1 nêu trong SEQ ID NO: 62, CDRL2 nêu trong SEQ ID NO: 63 và CDRL3 nêu trong SEQ ID NO: 64.
2. Protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23, trong đó protein liên kết kháng nguyên này chứa ít nhất một vùng thay đổi chuỗi nặng chứa các gốc axit amin 31-35, 50-65 và 99-113 nêu trong SEQ ID NO: 31; và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin 23-36, 52-58 và 91-101 nêu trong SEQ ID NO: 1.
3. Protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23, trong đó protein liên kết kháng nguyên này chứa vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 31 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 1.
4. Protein liên kết kháng nguyên phân lập được theo điểm 1, 2 hoặc 3, trong đó protein liên kết kháng nguyên này có ít nhất một đặc tính được chọn từ nhóm bao gồm:
 - a) làm giảm hoạt tính IL-23 của người;
 - b) làm giảm sự sản xuất xytokin tiền viêm;
 - c) liên kết với IL-23 của người với K_D nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-8} M;
 - d) có tốc độ K_{off} nhỏ hơn hoặc bằng 5×10^{-6} 1/s; và
 - e) có IC_{50} nhỏ hơn hoặc bằng 400 pM.
5. Dược phẩm chứa ít nhất một protein liên kết kháng nguyên theo điểm 1, 2, 3 hoặc 4 và tá dược được dụng.
6. Phân tử axit nucleic phân lập được mã hóa một hoặc cả hai vùng thay đổi của protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23, trong đó protein liên kết kháng nguyên này chứa ít nhất một vùng thay đổi chuỗi nặng chứa: CDRH1 nêu trong SEQ ID NO: 91, CDRH2 nêu trong SEQ ID NO: 92 và CDRH3 nêu trong SEQ ID NO: 93; và ít nhất một vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa:

7. Phân tử axit nucleic phân lập được mã hóa một hoặc cả hai vùng thay đổi của protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23, trong đó protein liên kết kháng nguyên này chứa vùng thay đổi chuỗi nặng chứa các gốc axit amin 31-35, 50-65 và 99-113 nêu trong SEQ ID NO: 31; và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa các gốc axit amin 23-36, 52-58 và 91-101 nêu trong SEQ ID NO: 1.
8. Phân tử axit nucleic phân lập được mã hóa một hoặc cả hai vùng thay đổi của protein liên kết kháng nguyên phân lập được liên kết với IL-23, trong đó protein liên kết kháng nguyên này chứa vùng thay đổi chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 31 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 1.
9. Phân tử axit nucleic phân lập được theo điểm 8, trong đó axit nucleic mã hóa vùng thay đổi chuỗi nặng là SEQ ID NO: 32.
10. Phân tử axit nucleic phân lập được theo điểm 8, trong đó axit nucleic mã hóa vùng thay đổi chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 2.
11. Phân tử axit nucleic phân lập được theo điểm 8, trong đó axit nucleic mã hóa vùng thay đổi chuỗi nặng là SEQ ID NO: 32 và axit nucleic mã hóa vùng thay đổi chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 2.
12. Phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 11, trong đó phân tử axit nucleic này được liên kết có điều khiển với trình tự kiểm soát.
13. Vector phân lập được chứa phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 12.
14. Tế bào chủ phân lập được chứa phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 12.
15. Tế bào chủ phân lập được chứa vector theo điểm 13.
16. Phương pháp sản xuất protein liên kết kháng nguyên liên kết với IL-23, trong đó phương pháp này bao gồm bước thu protein liên kết kháng nguyên này từ tế bào chủ theo điểm 15, trong đó tế bào chủ này chứa axit nucleic mã hóa cả vùng thay đổi chuỗi nặng và vùng thay đổi chuỗi nhẹ của protein liên kết kháng nguyên này.
17. Protein liên kết kháng nguyên phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó protein liên kết kháng nguyên này là kháng thể.

18. Protein liên kết kháng nguyên phân lập được theo điểm 17, trong đó kháng thể là kháng thể đơn dòng, kháng thể tái tổ hợp, kháng thể của người, kháng thể được làm giống với kháng thể của người, kháng thể khảm, kháng thể đa đặc hiệu hoặc mảnh kháng thể của chúng.

19. Protein liên kết kháng nguyên phân lập được theo điểm 18, trong đó mảnh kháng thể là mảnh Fab, mảnh Fab', mảnh F(ab')₂, mảnh Fv, đoạn Fv chuỗi đơn dạng dime (diabody) hoặc phân tử kháng thể chuỗi đơn.

20. Protein liên kết kháng nguyên phân lập được theo điểm 18, trong đó protein liên kết kháng nguyên này là kháng thể của người.

21. Protein liên kết kháng nguyên phân lập được theo điểm 18, trong đó protein liên kết kháng nguyên này là kháng thể đơn dòng.

22. Protein liên kết kháng nguyên phân lập được theo điểm 17, trong đó protein liên kết kháng nguyên này thuộc typ IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4.

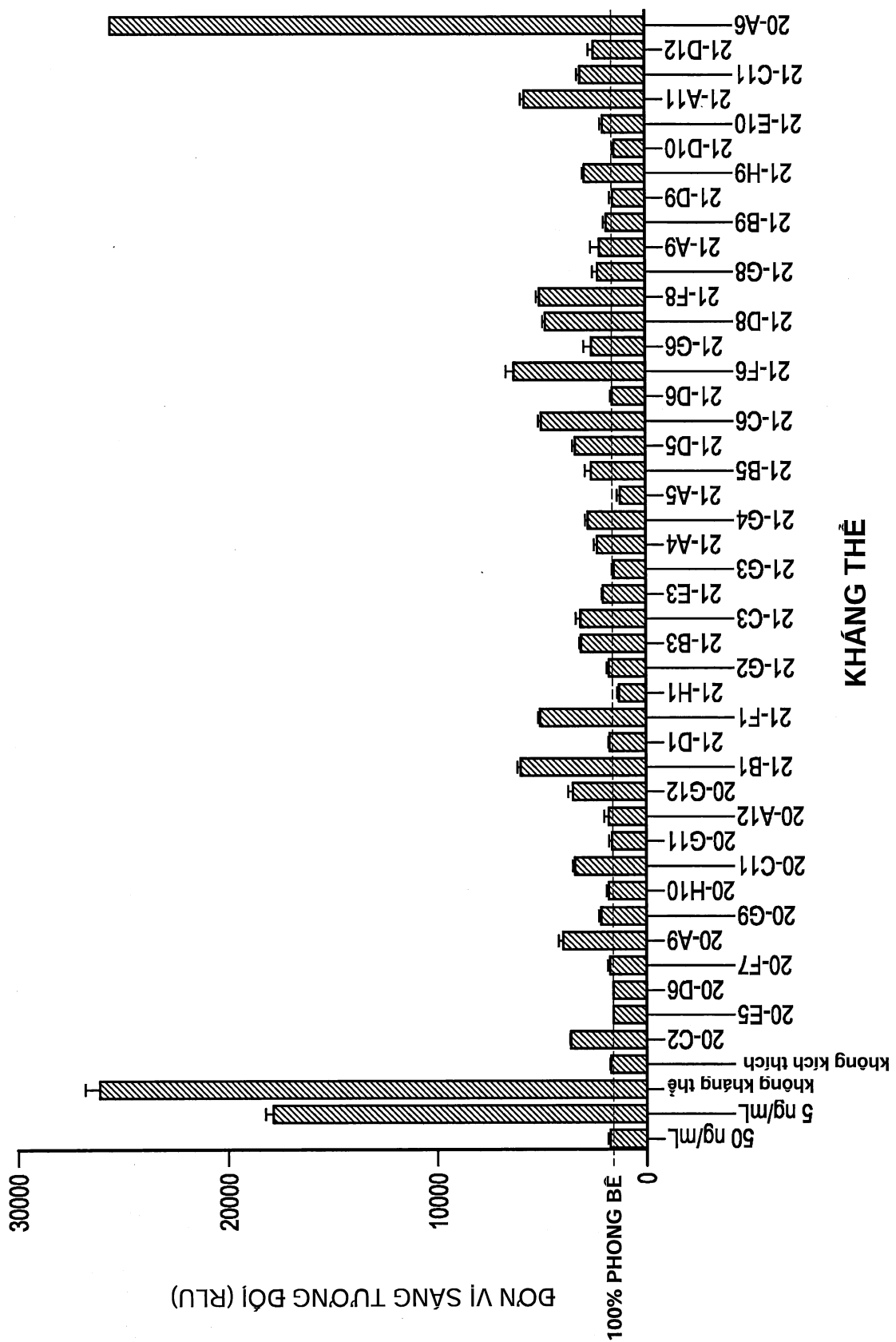
23. Protein liên kết kháng nguyên phân lập được theo điểm 22, trong đó protein liên kết kháng nguyên này thuộc typ IgG1 hoặc IgG2.

24. Dược phẩm theo điểm 5, trong đó dược phẩm này còn chứa nhóm đánh dấu hoặc nhóm tác động.

25. Dược phẩm theo điểm 24, trong đó nhóm đánh dấu được chọn từ nhóm bao gồm chất đánh dấu đồng vị, chất đánh dấu có từ tính, gốc có hoạt tính oxy hóa-khử, chất nhuộm quang học, nhóm được biotinyl hóa và epitop polypeptit đã xác định trước được nhận diện bằng chất chỉ thị thứ cấp.

26. Dược phẩm theo điểm 25, trong đó nhóm tác động được chọn từ nhóm bao gồm chất đồng vị phóng xạ, nuclid phóng xạ, độc tố, nhóm trị liệu và nhóm hóa trị liệu.

27. Protein liên kết kháng nguyên phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó protein liên kết kháng nguyên này được cộng hợp với nhóm đánh dấu.



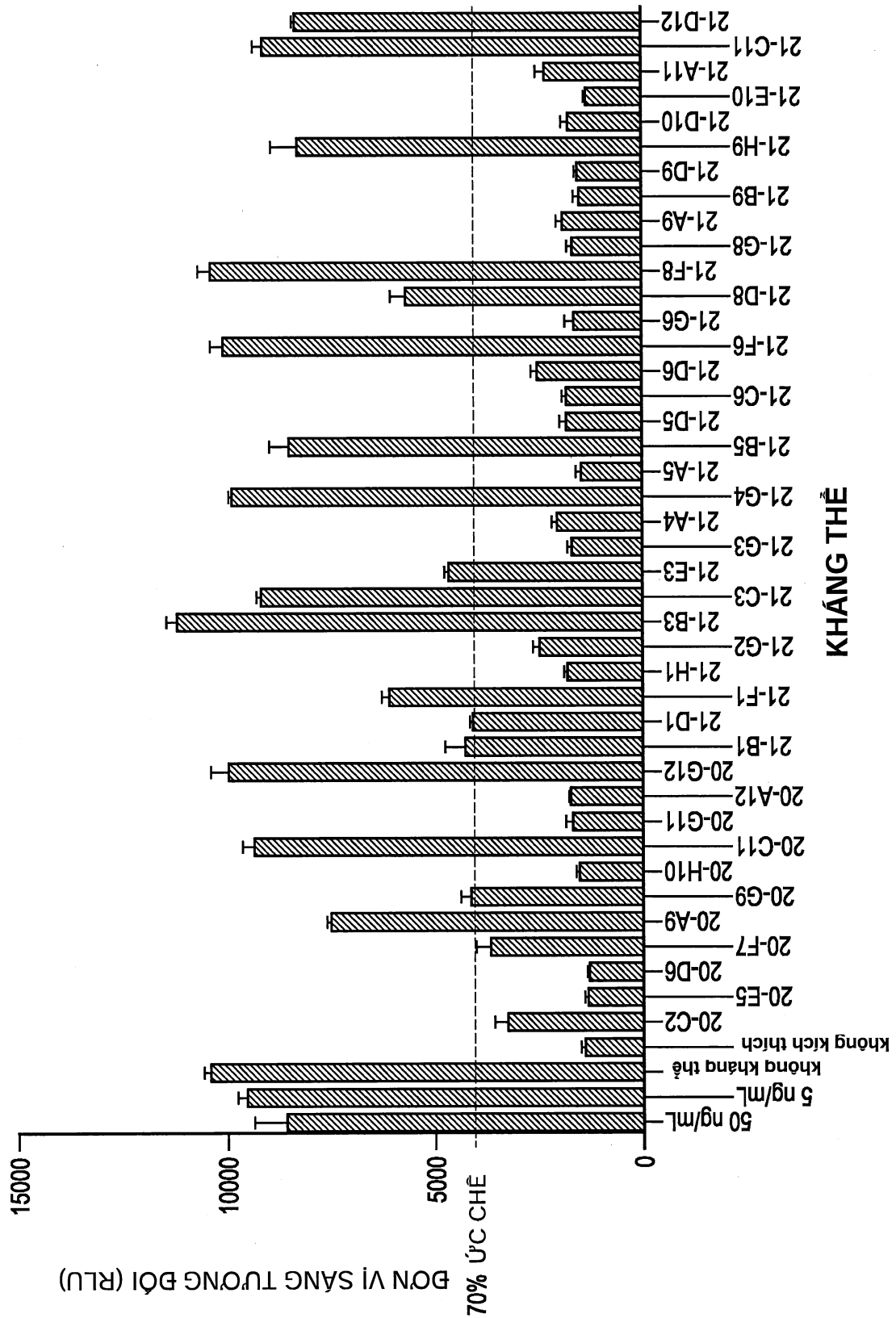


Fig. 1B

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Towne, Jennifer
 Cheng, Janet
 O'Neill, Jason
 Zhang, Yu
 Sun, Yu
 Cerne, Heather
 Piper, Derek
 Ketchum, Randal

<120> PROTEIN LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN LIÊN KẾT VỚI IL-23 CỦA NGƯỜI VÀ ĐƯỢC
 PHẪM CHỨA PROTEIN NÀY

<130> A-1529-WO-PCT

<140> sẽ được chỉ định

<141> 2010-10-26

<150> 61/381,287

<151> 2010-09-09

<150> 61/254,982

<151> 2009-10-26

<160> 155

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Thr Gly Ala Gly
 20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ser Gly Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95

Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 2
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgcactg ggagcagctc caacaccggg gcagggttatg atgtacactg gtaccagcaa 120
 gttccaggaa cagcccccaa actcctcatt tatggtagcg gcaatcggcc ctcagggggtc 180
 cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactggactc 240
 caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgggttg 300
 gtgttcggcg gagggaccag gctgaccgtc ctg 333

<210> 3
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30
 Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Ser Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95
 Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 4
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
 1 5 10 15

21415

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Ser Gly Ile Asn Val Gly Thr
20 25 30

Tyr Arg Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Met Ile Trp His Ser Ser Ala Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110

Thr Val Leu
115

<210> 5
<211> 345
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 5
caggctgtgc tgactcagcc gtcttcctc tctgcatctc ctggagcatc agccagtctc 60
acctgcacct tacgcagtgg catcaatggt ggtacctaca ggatatactg gtaccagcag 120
aagccaggga gtcctcccca gtatctcctg aggtacaaat cagactcaga taagcagcag 180
ggctctggag tccccagccg cttctctgga tccaaagatg cttcggccaa tgcagggatt 240
ttactcatct ctgggctcca gtctgaggat gaggctgact attactgtat gatttggcac 300
agcagcgctt cggtatctcg cggagggacc aagctgaccg tccta 345

<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Glu Asn Thr Val Thr Ile Tyr Tyr Asn Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 7
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

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

<210> 8

<211> 348

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 8

cagcctgtgc tgactcagcc accttctgca tcagcctccc tgggagcctc ggtcacactc 60
 acctgcaccc tgaacagcgg ctacagtgat tataaagtgg actggtacca gcagagacca 120
 gggaagggcc cccggtttgt gatgcgagtg ggacttggtg ggattgtggg atccaagggg 180
 gatggcatcc ctgatcgctt ctcagtcttg ggctcaggcc tgaatcggtta cctgaccatc 240
 aagaatatcc aggaagagga tgagagtgcac taccactgtg gggcagacca tggcagtggg 300
 agcaacttcg tgtatgtctt cggaactggg accaaggtca ccgtccta 348

<210> 9

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Thr Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr Lys
 20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Gly Pro Arg Phe Val Met
 35 40 45

Arg Val Gly Thr Gly Gly Ile Val Gly Ser Lys Gly Glu Gly Ile Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Val Leu Gly Ser Gly Leu Asn Arg Tyr Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Lys Asn Ile Gln Glu Glu Asp Glu Ser Asp Tyr His Cys Gly Ala Asp
 85 90 95

His Gly Ser Gly Asn Asn Phe Val Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys
 100 105 110

Val Thr Val Leu
 115

<210> 10
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 cagcctgtgc tgactcagcc accttctgca tcagcctccc tgggagcctc ggtcacactc 60
 acctgcaccc tgagcagcgg ctacagtgat tataaagtgg actggtacca gcagagacca 120
 gggaagggcc cccggtttgt gatgcgagtg ggcaactggtg ggattgtggg atccaagggg 180
 gaaggcatcc ctgatcgctt ctcagtcttg ggctcaggcc tgaatcggtg cctgaccatc 240
 aagaacatcc aggaagagga tgagagtgc taccactgtg gggcagacca tggcagtggg 300
 aacaacttcg tgtatgtctt cggaactggg accaaggtca ccgtccta 348

<210> 11
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Gln Pro Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr Lys
 20 25 30

Val Asp Trp Tyr Gln Leu Arg Pro Gly Lys Gly Pro Arg Phe Val Met
 35 40 45

Arg Val Gly Thr Gly Gly Thr Val Gly Ser Lys Gly Glu Gly Ile Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Val Leu Gly Ser Gly Leu Asn Arg Ser Leu Thr Ile
65 70 75 80

Lys Asn Ile Gln Glu Glu Asp Glu Ser Asp Tyr His Cys Gly Ala Asp
85 90 95

His Gly Ser Gly Ser Asn Phe Val Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys
100 105 110

Val Thr Val Leu
115

<210> 12

<211> 348

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 12

cagcctgagt tgactcagcc accttctgca tcagcctccc tgggagcctc ggtcacactc 60

acctgcaccc tgagcagcgg ctacagtgat tataaagtgg actggtacca gctgagacca 120

gggaagggcc cccggtttgt gatgcgagtg ggcactggtg ggactgttg atccaagggg 180

gaaggcatcc ctgatcgctt ctcagtcttg ggctcaggcc tgaatcggtc cctgaccatc 240

aagaacatcc aggaagagga tgagagtgac taccactgtg gggcagacca tggcagtggg 300

agcaacttcg tgtatgtctt cggaactggg accaaggtca ccgtccta 348

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Asp Ile Gln Leu Thr Pro Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ala Gly Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asp Ser Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

21415

100

105

<210> 14
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 gacatccagt tgaccccgtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca gggatttgcc ggctgggttag cctggatatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctgacagtt tccctccac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 15
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

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

<210> 16
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 gacatccaga tgaccccgtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgtc gggcgagtca gggtattagc agctgggttag cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctagcctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtgtatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccattcac tttcggccct 300
 gggaccaaaag tggatttcaa a 321

<210> 17
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

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

<210> 18
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca gggaagtagc agctggtttg cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc caaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccattcac tttcggccct 300
 gggaccaaaag tggatatcaa a 321

<210> 19
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Asp Ser Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 20
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 20

gacagccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcct ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttggtc gggcgagtca ggggtattagc agctggtttg cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggcaagccc ctaacctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccattcac tttcggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 21
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

<210> 22
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 22

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgggtca gggtattagc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatcg 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gacgattttg caacttacta ttgtcaacag gctaccagtt ttcccctcac ttccggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Phe Ser Gly Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 24
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 24

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggttttagc ggttggttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag gctaacagtt tcccattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Ala Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Val Lys
100 105

<210> 26
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 26

```

gacatccagt tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgtc gggcgagtca gggtattagc agctgggttg cctgggtatca gcagaaacca      120
gggaaagccc ctaacctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct      240
gcagattttg caacttactt ttgtcaacag gctaacagtt tcccattcac tttcggccct      300
gggaccaaag tggatgtcaa a                                           321

```

<210> 27
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

```

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

```

<210> 28
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 28

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcactttgtc gggcgagtca gggtagtagc agctggtttg cctgggtatca acagaaacca 120
 gggaaagccc caaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccattcac tttcggccct 300
 gggaccaaaag tggatatcaa a 321

<210> 29
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29

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

<210> 30
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự liên ứng

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa có thể là Ile hoặc Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)

```

<222> (4)..(4)
<223> Xaa có thể là Met hoặc Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (29)..(29)
<223> Xaa có thể là Gly hoặc Val

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (30)..(30)
<223> Xaa có thể là Ser, Phe hoặc Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (32)..(32)
<223> Xaa có thể là Ser hoặc Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (34)..(34)
<223> Xaa có thể là Phe hoặc Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (43)..(43)
<223> Xaa có thể là Lys hoặc Gln

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (46)..(46)
<223> Xaa có thể là Lys, Asn hoặc Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (67)..(67)
<223> Xaa có thể là Gly hoặc Val

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (71)..(71)
<223> Xaa có thể là Asp hoặc Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (82)..(82)
<223> Xaa có thể là Glu hoặc Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (88)..(88)
<223> Xaa có thể là Tyr hoặc Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (107)..(107)
<223> Xaa có thể là Ile, Val hoặc Phe

```

<400> 30

Asp Xaa Gln Xaa Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Xaa Xaa Ser Xaa
 20 25 30

Trp Xaa Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Xaa Ala Pro Xaa Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Xaa Ser Gly Thr Xaa Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Xaa Asp Phe Ala Thr Tyr Xaa Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Xaa Lys
 100 105

<210> 31

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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 Glu 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 Arg Asp Arg Gly Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Pro Asp Ala Phe Asp
 100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 32

<211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 32

```

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct      120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa tgaatactat      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgg      300
gggtatacca gtagctggta ccctgatgct tttgatatct ggggcccaagg gacaatggtc      360
accgtctctt ca                                                                372

```

<210> 33
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33

```

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 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85              90              95
Ala Arg Asp Arg Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Tyr Pro Asp Ala Phe Asp
100             105             110
Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115             120

```

<210> 34
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

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

<210> 35

<211> 363

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 35

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatttg atggaagtct taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa caccctgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaacgg 300
 actacttttaa gtgggagcta ctttgactac tggggccagg gaaccctggc caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 36

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

<210> 37
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 37

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctgggaggctc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgccca tgcactgggt cgcaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg gttgtcagtt atatcacatg atggaagtat taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaacgg 300
 actactctaa gtgggagcta ctttgactac tggggccagg gaaccctggc caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 38
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Ser Thr Ile Tyr Ile Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Ile Ala Ala Ala Gly Gly Phe His Tyr Tyr Tyr Ala Leu
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 39
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 39

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ctggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagta tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtttcgtac attagtagta ggagtagtac catatacatc 180
 gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agacgaagac acggctgtgt attactgtgc gagacggata 300
 gcagcagctg gtgggttcca ctactactac gctttggacg tctggggcca agggaccacg 360
 gtcaccgtct cctca 375

<210> 40
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Arg Tyr His Ala Asp Ser Val

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

<210> 41
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 41

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacaac ctgggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctatagca tgaactgggt ccgccaggct	120
ccaggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagca gtagtagtac cagataccac	180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctcaactgtat	240
ctgcaaataga acagcctgag agacgaggac acggctgtgt attactgtgc gagacgtata	300
gcagcagctg gtccgtgggg ctactactac gctatggacg tctggggcca agggaccacg	360
gtcaccgtct cctca	375

<210> 42
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

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

Ala Arg Arg Ile Ala Ala Ala Gly Pro Trp Gly Tyr Tyr Tyr Ala Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 43
<211> 375
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 43

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgtag tctctggatt caccttcagt agtttttagca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagtc gtagtagtac catatactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agacgaggac acggctgtgt attattgtgc gagacgtata 300
gcagcagctg gtccgtgggg ctactactac gctatggacg tctggggcca agggaccacg 360
gtcaccgtct cctca 375

<210> 44
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Met Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 45
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 45

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt acttactact ggagctggat ccggcagccc 120
 gccgggaagg gactggagtg gattgggctt atctatacca gtgggagcac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatgtca ttagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aggctgacct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtttatt actgtgagag agatcgtggg 300
 tactactacg gtgtggacgt ctggggccag gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 46
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46

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

<210> 47
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 47

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtt actactggag ctggatccgc      120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggcacatcc attacagtgg gaacacctac      180
tacaaccgct ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaatcagttc      240
tccctgaaac tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgaaaaat      300
cgcggtttct actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca      360

```

<210> 48
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1              5              10              15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Gly
      20              25              30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35              40              45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50              55              60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Gln Asn Gln Phe
65              70              75              80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85              90              95

Cys Ala Arg Asp Arg Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
      100              105              110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115              120

```

<210> 49
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 49

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcaac agtggtgggtt actactggag ctggatccgc      120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagctcctac      180
tacaaccgct ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctca gaaccagttc      240
tcctgaagc  tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagat      300
cgggggcact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca      360

```

<210> 50

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

```

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

```

<210> 51

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 51

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agtggtgggtt actactggag ctggatccgc      120

```

cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacattt attacagtgg gagcacctac 180
 tacaaccggt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagat 300
 cggggccact actatggaat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 52
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52

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

<210> 53
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 53

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccaaga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtga ctccatcagt agttacttct ggagctggat ccggcagccc 120
 ccagggaagg gactggagtg gcttgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca atagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtacgag agatcggggg 300

agctactacg gatctgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca

354

<210> 54
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Ser Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asn Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 55
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 55

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtt actactggac ctggatccgc 120

cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gaacacctac 180

tacaaccgct ccctcaagag tcgaattacc atatcagtgg acacgtctaa gaaccagttc 240

tccctgagcc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagaaat 300

cgcggttact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacgggtcac cgtctcctca 360

<210> 56

<211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 56

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

<210> 57
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 57

caggtgcagc	tcgaggagtc	gggccagga	ctggtgaagc	cttcacagac	cctgtccctc	60
acctgcactg	tctctggtgg	ctccatcagc	agtgggtggt	actactggag	ctggatccgc	120
cagcaccag	ggaagggcct	ggagtggatt	gggtacatct	attacagtgg	gagcacctac	180
tacaaccgct	ccctcaagag	tcgagttacc	atgtcagtag	acacgtctaa	gaaccagttc	240
tccctgaaac	tgagctctgt	gactgccgcg	gacacggccg	tgtattactg	tgcgaaaaat	300
cgcggttct	actacggtat	ggacgtctgg	ggccaaggga	ccacggtcac	cgtctcctca	360

<210> 58
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Arg Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 59
<211> 360
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 59

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtg ctccatcaat agtgggtggtt actactggag ctggatccgc 120
cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggtacatct attacagtgg gagcagctac 180
tacaaccgt ccctcaagag tcgagttacc atatcagttg acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagttctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagat 300
cgggggcact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 60
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

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	Leu	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	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	Glu	Asn	Thr	Val	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
			100					105					110		
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120								

<210>	61
<211>	116
<212>	PRT
<213>	Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên ứng

```
<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (3)..(3)
<223> Xaa có thể là Val hoặc Glu
```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (25)..(25)
<223> Xaa có thể là Asn hoặc Ser

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (38)..(38)
<223> Xaa có thể là Gln hoặc Leu

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (55)..(55)
<223> Xaa có thể là Ile hoặc Thr

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (61)..(61)
<223> Xaa có thể là Asp hoặc Glu

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (77)..(77)
<223> Xaa có thể là Tyr hoặc Ser

```

<220>

<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)

<222> (101)..(101)

<223> Xaa có thể là Ser hoặc Asn

<400> 61

Gln	Pro	Xaa	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Ala
1				5					10					15	

Ser	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Leu	Xaa	Ser	Gly	Tyr	Ser	Asp	Tyr	Lys
			20					25					30		

Val	Asp	Trp	Tyr	Gln	Xaa	Arg	Pro	Gly	Lys	Gly	Pro	Arg	Phe	Val	Met
		35					40					45			

Arg	Val	Gly	Thr	Gly	Gly	Xaa	Val	Gly	Ser	Lys	Gly	Xaa	Gly	Ile	Pro
	50					55					60				

Asp	Arg	Phe	Ser	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Leu	Asn	Arg	Xaa	Leu	Thr	Ile
65					70					75					80

Lys	Asn	Ile	Gln	Glu	Glu	Asp	Glu	Ser	Asp	Tyr	His	Cys	Gly	Ala	Asp
			85						90					95	

His	Gly	Ser	Gly	Xaa	Asn	Phe	Val	Tyr	Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys
			100					105					110		

Val	Thr	Val	Leu
			115

<210> 62

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Thr	Gly	Ala	Gly	Tyr	Asp	Val	His
1				5					10				

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Gly	Ser	Gly	Asn	Arg	Pro	Ser
1			5			

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Trp Val
1 5 10

<210> 65

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Gly Ser Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Met Ile Trp His Ser Ser Ala Ser Val
1 5

<210> 68

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Thr Leu Arg Ser Gly Ile Asn Val Gly Thr Tyr Arg Ile Tyr
1 5 10

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser

21415

1 5 10

<210> 70
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 70

Gly Ala Asp His Gly Ser Gly Ser Asn Phe Val Tyr Val
 1 5 10

<210> 71
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 71

Thr Leu Asn Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr Lys Val
 1 5 10

<210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 72

Val Gly Thr Gly Gly Ile Val Gly Ser Lys Gly Asp
 1 5 10

<210> 73
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 73

Gly Ala Asp His Gly Ser Gly Asn Asn Phe Val Tyr Val
 1 5 10

<210> 74
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74

Thr Leu Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr Lys Val
 1 5 10

<210> 75

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 75

Val Gly Thr Gly Gly Ile Val Gly Ser Lys Gly Glu
 1 5 10

<210> 76
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 76

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr
 1 5

<210> 77
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 77

Arg Ala Ser Gln Gly Phe Ser Gly Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 78
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 78

Val Gly Thr Gly Gly Thr Val Gly Ser Lys Gly Glu
 1 5 10

<210> 79
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 79

Gln Gln Ala Thr Ser Phe Pro Leu Thr
 1 5

<210> 80
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 80

Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 81

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Gln Gln Ala Asp Ser Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 83

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Arg Ala Ser Gln Val Ile Ser Ser Trp Phe Ala
1 5 10

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Arg Ala Ser Gln Gly Ser Ser Ser Trp Phe Ala
1 5 10

<210> 86
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 86

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Phe Ala
 1 5 10

<210> 87
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 87

Arg Ala Gly Gln Val Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 88
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 88

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ala Gly Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 89
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 89

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly
 1 5 10

<210> 90
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 90

Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 91
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 91

Ser Tyr Gly Met His
 1 5

<210> 92
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 92

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 93
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 93

Asp Arg Gly Tyr Thr Ser Ser Trp Tyr Pro Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10 15

<210> 94
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 94

Ser Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 95
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 95

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 96
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 96

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

<210> 97
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 97

Thr	Tyr	Ser	Met	Asn
1				5

<210> 98
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 98

Val	Ile	Ser	Phe	Asp	Gly	Ser	Leu	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 99
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 99

Glu	Arg	Thr	Thr	Leu	Ser	Gly	Ser	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5					10		

<210> 100
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 100

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 101
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 101

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

Gly

<210> 102
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 102

Arg Ile Ala Ala Ala Gly Gly Phe His Tyr Tyr Tyr Ala Leu Asp Val
 1 5 10 15

<210> 103
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 103

Ser Phe Ser Met Asn
 1 5

<210> 104
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 104

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

Gly

<210> 105
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 105

Arg	Ile	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Val
1				5					10					15	

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Ser	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Thr
1				5		

<210> 107

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

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

Gly

<210> 108

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Asn	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
1				5					10

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Ser	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Ser
1				5		

<210> 110

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

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

Gly

<210> 111
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 111

Asn Arg Gly Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 112
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 112

Ser Tyr Phe Trp Ser
 1 5

<210> 113
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 113

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 114
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 114

Asp Arg Gly His Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 115
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 115

Thr Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 116
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 116

His Ile His Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 117
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 117

Asp Arg Gly Ser Tyr Tyr Gly Ser Asp Tyr
1 5 10

<210> 118
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 118

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 119
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 119

Asp Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Val Asp Val
1 5 10

<210> 120
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 120

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 121
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 121

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 122
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 122

Leu Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 123
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự liên ứng

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa có thể là Gly hoặc Val

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa có thể là Ile, Phe hoặc Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa có thể là Ser hoặc Gly

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa có thể là Phe hoặc Leu.

<400> 123

Arg Ala Ser Gln Xaa Ser Xaa Trp Xaa Ala
 1 5 10

<210> 124
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự liên ứng

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa có thể là Asn hoặc Ser

<400> 124

Thr	Leu	Xaa	Ser	Gly	Tyr	Ser	Asp	Tyr	Lys	Val	Asp
1				5					10		

<210> 125
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự liên ứng

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa có thể là Ile hoặc Thr

<400> 125

Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Xaa	Gly	Ala	Gly	Tyr	Asp	Val	His
1				5					10				

<210> 126
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự liên ứng

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa có thể là Ile hoặc Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (12)..(12)

<223> Xaa có thể là Asp hoặc Glu

<400> 126

Val	Gly	Thr	Gly	Gly	Xaa	Val	Gly	Ser	Lys	Gly	Xaa
1				5					10		

<210> 127

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự liên ứng

<220>

<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)

<222> (3)..(3)

<223> Xaa có thể là Asn hoặc Gly

<400> 127

Gly	Ser	Xaa	Asn	Arg	Pro	Ser
1			5			

<210> 128

<211> 13

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự liên ứng

<220>

<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)

<222> (8)..(8)

<223> Xaa có thể là Ser hoặc Asn

<400> 128

Gly	Ala	Asp	His	Gly	Ser	Gly	Xaa	Asn	Phe	Val	Tyr	Val
1				5				10				

<210> 129

<211> 7

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự liên ứng

<220>

<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa có thể là Ser hoặc Thr

<400> 129

Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Xaa
 1 5

<210> 130
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự liên ứng

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa có thể là Gly hoặc Ala

<400> 130

Ser Tyr Xaa Met His
 1 5

<210> 131
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự liên ứng

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa có thể là Ser hoặc Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa có thể là Ser hoặc Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa có thể là Tyr hoặc Phe

<400> 131

Xaa Xaa Ser Met Asn
 1 5

<210> 132
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự liên ứng

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa có thể là Tyr hoặc His

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa có thể là Thr hoặc His

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa có thể là Ser hoặc Asn

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa có thể là Thr hoặc Ser

<400> 132

Xaa	Ile	Xaa	Tyr	Ser	Gly	Xaa	Xaa	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

<210> 133
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự liên ứng

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa có thể là Phe hoặc His

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa có thể là Leu hoặc Thr

<400> 133

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

Gly

<210> 134
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự liên ứng

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa có thể là Arg hoặc Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa có thể là Ile hoặc Arg

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa có thể là Ile, His hoặc Try

<400> 134

Tyr Ile Ser Ser Xaa Ser Ser Thr Xaa Tyr Xaa Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 135
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự liên ứng

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa có thể là Lys hoặc Glu

<400> 135

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 136
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự liên ứng

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa có thể là Asn hoặc Asp

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa có thể là His, Tyr hoặc Phe

<400> 136

Xaa	Arg	Gly	Xaa	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
1				5					10

<210> 137
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự liên ứng

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa có thể là Gly hoặc Phe

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa có thể là Phe hoặc Trp

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa có thể là His hoặc Gly

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa có thể là Leu and Met

<400> 137

Arg Ile Ala Ala Ala Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Tyr Ala Xaa Asp Val
 1 5 10 15

<210> 138
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự liên ứng

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa có thể là Ser hoặc Thr

<400> 138

Asp Arg Gly Tyr Xaa Ser Ser Trp Tyr Pro Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10 15

<210> 139
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự liên ứng

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa có thể là Ile hoặc Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (41)..(41)
 <223> Xaa có thể là Val hoặc Leu

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (54)..(54)
 <223> Xaa có thể là Gly hoặc Asn

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (107)..(107)
 <223> Xaa có thể là Arg hoặc Lys

<400> 139

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

```

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Xaa Gly Ala Gly
      20                      25                      30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Xaa Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
      35                      40                      45

Leu Ile Tyr Gly Ser Xaa Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
      50                      55                      60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
      65                      70                      75                      80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
      85                      90                      95

Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Xaa Arg Leu Thr Val Leu
      100                     105                     110

```

```

<210> 140
<211> 120
<212> PRT
<213> Nhân tạo

```

```

<220>
<223> Trình tự liên ứng

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (30)..(30)
<223> Xaa có thể là And hoặc Ser

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (37)..(37)
<223> Xaa có thể là Ser hoặc Thr

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (52)..(52)
<223> Xaa có thể là Tyr hoặc His

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (54)..(54)
<223> Xaa có thể là Tyr hoặc His

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (58)..(58)
<223> Xaa có thể là Ser hoặc Asn

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (59)..(59)
<223> Xaa có thể là Ser hoặc Asn

```

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (69)..(69)
 <223> Xaa có thể là Ser hoặc Thr

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (71)..(71)
 <223> Xaa có thể là Val hoặc Ile

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (77)..(77)
 <223> Xaa có thể là Ile hoặc Met

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (83)..(83)
 <223> Xaa có thể là Lys hoặc Gln

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (99)..(99)
 <223> Xaa có thể là Arg hoặc Lys

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (100)..(100)
 <223> Xaa có thể là Asp hoặc Asn

<220>
 <221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
 <222> (103)..(103)
 <223> Xaa có thể là His, Phe hoặc Try

<400> 140

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Xaa Ser Gly
 20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Xaa Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Xaa Ile Xaa Tyr Ser Gly Xaa Xaa Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Xaa Thr Xaa Ser Val Asp Thr Ser Xaa Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Xaa Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Xaa Xaa Arg Gly Xaa Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 141
<211> 125
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên ứng

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (23)..(23)
<223> Xaa có thể là Ala hoặc Val

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (24)..(24)
<223> Xaa có thể là Ala hoặc Val

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (31)..(31)
<223> Xaa có thể là Thr hoặc Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (32)..(32)
<223> Xaa có thể là Tyr hoặc Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (54)..(54)
<223> Xaa có thể là Ser hoặc Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (58)..(58)
<223> Xaa có thể là Arg hoặc Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (60)..(60)
<223> Xaa có thể là His, Try hoặc Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (105)..(105)
<223> Xaa có thể là Pro hoặc Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (106)..(106)
<223> Xaa có thể là Trp hoặc Phe

```

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (107)..(107)
<223> Xaa có thể là Gly hoặc His

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (112)..(112)
<223> Xaa có thể là Met hoặc Leu

<400> 141

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Xaa Xaa Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Xaa
20          25          30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

Ser Tyr Ile Ser Ser Xaa Ser Ser Thr Xaa Tyr Xaa Ala Asp Ser Val
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65          70          75          80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95

Ala Arg Arg Ile Ala Ala Ala Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Tyr Ala Xaa
100         105         110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115         120         125

<210> 142
<211> 121
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Trình tự liên ứng

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (33)..(33)
<223> Xaa có thể là Gly hoặc Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)
<222> (48)..(48)
<223> Xaa có thể là Val hoặc Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)

```

<222> (49)..(49)

<223> Xaa có thể là Ala hoặc Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)

<222> (53)..(53)

<223> Xaa có thể là Phe hoặc His

<220>

<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)

<222> (57)..(57)

<223> Xaa có thể là Leu hoặc Ile

<400> 142

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1			5						10					15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		

Xaa	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Xaa
		35					40					45			

Xaa	Val	Ile	Ser	Xaa	Asp	Gly	Ser	Xaa	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	

Ala	Arg	Glu	Arg	Thr	Thr	Leu	Ser	Gly	Ser	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		

Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115					120	

<210> 143

<211> 124

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự liên ứng

<220>

<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)

<222> (58)..(58)

<223> Xaa có thể là Glu hoặc Lys

<220>

<221> MISC_FEATURE (ĐẶC ĐIỂM QUAN TRỌNG CHƯA MÔ TẢ ĐƯỢC)

<222> (103)..(103)

<223> Xaa có thể là Thr hoặc Ser

<400> 143

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 Xaa 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 Arg Asp Arg Gly Tyr Xaa Ser Ser Trp Tyr Pro Asp Ala Phe Asp
 100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 144

<211> 1026

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 144

aactcgggtga acaactgagg gaaccaaacc agagacgcgc tgaacagaga gaatcaggct 60
 caaagcaagt ggaagtgggc agagattcca ccaggactgg tgcaaggcgc agagccagcc 120
 agatttgaga agaaggcaaa aagatgctgg ggagcagagc tgtaatgctg ctgttgctgc 180
 tgccctggac agctcagggc agagctgtgc ctgggggcag cagccctgcc tggactcagt 240
 gccagcagct ttcacagaag ctctgcacac tggcctggag tgcacatcca ctagtgggac 300
 acatggatct aagagaagag ggagatgaag agactacaaa tgatgttccc catatccagt 360
 gtggagatgg ctgtgacccc caaggactca gggacaacag tcagttctgc ttgcaaagga 420
 tccaccaggg tctgattttt tatgagaagc tgctaggatc ggatattttc acagggggagc 480
 cttctctgct ccctgatagc cctgtggggc agcttcatgc ctccctactg ggcctcagcc 540
 aactcctgca gcctgagggt caccactggg agactcagca gattccaagc ctcagtccca 600
 gccagccatg gcagcgtctc cttctccgct tcaaaatcct tcgcagcctc caggcctttg 660

```

tggctgtagc cgcccgggtc ttgcccattg gagcagcaac cctgagtccc taaaggcagc      720
agctcaagga tggcactcag atctccatgg ccagcaagg ccaagataaa tctaccaccc      780
caggcacctg tgagccaaca ggttaattag tccattaatt ttagtgggac ctgcatatgt      840
tgaaaattac caatactgac tgacatgtga tgctgaccta tgataaggtt gagtatttat      900
tagatgggaa gggaaatttg gggattatatt atcctcctgg ggacagtttg gggaggatta      960
tttattgtat ttatattgaa ttatgtactt ttttcaataa agtcttattt ttgtggctaa     1020
aaaaaa                                           1026

```

```

<210> 145
<211> 189
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 145

```

```

Met Leu Gly Ser Arg Ala Val Met Leu Leu Leu Leu Leu Pro Trp Thr
1              5              10              15

Ala Gln Gly Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln
                20              25              30

Cys Gln Gln Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His
                35              40              45

Pro Leu Val Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr
    50              55              60

Thr Asn Asp Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln
65              70              75              80

Gly Leu Arg Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly
                85              90              95

Leu Ile Phe Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu
    100              105              110

Pro Ser Leu Leu Pro Asp Ser Pro Val Gly Gln Leu His Ala Ser Leu
    115              120              125

Leu Gly Leu Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr
    130              135              140

Gln Gln Ile Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu
145              150              155              160

Leu Arg Phe Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala
                165              170              175

Ala Arg Val Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro
    180              185

```

<210> 146
 <211> 1399
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 146

```

ctgttttcagg gccattggac tctccgtcct gccagagca agatgtgtca ccagcagttg      60
gtcatctctt gggtttccct gggttttctg gcatctcccc tcgtggccat atgggaactg      120
aagaaagatg tttatgtcgt agaattggat tggatatccg atgcccctgg agaaatggtg      180
gtcctcacct gtgacacccc tgaagaagat ggtatcacct ggaccttga ccagagcagt      240
gaggtcttag gctctggcaa aaccctgacc atccaagtca aagagtttgg agatgctggc      300
cagtacacct gtcacaaagg aggcgaggtt ctaagccatt cgctcctgct gcttcacaaa      360
aaggaagatg gaatttggtc cactgatatt ttaaaggacc agaaagaacc caaaaataag      420
acctttctaa gatgcgaggc caagaattat tctggacgtt tcacctgctg gtggctgacg      480
acaatcagta ctgatttgac attcagtgtc aaaagcagca gaggctcttc tgacccccaa      540
ggggtgacgt gcggagctgc tacactctct gcagagagag tcagagggga caacaaggag      600
tatgagtact cagtggagtg ccaggaggac agtgccctgcc cagctgctga ggagagtctg      660
cccattgagg tcatggtgga tgccgttcac aagctcaagt atgaaaacta caccagcagc      720
ttcttcatca gggacatcat caaacctgac ccaccaaga acttgacgt gaagccatta      780
aagaattctc ggcaggtgga ggtcagctgg gagtaccctg acacctggag tactccacat      840
tcctacttct ccctgacatt ctgcgttcag gtccagggca agagcaagag agaaaagaaa      900
gatagagtct tcacggacaa gacctcagcc acggtcatct gccgcaaaaa tgccagcatt      960
agcgtgcggg cccaggaccg ctactatagc tcatcttgga gcgaatgggc atctgtgccc     1020
tgcagttagg ttctgatcca ggatgaaaat ttggaggaaa agtggaagat attaagcaaa     1080
atgttttaaag acacaacgga atagacccaa aaagataatt tctatctgat ttgctttaaa     1140
acgttttttt aggatcacia tgatatcttt gctgtatttg tatagttaga tgctaaatgc     1200
tcattgaaac aatcagctaa tttatgtata gatcttccag ctctcaagtt gccatgggcc     1260
ttcatgctat ttaaataatt aagtaattta tgtatttatt agtatattac tgttatttaa     1320
cgtttgtctg ccaggatgta tggaatgttt catactctta tgacctgatc catcaggatc     1380
agtccttatt atgcaaaat                                     1399

```

<210> 147
 <211> 328

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

```

Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
1          5          10          15

Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
20          25          30

Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
35          40          45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
50          55          60

Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys
65          70          75          80

Glu Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val
85          90          95

Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp
100         105         110

Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe
115         120         125

Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp
130         135         140

Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg
145         150         155         160

Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser
165         170         175

Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu
180         185         190

Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
195         200         205

Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr
210         215         220

Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
225         230         235         240

Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
245         250         255

Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
260         265         270

Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
275         280         285

```

Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
 290 295 300

Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
 305 310 315 320

Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
 325

<210> 148
 <211> 2826
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 148

```

acaaggggtgg cagcctggct ctgaagtgga attatgtgct tcaaacaggt tgaaagaggg      60
aaacagtctt ttctgtctc cagacatgaa tcaggctcact attcaatggg atgcagtaat      120
agccctttac atactcttca gctgggtgtca tggaggaatt acaaataaa actgctctgg      180
ccacatctgg gtagaaccag ccacaatttt taagatgggt atgaatatct ctatatattg      240
ccaagcagca attaagaact gccaaccaag gaaacttcat ttttataaaa atggcatcaa      300
agaaagattt caaatcacia ggattaataa aacaacagct cggctttggg ataaaaactt      360
tctggaacca catgcttcta tgtactgcac tgctgaatgt cccaacatt ttcaagagac      420
actgatatgt ggaaaagaca tttcttctgg atatccgcca gatattcctg atgaagtaac      480
ctgtgtcatt tatgaatatt caggcaacat gacttgcacc tggaatgctg ggaagctcac      540
ctacatagac aaaaaatagc tggtagatgt gaagagttta gagacagaag aagagcaaca      600
gtatctcacc tcaagctata ttaacatctc cactgattca ttacaagggt gcaagaagta      660
cttggtttgg gtccaagcag caaacgcact aggcattggaa gagtcaaaac aactgcaaatt      720
tcacctggat gatatagtga taccttctgc agccgtcatt tccagggtctg agactataaa      780
tgctacagtg cccaagacca taattttatt ggatagtcaa acaacaattg aaaaggtttc      840
ctgtgaaatg agatacaagg ctacaacaaa ccaacttgg aatgttaaag aatttgacac      900
caattttaca tatgtgcaac agtcagaatt ctacttggag ccaaacatta agtacgtatt      960
tcaagtgaga tgtcaagaaa caggcaaaaag gtactggcag ccttggagtt cactgttttt      1020
tcataaaaca cctgaaacag ttccccaggc cacatcaaaa gcattccaac atgacacatg      1080
gaattctggg ctaacagttg cttccatctc tacagggcac cttacttctg acaacagagg      1140
agacattgga cttttattgg gaatgatcgt ctttgctgtt atgttgtcaa ttctttcttt      1200
gattgggata ttaacagat cattccgaac tgggattaaa agaaggatct tattgttaat      1260

```

accaaagtgg ctttatgaag atattcctaa tatgaaaaac agcaatgttg tgaaaatgct	1320
acaggaaaat agtgaactta tgaataataa ttccagtgag caggtcctat atgttgatcc	1380
catgattaca gagataaaaag aaatcttcat cccagaacac aagcctacag actacaagaa	1440
ggagaataca ggacccctgg agacaagaga ctacccgcaa aactcgctat tcgacaatac	1500
tacagttgta tatattcctg atctcaacac tggatataaa ccccaaattt caaattttct	1560
gcctgagggg agccatctca gcaataataa tgaaattact tccttaacac ttaaaccacc	1620
agttgattcc ttagactcag gaaataatcc caggttacaa aagcatccta attttgcttt	1680
ttctgtttca agtgtgaatt cactaagcaa cacaatattt cttggagaat taagcctcat	1740
attaaatcaa ggagaatgca gttctcctga cataaaaaac tcagtagagg aggaaaccac	1800
catgcttttg gaaaatgatt caccagtgga aactattcca gaacagaccc tgcttcctga	1860
tgaatttgtc tcctgttttg ggatcgtgaa tgaggagttg ccatctatta atacttattt	1920
tccacaaaat attttggaag gccacttcaa taggatttca ctcttggaag agtagagctg	1980
tgtgggtcaa atcaatatga gaaagctgcc ttgcaatctg aacttgggtt ttccctgcaa	2040
tagaaattga attctgcctc tttttgaaaa aaatgtattc acatacaaat cttcacatgg	2100
acacatgttt tcatttcctt tggataaata cctaggtagg ggattgctgg gccatatgat	2160
aagcatatgt ttcagttcta ccaatcttgt ttccagagta gtgacatttc tgtgctccta	2220
ccatcaccat gtaagaattc ccgggagctc catgcctttt taatttttagc cattcttctg	2280
cctcatttct taaaattaga gaattaaggt cccgaaggtg gaacatgctt catgggtcaca	2340
catacaggca caaaaacagc attatgtgga cgcctcatgt attttttata gagtcaacta	2400
tttctctttt attttccctc attgaaagat gcaaaaacagc tctctattgt gtacagaaag	2460
ggtaaataat gcaaaatacc tggtagtaaa ataaatgctg aaaattttcc tttaaaatag	2520
aatcattagg ccaggcgtgg tggctcatgc ttgtaatccc agcactttgg taggctgagg	2580
taggtggatc acctgaggtc aggagttcga gtccagcctg gccaatatgc tgaaaccctg	2640
tctctactaa aattacaaaa attagccggc catggtggca ggtgcttgta atcccagcta	2700
cttgggaggc tgaggcagga gaatcacttg aaccaggaag gcagagggtg cactgagctg	2760
agattgtgcc actgcactcc agcctgggca acaagagcaa aactctgtct ggaaaaaaaa	2820
aaaaaa	2826

<210> 149

<211> 629

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

```

Met Asn Gln Val Thr Ile Gln Trp Asp Ala Val Ile Ala Leu Tyr Ile
1          5          10          15

Leu Phe Ser Trp Cys His Gly Gly Ile Thr Asn Ile Asn Cys Ser Gly
20          25          30

His Ile Trp Val Glu Pro Ala Thr Ile Phe Lys Met Gly Met Asn Ile
35          40          45

Ser Ile Tyr Cys Gln Ala Ala Ile Lys Asn Cys Gln Pro Arg Lys Leu
50          55          60

His Phe Tyr Lys Asn Gly Ile Lys Glu Arg Phe Gln Ile Thr Arg Ile
65          70          75          80

Asn Lys Thr Thr Ala Arg Leu Trp Tyr Lys Asn Phe Leu Glu Pro His
85          90          95

Ala Ser Met Tyr Cys Thr Ala Glu Cys Pro Lys His Phe Gln Glu Thr
100         105         110

Leu Ile Cys Gly Lys Asp Ile Ser Ser Gly Tyr Pro Pro Asp Ile Pro
115         120         125

Asp Glu Val Thr Cys Val Ile Tyr Glu Tyr Ser Gly Asn Met Thr Cys
130         135         140

Thr Trp Asn Ala Gly Lys Leu Thr Tyr Ile Asp Thr Lys Tyr Val Val
145         150         155         160

His Val Lys Ser Leu Glu Thr Glu Glu Glu Gln Gln Tyr Leu Thr Ser
165         170         175

Ser Tyr Ile Asn Ile Ser Thr Asp Ser Leu Gln Gly Gly Lys Lys Tyr
180         185         190

Leu Val Trp Val Gln Ala Ala Asn Ala Leu Gly Met Glu Glu Ser Lys
195         200         205

Gln Leu Gln Ile His Leu Asp Asp Ile Val Ile Pro Ser Ala Ala Val
210         215         220

Ile Ser Arg Ala Glu Thr Ile Asn Ala Thr Val Pro Lys Thr Ile Ile
225         230         235         240

Tyr Trp Asp Ser Gln Thr Thr Ile Glu Lys Val Ser Cys Glu Met Arg
245         250         255

Tyr Lys Ala Thr Thr Asn Gln Thr Trp Asn Val Lys Glu Phe Asp Thr
260         265         270

Asn Phe Thr Tyr Val Gln Gln Ser Glu Phe Tyr Leu Glu Pro Asn Ile
275         280         285

```

Lys Tyr Val Phe Gln Val Arg Cys Gln Glu Thr Gly Lys Arg Tyr Trp
 290 295 300
 Gln Pro Trp Ser Ser Leu Phe Phe His Lys Thr Pro Glu Thr Val Pro
 305 310 315 320
 Gln Val Thr Ser Lys Ala Phe Gln His Asp Thr Trp Asn Ser Gly Leu
 325 330 335
 Thr Val Ala Ser Ile Ser Thr Gly His Leu Thr Ser Asp Asn Arg Gly
 340 345 350
 Asp Ile Gly Leu Leu Leu Gly Met Ile Val Phe Ala Val Met Leu Ser
 355 360 365
 Ile Leu Ser Leu Ile Gly Ile Phe Asn Arg Ser Phe Arg Thr Gly Ile
 370 375 380
 Lys Arg Arg Ile Leu Leu Leu Ile Pro Lys Trp Leu Tyr Glu Asp Ile
 385 390 395 400
 Pro Asn Met Lys Asn Ser Asn Val Val Lys Met Leu Gln Glu Asn Ser
 405 410 415
 Glu Leu Met Asn Asn Asn Ser Ser Glu Gln Val Leu Tyr Val Asp Pro
 420 425 430
 Met Ile Thr Glu Ile Lys Glu Ile Phe Ile Pro Glu His Lys Pro Thr
 435 440 445
 Asp Tyr Lys Lys Glu Asn Thr Gly Pro Leu Glu Thr Arg Asp Tyr Pro
 450 455 460
 Gln Asn Ser Leu Phe Asp Asn Thr Thr Val Val Tyr Ile Pro Asp Leu
 465 470 475 480
 Asn Thr Gly Tyr Lys Pro Gln Ile Ser Asn Phe Leu Pro Glu Gly Ser
 485 490 495
 His Leu Ser Asn Asn Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Leu Lys Pro Pro
 500 505 510
 Val Asp Ser Leu Asp Ser Gly Asn Asn Pro Arg Leu Gln Lys His Pro
 515 520 525
 Asn Phe Ala Phe Ser Val Ser Ser Val Asn Ser Leu Ser Asn Thr Ile
 530 535 540
 Phe Leu Gly Glu Leu Ser Leu Ile Leu Asn Gln Gly Glu Cys Ser Ser
 545 550 555 560
 Pro Asp Ile Gln Asn Ser Val Glu Glu Glu Thr Thr Met Leu Leu Glu
 565 570 575
 Asn Asp Ser Pro Ser Glu Thr Ile Pro Glu Gln Thr Leu Leu Pro Asp
 580 585 590
 Glu Phe Val Ser Cys Leu Gly Ile Val Asn Glu Glu Leu Pro Ser Ile

595	600	605	
Asn Thr Tyr Phe Pro Gln Asn Ile Leu Glu Ser His Phe Asn Arg Ile			
610	615	620	
Ser Leu Leu Glu Lys			
625			

<210> 150
 <211> 2100
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 150

```

ggtggctgaa cctcgcaggt ggcagagagg ctcccctggg gctgtggggc tctacgtgga      60
tccgatggag ccgctggtga cctgggtggt cccctcctc ttctcttcc tgctgtccag      120
gcagggcgct gcctgcagaa ccagtgaagt ctgttttcag gacccgccat atccggatgc      180
agactcaggc tcggcctcgg gccctagga cctgagatgc tatcggatat ccagtgatcg      240
ttacgagtgc tcctggcagt atgaggggtcc cacagctggg gtcagccact tcctgcggtg      300
ttgccttagc tccgggcgct gctgctactt cgccgccggc tcagccacca ggctgcagtt      360
ctccgaccag gctggggtgt ctgtgctgta cactgtcaca ctctgggtgg aatcctgggc      420
caggaaccag acagagaagt ctctgaggt gaccctgcag ctctacaact cagttaaata      480
tgagcctcct ctgggagaca tcaaggtgtc caagttggcc gggcagctgc gtatggagtg      540
ggagaccccg gataaccagg ttggtgctga ggtgcagttc cggcaccgga caccagcag      600
cccatggaag ttgggcgact gcggacctca ggatgatgat actgagtcct gcctctgccc      660
cctggagatg aatgtggccc aggaattcca gctccgacga cggcagctgg ggagccaagg      720
aagttcctgg agcaagtgga gcagccccgt gtgcgttccc cctgaaaacc cccacagcc      780
tcaggtgaga ttctcgggtg agcagctggg ccaggatggg aggaggcggc tgaccctgaa      840
agagcagcca acccagctgg agcttccaga aggctgtcaa gggctggcgc ctggcacgga      900
ggtcacttac cgactacagc tccacatgct gtctgcccg tgtaaggcca aggccaccag      960
gaccctgcac ctggggaaga tgccctatct ctcggtgct gcctacaacg tggctgtcat     1020
ctcctcgaac caatttggtc ctggcctgaa ccagacgtgg cacattcctg ccgacacca     1080
cacagaacca gtggctctga atatcagcgt cggaaccaac gggaccacca tgtattggcc     1140
agcccgggct cagagcatga cgtattgcat tgaatggcag cctgtgggcc aggacggggg     1200
ccttgccacc tgcagcctga ctgcgccgca agaccggat ccggctggaa tggcaacct     1260
  
```

cagctggagt cgagagtctg gggcaatggg gcaggaaaag tggtactaca ttaccatctt 1320
 tgcctctgcg caccgccaga agctcacctt gtggtctacg gtcctgtcca cctaccactt 1380
 tggggggcaat gcctcagcag ctgggacacc gcaccacgtc tcggtgaaga atcatagctt 1440
 ggactctgtg tctgtggact gggcaccatc cctgctgagc acctgtcccg gcgtcctaaa 1500
 ggagtatgtt gtccgctgcc gagatgaaga cagcaaacag gtgtcagagc atcccgtgca 1560
 gccacagag acccaagtta ccctcagtgg cctgcgggct ggtgtagcct acacggtgca 1620
 ggtgcgagca gacacagcgt ggctgagggg tgtctggagc cagccccagc gcttcagcat 1680
 cgaagtgcag gtttctgatt ggctcatctt ctgcgctcc ctggggagct tcctgagcat 1740
 ccttctctgtg ggcgtccttg gctaccttg cctgaacagg gccgcacggc acctgtgccc 1800
 gccgctgccc acaccctgtg ccagctccgc cattgagttc cctggaggga aggagacttg 1860
 gcagtggatc aaccctgtg acttccagga agaggcatcc ctgcaggagg ccctggtggt 1920
 agagatgtcc tgggacaaaag gcgagaggac tgagcctctc gagaagacag agctacctga 1980
 ggggtcccct gagctggccc tggatacaga gttgtccttg gaggatggag acaggtgcaa 2040
 ggccaagatg tgatcgttga ggctcagaga gggtagtgta ctgcccag gctacgtagc 2100

<210> 151

<211> 662

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 151

Met Glu Pro Leu Val Thr Trp Val Val Pro Leu Leu Phe Leu Phe Leu
1 5 10 15

Leu Ser Arg Gln Gly Ala Ala Cys Arg Thr Ser Glu Cys Cys Phe Gln
20 25 30

Asp Pro Pro Tyr Pro Asp Ala Asp Ser Gly Ser Ala Ser Gly Pro Arg
35 40 45

Asp Leu Arg Cys Tyr Arg Ile Ser Ser Asp Arg Tyr Glu Cys Ser Trp
50 55 60

Gln Tyr Glu Gly Pro Thr Ala Gly Val Ser His Phe Leu Arg Cys Cys
65 70 75 80

Leu Ser Ser Gly Arg Cys Cys Tyr Phe Ala Ala Gly Ser Ala Thr Arg
85 90 95

Leu Gln Phe Ser Asp Gln Ala Gly Val Ser Val Leu Tyr Thr Val Thr
100 105 110

Leu Trp Val Glu Ser Trp Ala Arg Asn Gln Thr Glu Lys Ser Pro Glu
115 120 125

Val	Thr	Leu	Gln	Leu	Tyr	Asn	Ser	Val	Lys	Tyr	Glu	Pro	Pro	Leu	Gly	130	135	140
Asp	Ile	Lys	Val	Ser	Lys	Leu	Ala	Gly	Gln	Leu	Arg	Met	Glu	Trp	Glu	145	150	155
Thr	Pro	Asp	Asn	Gln	Val	Gly	Ala	Glu	Val	Gln	Phe	Arg	His	Arg	Thr	165	170	175
Pro	Ser	Ser	Pro	Trp	Lys	Leu	Gly	Asp	Cys	Gly	Pro	Gln	Asp	Asp	Asp	180	185	190
Thr	Glu	Ser	Cys	Leu	Cys	Pro	Leu	Glu	Met	Asn	Val	Ala	Gln	Glu	Phe	195	200	205
Gln	Leu	Arg	Arg	Arg	Gln	Leu	Gly	Ser	Gln	Gly	Ser	Ser	Trp	Ser	Lys	210	215	220
Trp	Ser	Ser	Pro	Val	Cys	Val	Pro	Pro	Glu	Asn	Pro	Pro	Gln	Pro	Gln	225	230	235
Val	Arg	Phe	Ser	Val	Glu	Gln	Leu	Gly	Gln	Asp	Gly	Arg	Arg	Arg	Leu	245	250	255
Thr	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Thr	Gln	Leu	Glu	Leu	Pro	Glu	Gly	Cys	Gln	260	265	270
Gly	Leu	Ala	Pro	Gly	Thr	Glu	Val	Thr	Tyr	Arg	Leu	Gln	Leu	His	Met	275	280	285
Leu	Ser	Cys	Pro	Cys	Lys	Ala	Lys	Ala	Thr	Arg	Thr	Leu	His	Leu	Gly	290	295	300
Lys	Met	Pro	Tyr	Leu	Ser	Gly	Ala	Ala	Tyr	Asn	Val	Ala	Val	Ile	Ser	305	310	315
Ser	Asn	Gln	Phe	Gly	Pro	Gly	Leu	Asn	Gln	Thr	Trp	His	Ile	Pro	Ala	325	330	335
Asp	Thr	His	Thr	Glu	Pro	Val	Ala	Leu	Asn	Ile	Ser	Val	Gly	Thr	Asn	340	345	350
Gly	Thr	Thr	Met	Tyr	Trp	Pro	Ala	Arg	Ala	Gln	Ser	Met	Thr	Tyr	Cys	355	360	365
Ile	Glu	Trp	Gln	Pro	Val	Gly	Gln	Asp	Gly	Gly	Leu	Ala	Thr	Cys	Ser	370	375	380
Leu	Thr	Ala	Pro	Gln	Asp	Pro	Asp	Pro	Ala	Gly	Met	Ala	Thr	Tyr	Ser	385	390	395
Trp	Ser	Arg	Glu	Ser	Gly	Ala	Met	Gly	Gln	Glu	Lys	Cys	Tyr	Tyr	Ile	405	410	415
Thr	Ile	Phe	Ala	Ser	Ala	His	Pro	Glu	Lys	Leu	Thr	Leu	Trp	Ser	Thr	420	425	430

Val Leu Ser Thr Tyr His Phe Gly Gly Asn Ala Ser Ala Ala Gly Thr
 435 440 445
 Pro His His Val Ser Val Lys Asn His Ser Leu Asp Ser Val Ser Val
 450 455 460
 Asp Trp Ala Pro Ser Leu Leu Ser Thr Cys Pro Gly Val Leu Lys Glu
 465 470 475 480
 Tyr Val Val Arg Cys Arg Asp Glu Asp Ser Lys Gln Val Ser Glu His
 485 490 495
 Pro Val Gln Pro Thr Glu Thr Gln Val Thr Leu Ser Gly Leu Arg Ala
 500 505 510
 Gly Val Ala Tyr Thr Val Gln Val Arg Ala Asp Thr Ala Trp Leu Arg
 515 520 525
 Gly Val Trp Ser Gln Pro Gln Arg Phe Ser Ile Glu Val Gln Val Ser
 530 535 540
 Asp Trp Leu Ile Phe Phe Ala Ser Leu Gly Ser Phe Leu Ser Ile Leu
 545 550 555 560
 Leu Val Gly Val Leu Gly Tyr Leu Gly Leu Asn Arg Ala Ala Arg His
 565 570 575
 Leu Cys Pro Pro Leu Pro Thr Pro Cys Ala Ser Ser Ala Ile Glu Phe
 580 585 590
 Pro Gly Gly Lys Glu Thr Trp Gln Trp Ile Asn Pro Val Asp Phe Gln
 595 600 605
 Glu Glu Ala Ser Leu Gln Glu Ala Leu Val Val Glu Met Ser Trp Asp
 610 615 620
 Lys Gly Glu Arg Thr Glu Pro Leu Glu Lys Thr Glu Leu Pro Glu Gly
 625 630 635 640
 Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp Thr Glu Leu Ser Leu Glu Asp Gly Asp
 645 650 655
 Arg Cys Lys Ala Lys Met
 660

<210> 152
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 152

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtt actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggcacatcc attacagtgg gaacacctac 180

tacaaccggt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaatcagttc 240

tccctgaaac tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgcgaaat 300

cgcggttct actacggtat ggacgtctgg ggccaagga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 153

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 153

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly His Ile His Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Asn Arg Gly Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 154

<211> 23

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tín hiệu melittin ong mật

<400> 154

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala Ala Ala
20

<210> 155

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đuôi His

<400> 155

His His His His His His

1

5

1