



(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)



1-0023969

(51)⁷ C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2011-02667

(22) 16/03/2010

(86) PCT/US2010/027422 16/03/2010

(87) WO2010/107752 23/09/2010

(30) 61/162,154 20/03/2009 US; 61/306,829 22/02/2010 US

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/07/2012 292A

(73) Amgen Inc. (US)

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

(72) HSU, Hailing (US); FOLTZ, Ian (CA); ARORA, Taruna (IN); JACOBSEN,
Frederick, W. (US)

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

(54) PROTEIN LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN ĐẶC HIỆU DỊ ĐIME ALPHA4BETA7
VÀ CHẾ PHẨM CHỨA PROTEIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị đime alpha4beta7, axit nucleic mã hoá protein này, vector, tế bào chủ, phương pháp sản xuất protein này và chế phẩm chứa protein này.

Lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm và phương pháp liên quan đến protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị đime $\alpha 4\beta 7$.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Integrin là protein xuyên màng typ I dị đime được tạo thành từ hai cấu trúc dưới phân tử (một cấu trúc dưới phân tử α và một cấu trúc dưới phân tử β) và điều tiết nhiều loại tương tác tế bào-tế bào và tế bào-cơ chất ngoại bào khác nhau. Về mặt chức năng, integrin được biết là tham gia vào nhiều quy trình sinh học khác nhau, bao gồm quá trình di chuyển và lưu thông bạch cầu và đáp ứng miễn dịch. Ở động vật có vú, có 18 cấu trúc dưới phân tử α đã biết và 8 cấu trúc dưới phân tử β đã biết, các cấu trúc này kết hợp với nhau tạo thành 24 integrin riêng biệt. Tính đặc hiệu phối tử được xác định phần lớn là theo các tổ hợp cụ thể của các cấu trúc dưới phân tử α và β được biểu hiện, trong khi ái lực với phối tử được điều biến bởi sự thay đổi cấu dạng của integrin và phụ thuộc vào cation hóa trị hai.

Các phối tử của integrin tạo thành các nhóm đa dạng về cấu trúc bao gồm protein cơ chất ngoại bào như collagen, fibronectin, vitronectin và laminin; các đối thụ thể như phân tử bám dính tế bào (ví dụ, phân tử bám dính tế bào mạch máu hay VCAM (vascular cellular adhesion molecule)) và protein huyết tương. Nhiều vi sinh vật gây bệnh cũng sử dụng integrin để bắt đầu việc gây nhiễm hoặc làm vị trí để liên kết độc tố. Các phối tử đa dạng về cấu trúc có chung gốc axit glutamic hoặc aspartic lộ ra ngoài, thường có mặt trong vòng linh động mở rộng, đóng vai trò quan trọng trong việc nhận biết bởi integrin.

Integrin $\alpha 4$ ($\alpha 4$ được kết hợp với cấu trúc dưới phân tử $\beta 1$ hoặc $\beta 7$) đóng vai trò quan trọng trong hệ miễn dịch. $\alpha 4\beta 1$ được biểu hiện ở lympho bào và tế bào u tủy; nó có vẻ là thành phần liên kết chính với phân tử bám dính tế bào mạch máu (VCAM). VCAM được biểu hiện khắp nơi trên nội mạc mạch máu, được điều hòa tăng trong quá trình viêm và liên kết với $\alpha 4\beta 7$ cũng như $\alpha 4\beta 1$ (mặc dù yếu đối với $\alpha 4\beta 7$). Mặc dù cũng được phát hiện ở tế bào

T, tế bào B, tế bào NK và tế bào ưa eosin ngoại biên, nhưng alpha4beta7 được biểu hiện ở mức cao nhất ở phân nhóm tế bào T nhớ CD4+CD45RA mà đã được chứng minh là khu trú ưu tiên ở ruột. Phôi tử chính của dị dime alpha4beta7 là phân tử bám dính tế bào addressin màng nhày loại 1 (MAdCAM-1 hoặc MAdCAM), được biểu hiện ở nội mạc ruột.

Ngoài việc ghép cặp với chuỗi alpha4, cấu trúc dưới phân tử beta7 cũng ghép cặp với alphaE để tạo thành alphaEbета7, được biểu hiện chủ yếu ở lympho bào nội biểu mô (IEL) trong ruột, phổi và đường sinh dục-niệu. AlphaEbета7 cũng được biểu hiện ở tế bào đuôi gai trong ruột. Dị dime alphaEbета7 liên kết với E-cadherin, được biểu hiện ở các tế bào biểu mô. Tế bào IEL được cho là tạo ra cơ chế giám sát miễn dịch trong khoang biểu mô.

Các kháng thể liên kết với alpha4 và ức chế sự liên kết của alpha4beta1 với VCAM-1 và fibronectin tạo thành vùng 52 axit amin của alpha4, giữa các gốc 152 và 203 (Schiffer et al., J. Biol. Chem. 270:14270; 1995). Tidswell và cộng sự (J. Immunol. 159:1497; 1997) đã xác định được rằng miền beta7 đóng vai trò quan trọng trong việc liên kết với MAdCAM-1, bằng cách sử dụng bảng kháng thể liên kết beta7 trong phương pháp tiếp cận cấu trúc dưới phân tử beta7 khảm chuột/người. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng sáu trong số bảy kháng thể ức chế việc liên kết với MAdCAM-1 và E-cadherin tạo thành vùng bao gồm các axit amin từ 176 đến 250, mà có vẻ như có sự tương đồng với vị trí bám dính phụ thuộc ion kim loại (MIDAS) của các cấu trúc dưới phân tử integrin khác. Một trong số các kháng thể được Tidswell et al. sử dụng là kháng thể đặc hiệu dị dime alpha4beta7 được gọi là ACT-1.

Kháng thể ACT-1 được mô tả đầu tiên bởi Lazarovitz và cộng sự (J. Immunol. 133:1857; 1984) dưới dạng kháng thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch chuột nhất bằng dòng tế bào lympho T đặc hiệu giải độc tổ uốn ván ở người từ PBMC. Sau đó, ACT-1 được chứng minh là liên kết đặc hiệu với dị dime alpha4beta7 (Schweighoffer et al., J. Immunol. 151:717, 1993). Trong khi ACT-1 không liên kết với alpha4beta7 của chuột, thì nó lại liên kết với alpha4beta7 của ít nhất một số loài động vật linh trưởng không phải là người và được chứng minh là làm giảm bệnh viêm kết tràng tự phát ở khi sóc đầu bông bị nhốt (Hesterberg et al., Gastroenterology 111:1373; 1996).

ACT-1 được làm giống như của người và được đánh giá là chất trị liệu bệnh viêm loét đại tràng cho người (Feagan et al., N Engl J Med. 352:2499; 2005), và gần đây là cả bệnh Crohn (Feagan et al, Clinical Gastroenterology and Hepatology, 6:1370, 2008). ACT-1 được làm giống như của người, còn được gọi là vedolizumab, được mô tả trong WO 98/06248 và patent Mỹ số 7,147,85, cũng như WO 07/061679 và patent Mỹ số 2007-0122404. Kháng thể được làm giống như của người khác, natalizumab (Tysabri®), được sử dụng để điều trị bệnh Crohn. Natalizumab là dạng được làm giống như của người của kháng thể của chuột đặc hiệu alpha4. Vedolizumab được cho thấy là gây ra đáp ứng kháng kháng thể được làm giống như của người trung tính ở một tỷ lệ bệnh nhân và natalizumab liên quan đến bệnh lý não chất trắng đa ổ tiến triển (progressive multifocal leukoencephalopathy-PML), loại rối loạn thần kinh liên quan đến sự tái hoạt hóa khi nhiễm virus JC ở đối tượng bị suy giảm miễn dịch. Do đó, vẫn cần có hợp chất có tác dụng trị liệu giúp cải thiện các nhược điểm này đồng thời phá vỡ con đường alpha4beta7/MAdCAM-1.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên được phân lập liên kết đặc hiệu với alpha4beta7 của người (nghĩa là, protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị thể alpha4beta7). Theo khía cạnh khác của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên này liên kết đặc hiệu với alpha4beta7 của động vật linh trưởng không phải là người, khỉ cynomologous, a tinh tinh, động vật có vú không phải động vật linh trưởng, loài gặm nhấm, chuột nhắt, chuột cống, chuột đồng, chuột lang, mèo hoặc chó. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên được phân lập bao gồm kháng thể của người; kháng thể khảm; kháng thể đơn dòng; kháng thể tái tổ hợp; mảnh kháng thể liên kết kháng nguyên; kháng thể chuỗi đơn; mảnh kháng thể đặc hiệu hai vị trí; mảnh kháng thể có ba vị trí đặc hiệu; mảnh kháng thể có bốn vị trí đặc hiệu; mảnh Fab; mảnh F(ab')₂; kháng thể miễn; kháng thể IgD; kháng thể IgE; kháng thể IgM; kháng thể IgG1; kháng thể IgG2; kháng thể IgG3; kháng thể IgG4; hoặc kháng thể IgG4 có ít nhất một đột biến trong vùng bản lề làm giảm xu hướng tạo thành liên kết disulfua chuỗi H bên trong. Theo khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên được phân lập chứa vùng ổn định chuỗi nặng từ một trong các kháng thể nêu trên; theo một khía cạnh khác, vùng ổn định là polypeptit chứa SEQ ID NO:72; polypeptit đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:72; polypeptit có trình tự axit amin như được nêu

trong SEQ ID NO:72 từ đó một, hai, ba, bốn hoặc năm axit amin có đầu tận N và/hoặc đầu tận C bị loại bỏ; hoặc một trong các polypeptit nêu trên kết hợp với một hoặc nhiều cơ chế biến đổi sau dịch mã. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên được phân lập chứa vùng ổn định chuỗi nhẹ kapa, theo một phương án khác nó chứa một vùng chuỗi nhẹ lambda. Theo một phương án, vùng ổn định chuỗi nhẹ là polypeptit chứa SEQ ID NO:70; polypeptit đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:70; polypeptit có trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO:70 từ đó một, hai, ba, bốn hoặc năm axit amin có đầu tận N và/hoặc đầu tận C bị loại bỏ; hoặc một trong các polypeptit nêu trên kết hợp với một hoặc nhiều cơ chế biến đổi sau dịch mã.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị đime alpha4beta7 có chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, mỗi protein này chứa một hoặc nhiều vùng quyết định bổ trợ hoặc các CDR. Theo khía cạnh khác của sáng chế, vùng thay đổi chuỗi nặng chứa CDR1, CDR2 và CDR3 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1, CDR2 và CDR3, trong đó mỗi CDR tương ứng được chọn từ nhóm gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:55 và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:58; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:56 và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:59; và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:57 và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:60.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, vùng thay đổi chuỗi nặng còn chứa bốn vùng khung (FR) được gọi là FR1, FR2, FR3 và FR4 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ còn chứa bốn vùng khung (FR) được gọi là FR1, FR2, FR3 và FR4. Theo một khía cạnh, các FR được chọn từ các SEQ ID NO giống nhau như các CDR; theo một phương án khác, các FR được chọn từ SEQ ID NO khác nhau. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị đime alpha4beta7 trong đó vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO:55 và vùng thay đổi chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:58; vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO:56 và vùng thay đổi chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:59; hoặc vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa SEQ ID NO:57 và vùng thay đổi chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:60.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị đime alpha4beta7 được phân lập, có chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, mỗi trong số các protein này chứa một hoặc nhiều vùng quyết định bổ trợ hoặc CDR. Theo

khía cạnh khác của sáng chế, vùng thay đổi chuỗi nặng chứa CDR1, CDR2 và CDR3 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1, CDR2 và CDR3. Theo một phương án, các CDR chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm CDR1, CDR2 và CDR3 đồng nhất ít nhất 90% lần lượt với CDR1, CDR2 và CDR3 của SEQ ID NO: 3; CDR1, CDR2 và CDR3 đồng nhất ít nhất 90% lần lượt với CDR1, CDR2 và CDR3 của SEQ ID NO: 5; CDR1, CDR2 và CDR3 đồng nhất ít nhất 90% lần lượt với CDR1, CDR2 và CDR3 của SEQ ID NO: 7; CDR1, CDR2 và CDR3 đồng nhất ít nhất 90% lần lượt với CDR1, CDR2 và CDR3 của SEQ ID NO: 22; và CDR1, CDR2 và CDR3 đồng nhất ít nhất 90% lần lượt với CDR1, CDR2 và CDR3 của SEQ ID NO: 24; và CDR1, CDR2 và CDR3 thay đổi của chuỗi nặng là từ SEQ ID NO:58.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, vùng thay đổi chuỗi nặng còn chứa bốn vùng khung (FR) được gọi là FR1, FR2, FR3 và FR4 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ còn chứa bốn vùng khung (FR) được gọi là FR1, FR2, FR3 và FR4. Theo một khía cạnh, các FR được chọn từ các SEQ ID NO giống nhau như các CDR; theo một phương án khác, các FR được chọn từ SEQ ID NO khác nhau. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị đime alpha4beta7 trong đó vùng thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm vùng thay đổi chuỗi nhẹ đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:3; vùng thay đổi chuỗi nhẹ đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:5; vùng thay đổi chuỗi nhẹ đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:7; vùng thay đổi chuỗi nhẹ đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:22; và vùng thay đổi chuỗi nhẹ đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:24; và vùng thay đổi chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:58.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị đime alpha4beta7 được phân lập có vùng thay đổi chuỗi nặng chứa CDR1, CDR2 và CDR3 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1, CDR2 và CDR3, trong đó CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm CDR1, CDR2 và CDR3 đồng nhất ít nhất 90% lần lượt với CDR1, CDR2 và CDR3 của SEQ ID NO:12; CDR1, CDR2 và CDR3 đồng nhất ít nhất 90% lần lượt với CDR1, CDR2 và CDR3 của SEQ ID NO: 25; và CDR1, CDR2 và CDR3 đồng nhất ít nhất 90% lần lượt với CDR1, CDR2 và CDR3 của SEQ ID NO: 26; và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm CDR1, CDR2 và CDR3 đồng nhất ít nhất 90% lần lượt với CDR1, CDR2 và CDR3, của SEQ ID NO:41; và CDR1, CDR2 và CDR3 có độ

đồng nhất ít nhất 90% lần lượt với CDR1, CDR2 và CDR3 của SEQ ID NO:54. Theo một phương án, vùng thay đổi chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm bao gồm các vùng thay đổi đồng nhất ít nhất 90% với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 12, 25 và 26, và vùng thay đổi chuỗi nặng được chọn từ nhóm bao gồm các vùng thay đổi đồng nhất ít nhất 90% với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:41 và 54. Theo khía cạnh khác của sáng chế, vùng thay đổi chuỗi nặng còn chứa bốn vùng khung (FR) được gọi là FR1, FR2, FR3 và FR4 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ còn chứa bốn vùng khung (FR) được gọi là FR1, FR2, FR3 và FR4. Theo một khía cạnh, các FR được chọn từ các SEQ ID NO giống nhau như các CDR; theo một phương án khác, các FR được chọn từ SEQ ID NO khác nhau.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị đime alpha4beta7 phân lập có vùng thay đổi chuỗi nặng chứa CDR1, CDR2 và CDR3 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1, CDR2 và CDR3, trong đó mỗi CDR tương ứng đồng nhất ít nhất 90% với CDR được chọn từ nhóm gồm CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:10, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:38; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:2, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:30; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:20, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:51; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:11, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:39; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:13, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:42; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:17, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:46; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:8, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:36; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:19, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:49; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:18, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:47; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:21, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:52; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:3, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:31; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:7, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:35; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:6, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:34;

CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:1, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:29; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:22, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:50; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:24, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:40; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:9, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:37; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:4, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:32; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:28, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:53; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:16, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:45; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:15, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:44; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:14, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:43; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:27, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:43; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:5, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:33; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:12, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:41; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:23, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:48; CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:25, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:54; và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nhẹ từ SEQ ID NO:26, và CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng từ SEQ ID NO:54. Theo khía cạnh khác, các CDR của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là giống với các CDR tương ứng của các SEQ ID NO được viện dẫn. Theo một phương án của sáng chế, vùng thay đổi chuỗi nặng còn chứa bốn vùng khung (FR) được gọi là FR1, FR2, FR3 và FR4 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ còn chứa bốn vùng khung (FR) được gọi là FR1, FR2, FR3 và FR4. Theo một khía cạnh, các FR được chọn từ các SEQ ID NO giống nhau như các CDR; theo một phương án khác, các FR được chọn từ SEQ ID NO khác nhau.

Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị dime alpha4beta7 chứa vùng thay đổi chuỗi nhẹ và vùng thay đổi chuỗi nặng, trong đó vùng thay đổi chuỗi nhẹ đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:10, và vùng thay đổi chuỗi nặng đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:38; vùng thay đổi chuỗi nhẹ đồng nhất ít

[illegible]

ít nhất 90% với SEQ ID NO:44; vùng thay đổi chuỗi nhẹ đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:14, và vùng thay đổi chuỗi nặng đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:43; vùng thay đổi chuỗi nhẹ đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:27, và vùng thay đổi chuỗi nặng đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:43; vùng thay đổi chuỗi nhẹ đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:5, và vùng thay đổi chuỗi nặng đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:33; vùng thay đổi chuỗi nhẹ đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:12, và vùng thay đổi chuỗi nặng đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:41; vùng thay đổi chuỗi nhẹ đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:23, và vùng thay đổi chuỗi nặng đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:48; vùng thay đổi chuỗi nhẹ đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:25, và vùng thay đổi chuỗi nặng đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:54; hoặc vùng thay đổi chuỗi nhẹ đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:26, và vùng thay đổi chuỗi nặng đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:54. Theo khía cạnh khác, các vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là giống với các vùng thay đổi tương ứng của các SEQ ID NO được viện dẫn.

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị dime alpha4beta7 được phân lập có giá trị EC50 nhỏ hơn 35ng/ml trong thử nghiệm liên kết tế bào T nhớ CD4 +; một khía cạnh khác đề xuất việc liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị dime alpha4beta7 được phân lập có giá trị EC50 nhỏ hơn 10ng/ml trong thử nghiệm liên kết tế bào T nhớ CD4+. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị dime alpha4beta7 được phân lập có IC50 trong thử nghiệm cạnh tranh MAdCAM nhỏ hơn 30 ng/m; theo một phương án khác, sáng chế đề xuất việc liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị dime alpha4beta7 được phân lập có IC50 nhỏ hơn 10ng/ml trong thử nghiệm cạnh tranh MAdCAM. Một khía cạnh khác của sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị dime alpha4beta7 được phân lập liên kết với thể đột biến S250N của alpha4beta7.

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hoá các polypeptit nêu trên. Theo khía cạnh khác của sáng chế, axit nucleic là vector. Theo phương án khác của sáng chế, sáng chế đề xuất tế bào chủ được biến nạp hoặc được chuyển nhiễm với các axit nucleic theo sáng chế. Theo khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế polypeptit bao gồm bước ủ các tế bào chủ dưới điều kiện thúc đẩy sự biểu hiện của polypeptit và thu hoạch các polypeptit này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào được phân lập tiết protein liên kết kháng nguyên liên kết alpha4beta7. Theo phương án khác, tế bào là tế bào lai. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra protein liên kết kháng nguyên liên kết đặc hiệu với alpha4beta7 (nghĩa là, alpha4beta7 của người), bao gồm bước ủ tế bào được phân lập dưới các điều kiện cho phép nó biểu hiện protein liên kết kháng nguyên này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên được phân lập liên kết đặc hiệu với dị dime alpha4beta7. Theo phương án khác, protein liên kết kháng nguyên được phân lập, khi liên kết với alpha4beta7 của người, ức chế liên kết của alpha4beta7 với MAdCAM-1. Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế ít nhất một hoạt tính của alpha4beta7, bao gồm bước cho tế bào biểu hiện alpha4beta7 tiếp xúc với protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu với dị dime alpha4beta7 sao cho hoạt tính này bị ức chế một phần hoặc toàn bộ. Theo một khía cạnh, phương pháp này được tiến hành in vivo. Theo một khía cạnh của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên được phân lập ức chế sự bám dính của tế bào biểu hiện alpha4beta7 với tế bào biểu hiện MAdCAM-1. Vẫn theo một khía cạnh khác của sáng chế, protein liên kết kháng nguyên được phân lập ức chế sự di chuyển của tế bào biểu hiện alpha4beta7 đến khu vực hoặc mô được cư trú bởi các tế bào biểu hiện MAdCAM-1; theo một ví dụ của phương án này, protein liên kết kháng nguyên được phân lập ức chế sự di chuyển của lympho bào vào ruột.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên. Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị tình trạng bệnh ở đối tượng bao gồm bước cho đối tượng dùng dược phẩm này, trong đó tình trạng bệnh này có thể được điều trị bằng cách giảm hoạt tính (một phần hoặc toàn bộ) của alpha4beta7 ở đối tượng này. Theo phương án khác, đối tượng là người. Theo phương án khác, tình trạng bệnh là tình trạng viêm của hệ dạ dày ruột. Theo đó, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho đối tượng chịu tình trạng bệnh được đặc trưng bởi sự di chuyển không thích hợp của tế bào biểu hiện alpha4beta7 đến mô chứa tế bào biểu hiện MAdCAM, bao gồm việc cho đối tượng dùng protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị dime alpha4beta7 với lượng đủ để ức chế (một phần hoặc toàn bộ) sự di chuyển của tế bào biểu hiện alpha4beta7 đến mô chứa tế bào biểu hiện MAdCAM. Theo một phương án, tình trạng bệnh là bệnh viêm ruột, ví dụ, viêm loét đại tràng,

bệnh Crohn, bệnh Celiac (bệnh Sprue không thuộc vùng nhiệt đới), bệnh lý về ruột liên quan đến bệnh lý cột sống huyết thanh âm tính, viêm ruột kết vi mô hoặc viêm ruột kết thể collagen, viêm dạ dày ruột do tăng bạch cầu ưa eosin hoặc viêm túi trong xảy ra sau khi cắt bỏ đại tràng-trực tràng và nối hồi tràng. Theo phương án khác, tình trạng bệnh là viêm tụy, bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin, viêm vú, viêm túi mật, viêm đường mật, viêm quanh ống mật, viêm phế quản mạn tính, viêm xoang mạn tính, bệnh hen hoặc bệnh ghép chống chủ.

Theo phương án khác, phương pháp còn bao gồm bước cho đối tượng dùng điều trị thứ hai. Theo phương án khác, điều trị thứ hai được sử dụng cho đối tượng trước và/hoặc đồng thời và/hoặc sau khi cho đối tượng dùng được phẩm theo sáng chế. Theo phương án khác, điều trị thứ hai bao gồm chất chống viêm. Theo phương án khác, được phẩm thứ hai bao gồm chất được chọn từ nhóm gồm thuốc chống viêm không steroid, steroid và các chất điều hòa miễn dịch. Theo phương án khác, phương pháp bao gồm bước cho đối tượng dùng điều trị thứ ba.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tăng tuổi thọ của đối tượng bao gồm việc cho đối tượng này dùng được phẩm theo sáng chế. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp giảm hoạt tính $\alpha 4\beta 7$ ở đối tượng có nhu cầu bao gồm việc cho đối tượng này dùng được phẩm theo sáng chế. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp giảm sự di chuyển được điều tiết bởi $\alpha 4\beta 7$ (ví dụ, tái cư trú ở ruột được điều tiết bởi $\alpha 4\beta 7$) ở đối tượng có nhu cầu bao gồm bước cho đối tượng dùng được phẩm theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm, bộ kit và phương pháp liên quan đến phân tử liên kết integrin $\alpha 4\beta 7$ (“ $\alpha 4\beta 7$ ”), bao gồm các phân tử có tác dụng chủ vận hoặc đối kháng $\alpha 4\beta 7$, như các kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, các mảnh kháng thể và dẫn xuất kháng thể, như kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ đối kháng, các mảnh kháng thể hoặc dẫn xuất kháng thể. Sáng chế cũng đề cập đến các axit nucleic, và dẫn xuất và các mảnh của nó, bao gồm trình tự nucleotit mã hóa toàn bộ hoặc một phần polypeptit liên kết $\alpha 4\beta 7$, ví dụ như axit nucleic mã hóa toàn bộ hoặc một phần kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$, mảnh kháng thể hoặc dẫn xuất kháng thể, plasmit và vector chứa các axit nucleic này và tế bào hoặc dòng tế bào chứa các axit nucleic

và/hoặc vector và plasmit này. Các phương pháp được đề xuất bao gồm, ví dụ, phương pháp tạo ra, nhận biết hoặc phân các lập phân tử liên kết với alpha4beta7, như các kháng thể kháng alpha4beta7, phương pháp xác định phân tử có liên kết với alpha4beta7 hay không, phương pháp xác định phân tử có tác dụng chủ vận hay đối kháng alpha4beta7, phương pháp tạo ra chế phẩm, như dược phẩm, bao gồm phân tử liên kết với alpha4beta7, và phương pháp bao gồm cho đối tượng dùng phân tử liên kết với alpha4beta7 này, ví dụ, phương pháp điều trị tình trạng bệnh được điều tiết bởi alpha4beta7 và tác dụng chủ vận hoặc đối kháng hoạt tính sinh học của alpha4beta7, *in vivo* hoặc *in vitro*.

Các trình tự polynucleotit và polypeptit được biểu thị bằng cách sử dụng chữ viết tắt gồm từ một đến ba ký tự chuẩn. Trừ khi có chỉ dẫn khác, mỗi trình tự polypeptit có đầu tận amino ở bên trái và đầu tận carboxy ở bên phải; mỗi trình tự axit nucleic sợi đơn và sợi trên cùng của mỗi trình tự axit nucleic sợi kép có đầu 5' ở bên trái và đầu 3' ở bên phải. Một trình tự polypeptit hoặc polynucleotit cụ thể cũng có thể được mô tả bằng cách giải thích nó khác với trình tự tham chiếu như thế nào.

Trừ khi được định nghĩa khác trong bản mô tả này, các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong sáng chế đều được hiểu theo cách hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, trừ khi được yêu cầu khác trong từng ngữ cảnh, các thuật ngữ số ít có thể bao gồm cả số nhiều và các thuật ngữ số nhiều bao gồm cả số ít. Thông thường, các thuật ngữ được sử dụng liên quan đến và các kỹ thuật về nuôi cấy tế bào và mô, sinh học phân tử, miễn dịch học, vi sinh học, di truyền học và hóa học về protein và axit nucleic và phương pháp lai được mô tả trong bản mô tả này là các thuật ngữ được biết đến rộng rãi và thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp và các kỹ thuật theo sáng chế thường được thực hiện theo các phương pháp thông thường được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này và như đã mô tả trong các tài liệu tham khảo thông thường và tài liệu cụ thể hơn khác được viện dẫn và được thảo luận trong phần mô tả này trừ khi có chỉ dẫn khác. Xem, ví dụ, Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) và Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), và Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), được kết hợp vào đây bằng cách

viện dẫn. Các phản ứng enzym và kỹ thuật tinh chế được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, như thường được thực hiện trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc như được mô tả trong bản mô tả này. Các thuật ngữ được sử dụng liên quan đến, và các quy trình và các kỹ thuật phòng thí nghiệm về, hóa học phân tích, hóa hữu cơ tổng hợp và hóa y và hóa được mô tả trong bản mô tả này đều được biết đến rộng rãi và thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật chuẩn có thể được sử dụng trong các tổng hợp hóa học, phân tích hóa học, được phẩm, chế phẩm, và sự phân phối và điều trị cho bệnh nhân.

Các thuật ngữ sau đây, trừ khi có chỉ dẫn khác, nên được hiểu theo nghĩa dưới đây:

Thuật ngữ "phân tử được phân lập" (trong đó phân tử này là, ví dụ, polypeptit, polynucleotit hoặc kháng thể) là phân tử mà do nguồn gốc hoặc nguồn thu nhận của nó (1) không liên kết với các thành phần kết hợp tự nhiên kèm theo nó ở trạng thái tự nhiên của nó, (2) hầu như không chứa phân tử khác từ các loài tương tự, (3) được biểu hiện bởi tế bào thuộc các loài khác hoặc (4) không xuất hiện trong tự nhiên mà không có sự can thiệp của con người. Vì vậy, một phân tử được tổng hợp hóa học hoặc được tổng hợp trong hệ tế bào khác với tế bào mà nó có nguồn gốc tự nhiên từ đó, sẽ được "phân lập" từ các thành phần kết hợp tự nhiên của nó. Phân tử cũng có thể được làm cho hầu như không chứa các thành phần kết hợp tự nhiên bởi sự phân lập, bằng cách sử dụng kỹ thuật tinh chế đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Độ tinh khiết hoặc độ đồng nhất phân tử có thể được thử nghiệm bằng nhiều phương thức đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, độ tinh khiết của mẫu polypeptit có thể được thử nghiệm bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamit và nhuộm gel để hiển thị polypeptit bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nhằm mục đích này, phương pháp phân tích mức độ cao hơn có thể được thực hiện bằng cách sử dụng HPLC hoặc các phương thức khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để tinh chế.

Các thuật ngữ "chất ức chế alpha4beta7" và "chất đối kháng alpha4beta7" được sử dụng thay thế cho nhau. Mỗi chất này là phân tử ức chế một cách có thể nhận biết được ít nhất một chức năng của alpha4beta7. Ngược lại, "chất chủ vận alpha4beta7" là phân tử làm gia tăng một cách có thể nhận biết được ít nhất một chức năng của alpha4beta7. Việc ức chế bởi chất ức chế alpha4beta7 không cần phải hoàn toàn miễn là nó có thể nhận biết được, ví dụ bằng cách sử dụng thử nghiệm. Thử nghiệm bất kỳ

về chức năng của alpha4beta7 có thể được sử dụng, ví dụ về thử nghiệm này được nêu trong bản mô tả này. Các ví dụ về chức năng của alpha4beta7 có thể bị ức chế bởi chất ức chế alpha4beta7 (hoặc được gia tăng bởi chất chủ vận alpha4beta7) bao gồm sự liên kết phối tử (nghĩa là, liên kết với MAdCAM-1), sự bám dính với tế bào biểu hiện phối tử, sự di chuyển đến ngăn cụ thể như ruột, giải phóng xytokin, chemokin và các hợp chất trung gian khác, tăng cường hoặc làm tăng mạnh đáp ứng viêm và sự tổn thương mô và các chức năng tương tự. Ví dụ về các loại chất ức chế alpha4beta7 và chất chủ vận alpha4beta7 bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polypeptit liên kết alpha4beta7 như protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, các protein liên kết kháng nguyên alpha4beta7), các kháng thể, các mảnh kháng thể và dẫn xuất kháng thể.

Các thuật ngữ "peptit", "polypeptit" và "protein" mỗi thuật ngữ này được dùng để chỉ phân tử chứa hai hoặc nhiều gốc axit amin được kết hợp với nhau bằng liên kết peptit. Các thuật ngữ này bao gồm, ví dụ, protein tự nhiên và nhân tạo, các mảnh protein và các dạng tương đồng của polypeptit (như protein đột biến (mutein), biến thể và protein dung hợp) của trình tự protein cũng như các protein được biến đổi sau dịch mã hoặc theo cách khác là do liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị. Peptit, polypeptit hoặc protein có thể là monome hoặc polyme.

Thuật ngữ "mảnh polypeptit" khi được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ polypeptit đã bỏ đi đầu tận amino và/hoặc đầu tận carboxy so với polypeptit có chiều dài đầy đủ tương ứng. Các mảnh có thể có chiều dài chứa, ví dụ, ít nhất 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 50, 70, 80, 90, 100, 150 hoặc 200 axit amin. Các mảnh cũng có thể có chiều dài chứa, ví dụ, nhiều nhất là 1000, 750, 500, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 14, 13, 12, 11 hoặc 10 axit amin. Các mảnh cũng có thể thu được từ quy trình phân giải protein (hoặc quy trình khác), mà ví dụ, tạo ra sự biến đổi từ một đến năm axit amin biết trước ở đầu tận amino và/hoặc carboxy. Mảnh còn có thể chứa, ở một trong số hai đầu hoặc ở cả hai đầu của nó, một hoặc nhiều axit amin bổ sung, ví dụ, trình tự axit amin từ một protein có trong tự nhiên khác (ví dụ, Fc hoặc miền khóa kéo leuxin) hoặc trình tự axit amin nhân tạo (ví dụ, trình tự liên kết nhân tạo hoặc protein gắn đuôi).

Các polypeptit theo sáng chế bao gồm polypeptit được biến đổi theo cách bất kỳ và vì lý do bất kỳ, ví dụ, để: (1) giảm độ nhạy với sự phân giải protein, (2) giảm độ nhạy với sự oxy hóa, (3) thay đổi ái lực liên kết để tạo thành phức hợp, (4) thay đổi ái

lực liên kết và (5) tạo ra hoặc biến đổi các đặc tính lý hóa hoặc chức năng khác. Các dạng tương đồng bao gồm các mutein của polypeptit. Ví dụ, các thay thế một hoặc nhiều axit amin (ví dụ, thay thế axit amin bảo toàn) có thể được thực hiện trên trình tự có trong tự nhiên (ví dụ, trên phần polypeptit nằm ngoài (các) miền tạo nên sự tiếp xúc giữa các phân tử). Trình tự liên ứng có thể được sử dụng để chọn lựa các gốc axit amin để thay thế; người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này biết rằng các gốc axit amin bổ sung có thể được thế.

“Thay thế axit amin bảo toàn” là việc hầu như không làm thay đổi đặc điểm cấu trúc của trình tự ban đầu (ví dụ, việc thay thế axit amin không nên có khuynh hướng phá vỡ cấu trúc xoắn kép xuất hiện trong trình tự ban đầu hoặc không làm đứt gãy các loại cấu trúc bậc hai khác đặc trưng cho trình tự ban đầu hoặc cần thiết cho chức năng của nó). Các ví dụ về cấu trúc bậc hai và bậc ba của polypeptit đã được biết trong lĩnh vực này được mô tả trong tài liệu *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); và Thornton *et al.* *Nature* 354:105 (1991), được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Sáng chế còn đề xuất các dạng tương đồng không phải peptit của polypeptit liên kết $\alpha_4\beta_7$. Các dạng tương đồng không phải peptit thường được sử dụng trong ngành công nghiệp dược phẩm dưới dạng thuốc với các đặc tính tương tự đặc tính của peptit khuôn mẫu. Các loại hợp chất không phải peptit này được gọi là "chất mô phỏng peptit" hoặc "chất giả peptit", xem, ví dụ, Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber and Freidinger *TINS* p.392 (1985); và Evans *et al.* *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987), được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Các chất mô phỏng peptit tương tự về mặt cấu trúc với các peptit hữu dụng để trị liệu có thể được sử dụng để tạo ra tác dụng trị liệu hoặc phòng bệnh tương đương. Thông thường, chất giả peptit tương tự về mặt cấu trúc với polypeptit kiểu mẫu (nghĩa là, polypeptit có đặc tính sinh hóa hoặc được tính mong muốn), như kháng thể của người, nhưng có một hoặc nhiều liên kết peptit tùy ý được thay thế bằng liên kết được chọn từ nhóm gồm: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (*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 trong lĩnh vực kỹ thuật này. Việc thay thế có hệ thống của một hoặc nhiều axit amin trong trình tự liên ứng bằng D-axit amin của cùng loại

(ví dụ, D-lysin thay thế cho L-lysin) cũng có thể được sử dụng để tạo ra peptit ổn định hơn. Ngoài ra, các peptit bị cưỡng ép chứa trình tự bảo toàn hoặc sự biến đổi trình tự liên ứng hầu như đồng nhất có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (Rizo và Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992), được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn), ví dụ, bằng cách bổ sung các gốc xystein bên trong có khả năng tạo ra cầu nối disulfua nội phân tử làm đóng vòng peptit.

“Biến thể” của polypeptit (ví dụ, kháng thể) bao gồm trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin được cài xen, xóa và/hoặc thay thế trong trình tự axit amin so với trình tự polypeptit khác. Các biến thể theo sáng chế bao gồm protein dung hợp.

“Dẫn xuất” của polypeptit là polypeptit (ví dụ, kháng thể) được biến đổi hóa học, như bằng cách tiếp hợp với gốc hóa học khác (như polyetylen glycol hoặc albumin, ví dụ, albumin huyết thanh người), phosphoryl hóa và/hoặc đường hóa. Trừ khi có chỉ dẫn khác, thuật ngữ “kháng thể” bao gồm, ngoài các kháng thể chứa hai chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ và hai chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ, các dẫn xuất, biến thể, mảnh và mutein của nó, ví dụ về chúng được mô tả dưới đây.

“Protein liên kết kháng nguyên” là protein chứa phần liên kết với kháng nguyên và, tùy ý, phần cấu trúc giàn giáo hoặc khung cho phép phần liên kết kháng nguyên tuân theo một thể cấu tạo để tăng cường việc liên kết của protein liên kết kháng nguyên với kháng nguyên. Các 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 của kháng thể và thể tương tự của kháng thể. Protein liên kết kháng nguyên này có thể chứa, ví dụ, cấu trúc giàn giáo protein thay thế hoặc cấu trúc giàn giáo nhân tạo với các dẫn xuất CDR hoặc CDR được ghép. Các cấu trúc giàn giáo này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, cấu trúc giàn giáo thu được từ kháng thể chứa các đột biến được đưa vào để, ví dụ, làm ổn định cấu trúc không gian ba chiều của protein liên kết kháng nguyên cũng như cấu trúc giàn giáo tổng hợp hoàn toàn chứa, ví dụ, polyme tương thích về mặt sinh học. Xem, ví dụ, Korndorfer et al., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Volume 53, Issue 1:121-129; Roque et al., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654. Ngoài ra, chất mô phỏng kháng thể peptit (“PAM”-peptide antibody mimetics) có thể được sử dụng, cũng như các cấu trúc giàn giáo có

gốc là các chất mô phỏng kháng thể sử dụng các thành phần liên kết với fibronectin làm cấu trúc giàn giáo.

Protein liên kết kháng nguyên có thể có, ví dụ, cấu trúc của globulin miễn dịch có trong tự nhiên. “Globulin miễn dịch” là phân tử dạng tetrame. Trong globulin miễn dịch có trong tự nhiên, mỗi tetrame gồm có hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi cặp có một chuỗi “nhẹ” (khoảng 25 kDa) và một chuỗi “nặng” (khoảng 50-70 kDa). Phần đầu tận amino của mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi chứa 100 đến 110 axit amin hoặc nhiều hơn, chủ yếu chịu trách nhiệm nhận biết kháng nguyên. Phần đầu tận carboxy của mỗi chuỗi xác định vùng ổn định chịu trách nhiệm chính đối với chức năng thực hiện. Các chuỗi nhẹ trong kháng thể của người được phân loại thành chuỗi nhẹ kappa hoặc lambda. Các chuỗi nặng được phân loại thành mu, delta, gama, alpha hoặc epsilon và xác định isotyp kháng thể lần lượt là IgM, IgD, IgG, IgA và IgE. Trong chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, vùng biến đổi và vùng ổn định được nối bởi vùng “J” có khoảng 12 axit amin hoặc nhiều hơn, với chuỗi nặng cũng bao gồm vùng “D” có khoảng 10 axit amin hoặc nhiều hơn. Xem tổng quát, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn). Các vùng thay đổi của cặp chuỗi nhẹ/chuỗi nặng tạo thành vị trí liên kết kháng thể sao cho globulin miễn dịch còn nguyên vẹn có hai vị trí liên kết.

Các vùng thay đổi của chuỗi globulin miễn dịch có trong tự nhiên có cùng một cấu trúc chung của vùng khung bảo toàn tương đối (FR) được nối bằng ba vùng siêu biến, còn được gọi là vùng quyết định hỗ trợ hoặc các CDR. Từ đầu tận N đến đầu tận C, cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đều chứa các miền FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 và FR4. Sự phân bố axit amin vào mỗi miền là tuân theo các định nghĩa của Kabat *et al.* trong *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991. Các hệ thống đánh số khác cho các axit amin trong chuỗi globulin miễn dịch bao gồm IMGT® (hệ thống thông tin ImMunoGeneTics quốc tế; Lefranc *et al*, *Dev. Comp. Immunol.* 29:185-203; 2005) và AHO (Honegger and Pluckthun, *J. Mol. Biol.* 309(3):657-670; 2001).

Các kháng thể có thể được lấy từ nguồn như huyết thanh hoặc huyết tương có chứa các globulin miễn dịch có tính đặc hiệu kháng nguyên khác nhau. Khi các kháng thể này được tinh chế dựa vào ái lực, chúng có thể được làm giàu tính đặc hiệu kháng

nguyên cụ thể. Các chế phẩm kháng thể được làm giàu này thường được tạo ra với ít hơn 10% kháng thể có hoạt tính liên kết đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể. Việc đưa các chế phẩm này qua một vài chu trình tinh chế bằng ái lực có thể tăng tỷ lệ kháng thể có hoạt tính liên kết đặc hiệu với kháng nguyên. Các kháng thể được tổng hợp theo cách này thường được đề cập đến là “đơn đặc hiệu”. Các chế phẩm kháng thể đơn đặc hiệu có thể được tạo nên từ khoảng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% hoặc 99,9% kháng thể có hoạt tính liên kết đặc hiệu đối với kháng nguyên cụ thể.

"Kháng thể" được dùng để chỉ globulin miễn dịch nguyên vẹn hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó cạnh tranh với kháng thể nguyên vẹn trong việc liên kết đặc hiệu, trừ khi có quy định cụ thể khác. Phần liên kết kháng nguyên có thể được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN hoặc bằng cách phân cắt các kháng thể nguyên vẹn bằng enzym hoặc hóa học. Phần liên kết kháng nguyên bao gồm, không kể những cái khác, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, các kháng thể miền (dAb) và các mảnh của vùng quyết định hỗ trợ (CDR), các mảnh của vùng thay đổi, các kháng thể chuỗi đơn (scFv), các kháng thể khảm, mảnh Fv chuỗi đơn dạng dime (diabody), mảnh Fv chuỗi đơn dạng trime (triabody), mảnh Fv chuỗi đơn dạng tetrame (tetrabody) và polypeptit chứa ít nhất một phần globulin miễn dịch đủ để đem lại sự liên kết kháng nguyên đặc hiệu cho polypeptit.

Mảnh Fab là mảnh đơn trị có các miền V_L, V_H, C_L và C_H1; mảnh F(ab')₂ là mảnh lưỡng trị có hai mảnh Fab được liên kết bằng cầu nối disulfua tại vùng bản lề; mảnh Fd có các miền V_H và C_H1; mảnh Fv có các miền V_L và V_H của một nhánh của kháng thể; và mảnh dAb có miền V_H, miền V_L, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của miền V_H hoặc V_L (patent Mỹ số 6,846,634, 6,696,245, công bố đơn Mỹ số 05/0202512, 04/0202995, 04/0038291, 04/0009507, 03/0039958, Ward *et al.*, Nature 341:544-546, 1989).

Kháng thể chuỗi đơn (scFv) là kháng thể trong đó vùng V_L và vùng V_H được nối thông qua trình tự liên kết (ví dụ, trình tự tổng hợp của các gốc axit amin) để tạo ra chuỗi protein liên tục, trong đó trình tự liên kết này đủ dài để cho phép chuỗi protein này gấp nếp ngược trở lại trên chính nó và tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên đơn trị (xem, ví dụ, Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-26 và Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83). Các diabody là các kháng thể lưỡng trị chứa hai chuỗi

polypeptit, trong đó mỗi chuỗi polypeptit bao gồm các miền V_H và V_L được nối bằng trình tự liên kết quá ngắn để có thể cho phép ghép cặp hai miền trên cùng một chuỗi, vì thế cho phép mỗi miền bắt cặp với miền bổ trợ trên chuỗi polypeptit khác (xem, ví dụ, Holliger *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, và Poljak *et al.*, 1994, Structure 2:1121-23). Nếu hai chuỗi polypeptit của diabody là giống nhau, thì diabody thu được từ việc bắt cặp của chúng sẽ có hai vị trí liên kết kháng nguyên giống nhau. Các chuỗi polypeptit có các trình tự khác nhau có thể được sử dụng để tạo ra diabody có hai vị trí liên kết kháng nguyên khác nhau. Tương tự, triabody và tetrabody lần lượt là các kháng thể chứa ba và bốn chuỗi polypeptit, và lần lượt tạo ra ba và bốn vị trí liên kết kháng nguyên, có thể giống hoặc khác nhau.

Các vùng quyết định bổ trợ (các CDR) và vùng khung (FR) của một kháng thể xác định có thể được nhận biết bằng cách sử dụng hệ thống được mô tả bởi Kabat *et al. supra*; Lefranc *et al.*, *supra* và/hoặc Honegger and Pluckthun, *supra*. Một hoặc nhiều CDR có thể được kết hợp vào phân tử bằng liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị để làm cho nó là protein liên kết kháng nguyên. Protein liên kết kháng nguyên có thể kết hợp (các) CDR như một phần của chuỗi polypeptit lớn hơn, có thể liên kết (các) CDR theo cách cộng hóa trị với chuỗi polypeptit khác hoặc có thể kết hợp (các) CDR theo cách không cộng hóa trị. Các CDR cho phép protein liên kết kháng nguyên liên kết đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể mong muốn.

Protein liên kết kháng nguyên có thể có một hoặc nhiều vị trí liên kết. Nếu có nhiều hơn một vị trí liên kết, thì các vị trí liên kết này có thể giống nhau hoặc có thể khác nhau. Ví dụ, globulin miễn dịch có trong tự nhiên của người thường có hai vị trí liên kết giống nhau, trong khi kháng thể “đặc hiệu kép” hoặc “chức năng kép” có hai vị trí liên kết khác nhau.

Thuật ngữ “kháng thể của người” bao gồm tất cả các kháng thể có một hoặc nhiều vùng thay đổi và vùng cố định có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch của người. Theo một phương án, tất cả các miền thay đổi và miền ổn định đều thu được từ trình tự globulin miễn dịch của người (kháng thể đầy đủ của người). Các kháng thể này có thể được tổng hợp bằng nhiều cách khác nhau, ví dụ về các cách này được mô tả dưới đây, bao gồm bằng cách gây miễn dịch bằng kháng nguyên mong muốn của chuột nhắt được biến đổi gen để biểu hiện các kháng thể thu được từ gen mã hoá chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của người.

Kháng thể được làm giống như của người có trình tự khác với trình tự của kháng thể thu được từ loài không phải người bằng một hoặc nhiều phần thể, xóa và/hoặc thêm axit amin, sao cho kháng thể được làm giống như của người ít có khả năng gây đáp ứng miễn dịch và/hoặc gây đáp ứng miễn dịch ở mức độ ít nghiêm trọng hơn, so với kháng thể của loài không phải người, khi nó được dùng cho đối tượng là người. Theo một phương án, các axit amin nhất định trong miền khung và miền ổn định của các chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể của loài không phải người được gây đột biến để thu được kháng thể được làm giống như của người. Theo một phương án khác, (các) miền ổn định từ kháng thể của người được dung hợp với (các) miền thay đổi của loài không phải người. Theo một phương án khác, một hoặc nhiều gốc axit amin trong một hoặc nhiều trình tự CDR của kháng thể không phải của người được thay đổi để giảm tính sinh miễn dịch có thể xảy ra của kháng thể không phải của người khi nó được dùng cho đối tượng là người, trong đó các gốc axit amin đã biến đổi hoặc không quan trọng đối với sự liên kết đặc hiệu miễn dịch của kháng thể với kháng nguyên của nó, hoặc các thay đổi trình tự axit amin được tạo ra là các thay đổi bảo toàn, sao cho liên kết của kháng thể được làm giống như của người với kháng nguyên không yếu hơn nhiều so với liên kết của kháng thể không phải người với kháng nguyên. Ví dụ về cách để tạo ra các kháng thể được làm giống như của người có thể được tìm thấy trong các patent Mỹ số 6,054,297, 5,886,152 và 5,877,293.

Thuật ngữ "kháng thể khảm" được dùng để chỉ kháng thể chứa một hoặc nhiều vùng từ một kháng thể và một hoặc nhiều vùng từ một hoặc nhiều kháng thể khác. Theo một phương án, một hoặc nhiều trong số các CDR thu được từ kháng thể kháng alpha4beta7 của người. Theo phương án khác, tất cả các CDR đều thu được từ kháng thể kháng alpha4beta7 của người. Theo một phương án khác, các CDR từ nhiều hơn một các kháng thể kháng alpha4beta7 của người được trộn lẫn và được làm khớp trong kháng thể khảm. Ví dụ, kháng thể khảm có thể chứa CDR1 từ chuỗi nhẹ của kháng thể kháng alpha4beta7 của người thứ nhất, CDR2 và CDR3 từ chuỗi nhẹ của kháng thể kháng alpha4beta7 của người thứ hai, và các CDR từ chuỗi nặng của kháng thể kháng alpha4beta7 thứ ba. Cũng có thể có các tổ hợp khác và các tổ hợp này được bao hàm trong các phương án của sáng chế.

Ngoài ra, vùng khung có thể thu được từ một trong các kháng thể kháng alpha4beta7 giống nhau, từ một hoặc nhiều kháng thể khác nhau, như kháng thể của

người hoặc kháng thể được làm giống như của người. Theo một ví dụ về kháng thể khảm, phần chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là giống với, đồng nhất với hoặc thu được từ kháng thể từ một loài cụ thể hoặc thuộc lớp hoặc lớp phụ kháng thể cụ thể, trong khi phần còn lại của (các) chuỗi là giống với, đồng nhất với hoặc thu được từ (các) kháng thể từ loài khác hoặc thuộc lớp hoặc lớp phụ kháng thể khác. Các mảnh của các kháng thể có hoạt tính sinh học mong muốn cũng được bao gồm (*nghĩa là*, khả năng liên kết đặc hiệu với $\alpha 4\beta 7$). Xem, ví dụ, patent Mỹ số 4,816,567 và Morrison, 1985, Science 229:1202-07.

"Kháng thể trung hòa" hoặc "kháng thể ức chế" là kháng thể ức chế sự tương tác của $\alpha 4\beta 7$ với MAdCAM-1 khi lượng dư kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ làm giảm lượng tương tác ít nhất khoảng 20% bằng cách tiến hành thử nghiệm như các thử nghiệm được nêu trong phần ví dụ thực hiện sáng chế. Theo các phương án khác, protein liên kết kháng nguyên này làm giảm tương tác của $\alpha 4\beta 7$ với MAdCAM-1 $\alpha 4\beta 7$ là ít nhất 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% và 99,9%.

Mảnh hoặc thể tương tự của kháng thể có thể được tạo ra dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này dựa vào bản mô tả này và bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết rõ trong lĩnh vực này. Đầu tận amino và carboxy của các mảnh hoặc các thể tương tự xuất hiện gần ranh giới của các miền chức năng. Các miền cấu trúc và chức năng có thể được nhận biết bằng so sánh dữ liệu trình tự nucleotit và/hoặc axit amin với cơ sở dữ liệu của trình tự công khai hoặc độc quyền. Các phương pháp so sánh bằng máy tính có thể được sử dụng để nhận biết các motif trình tự hoặc miền cấu trúc protein dự đoán xuất hiện trong các protein khác có cấu trúc và/hoặc chức năng đã biết. Các phương pháp để nhận biết trình tự protein gấp thành cấu trúc không gian ba chiều là đã biết. Xem, ví dụ, Bowie *et al.*, 1991, Science 253:164.

"Kháng thể ghép CDR" là kháng thể chứa một hoặc nhiều CDR thu được từ kháng thể của một loài hoặc isotyp cụ thể và khung của kháng thể khác của cùng loài hoặc isotyp hoặc của loài hoặc isotyp khác.

"Kháng thể đa đặc hiệu" là kháng thể nhận diện được nhiều hơn một epitop trên một hoặc nhiều kháng nguyên. Lớp phụ của loại kháng thể này là "kháng thể đặc hiệu

kép” nhận diện được hai epitop khác biệt trên các kháng nguyên giống hoặc khác nhau.

Protein liên kết kháng nguyên “liên kết đặc hiệu” với kháng nguyên (ví dụ, alpha4beta7 của người) nếu nó liên kết với kháng nguyên có hằng số phân ly bằng 1 nanomol hoặc nhỏ hơn. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, protein liên kết kháng nguyên là “đặc hiệu dị đime” nếu nó liên kết với integrin dị đime thứ nhất mà không phải là các integrin khác có chung một chuỗi với integrin thứ nhất. Ví dụ, nếu kháng thể đặc hiệu với dị đime alpha4beta7 thì sẽ liên kết với alpha4beta7 chứ không phải alpha4beta1 hay alphaEbeta7.

Các integrin được biết là phù hợp với các dạng cấu hình khác nhau, phụ thuộc vào trạng thái hoạt hoá của (các) tế bào biểu hiện chúng và vào sự có mặt hoặc vắng mặt các ion kim loại nhất định. Một integrin ở dạng cấu hình “hoạt động” liên kết với phối tử cùng nguồn gốc với nó với ái lực cao hơn so với cùng integrin này ở dạng cấu hình “bất hoạt”. Protein liên kết kháng nguyên có thể liên kết với integrin chỉ ở dạng cấu hình hoạt động của nó, chỉ ở dạng cấu hình bất hoạt của nó hoặc ở cả hai hoặc một trong hai dạng cấu hình này. Ví dụ, protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị đime alpha4beta7 có thể liên kết với alpha4beta7 khi có mặt hoặc không có mặt cation mangan hóa trị hai (Mn^{2+}), chỉ ra rằng protein liên kết kháng nguyên liên kết với cả alpha4beta7 hoạt động và bất hoạt.

“Miền liên kết kháng nguyên”, “vùng liên kết kháng nguyên,” hoặc “vị trí liên kết kháng nguyên” là một phần của protein liên kết kháng nguyên chứa các gốc axit amin (hoặc các gốc khác) tương tác với kháng nguyên và góp phần tạo nên tính đặc hiệu của protein liên kết kháng nguyên và ái lực với kháng nguyên. Để kháng thể liên kết đặc hiệu với kháng nguyên của nó, nó phải bao gồm ít nhất một phần của ít nhất một miền CDR của nó.

“Epitop” là phần của phân tử được liên kết bởi protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, bởi kháng thể). Epitop có thể chứa phần không liên kết của phân tử (ví dụ, trong polypeptit, các gốc axit amin không liên kết trong trình tự bậc một của polypeptit nhưng, trong cấu trúc bậc ba hoặc bậc bốn của polypeptit, các gốc này lại đủ gần với nhau để được liên kết bởi protein liên kết kháng nguyên).

“Phần trăm đồng nhất” của hai polynucleotit hoặc hai trình tự polypeptit được xác định bằng cách so sánh các trình tự này bằng chương trình máy tính GAP (một phần của gói GCG Wisconsin, version 10.3 (Accelrys, San Diego, CA)) bằng cách sử dụng các thông số mặc định của nó.

Các thuật ngữ “polynucleotit”, “oligonucleotit” và “axit nucleic” được sử dụng thay thế cho nhau và bao gồm phân tử ADN (ví dụ, ADN bổ trợ hoặc ADN bộ gen), phân tử ARN (ví dụ, ARN thông tin), các dạng tương đồng của ADN hoặc ARN được tạo ra bằng cách sử dụng các dạng tương đồng nucleotit (ví dụ, axit nucleic peptit và các dạng tương đồng nucleotit không có trong tự nhiên) và thể lai của nó. Phân tử axit nucleic có thể là sợi đơn hoặc sợi kép. Theo một phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm một khung đọc mở liền kề mã hoá kháng thể hoặc mảnh, dẫn xuất, mutein hoặc biến thể của nó, theo sáng chế.

Hai polynucleotit sợi đơn là “bổ thể” của nhau nếu trình tự của chúng có thể được sắp thẳng theo hướng không song song sao cho mọi nucleotit trong một polynucleotit đối diện với nucleotit bổ sung của nó trong polynucleotit còn lại, không đưa các khoảng trống vào và không có các nucleotit không bắt cặp ở đầu 5’ hoặc 3’ của một trong hai trình tự. Một polynucleotit “bổ sung” cho một polynucleotit khác nếu hai polynucleotit này có thể tạo ra thể lai với nhau dưới điều kiện nghiêm ngặt vừa phải. Vì vậy, một polynucleotit có thể bổ sung cho một polynucleotit khác mà không phải là bổ thể của nó.

“Vector” là axit nucleic có thể được dùng để đưa một axit nucleic khác liên kết với nó vào tế bào. Một loại vector là “plasmid”, là phân tử ADN sợi đơn thẳng hoặc vòng mà mảnh axit nucleic bổ sung có thể được nối vào đó. Một loại vector khác là vector virus (ví dụ, retrovirus có khiếm khuyết trong quá trình sao chép, adenovirus và virus liên hợp với adeno), trong đó các mảnh ADN bổ sung có thể được đưa vào bộ gen virus. Các vector nhất định có khả năng sao chép tự sinh trong tế bào chủ nơi mà chúng được đưa vào (ví dụ, vector vi khuẩn bao gồm dạng sao chép chứa gốc sao chép vi khuẩn và vector của loài động vật có vú thuộc thể bổ sung). Các vector khác (như vector của loài động vật có vú không thuộc thể bổ sung) được kết hợp vào bộ gen của tế bào chủ khi được đưa vào trong tế bào chủ và nhờ đó được sao chép cùng với bộ gen vật chủ. “Vector biểu hiện” là loại vector có thể điều khiển sự biểu hiện của polynucleotit được chọn.

Trình tự nucleotit được “liên kết hoạt động” với trình tự điều hòa nếu trình tự điều hòa này tác động đến việc biểu hiện (ví dụ, mức độ, thời gian hoặc vị trí biểu hiện) của trình tự nucleotit. “Trình tự điều hòa” là axit nucleic tác động đến sự biểu hiện (ví dụ, mức độ, thời gian hoặc vị trí biểu hiện) của axit nucleic mà nó liên kết hoạt động. Trình tự điều hòa có thể, ví dụ, thể hiện tác dụng của nó trực tiếp lên axit nucleic được điều hòa, hoặc thông qua tác động của một hoặc nhiều phân tử khác (ví dụ, polypeptit liên kết với trình tự điều hòa và/hoặc axit nucleic). Ví dụ về trình tự điều hòa bao gồm trình tự gen khởi đầu, gen tăng cường và các yếu tố kiểm soát sự biểu hiện khác (ví dụ, tín hiệu bổ sung đuôi poly (A)). Ví dụ khác về trình tự điều hòa được mô tả trong, ví dụ, Goeddel, 1990, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA and Baron *et al.*, 1995, *Nucleic Acid Res.* 23:3605–06.

“Tế bào chủ” là tế bào có thể được dùng để biểu hiện axit nucleic, ví dụ axit nucleic theo sáng chế. Tế bào chủ có thể là tế bào của sinh vật nhân sơ, ví dụ, *E. coli* hoặc có thể là tế bào của sinh vật nhân chuẩn, ví dụ, sinh vật nhân chuẩn đơn bào (ví dụ, nấm men hoặc các loại nấm khác), tế bào thực vật (ví dụ, tế bào cây thuốc lá hoặc tế bào cây cà chua), tế bào động vật (ví dụ, tế bào của người, tế bào khi, tế bào chuột đồng, tế bào chuột cống, tế bào chuột nhắt hoặc tế bào côn trùng) hoặc tế bào lai. Ví dụ về các tế bào chủ bao gồm dòng COS-7 của tế bào thận khi (ATCC CRL 1651) (xem Gluzman *et al.*, 1981, *Cell* 23:175), tế bào L, tế bào C127, tế bào 3T3 (ATCC CCL 163), tế bào buồng trứng chuột đồng Trung quốc (CHO) hoặc các tế bào thu được từ chúng như V Reggie CHO và các dòng tế bào liên quan được phát triển trong môi trường không huyết thanh (xem Rasmussen *et al.*, 1998, *Cytotechnology* 28:31) hoặc CHO chủng DX-B11, thiếu hụt DHFR (xem Urlaub *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-20), tế bào HeLa, các dòng tế bào BHK (ATCC CRL 10), dòng tế bào CV1/EBNA thu được từ dòng tế bào thận khi xanh châu Phi CV1 (ATCC CCL 70) (xem McMahan *et al.*, 1991, *EMBO J.* 10:2821), tế bào thận phôi người như 293, 293 EBNA hoặc MSR 293, tế bào A431 biểu bì của người, tế bào Colo205 của người, các dòng tế bào động vật linh trưởng được biến nạp khác, tế bào lưỡng bội bình thường, chủng tế bào thu được từ việc nuôi cấy in vitro mô sơ cấp, các mô cấy sơ cấp, các tế bào HL-60, U937, HaK hoặc Jurkat. Thông thường, tế bào chủ là tế bào nuôi cấy có thể được biến nạp hoặc chuyển nhiễm với axit nucleic mã hoá polypeptit, sau

đó có thể được biểu hiện trong tế bào chủ. Cụm từ “tế bào chủ tái tổ hợp” có thể được sử dụng để chỉ tế bào chủ được biến nạp hoặc chuyển nhiễm với axit nucleic cần được biểu hiện. Tế bào chủ cũng có thể là tế bào chứa axit nucleic nhưng không biểu hiện nó ở mức độ mong muốn trừ khi trình tự điều hòa được đưa vào tế bào chủ này sao cho nó trở nên liên kết hoạt động với axit nucleic. Được hiểu rằng thuật ngữ tế bào chủ không những được dùng để chỉ tế bào của đối tượng cụ thể mà đời sau hoặc đời sau có tiềm năng của tế bào này. Do các cải biến này có thể xuất hiện trong các thế hệ kế tiếp do, ví dụ sự đột biến hoặc ảnh hưởng của môi trường, thực tế là đời sau có thể không giống với tế bào ban đầu, nhưng vẫn được bao gồm trong phạm vi của thuật ngữ khi được sử dụng trong bản mô tả này.

Các protein liên kết kháng nguyên

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, các kháng thể, mảnh kháng thể, dẫn xuất kháng thể, mutein kháng thể và biến thể kháng thể) liên kết với alpha4beta7, như alpha4beta7 ở người.

Protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm protein liên kết kháng nguyên ức chế hoạt tính sinh học của alpha4beta7. Ví dụ về các hoạt tính sinh học này bao gồm sự liên kết của alpha4beta7 với MAdCAM-1 và sự bám dính giữa các tế bào biểu hiện alpha4beta7 và tế bào biểu hiện MAdCAM-1. Các hoạt tính sinh học khác bao gồm các hoạt tính được điều tiết bởi alpha4beta7 in vivo, như sự di chuyển hoặc tái cư trú; cụ thể là alpha4beta7 có liên quan đến sự di chuyển của các lympho bào đến ruột. Việc biểu hiện MAdCAM-1 tăng trong ruột bị viêm sẽ tăng cường sự thu nạp các lympho bào biểu hiện alpha4beta7 cho ruột, nơi mà sự hoạt hoá lympho bào bất thường làm gia tăng đáp ứng viêm và hư hại mô.

Các protein liên kết kháng nguyên khác nhau có thể liên kết với các miền hoặc các epitop khác nhau của alpha4beta7 hoặc tác động nhờ các cơ chế tác động khác. Ví dụ bao gồm nhưng không giới hạn ở protein liên kết kháng nguyên can thiệp vào khả năng liên kết với MAdCAM-1 của alpha4beta7 hoặc ức chế các tương tác tế bào như sự bám dính giữa các tế bào biểu hiện alpha4beta7 và tế bào biểu hiện MAdCAM-1. Vị trí tác động này có thể là, ví dụ, nội bào (ví dụ, bằng cách can thiệp vào tăng dẫn truyền tín hiệu nội bào) hoặc ngoại bào. Protein liên kết kháng nguyên không cần phải ức chế hoàn toàn hoạt tính được gây ra bởi alpha4beta7 để có thể sử dụng theo sáng

chế; đúng hơn là, protein liên kết kháng nguyên làm giảm hoạt tính cụ thể của alpha4beta7 cũng được tính đến để sử dụng. (Các thảo luận trong bản mô tả này về cơ chế tác động đặc trưng của protein liên kết kháng nguyên liên kết alpha4beta7 trong việc điều trị các bệnh cụ thể chỉ có ý nghĩa minh họa và các phương pháp được nêu trong bản mô tả này không bị ràng buộc bởi các cơ chế này.)

Các dẫn xuất khác của các kháng thể kháng alpha4beta7 trong phạm vi của sáng chế bao gồm các thể tiếp hợp cộng hóa trị hoặc thể tiếp hợp cộng gộp của các kháng thể kháng alpha4beta7 hoặc mảnh của nó, với các protein hoặc polypeptit khác, như bằng cách biểu hiện protein dung hợp tái tổ hợp chứa polypeptit khác loại được dung hợp với đầu tận N hoặc đầu tận C của polypeptit kháng thể kháng alpha4beta7. Ví dụ, peptit tiếp hợp có thể là polypeptit tín hiệu (hoặc chỉ huy) khác loại, như chất chỉ huy yếu tố alpha của nấm men hoặc peptit như thể epitop. Protein dung hợp chứa protein liên kết kháng nguyên có thể chứa các peptit được bổ sung để tạo thuận lợi cho việc tinh chế hoặc nhận biết protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, poly-His). Protein liên kết kháng nguyên cũng có thể được liên kết với peptit FLAG® Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) (SEQ ID NO:62) như được mô tả trong Hopp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988 và Patent Mỹ số 5,011,912. Peptit FLAG® có tính kháng nguyên cao và tạo ra epitop được liên kết thuận nghịch với kháng thể đơn dòng đặc hiệu (mAb), cho phép thử nghiệm nhanh và dễ dàng tinh chế protein tái tổ hợp được biểu hiện. Các chất phản ứng có thể sử dụng để tạo ra protein dung hợp trong đó peptit FLAG® được dung hợp với polypeptit xác định là có bán trên thị trường (Sigma-Aldrich, St. Louis MO).

Oligome chứa một hoặc nhiều protein liên kết kháng nguyên có thể được dùng làm chất đối kháng alpha4beta7. Oligome này có thể ở dạng dimer, trimer hoặc các oligome lớn hơn được liên kết cộng hóa trị hoặc được liên kết không cộng hóa trị. Các oligome chứa hai hoặc nhiều hơn hai protein liên kết kháng nguyên được tính đến để sử dụng, một ví dụ là homodimer. Các oligome khác bao gồm dị dimer, homotrimer, dị trimer, homotetramer, dị tetramer, v.v.

Một phương án của sáng chế đề cập đến oligome chứa nhiều protein liên kết kháng nguyên được nối bằng các tương tác cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị giữa các gốc peptit được dung hợp với protein liên kết kháng nguyên. Các peptit này có thể là thành phần liên kết peptit (mảnh đệm) hoặc peptit có đặc tính thúc đẩy quá trình

oligome hóa. Khóa kéo leuxin và các polypeptit nhất định thu được từ các kháng thể là nằm trong số các peptit có thể thúc đẩy quá trình oligome hóa các protein liên kết kháng nguyên gắn với nó, như được mô tả chi tiết dưới đây.

Theo phương án cụ thể, các oligome chứa từ hai đến bốn protein liên kết kháng nguyên. Các protein liên kết kháng nguyên của oligome có thể ở dạng bất kỳ, như dạng bất kỳ trong số các dạng được nêu ở trên, ví dụ, biến thể hoặc mảnh. Tốt hơn là, các oligome này chứa protein liên kết kháng nguyên có hoạt tính liên kết $\alpha 4\beta 7$.

Theo một phương án, oligome được tạo ra bằng cách sử dụng polypeptit thu được từ các globulin miễn dịch. Việc tạo ra protein dung hợp chứa các polypeptit khác loại nhất định được dung hợp với các phần khác nhau của polypeptit thu được từ kháng thể (bao gồm miền Fc) đã được mô tả, như trong tài liệu của Ashkenazi et al., 1991, PNAS USA 88:10535; Byrn et al., 1990, Nature 344:677; và Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Protein", trong Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1 - 10.19.11.

Một phương án của sáng chế đề cập đến đime chứa hai protein dung hợp được tạo ra bằng cách dung hợp mảnh liên kết $\alpha 4\beta 7$ của kháng thể kháng $\alpha 4\beta 7$ với vùng Fc của kháng thể. Đime này có thể được tạo ra bằng cách, ví dụ, chèn một gen dung hợp mã hoá protein dung hợp vào vector biểu hiện thích hợp, biểu hiện gen dung hợp trong các tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện tái tổ hợp và cho phép protein dung hợp được biểu hiện lắp ráp các phân tử kháng thể giống nhau nhất, dựa vào đó các liên kết disulfua liên chuỗi tạo thành giữa các gốc Fc để tạo thành đime.

Thuật ngữ "polypeptit Fc" khi được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm dạng tự nhiên và dạng mutein của polypeptit thu được từ vùng Fc của kháng thể. Dạng bị cắt ngắn của polypeptit này chứa vùng bản lề thúc đẩy quá trình đime hóa cũng được bao gồm. Protein dung hợp chứa các gốc Fc (và oligome được tạo thành từ đó) tạo thuận lợi là tinh chế dễ dàng bằng sắc ký ái lực trên cột Protein A hoặc Protein G.

Một polypeptit Fc thích hợp, được mô tả trong đơn PCT số công bố WO 93/10151 (được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn), là polypeptit mạch đơn được kéo dài từ vùng bản lề đầu tận N đến đầu tận C tự nhiên của vùng Fc của kháng thể IgG1 của người. Một polypeptit Fc hữu dụng khác là mutein Fc được mô tả trong

patent Mỹ số 5,457,035 và trong tài liệu của Baum *et al.*, 1994, EMBO J. 13:3992-4001. Trình tự axit amin của mutein này giống với trình tự axit amin của trình tự Fc tự nhiên được nêu trong WO 93/10151, ngoại trừ 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. Mutein thể hiện ái lực giảm với các thụ thể Fc.

Theo các phương án khác, phần thay đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể kháng alpha4beta7 có thể được thay thế cho phần thay đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể.

Theo cách khác, oligome là protein dung hợp chứa nhiều protein liên kết kháng nguyên, có thành phần liên kết peptit (peptit đậm) hoặc không. Trong số các thành phần liên kết peptit thích hợp có các thành phần liên kết được mô tả trong các patent Mỹ số 4,751,180 và 4,935,233.

Phương pháp điều chế protein liên kết kháng nguyên dạng oligome bao gồm việc sử dụng khóa kéo leuxin. Miền khóa kéo leuxin là peptit thúc đẩy quá trình oligome hóa của protein trong đó chúng được tìm thấy. Khóa kéo leuxin được nhận diện lần đầu trong một vài protein liên kết ADN (Landschulz *et al.*, 1988, Science 240:1759) và được tìm thấy trong một số loại protein khác. Trong số các khóa kéo leuxin đã biết là các peptit có trong tự nhiên và dẫn xuất của nó được dime hóa hoặc trime hóa. Ví dụ về miền khóa kéo leuxin thích hợp để tạo ra protein oligome được mô tả trong đơn PCT số công bố WO 94/10308 và khóa kéo leuxin thu được từ protein D hoạt động bề mặt (SPD) ở phổi được mô tả trong Hoppe *et al.*, 1994, FEBS Letters 344:191, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Việc sử dụng khóa kéo leuxin biến đổi cho phép trime hóa ổn định các protein khác loại được dung hợp vào đó được mô tả trong tài liệu của Fanslow *et al.*, 1994, Seminate Immunol. 6:267-78. Theo một phương thức, protein dung hợp tái tổ hợp chứa mảnh kháng thể kháng alpha4beta7 hoặc dẫn xuất được dung hợp với peptit khóa kéo leuxin được biểu hiện ở các tế bào chủ thích hợp và các mảnh kháng thể kháng alpha4beta7 dạng oligome tan được hoặc dẫn xuất của nó được thu hồi từ phần nổi bề mặt của dịch nuôi cấy.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên can thiệp vào việc liên kết của alpha4beta7 với MAdCAM-1. Protein liên kết kháng nguyên này có thể được làm kháng alpha4beta7 hoặc mảnh, biến thể hoặc dẫn xuất của nó và được

sàng lọc trong các thử nghiệm thông thường để xác định khả năng can thiệp vào việc liên kết của alpha4beta7 với MAdCAM-1. Ví dụ về thử nghiệm thích hợp là thử nghiệm kiểm tra khả năng của protein liên kết kháng nguyên trong việc ức chế liên kết của MAdCAM-1 (nghĩa là MAdCAM-1 hòa tan) với tế bào biểu hiện alpha4beta7 hoặc kiểm tra khả năng của protein liên kết kháng nguyên trong việc làm giảm đáp ứng sinh học hoặc tế bào do sự tương tác của MAdCAM-1 và alpha4beta7 (nghĩa là sự bám dính của các tế bào biểu hiện alpha4beta7 với MAdCAM-1 hoặc tế bào biểu hiện MAdCAM-1). Các thử nghiệm bổ sung kiểm tra protein liên kết kháng nguyên bao gồm các thử nghiệm so sánh định tính hoặc định lượng sự liên kết của protein liên kết kháng nguyên với polypeptit alpha4beta7 với sự liên kết của protein liên kết kháng nguyên đã biết với polypeptit alpha4beta7, một số ví dụ về thử nghiệm này được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên biểu lộ tính chọn lọc loài. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên liên kết với một hoặc nhiều alpha4beta7 của động vật có vú, ví dụ, với alpha4beta7 của người và một hoặc nhiều trong số alpha4beta7 của chuột nhắt, chuột cống, chuột lang, chuột đồng, chuột nhảy, mèo, thỏ, chó, dê, cừu, bò, ngựa, lạc đà và động vật linh trưởng không phải người. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên liên kết với một hoặc nhiều alpha4beta7 của động vật linh trưởng, ví dụ, với alpha4beta7 của người và một hoặc nhiều trong số alpha4beta7 của khỉ cynomologous, khỉ đuôi sóc, khỉ nâu (khỉ rezut), khỉ vàng sư tử tamarin và tinh tinh. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên liên kết đặc hiệu với alpha4beta7 của người, khỉ cynomologous, khỉ đuôi sóc, khỉ rezut, khỉ vàng sư tử tamarin hoặc tinh tinh. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên không liên kết với một hoặc nhiều alpha4beta7 của chuột nhắt, chuột cống, chuột lang, chuột đồng, chuột nhảy, mèo, thỏ, chó, dê, cừu, bò, ngựa, lạc đà và động vật linh trưởng không phải người. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên không liên kết với loài khỉ New World như khỉ đuôi sóc.

Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên không thể hiện liên kết đặc hiệu với protein có trong tự nhiên bất kỳ khác ngoài alpha4beta7. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên không thể hiện liên kết đặc hiệu protein có trong tự nhiên bất kỳ khác ngoài alpha4beta7 của động vật có vú. Theo một

phương án khác, protein liên kết kháng nguyên không thể hiện liên kết đặc hiệu với protein có trong tự nhiên bất kỳ khác ngoài alpha4beta7 của động vật linh trưởng. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên không có thể hiện liên kết đặc hiệu với protein có trong tự nhiên bất kỳ khác ngoài alpha4beta7 của người. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên liên kết đặc hiệu với alpha4beta7 từ ít nhất một động vật linh trưởng không phải người, ví dụ, alpha4beta7 của khỉ cynomologous và alpha4beta7 của người. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên liên kết đặc hiệu với alpha4beta7 của động vật linh trưởng không phải người, của khỉ cynomologous và của người với ái lực liên kết tương tự. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên phong bế hoạt tính của alpha4beta7 của động vật linh trưởng không phải người, của khỉ cynomologous và của người. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên có giá trị IC_{50} hoặc EC_{50} tương tự với alpha4beta7 của động vật linh trưởng không phải người, của khỉ cynomologous và của người trong thử nghiệm như được mô tả trong bản mô tả này.

Có thể xác định tính chọn lọc của protein liên kết kháng nguyên đối với alpha4beta7 bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và theo hướng dẫn trong bản mô tả này. Ví dụ, có thể xác định tính chọn lọc bằng cách sử dụng phương pháp thẩm tách Western, FACS, ELISA hoặc RIA.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên liên kết alpha4beta7 (ví dụ, kháng thể kháng alpha4beta7), có một hoặc nhiều đặc điểm sau: liên kết với cả alpha4beta7 của người và động vật linh trưởng không phải người, ức chế liên kết của MAdCAM-1 với alpha4beta7, ức chế sự bám dính của tế bào biểu hiện alpha4beta7 với MAdCAM-1, ức chế sự bám dính của tế bào biểu hiện alpha4beta7 với tế bào biểu hiện MAdCAM-1, ức chế sự di chuyển của tế bào biểu hiện alpha4beta7 tới các mô chứa tế bào biểu hiện MAdCAM-1, liên kết với cả dạng alpha4beta7 hoạt động và bất hoạt, gây điều hòa giảm tương đối nhỏ alpha4beta7 được biểu hiện trên bề mặt tế bào.

Các mảnh liên kết kháng nguyên của protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có thể được tạo ra theo kỹ thuật thông thường. Ví dụ về các mảnh này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, mảnh Fab và $F(ab')_2$. Mảnh kháng thể và dẫn xuất được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền cũng có thể được bao gồm.

Các phương án khác của sáng chế bao gồm các kháng thể khảm, ví dụ, các dạng được làm giống như của người của các kháng thể đơn dòng không phải người (ví dụ, loài chuột). Các kháng thể được làm giống như của người này có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết và tạo thuận lợi là tính sinh miễn dịch giảm khi các kháng thể này được dùng cho người. Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được làm giống như của người chứa miền thay đổi của kháng thể loài chuột (hoặc toàn bộ hoặc một phần vị trí liên kết kháng nguyên của nó) và miền ổn định thu được từ kháng thể của người. Theo cách khác, mảnh kháng thể được làm giống như của người có thể chứa vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể đơn dòng loài gặm nhấm và mảnh miền thay đổi (thiếu vị trí liên kết kháng nguyên) thu được từ kháng thể của người. Quy trình sản xuất các kháng thể đơn dòng khảm và các kháng thể đơn dòng được xử lý khác nữa bao gồm các quy trình được mô tả trong tài liệu của Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332:323, Liu *et al.*, 1987, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:3439, Larrick *et al.*, 1989, Bio/Technology 7:934 và Winter *et al.*, 1993, TIPS 14:139. Theo một phương án, kháng thể khảm là kháng thể được ghép CDR. Các kỹ thuật để tạo ra các kháng thể được làm giống như của người được mô tả trong, ví dụ, đơn sáng chế Mỹ số 10/194,975 (công bố ngày 27 tháng 02 năm 2003), các patent Mỹ số 5,869,619, 5,225,539, 5,821,337, 5,859,205, Padlan *et al.*, 1995, FASEB J. 9:133-39 và Tamura *et al.*, 2000, J. Immunol. 164:1432-41.

Các quy trình được phát triển để tạo ra các kháng thể người hoặc một phần của người ở động vật không phải người. Ví dụ, chuột nhắt trong đó một hoặc nhiều gen globulin miễn dịch nội sinh bị bất hoạt bằng nhiều cách khác nhau được chuẩn bị. Các gen globulin miễn dịch của người được đưa vào trong chuột nhắt để thay thế cho các gen của chuột bị bất hoạt. Các kháng thể được tạo ra trong cơ thể chuột kết hợp với chuỗi polypeptit globulin miễn dịch của người được mã hoá bởi vật liệu di truyền của người đã được đưa vào trong cơ thể chuột. Theo một phương án, động vật không phải người, như chuột biến đổi gen, được gây miễn dịch bằng polypeptit alpha4beta7, sao cho các kháng thể này được nhắm chống lại polypeptit alpha4beta7 được tạo ra ở động vật này. Một ví dụ về chất sinh miễn dịch thích hợp là alpha4beta7 tan được của người, như polypeptit chứa một phần của alpha4beta7 hoặc mảnh sinh miễn dịch alpha4beta7 khác. Ví dụ khác về chất sinh miễn dịch thích hợp là tế bào biểu hiện alpha4beta7 ở mức cao hoặc chế phẩm màng tế bào thu được từ đó.

Ví dụ về kỹ thuật tạo ra và sử dụng động vật chuyển gen để sản xuất các kháng thể của người hoặc một phần của người được mô tả trong các patent Mỹ số 5,814,318, 5,569,825 và 5,545,806, Davis et al., 2003, *Production of human antibodies from transgenic mice* trong Lo, ed. *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, Humana Press, NJ:191-200, Kellermann et al., 2002, *Curr Opin Biotechnol.* 13:593-97, Russel et al., 2000, *Infect Immun.* 68:1820-26, Gallo et al., 2000, *Eur J Immun.* 30:534-40, Davis et al., 1999, *Cancer Metastasis Rev.* 18:421-25, Green, 1999, *J Immunol Methods.* 231:11-23, Jakobovits, 1998, *Adv Drug Deliv Rev* 31:33-42, Green et al., 1998, *J Exp Med.* 188:483-95, Jakobovits A, 1998, *Exp. Opin. Invest. Drugs.* 7:607-14, Tsuda et al., 1997, *Genomics* 42:413-21, Mendez et al., 1997, *Nat Genet.* 15:146-56, Jakobovits, 1994, *Curr Biol.* 4:761-63, Arbones et al., 1994, *Immunity.* 1:247-60, Green et al., 1994, *Nat Genet.* 7:13-21, Jakobovits et al., 1993, *Nature* 362:255-58, Jakobovits et al., 1993, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:2551-55. Chen, J. et al., 1993, *Int Immunol* 5: 647-656, Choi et al., 1993, *Nature Genetics* 4: 117-23, Fishwild et al., 1996, *Nat Biotechnol* 14: 845-51, Harding et al., 1995, *Ann NY Acad Sci*, Lonberg et al., 1994, *Nature* 368: 856-59, Lonberg, 1994, *Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibody* trong *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101, Lonberg et al., 1995, *Int Rev Immunol* 13: 65-93, Neuberger, 1996, *Nat Biotechnol* 14: 826, Taylor et al., 1992, *Nucleic Acid Research* 20: 6287-95, Taylor et al., 1994, *Int Immunol* 6: 579-91, Tomizuka et al., 1997, *Nat Gen* 16: 133-43, Tomizuka et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 722-27, Tuailon et al., 1993, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 3720-24 và Tuailon et al., 1994, *J Immunol* 152: 2912-20. Các ví dụ này và các ví dụ khác cũng được thảo luận trong công bố đơn sáng chế Mỹ số 2007-0098715, công bố ngày 03/05/2007.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng liên kết với alpha4beta7. Các kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách làm bất tử tế bào lách thu hoạch được từ động vật chuyển gen sau khi hoàn tất chu 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 kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách dung hợp chúng với tế bào u tủy để thu được các tế bào lai. Tế bào u tủy để sử dụng trong quy trình dung hợp tạo tế bào lai tốt hơn là không tạo kháng thể, có hiệu quả dung hợp cao và các khiếm khuyết enzym khiến cho chúng

không có khả năng sinh trưởng trong môi trường chọn lọc nhất định mà chỉ hỗ trợ cho sự phát triển của các tế bào dung hợp mong muốn (tế bào lai). Ví dụ về các dòng tế bào thích hợp để sử dụng trong quá trình dung hợp của 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 S194/5XX0 Bul; ví dụ về các dòng tế bào được sử dụng trong quá trình dung hợp của chuột cống bao gồm R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F và 4B210. Các dòng tế bào khác có thể dùng để dung hợp tế bào là U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 và UC729-6.

Theo một phương án, dòng tế bào lai được tạo ra bằng cách gây miễn dịch cho động vật (ví dụ, động vật chuyển gen có trình tự globulin miễn dịch của người) với chất sinh miễn dịch alpha4beta7; thu hoạch tế bào lách từ động vật được gây miễn dịch; dung hợp tế bào lách đã thu hoạch với dòng tế bào u tủy, nhờ đó tạo ra tế bào lai; thiết lập các dòng tế bào lai từ các tế bào lai và nhận diện dòng tế bào lai tạo ra kháng thể liên kết polypeptit alpha4beta7. Các dòng tế bào lai này và các kháng thể đơn dòng kháng alpha4beta7 được tạo ra từ chúng được bao gồm trong sáng chế.

Các 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 kỹ thuật này. Các tế bào lai hoặc các mAb có thể được sàng lọc tiếp để nhận diện các mAb với các đặc tính cụ thể, như khả năng phong bế hoạt tính gây ra bởi alpha4beta7. Ví dụ về việc sàng lọc này được nêu trong phần ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Các kháng thể đơn dòng cũng có thể được tạo ra bằng các quy trình được gọi là gây miễn dịch di truyền. Ví dụ, axit nucleic mã hoá kháng nguyên mong muốn có thể được kết hợp vào vector virus (như vector adenovirus). Vector thu được sau đó được sử dụng để phát triển đáp ứng miễn dịch chống lại kháng nguyên mong muốn ở động vật chủ thích hợp (ví dụ, bệnh đái tháo đường không do béo phì hoặc NOD, chuột nhắt). Kỹ thuật này về cơ bản là được mô tả trong tài liệu của Ritter et al., *Biodrugs* 16(1): 3 – 10 (2002), phần mô tả của nó được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Sự tiến hóa phân tử của các vùng quyết định bổ trợ (các CDR) ở trung tâm của vị trí liên kết kháng thể cũng được sử dụng để phân lập các kháng thể có ái lực tăng, ví dụ, các kháng thể có ái lực tăng đối với c-erbB-2, như được mô tả bởi Schier *et al.*,

1996, J. Mol. Biol. 263:551. Do đó, các kỹ thuật này có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể với alpha4beta7.

Protein liên kết kháng nguyên được nhắm chống lại alpha4beta7 có thể được sử dụng, ví dụ, trong thử nghiệm để phát hiện sự có mặt của polypeptit alpha4beta7 hoặc tế bào biểu hiện alpha4beta7, *in vitro* hoặc *in vivo*. Protein liên kết kháng nguyên cũng có thể được sử dụng để tinh chế protein alpha4beta7 bằng sắc ký ái lực miễn dịch. Các protein liên kết kháng nguyên mà có thể phong bế sự tương tác của MAdCAM-1 và alpha4beta7 có thể được sử dụng để ức chế hoạt tính sinh học tạo ra từ sự tương tác này. Việc phong bế protein liên kết kháng nguyên có thể được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế. Các protein liên kết kháng nguyên mà có chức năng như chất đối kháng alpha4beta7 có thể được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh do alpha4beta7 gây ra, bao gồm nhưng không giới hạn ở, tình trạng viêm. Theo một phương án, kháng thể đơn dòng kháng alpha4beta7 của người được tạo ra từ các quy trình bao gồm bước gây miễn dịch cho chuột nhất biến đổi gen được sử dụng để điều trị các tình trạng bệnh này.

Protein liên kết kháng nguyên có thể được sử dụng trong các quy trình *in vitro* hoặc được dùng *in vivo* để ức chế hoạt tính sinh học gây ra bởi alpha4beta7. Do đó, các rối loạn được gây ra hoặc làm trầm trọng (trực tiếp hoặc gián tiếp) bởi alpha4beta7 và sự tương tác của nó với MAdCAM-1, ví dụ về chúng được nêu trong bản mô tả này, có thể được điều trị. Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp trị liệu bao gồm bước cho động vật có vú cần điều trị sử dụng *in vivo* protein liên kết kháng nguyên phong bế alpha4beta7 với lượng hữu hiệu để làm giảm hoạt tính sinh học do alpha4beta7 gây ra.

Protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm các kháng thể đơn dòng của người một phần và của người hoàn toàn, ức chế hoạt tính sinh học của alpha4beta7. Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng của người phong bế ít nhất một phần tương tác của alpha4beta7 của người với MAdCAM-1. Theo một phương án, các kháng thể này được tạo ra bằng cách gây miễn dịch chuột nhất biến đổi gen bằng chất sinh miễn dịch alpha4beta7. Theo một phương án khác, chất sinh miễn dịch là polypeptit alpha4beta7 của người (ví dụ, tế bào được biến nạp hoặc chuyển nhiễm để biểu hiện alpha4beta7 hoặc tế bào biểu hiện alpha4beta7 theo cách tự nhiên). Các dòng tế bào lai thu được từ chuột nhất đã được gây miễn dịch này,

trong đó tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng liên kết alpha4beta7, cũng được bao gồm trong sáng chế.

Mặc dù các kháng thể của người, của người một phần hoặc được làm giống như của người, là thích hợp cho nhiều ứng dụng, đặc biệt là các ứng dụng liên quan đến việc dùng kháng thể cho đối tượng là người, các loại protein liên kết kháng nguyên khác cũng sẽ thích hợp cho các ứng dụng nhất định. Các kháng thể không phải của người theo sáng chế có thể, ví dụ, thu được từ động vật tạo kháng thể bất kỳ, như chuột nhắt, chuột, thỏ, dê, lừa hoặc động vật linh trưởng không phải người (như khỉ (ví dụ, khỉ cynomologous hoặc khỉ rezerut) hoặc khỉ không đuôi (ví dụ, tinh tinh)). Các kháng thể không phải của người theo sáng chế có thể được sử dụng, ví dụ, trong các ứng dụng dựa trên việc nuôi cấy *in vitro* và nuôi cấy tế bào hoặc ứng dụng khác bất kỳ trong đó đáp ứng miễn dịch với kháng thể theo sáng chế không xảy ra, không đáng kể, có thể được ngăn ngừa, không phải là mối quan tâm hoặc được mong muốn. Theo một phương án, kháng thể không phải của người theo sáng chế được dùng cho đối tượng không phải người. Theo một phương án khác, kháng thể không phải của người không gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng không phải người. Theo một phương án khác, kháng thể không phải của người là từ loài tương tự như đối tượng không phải người, ví dụ, kháng thể chuột nhắt theo sáng chế được dùng cho chuột nhắt. Kháng thể từ một loài cụ thể có thể được tạo ra bằng cách, ví dụ, gây miễn dịch cho động vật thuộc loài đó bằng chất sinh miễn dịch mong muốn (ví dụ, tế bào biểu hiện alpha4beta7 hoặc polypeptit alpha4beta7 tan được) hoặc bằng cách sử dụng hệ nhân tạo để tạo ra các kháng thể của loài đó (ví dụ, hệ được dựa trên sự biểu hiện của vi khuẩn hoặc thể thực khuẩn để tạo ra các kháng thể của loài cụ thể) hoặc bằng cách chuyển hóa kháng thể từ loài này thành kháng thể từ loài khác bằng cách thay thế, ví dụ, vùng ổn định của kháng thể bằng vùng ổn định từ loài khác hoặc bằng cách thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin của kháng thể sao cho nó tương tự nhất với trình tự của kháng thể từ loài khác. Theo một phương án, kháng thể là kháng thể khảm chứa trình tự axit amin thu được từ các kháng thể của hai hoặc nhiều loài khác nhau.

Protein liên kết kháng nguyên có thể được điều chế bằng các kỹ thuật thông thường bất kỳ. Ví dụ, chúng có thể được tinh chế từ tế bào biểu hiện chúng một cách tự nhiên (ví dụ, kháng thể có thể được tinh chế từ tế bào lai tạo ra nó) hoặc được tạo ra trong hệ biểu hiện tái tổ hợp, bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực

kỹ thuật này. Xem, 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 Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988).

Một hệ biểu hiện bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để tạo ra polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế. Nói chung, các tế bào chủ được biến nạp với vector biểu hiện tái tổ hợp chứa ADN mã hoá polypeptit mong muốn. Trong số các tế bào chủ có thể được sử dụng là tế bào sinh vật nhân sơ, tế bào nấm men hoặc tế bào sinh vật nhân chuẩn bậc cao. Sinh vật nhân sơ bao gồm sinh vật gram âm hoặc gram dương, ví dụ *E. coli* hoặc bacilli. Tế bào sinh vật nhân chuẩn bậc cao bao gồm tế bào côn trùng và các dòng tế bào đã được thiết lập có nguồn gốc từ động vật có vú. Ví dụ về các dòng tế bào chủ của động vật có vú thích hợp bao gồm dòng COS-7 của tế bào thận khỉ (ATCC CRL 1651) (Gluzman *et al.*, 1981, Tế bào 23:175), tế bào L, tế bào 293, tế bào C127, tế bào 3T3 (ATCC CCL 163), tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), tế bào HeLa, các dòng tế bào BHK (ATCC CRL 10) và dòng tế bào CVI/EBNA có nguồn gốc từ dòng tế bào thận khỉ xanh châu Phi CVI (ATCC CCL 70) như đã được mô tả bởi McMahan *et al.*, 1991, EMBO J. 10: 2821. Các vector tách dòng và biểu hiện thích hợp để sử dụng với tế bào chủ của vi khuẩn, nấm, nấm men và động vật có vú được mô tả bởi Pouwels et al. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985).

Tế bào được biến nạp có thể được nuôi cấy dưới điều kiện thúc đẩy sự biểu hiện của polypeptit và polypeptit được thu hồi bằng quy trình tinh chế protein thông thường. Một quy trình tinh chế này bao gồm việc sử dụng sắc ký ái lực, ví dụ, trên chất nền có toàn bộ hoặc một phần (ví dụ, miền ngoại bào) của alpha4beta7 được gắn vào đó. Polypeptit được dự tính để sử dụng trong bản mô tả này bao gồm các polypeptit kháng thể kháng alpha4beta7 của động vật có vú tái tổ hợp gần như cùng loại về cơ bản không chứa vật liệu nội sinh nhiễm tạp.

Trình tự axit amin của polypeptit có thể được kiểm tra bằng cách bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể giống với trình tự được nêu trong Danh mục trình tự hoặc có thể khác với trình tự đó ở một hoặc nhiều gốc axit amin do kết quả của quá trình xử lý. Ví dụ, trên tất cả hoặc một phần của các polypeptit cùng loại, axit amin đầu tận C từ chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng (hoặc phân tử chuỗi đơn liên quan) có thể

được loại bỏ, bằng quá trình phân giải protein hoặc bằng quá trình khác diễn ra trong thời gian nuôi cấy, ví dụ, xử lý gốc Lys đầu tận C. Theo cách khác, nhiều hơn một gốc axit amin đầu tận C bị loại bỏ, ví dụ hai axit amin đầu tận C hoặc ba, bốn hoặc năm axit amin đầu tận C. Ví dụ, đầu tận C có thể được cắt ngắn để amit hóa prolin của chuỗi nặng của kháng thể như đã được bộc lộ. Tương tự, các axit amin đầu tận N có thể vắng mặt, ví dụ, một, hai, ba, bốn hoặc năm axit amin đầu tận N có thể vắng mặt.

Theo cách khác hoặc ngoài ra, các gốc axit amin cũng có thể chịu các biến đổi sau dịch mã, ví dụ nhưng không giới hạn ở, glutamin (cụ thể là, glutamin ở đầu tận N) có thể được đóng vòng hoặc được chuyển hóa thành axit pyroglutamic; ngoài ra hoặc theo cách khác, các axit amin có thể trải qua quá trình khử amit, đồng phân hóa, đường hóa và/hoặc oxy hóa. Polypeptit theo sáng chế có thể chịu biến đổi khác sau dịch mã, bao gồm quá trình đường hóa, ví dụ đường hóa liên kết với N hoặc liên kết với O, ở vị trí đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Như đã mô tả trước đó, các thay đổi này có thể được thực hiện trong trình tự axit amin của polypeptit để ngăn chặn hoặc giảm thiểu việc biến đổi hoặc tạo điều kiện thuận lợi cho việc biến đổi trong trường hợp việc xử lý là có lợi.

Các chế phẩm polypeptit gần như cùng loại có thể chứa khoảng 1%, 5%, 10 %, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% hoặc 99% polypeptit trải qua dạng (hoặc các dạng) xử lý cụ thể. Các chế phẩm polypeptit gần như cùng loại này có thể chứa một vài (ít hơn hoặc bằng 50%), phần lớn (nhiều hơn 50% nhưng ít hơn 90%) hoặc gần như toàn bộ (nhiều hơn 90%) (các) dạng polypeptit đã xử lý cụ thể. Hơn nữa, các chế phẩm này có thể chứa polypeptit có các mức độ khác nhau của nhiều hơn một loại biến đổi liên quan đến việc xử lý, ví dụ, polypeptit có một số, phần lớn hoặc gần như toàn bộ lysin có đầu tận C bị loại bỏ (ví dụ, lysin có đầu tận C trong SEQ ID NO: 72) và một số, phần lớn hoặc gần như toàn bộ axit amin đầu tận N được chuyển hóa thành axit pyroglutamic (ví dụ, polypeptit bất kỳ được thể hiện trong Bảng 1 và/hoặc 2 hoặc trong trình tự liên ứng).

Protein liên kết kháng nguyên có thể được tạo ra và sàng lọc các đặc tính mong muốn, bằng cách kỹ thuật bất kỳ đã biết. Các kỹ thuật này bao gồm phân lập axit nucleic mã hoá chuỗi polypeptit (hoặc một phần của nó) của protein liên kết kháng nguyên mong muốn (ví dụ, kháng thể kháng alpha4beta7) và thao tác với axit nucleic thông qua kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Axit nucleic có thể được dung hợp với axit nucleic

mong muốn khác hoặc được biến đổi (ví dụ, bằng kỹ thuật gây đột biến hoặc kỹ thuật thông thường khác) để ví dụ, thêm, xóa hoặc thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể kháng alpha4beta7 theo sáng chế. Các mảnh này gồm toàn bộ trình tự thu được từ kháng thể hoặc có thể chứa trình tự bổ sung. Ví dụ về các mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm Fab, F(ab')₂, các kháng thể chuỗi đơn, diabody, triabody, tetrabody và các kháng thể miền. Các ví dụ khác được nêu trong Lunde *et al.*, 2002, Biochem. Soc. Trans. 30:500-06.

Các kháng thể chuỗi đơn có thể tạo thành bằng cách liên kết các mảnh miền thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (vùng Fv) thông qua cầu axit amin (liên kết peptit ngắn), tạo thành chuỗi polypeptit đơn. Các Fv chuỗi đơn (các scFv) này được tạo ra bằng cách dung hợp ADN mã hoá liên kết peptit giữa các ADN mã hoá hai polypeptit miền thay đổi (V_L và V_H). Polypeptit tạo thành có thể tự cuộn lại để tạo thành monome liên kết kháng nguyên hoặc chúng có thể tạo thành các multime (ví dụ, đime, trime hoặc tetrame), tùy vào chiều dài của thành phần liên kết linh hoạt giữa hai miền thay đổi (Kortt *et al.*, 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt *et al.*, 2001, Biomol. Eng. 18:95-108). Bằng cách kết hợp các polypeptit chứa V_L và V_H khác nhau, có thể tạo thành các scFv multime gắn với các epitop khác nhau (Kriangkum *et al.*, 2001, Biomol. Eng. 18:31-40). Kỹ thuật được phát triển để tạo ra các kháng thể chuỗi đơn bao gồm các kỹ thuật được mô tả trong patent Mỹ số 4,946,778; Bird, 1988, Science 242:423; Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Ward *et al.*, 1989, Nature 334:544, de Graaf *et al.*, 2002, Methods Mol Biol. 178:379-87.

Protein liên kết kháng nguyên (ví dụ, các kháng thể, các mảnh kháng thể và dẫn xuất kháng thể) theo sáng chế có thể bao gồm vùng ổn định đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Vùng ổn định chuỗi nhẹ có thể là, ví dụ, vùng ổn định chuỗi nhẹ kiểu kappa hoặc lambda, ví dụ, vùng ổn định chuỗi nhẹ kiểu kappa hoặc lambda của người. Vùng ổn định chuỗi nặng có thể là, ví dụ, vùng ổn định chuỗi nặng kiểu alpha-, delta-, epsilon-, gama- hoặc mu-, ví dụ, vùng ổn định chuỗi nặng kiểu alpha-, delta-, epsilon-, gama- hoặc mu- của người. Theo một phương án, vùng ổn định chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng là mảnh, dẫn xuất, biến thể hoặc mutein của vùng ổn định có trong tự nhiên.

Kỹ thuật đã biết để thu nhận kháng thể từ lớp phụ hoặc isotyp khác nhau từ kháng thể mong muốn, nghĩa là, chuyển lớp phụ. Vì vậy, các kháng thể IgG có thể thu được từ, ví dụ kháng thể IgM, và ngược lại. Kỹ thuật này cho phép tạo ra các kháng thể mới có các đặc tính liên kết kháng nguyên của kháng thể cho trước (kháng thể ban đầu), nhưng cũng có các đặc tính sinh học liên quan đến isotyp hoặc lớp phụ kháng thể khác với kháng thể ban đầu. Kỹ thuật ADN tái tổ hợp có thể được sử dụng. ADN đã được tách dòng mã hoá polypeptit kháng thể cụ thể có thể được sử dụng trong các quy trình như vậy, ví dụ ADN mã hoá miền ổn định của kháng thể có isotyp mong muốn. Xem thêm Lantto *et al.*, 2002, *Methods Mol. Biol.* 178:303-16. Hơn nữa, nếu IgG4 là mong muốn, cũng có thể mong muốn đưa đột biến điểm (CPSCP → CPPCP) vào vùng bản lề như được mô tả trong Bloom *et al.*, 1997, *Protein Science* 6:407, được kết hợp bằng cách viện dẫn) để làm giảm xu hướng tạo thành liên kết disulfua trong chuỗi H mà có thể dẫn đến tính không đồng nhất giữa các kháng thể IgG4.

Hơn nữa, kỹ thuật thu nhận protein liên kết kháng nguyên có các đặc tính khác nhau (nghĩa là ái lực khác nhau đối với kháng nguyên mà chúng liên kết) cũng đã biết. Một kỹ thuật như vậy, được đề cập đến là sự sắp xếp lại chuỗi, bao gồm bước hiển thị các thư mục gen miền thay đổi globulin miễn dịch trên bề mặt thực khuẩn thể dạng sợi, thường được gọi là hiển thị trên thực khuẩn thể. Việc sắp xếp lại chuỗi được sử dụng để tạo ra các kháng thể ái lực cao với hapten 2-phenyloxazol-5-on, như được mô tả bởi Marks *et al.*, 1992, *BioTechnology*, 10:779.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên có hằng số phân ly thấp từ alpha4beta7. Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên có K_d bằng 100pM hoặc thấp hơn. Theo một phương án khác, K_d bằng 10pM hoặc thấp hơn; theo một phương án khác, K_d bằng 5pM hoặc thấp hơn hoặc bằng 1pM hoặc thấp hơn. Theo một phương án khác, K_d gần như giống với kháng thể được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên liên kết với alpha4beta7 với K_d gần như giống với kháng thể được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên ức chế hoạt tính của alpha4beta7, ví dụ sự liên kết (hoặc bám dính) với MAdCAM-1, sự liên kết với tế bào biểu hiện MAdCAM-1 hoặc sự bám dính giữa các tế bào biểu hiện alpha4beta 7 và tế bào biểu hiện MAdCAM-1. Theo một phương án, protein liên kết

kháng nguyên có IC_{50} bằng 1000pM hoặc thấp hơn. Theo một phương án khác, IC_{50} bằng 500pM hoặc thấp hơn; theo một phương án khác, IC_{50} bằng 100pM hoặc thấp hơn. Theo một phương án khác, giá trị IC_{50} gần như giống với giá trị này của kháng thể được mô tả trong phần ví dụ. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên ức chế hoạt tính của alpha4beta7 với giá trị IC_{50} gần như giống với kháng thể được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế có ái lực biểu kiến với alpha4beta7 (hoặc tế bào biểu hiện alpha4beta7) bằng 1000pM hoặc thấp hơn. Theo các phương án khác, protein liên kết kháng nguyên có ái lực biểu kiến bằng 500pM hoặc thấp hơn, 200pM hoặc thấp hơn, 100pM hoặc thấp hơn, 80pM hoặc thấp hơn, 40pM hoặc thấp hơn hoặc 15pM hoặc thấp hơn. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên có ái lực biểu kiến gần như giống với kháng thể được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên có ái lực biểu kiến gần như giống với kháng thể được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến protein liên kết kháng nguyên liên kết với dạng alpha4beta7 hoạt động và bất hoạt. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên liên kết với chỉ một dạng hoặc tốt hơn là liên kết với một dạng của alpha4beta7. Ví dụ, protein liên kết kháng nguyên có thể liên kết alpha4beta7 khi có mặt hoặc vắng mặt Mn^{2+} (nghĩa là, nó liên kết với cả dạng hoạt động và dạng bất hoạt). Theo cách khác, protein liên kết kháng nguyên có thể liên kết với alpha4beta7 chỉ khi có mặt Mn^{2+} hoặc chỉ khi vắng mặt Mn^{2+} hoặc nó có thể liên kết với ái lực cao hơn dưới điều kiện này hơn là điều kiện khác, cho thấy nó ưu tiên liên kết với một dạng cụ thể của alpha4beta7.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên cạnh tranh liên kết với alpha4beta7 với kháng thể được mô tả trong bản mô tả này. Khả năng cạnh tranh này có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ bằng sự cạnh tranh liên kết với tế bào biểu hiện alpha4beta7 khi được quan sát bằng cách sử dụng kỹ thuật phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACS) hoặc các thử nghiệm tương tự khác, bằng sự cạnh tranh trong thử nghiệm như thử nghiệm bám dính (nghĩa là, giữa các tế bào biểu hiện alpha4beta7 và tế bào biểu hiện MAdCAM-1) hoặc bằng sự cạnh tranh trong thử nghiệm khác được mô tả trong

bản mô tả này. Theo một khía cạnh, protein liên kết kháng nguyên cạnh tranh liên kết với alpha4beta7 với kháng thể được mô tả trong bản mô tả này liên kết các epitop giống nhau hoặc epitop chồng lấp (hoặc liền kề) dưới dạng kháng thể. Theo một khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên cạnh tranh liên kết với alpha4beta7 với kháng thể được mô tả trong bản mô tả này ức chế hoạt tính của alpha4beta7.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên liên kết với alpha4beta7 của người được biểu hiện trên bề mặt tế bào và, khi được liên kết, ức chế sự tương tác alpha4beta7 với MAdCAM-1 mà không làm giảm đáng kể lượng alpha4beta7 trên bề mặt tế bào. Phương pháp bất kỳ để xác định hoặc ước tính lượng alpha4beta7 trên bề mặt và/hoặc bên trong tế bào có thể được sử dụng. Theo một phương án, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên liên kết với alpha4beta7 được biểu hiện trên bề mặt tế bào và, khi được liên kết, ức chế sự tương tác alpha4beta7 với MAdCAM-1 mà không làm tăng đáng kể tỷ lệ nội bào hóa của alpha4beta7 từ bề mặt tế bào. Theo các phương án khác, việc liên kết của protein liên kết kháng nguyên với tế bào biểu hiện alpha4beta7 dẫn đến alpha4beta7 trên bề mặt tế bào được nội bào hóa với tỷ lệ nhỏ hơn 75%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1% hoặc 0,1%.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất protein liên kết kháng nguyên có thời gian bán rã ít nhất một ngày *in vitro* hoặc *in vivo* (ví dụ khi được dùng cho đối tượng là người). Theo một phương án, protein liên kết kháng nguyên có thời gian bán rã ít nhất ba ngày. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên có thời gian bán rã là bốn ngày hoặc lâu hơn. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên có thời gian bán rã là tám ngày hoặc lâu hơn. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên được tạo dẫn xuất hoặc được biến đổi sao cho nó có thời gian bán rã lâu hơn so với protein liên kết kháng nguyên không được tạo dẫn xuất hoặc không được biến đổi. Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên chứa một hoặc nhiều đột biến điểm để tăng thời gian bán rã huyết tương, như được mô tả trong WO 00/09560, công bố ngày 24/2/2000, được kết hợp bằng cách viện dẫn.

Sáng chế còn đề xuất protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu nhiều vị trí, ví dụ, protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu hai vị trí, như protein liên kết kháng nguyên liên kết với hai epitop khác nhau của alpha4beta7 hoặc với epitop của alpha4beta7 và

epitop của phân tử khác, qua hai vị trí hoặc vùng liên kết kháng nguyên khác nhau. Hơn nữa, protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu hai vị trí như được bộc lộ trong bản mô tả này có thể chứa vị trí liên kết alpha4beta7 từ một kháng thể trong các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này và vùng liên kết alpha4beta7 thứ hai từ một kháng thể khác trong các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn đến các công bố khác. Theo cách khác, protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu hai vị trí có thể chứa vị trí liên kết kháng nguyên từ một kháng thể trong các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này và vị trí liên kết kháng nguyên thứ hai từ kháng thể alpha4beta7 khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc từ kháng thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết hoặc các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Nhiều phương pháp tạo ra kháng thể đặc hiệu hai vị trí là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được thảo luận trong đơn sáng chế Mỹ số 09/839,632, nộp ngày 20/4/2001 (được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn). Các phương pháp này bao gồm việc sử dụng các tế bào lai lai như được mô tả bởi Milstein *et al.*, 1983, *Nature* 305:537 và các tài liệu khác (patent Mỹ số 4,474,893, patent Mỹ số 6,106,833) và sự ghép đôi hóa học các mảnh kháng thể (Brennan *et al.*, 1985, *Science* 229:81; Glennie *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 139:2367; patent Mỹ số 6,010,902). Hơn nữa, kháng thể đặc hiệu hai vị trí có thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp, ví dụ bằng cách sử dụng gốc khóa kéo leuxin (nghĩa là, từ các protein Fos và Jun, tốt hơn là tạo thành dị đimer; Kostelny *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148:1547) hoặc các cấu trúc miền tương tác kiểu ổ khóa và chìa khóa như đã mô tả trong patent Mỹ số 5,582,996. Các kỹ thuật hữu dụng khác bao gồm các kỹ thuật được mô tả trong Kortt *et al.*, 1997, *supra*; patent Mỹ số 5,959,083; và patent Mỹ số 5,807,706.

Theo một khía cạnh khác, protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm dẫn xuất của kháng thể. Kháng thể được tạo dẫn xuất có thể chứa phân tử hoặc chất bất kỳ đem lại đặc tính mong muốn cho kháng thể, như thời gian bán rã tăng trong ứng dụng cụ thể. Kháng thể được tạo dẫn xuất có thể chứa, ví dụ, gốc phát hiện được (hoặc được đánh dấu) (ví dụ, phân tử có hoạt tính phóng xạ, phân tử đo màu, phân tử kháng nguyên hoặc phân tử enzyme, hạt phát hiện được (như hạt từ tính hoặc hạt có mật độ điện tử cao (ví dụ, vàng)), hoặc phân tử liên kết với phân tử khác (ví dụ, biotin hoặc streptavidin)), gốc trị liệu hoặc chẩn đoán (ví dụ, gốc có hoạt tính phóng xạ, gốc gây

độc tế bào hoặc gốc dược tính) hoặc phân tử làm tăng độ thích hợp của kháng thể trong ứng dụng cụ thể (ví dụ, dùng cho đối tượng, như người hoặc các ứng dụng *in vivo* hoặc *in vitro* khác). Ví dụ về phân tử có thể được sử dụng để tạo dẫn xuất kháng thể bao gồm albumin (ví dụ, albumin huyết thanh của người) và polyetylen glycol (PEG). Các dẫn xuất liên kết albumin và PEG hóa của các kháng thể có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án, kháng thể được tiếp hợp hoặc theo cách khác là được liên kết 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 gồm dextran, poly(n-vinyl pyrrolidone), polyetylen glycol, propylen glycol homopolyme, copolyme polypropylen oxit/etylen oxit, polyol được polyoxyetyl hóa và các rượu polyvinyl. Đơn sáng chế Mỹ số 20030195154.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sàng lọc phân tử liên kết với alpha4beta7 bằng cách sử dụng protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế. Kỹ thuật sàng lọc thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng. Theo một phương án, phân tử alpha4beta7 hoặc mảnh của nó mà protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế liên kết vào, được tiếp xúc với protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế và với phân tử khác, trong đó phân tử khác liên kết với alpha4beta7 nếu nó làm giảm liên kết của protein liên kết kháng nguyên với alpha4beta7. Liên kết của protein liên kết kháng nguyên có thể được phát hiện bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ, như ELISA. Việc phát hiện sự liên kết của protein liên kết kháng nguyên với alpha4beta7 có thể được đơn giản hóa bằng cách đánh dấu theo cách phát hiện được protein liên kết kháng nguyên, như đã nêu trên. Theo một phương án khác, phân tử liên kết alpha4beta7 được phân tích thêm để xác định nó có ức chế sự hoạt hóa và/hoặc truyền tín hiệu alpha4beta7 hay không.

Axit nucleic

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic được phân lập. Các axit nucleic chứa, ví dụ, polynucleotit mã hoá toàn bộ hoặc một phần protein liên kết kháng nguyên, ví dụ, một hoặc cả hai chuỗi kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh, dẫn xuất, mutein hoặc biến thể của nó, các polynucleotit thích hợp để sử dụng làm đoạn dò lai, đoạn mồi PCR hoặc đoạn mồi giải trình tự để nhận diện, phân tích, gây đột biến hoặc khuếch đại polynucleotit mã hoá polypeptit, axit nucleic đối mã để ức chế sự biểu

hiện của polynucleotit và trình tự bổ sung của các trình tự nêu trên. Các axit nucleic có thể có chiều dài bất kỳ. Chúng có thể có chiều dài gồm, ví dụ, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1000, 1500, 3000, 5000 nucleotit hoặc nhiều hơn và/hoặc có thể chứa một hoặc nhiều trình tự bổ sung, ví dụ, trình tự điều hòa và/hoặc là một phần của axit nucleic lớn hơn, ví dụ, vectơ. Các axit nucleic có thể là sợi đơn hoặc sợi kép và có thể chứa các nucleotit ARN và/hoặc ADN và biến thể nhân tạo của nó (ví dụ, axit nucleic peptit).

Axit nucleic mã hoá polypeptit kháng thể (ví dụ, chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, chỉ miền thay đổi hoặc toàn bộ chiều dài) có thể được phân lập từ tế bào B của chuột nhắt được gây miễn dịch bằng alpha4beta7. Axit nucleic có thể được phân lập bằng các quy trình thông thường như phản ứng chuỗi polymeraza (PCR).

Sáng chế còn đề xuất axit nucleic lai với các axit nucleic khác ở điều kiện lai cụ thể. Các phương pháp lai axit nucleic là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Như được xác định trong bản mô tả, điều kiện lai nghiêm ngặt vừa phải sử dụng dung dịch rửa sơ bộ chứa natri clorua/natri xitrat (SSC) 5X, SDS 0,5%, EDTA 1,0mM (pH=8,0), dung dịch đệm lai chứa formamit khoảng 50%, SSC 6X và nhiệt độ lai bằng 55°C (hoặc dung dịch lai tương tự khác, như dung dịch chứa formamit khoảng 50%, với nhiệt độ lai là 42°C) và điều kiện rửa là nhiệt độ 60°C, trong SSC 0,5X, SDS 0,1%. Điều kiện lai nghiêm ngặt lai trong SSC 6X ở nhiệt độ 45°C, sau đó rửa một hoặc nhiều lần trong SSC 0,1X, SDS 0,2% ở nhiệt độ 68°C. Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể điều chỉnh bằng tay quá trình lai và/hoặc điều kiện rửa để tăng hoặc giảm độ nghiêm ngặt của quá trình lai sao cho các axit nucleic chứa các trình tự nucleotit đồng nhất ít nhất 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 hoặc 99% với nhau thường vẫn được lai với nhau. Các thông số cơ bản ảnh hưởng đến việc lựa chọn điều kiện lai và hướng dẫn thiết lập các điều kiện thích hợp được nêu bởi, ví dụ, Sambrook, Fritsch and Maniatis (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 and 11; và *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4) và có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này trên cơ sở, ví dụ, chiều dài và/hoặc thành phần bazơ của ADN.

Các thay đổi có thể được đưa vào axit nucleic bằng cách gây đột biến, nhờ đó làm thay đổi trình tự axit amin của polypeptit (ví dụ, protein liên kết kháng nguyên) mà nó mã hóa. Đột biến có thể được đưa vào bằng kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án, một hoặc nhiều gốc axit amin cụ thể được thay đổi bằng cách sử dụng, ví dụ, protocol gây đột biến điểm. Theo một phương án khác, một hoặc nhiều gốc được lựa chọn ngẫu nhiên được thay đổi bằng cách sử dụng, ví dụ, protocol gây đột biến ngẫu nhiên. Tuy nhiên, khi được tiến hành, polypeptit đột biến có thể được biểu hiện và được sàng lọc đặc tính mong muốn (ví dụ, sự liên kết với alpha4beta7 hoặc phong bế sự liên kết của alpha4beta7 với addressin như MAdCAM).

Đột biến có thể được đưa vào axit nucleic mà không làm thay đổi đáng kể hoạt tính sinh học của polypeptit mà nó mã hóa. Ví dụ, có thể tạo ra các phần thể nucleotit dẫn tới các phần thể axit amin ở các gốc axit amin không thiết yếu. Theo một phương án, trình tự nucleotit hoặc mảnh, biến thể mong muốn hoặc dẫn xuất của nó, được gây đột biến sao cho nó mã hóa trình tự axit amin chứa một hoặc nhiều phần xóa hoặc phần thể các gốc axit amin. Theo một phương án khác, việc gây đột biến chèn một axit amin liên kết với một hoặc nhiều gốc axit amin. Theo cách khác, một hoặc nhiều đột biến có thể được đưa vào axit nucleic làm thay đổi chọn lọc hoạt tính sinh học (ví dụ, sự liên kết của alpha4beta7, ức chế liên kết của alpha4beta7 với addressin như MAdCAM, v.v.) của polypeptit mà nó mã hóa. Ví dụ, đột biến có thể làm thay đổi định tính hoặc định lượng hoạt tính sinh học. Ví dụ về các thay đổi định lượng bao gồm việc tăng, giảm hoặc triệt tiêu hoạt tính. Ví dụ về các thay đổi định tính bao gồm thay đổi tính đặc hiệu kháng nguyên của protein liên kết kháng nguyên.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic thích hợp để sử dụng làm đoạn mồi hoặc đoạn dò lai để phát hiện các trình tự axit nucleic theo sáng chế. Phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể chỉ chứa một phần của trình tự axit nucleic mã hoá polypeptit nguyên chiều dài theo sáng chế, ví dụ, một mảnh có thể được sử dụng làm đoạn dò hoặc đoạn mồi hoặc mảnh mã hoá phần hoạt tính (ví dụ, phần liên kết alpha4beta7) của polypeptit theo sáng chế.

Đoạn dò trên cơ sở trình tự axit nucleic theo sáng chế có thể được sử dụng để phát hiện axit nucleic hoặc các axit nucleic tương tự, ví dụ, sản phẩm phiên mã mã hoá polypeptit theo sáng chế. Đoạn dò có thể chứa nhóm đánh dấu, ví dụ chất đồng vị

phóng xạ, hợp chất phát huỳnh quang, enzym hoặc đồng nhân tố enzym. Các đoạn dò này có thể được sử dụng để nhận diện tế bào biểu hiện polypeptit.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vectơ chứa axit nucleic mã hoá polypeptit theo sáng chế hoặc một phần của nó. Ví dụ về vectơ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, plasmit, vectơ virus, vectơ động vật có vú không thuộc thể bổ sung và các vectơ biểu hiện, ví dụ, vectơ biểu hiện tái tổ hợp.

Các vectơ biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế có thể chứa axit nucleic theo sáng chế ở dạng thích hợp để biểu hiện axit nucleic trong tế bào chủ. Các vectơ biểu hiện tái tổ hợp bao gồm một hoặc nhiều trình tự điều hòa, được chọn dựa vào các tế bào chủ cần được sử dụng để biểu hiện, được liên kết hoạt động với trình tự axit nucleic cần được biểu hiện. Trình tự điều hòa bao gồm các trình tự điều khiển sự biểu hiện cấu trúc của trình tự nucleotit trong nhiều loại tế bào chủ (ví dụ, trình tự tăng cường gen sớm SV40, trình tự khởi đầu virus sacôm Rous và trình tự khởi đầu xytomegalovirus), trình tự điều khiển sự biểu hiện của trình tự nucleotit chỉ trong các tế bào chủ nhất định (ví dụ, trình tự điều hòa đặc hiệu mô, xem Voss *et al.*, 1986, Trends Biochem. Sci. 11:287, Maniatis *et al.*, 1987, Science 236:1237, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn) và trình tự điều khiển sự biểu hiện cảm ứng của trình tự nucleotit trong đáp ứng với điều trị hoặc tình trạng bệnh cụ thể (ví dụ, trình tự khởi đầu metallothionin trong các tế bào của động vật có vú và trình tự khởi đầu đáp ứng tet và/hoặc đáp ứng streptomycin ở cả hai hệ sinh vật nhân sơ và sinh vật nhân chuẩn (xem *id.*). Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này biết rằng việc thiết kế vectơ biểu hiện có thể phụ thuộc vào các yếu tố như sự lựa chọn tế bào chủ cần được biến nạp, mức độ biểu hiện của protein mong muốn, v.v. Các vectơ biểu hiện theo sáng chế có thể được đưa vào trong các tế bào chủ để nhờ đó tạo ra các protein hoặc peptit, bao gồm protein hoặc peptit dung hợp, được mã hóa bởi các axit nucleic như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các tế bào chủ mà vectơ biểu hiện tái tổ hợp theo sáng chế đã được đưa vào tế bào chủ này. Tế bào chủ có thể là tế bào sinh vật nhân sơ (ví dụ, *E. coli*) hoặc tế bào sinh vật nhân chuẩn (ví dụ, tế bào nấm men, tế bào của côn trùng hoặc tế bào của động vật có vú (ví dụ, tế bào CHO)). ADN vectơ có thể được đưa vào trong tế bào sinh vật nhân sơ hoặc nhân chuẩn bằng kỹ thuật biến nạp hoặc chuyển nhiễm thông thường. Để chuyển nhiễm ổn định các tế bào

của động vật có vú, đã biết rằng, phụ thuộc vào vector biểu hiện và kỹ thuật chuyển nhiễm được sử dụng, chỉ có một mảnh nhỏ của tế bào có thể kết hợp ADN lạ vào trong bộ gen của chúng. Để nhận diện và lựa chọn các thể kết hợp này, gen mã hóa gen đánh dấu chọn lọc (ví dụ, để kháng các chất kháng sinh) thường được đưa vào các tế bào chủ cùng với gen mong muốn. Tốt hơn nếu gen đánh dấu chọn lọc bao gồm các gen đem lại tính kháng cho thuốc, như G418, hygromycin và metotrexat. Các tế bào được chuyển nhiễm ổn định với axit nucleic được đưa vào có thể được nhận diện bằng cách lựa chọn thuốc (ví dụ, các tế bào kết hợp với gen đánh dấu chọn lọc sẽ sống sót, trong khi các tế bào khác sẽ chết), trong số các phương pháp khác.

Chỉ định

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho đối tượng. Phương pháp này có thể, ví dụ, có hiệu quả tốt nói chung trên đối tượng, ví dụ, phương pháp này có thể làm tăng tuổi thọ mong muốn của đối tượng. Theo cách khác, phương pháp này có thể, ví dụ, điều trị, ngăn ngừa, chữa trị, làm thuyên giảm hoặc cải thiện (“điều trị”) bệnh, rối loạn, tình trạng bệnh hoặc chứng bệnh (“tình trạng bệnh”). Trong số các tình trạng bệnh cần được điều trị theo theo sáng chế là các tình trạng bệnh đặc trưng bởi sự biểu hiện hoặc hoạt tính không thích hợp của alpha4beta7. Các tình trạng bệnh này bao gồm các tình trạng bệnh liên quan đến việc di chuyển không thích hợp của tế bào, ví dụ, việc di chuyển của bạch cầu (như lympho bào hoặc bạch cầu đơn nhân) đến đường dạ dày ruột hoặc các mô khác chứa tế bào biểu hiện MAdCAM-1 (do kết quả từ việc liên kết của bạch cầu với tế bào biểu hiện MAdCAM-1). Các bệnh có thể được điều trị bao gồm bệnh viêm ruột, như viêm loét đại tràng, bệnh Crohn, bệnh Celiac (bệnh Sprue không thuộc vùng nhiệt đới), bệnh lý ruột liên quan đến bệnh lý khớp huyết thanh âm tính, viêm ruột kết vi mô hoặc viêm ruột kết thể collagen, viêm dạ dày ruột do tăng bạch cầu ưa eosin hoặc viêm túi trong xảy ra sau khi cắt bỏ đại tràng-trực tràng và nối hồi tràng. Các tình trạng bệnh khác có thể được điều trị theo phương pháp của sáng chế bao gồm viêm tụy, bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin, viêm vú, viêm túi mật, viêm đường mật, viêm quanh ống mật, viêm phế quản mạn tính, viêm xoang mạn tính, bệnh hen và bệnh ghép chống chủ.

Các phương pháp trị liệu và sử dụng protein liên kết kháng nguyên

Các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm việc cho đối tượng dùng protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị đime alpha4beta7, nhờ đó giảm đáp ứng sinh học gây ra bởi alpha4beta7 mà đóng một vai trò ở các tình trạng bệnh cụ thể. Theo một phương án cụ thể, các phương pháp theo sáng chế bao gồm việc cho alpha4beta7 nội sinh tiếp xúc với protein liên kết kháng nguyên alpha4beta7, ví dụ bằng cách cho đối tượng sử dụng hoặc trong các quy trình *ex vivo*.

Thuật ngữ “điều trị” bao gồm việc làm thuyên giảm hoặc ngăn ngừa ít nhất một triệu chứng hoặc khía cạnh khác của rối loạn hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh và các tác động tương tự. Protein liên kết kháng nguyên không cần có tác dụng chữa trị hoàn toàn hoặc trừ diệt mọi triệu chứng hoặc biểu hiện của bệnh, để cấu thành hợp chất trị liệu có thể sử dụng. Như được biết trong lĩnh vực thích hợp, thuốc được sử dụng làm các chất trị liệu có thể làm giảm mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh xác định, nhưng không cần phải loại bỏ mọi biểu hiện của bệnh để được xem là các chất trị liệu hữu dụng. Tương tự, việc điều trị dùng để phòng ngừa không cần phải có hiệu quả hoàn toàn trong việc ngăn ngừa sự khởi phát tình trạng bệnh để cấu thành chất phòng ngừa có thể sử dụng. Việc làm giảm một cách đơn thuần sự ảnh hưởng của bệnh (ví dụ bằng cách giảm số lượng hoặc mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng của nó, hoặc bằng cách tăng tính hiệu quả của việc điều trị khác hoặc bằng cách tạo ra hiệu quả có lợi khác) hoặc giảm khả năng bệnh sẽ xuất hiện hoặc bị xấu đi ở đối tượng, là đủ. Một phương án của sáng chế mô tả phương pháp bao gồm việc cho bệnh nhân dùng chất đối kháng alpha4beta7 với lượng và thời gian đủ để đem lại sự cải thiện được duy trì liên tục so với đường cơ bản của yếu tố chỉ thị phản ánh mức độ nghiêm trọng của các rối loạn cụ thể.

Như được hiểu trong lĩnh vực thích hợp, được phẩm chứa các phân tử theo sáng chế được dùng cho đối tượng theo cách thích hợp với chỉ định. Được phẩm có thể được sử dụng bằng kỹ thuật thích hợp bất kỳ, bao gồm nhưng không giới hạn ở, dùng ngoài đường tiêu hóa, dùng khu trú hoặc bằng cách xông. Nếu được tiêm, được phẩm có thể được dùng, ví dụ, qua đường trong khớp, trong tĩnh mạch, tiêm bắp, tại vị trí thương tổn, trong màng bụng hoặc tiêm dưới da, bằng tiêm tĩnh mạch nhanh hoặc tiêm truyền liên tục. Việc dùng tại chỗ, như tại vị trí bị bệnh hoặc bị thương cũng được bao gồm, như là phân phối qua da và giải phóng duy trì từ mảnh cấy ghép. Việc phân phối

bằng cách xông bao gồm, ví dụ, xông qua đường mũi hoặc miệng, sử dụng máy khí dung, xông chất đối kháng ở dạng sol khí và cách tương tự. Các phương án thay thế khác bao gồm thuốc nhỏ mắt; các chế phẩm dùng qua đường miệng bao gồm viên tròn, sirô, viên thuốc hình thoi hoặc kẹo cao su; và các chế phẩm dùng khu trú như thuốc xức, gel, thuốc xịt và thuốc mỡ.

Việc sử dụng protein liên kết kháng nguyên trong quy trình *ex vivo* cũng được bao gồm. Ví dụ, máu của bệnh nhân hoặc dịch thể khác có thể được cho tiếp xúc với protein liên kết kháng nguyên liên kết alpha4beta7 *ex vivo*. Protein liên kết kháng nguyên có thể được liên kết với chất nền không tan hoặc vật liệu giá thể rắn thích hợp.

Có lợi nếu protein liên kết kháng nguyên được dùng ở dạng chế phẩm chứa một hoặc nhiều thành phần bổ sung như chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng chấp nhận được về mặt sinh lý. Tùy ý, chế phẩm này còn chứa một hoặc nhiều hoạt chất sinh lý, ví dụ, chất ức chế viêm hoặc ức chế miễn dịch thứ hai, chất chống tạo mạch, chất giảm đau, v.v., ví dụ không loại trừ về các chất này được nêu trong bản mô tả này. Theo các phương án cụ thể khác, chế phẩm này chứa một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu hoạt chất sinh lý ngoài protein liên kết kháng nguyên liên kết alpha4beta7.

Theo một phương án, dược phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên theo sáng chế cùng với một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm gồm dung dịch đệm, chất chống oxy hoá như axit ascorbic, polypeptit phân tử lượng thấp (như polypeptit có ít hơn 10 axit amin), protein, axit amin, hydrat cacbon như glucoza, sucroza hoặc dextrin, chất tạo chelat như EDTA, glutathion, chất làm ổn định và tá dược. Muối đệm trung hòa hoặc muối được trộn 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 benzylic cũng có thể được bổ sung. Chế phẩm này có thể được bào chế ở dạng đông khô bằng cách sử dụng dung dịch tá dược thích hợp (ví dụ, sucroza) làm chất pha loãng. Các thành phần thích hợp là không gây độc cho thể nhận ở liều lượng và nồng độ được dùng. Các ví dụ khác về thành phần có thể được dùng trong chế phẩm được trình bày trong Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed. (1980) and 20th Ed. (2000), Mack Publishing Company, Easton, PA.

Bộ kit để sử dụng bởi người hành nghề y bao gồm chất ức chế alpha4beta7 theo sáng chế và nhãn hoặc các hướng dẫn khác để sử dụng trong điều trị tình trạng bệnh

bất kỳ được nêu trong bản mô tả này. Theo một phương án, bộ kit bao gồm chế phẩm vô trùng của một hoặc nhiều protein liên kết kháng nguyên liên kết alpha4beta7, có thể ở dạng chế phẩm như được bọc lộ ở trên và có thể ở trong một hoặc nhiều lọ nhỏ.

Liều lượng và tần suất dùng 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 nghiêm trọng của bệnh cần được điều trị, dù tình trạng bệnh là cấp tính hay mạn tính, và kích thước và tình trạng bệnh chung của đối tượng. Liều lượng thích hợp có thể được xác định bằng quy trình đã biết trong lĩnh vực thích hợp, như trong các thử nghiệm lâm sàng có thể bao gồm các thử nghiệm tăng liều.

Chất ức chế alpha4beta7 theo sáng chế có thể được dùng, ví dụ, một lần hoặc nhiều hơn một lần, ví dụ ở các khoảng thời gian cách đều trong một giai đoạn. Theo các phương án cụ thể, protein liên kết kháng nguyên được dùng trong khoảng thời gian ít nhất là một tháng hoặc nhiều hơn, ví dụ một, hai hoặc ba tháng hoặc thậm chí không hạn định. Để điều trị các tình trạng bệnh mạn tính, việc điều trị lâu dài thường mang lại hiệu quả tốt nhất. Tuy nhiên, để điều trị tình trạng bệnh cấp tính, việc dùng trong khoảng thời gian ngắn hơn, ví dụ từ một đến sáu tuần, có thể thích hợp. Nói chung, protein liên kết kháng nguyên được dùng cho đến khi bệnh nhân biểu hiện mức độ cải thiện thích hợp về mặt sức khỏe so với đường cơ sở của yếu tố hoặc các yếu tố chỉ thị được chọn.

Các phương án cụ thể của sáng chế bao gồm việc dùng protein liên kết kháng nguyên ở liều dùng nằm trong khoảng từ 1ng protein liên kết kháng nguyên với mỗi kg thể trọng của đối tượng mỗi ngày (“1ng/kg/ngày”) đến 10 mg/kg/ngày, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 500ng/kg/ngày đến 5mg/kg/ngày và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 5µg/kg/ngày đến 2mg/kg/ngày. Theo các phương án bổ sung, protein liên kết kháng nguyên được dùng cho người lớn một lần mỗi tuần, hai lần mỗi tuần hoặc ba hoặc nhiều hơn ba lần mỗi tuần, để điều trị bệnh, tình trạng bệnh hoặc rối loạn liên quan đến alpha4beta7, như rối loạn về mặt y học được bọc lộ trong bản mô tả này. Nếu được tiêm, lượng hữu hiệu của protein liên kết kháng nguyên với mỗi liều ở người lớn có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 20mg/m² và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 12mg/m². Theo cách khác, liều không đổi có thể được dùng; với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 100mg/liều. Liều không đổi có thể nằm trong khoảng từ 20 đến 30mg mỗi liều. Theo một phương án của sáng chế, liều không đổi bằng 25mg/liều được dùng

nhắc lại bằng cách tiêm. Nếu sử dụng đường dùng khác với tiêm, liều được điều chỉnh thích hợp theo thực hành y tế chuẩn. Một ví dụ về chế độ trị liệu bao gồm việc tiêm liều từ 20 đến 30mg protein liên kết kháng nguyên từ một đến ba lần mỗi tuần trong khoảng thời gian ít nhất ba tuần, cho dù việc điều trị trong khoảng thời gian dài hơn có thể là cần thiết để đem lại mức độ cải thiện mong muốn. Với đối tượng nhi khoa (tuổi từ 4 đến 17), một chế độ thích hợp được lấy làm ví dụ bao gồm việc tiêm dưới da với liều 0,4mg/kg, lên tới liều tối đa là 25mg protein liên kết kháng nguyên được dùng từ một hoặc ba lần mỗi tuần.

Các phương án cụ thể về phương pháp được nêu trong bản mô tả này bao gồm việc tiêm dưới da protein liên kết kháng nguyên với lượng nằm trong khoảng từ 0,5mg đến 10mg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 3 đến 5mg, một hoặc hai lần mỗi tuần. Một phương án khác đề xuất việc dùng protein liên kết kháng nguyên qua đường phổi (ví dụ, bằng máy khí dung) với lượng 3mg hoặc nhiều hơn một lần một tuần.

Ví dụ về chế độ trị liệu được nêu trong bản mô tả này bao gồm việc tiêm dưới da protein liên kết kháng nguyên một lần một tuần, với liều nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3mg, để điều trị tình trạng bệnh trong đó alpha4beta7 đóng một vai trò. Ví dụ về tình trạng bệnh này được nêu trong bản mô tả này và bao gồm, ví dụ, tình trạng bệnh khớp như đã nêu trước đó và các tình trạng bệnh khác trong đó việc di chuyển dư thừa hoặc không thích hợp của tế bào biểu hiện alpha4beta7 đóng vai trò chính (như được mô tả trong bản mô tả này; ví dụ, bệnh viêm ruột, viêm tụy, v.v). Việc dùng hàng tuần protein liên kết kháng nguyên được tiếp tục cho đến khi đạt được kết quả mong muốn, như giảm các triệu chứng của đối tượng. Việc điều trị có thể bắt đầu lại khi cần hoặc, theo cách khác, liệu duy trì có thể được dùng.

Ví dụ khác về chế độ trị liệu được nêu trong bản mô tả này bao gồm việc dùng chất ức chế alpha4beta7 theo sáng chế theo con đường dưới da hoặc trong tĩnh mạch với liều lượng là 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 hoặc 20mg trên mỗi kg khối lượng cơ thể của đối tượng (mg/kg). Liều này có thể cho đối tượng dùng một lần hoặc nhiều hơn một lần ở khoảng thời gian nhất định, ví dụ, một lần một ngày, ba lần một tuần, hai lần một tuần, một lần một tuần, ba lần một tháng, hai lần một tháng, một lần một tháng, một lần mỗi hai tháng, một lần mỗi ba tháng, một lần mỗi sáu tháng hoặc một lần một năm. Khoảng thời gian điều trị và các thay đổi bất kỳ về liều và/hoặc tần suất điều trị,

có thể thay đổi hoặc biến đổi trong quá trình điều trị để đáp ứng nhu cầu cụ thể của đối tượng.

Theo một phương án khác, protein liên kết kháng nguyên được dùng cho đối tượng với lượng và thời gian đủ để đem lại sự cải thiện, tốt hơn là sự cải thiện duy trì, ở ít nhất một yếu tố chỉ thị phản ánh mức độ nghiêm trọng của rối loạn đang được điều trị. Các yếu tố chỉ thị khác nhau phản ánh mức độ đau ốm, bệnh hoặc tình trạng bệnh của đối tượng có thể được đánh giá để xác định lượng và thời gian điều trị này có thích hợp hay không. Yếu tố chỉ thị bao gồm, ví dụ, các yếu tố chỉ thị được chấp nhận về mặt y tế gồm mức độ nghiêm trọng của bệnh, các triệu chứng hoặc biểu hiện của rối loạn đang nghi ngờ. Theo một phương án, sự cải thiện được xem là được duy trì nếu đối tượng có sự cải thiện trong ít nhất hai thời điểm cách nhau từ hai đến bốn tuần. Mức độ cải thiện thường được xác định bởi bác sĩ, người có thể đưa ra quyết định dựa trên cơ sở các dấu hiệu, các triệu chứng, mẫu sinh thiết hoặc kết quả xét nghiệm khác và là người có thể sử dụng bảng câu hỏi được dùng cho đối tượng, như bảng câu hỏi về chất lượng cuộc sống được tạo ra cho một bệnh xác định.

Việc biến đổi sự biểu hiện alpha4beta7 và/hoặc việc hoạt hoá alpha4beta7 và hoặc đối tác liên kết MAdCAM-1 của nó, liên quan đến các rối loạn, bao gồm, ví dụ, bệnh viêm trong hệ dạ dày ruột. Đối tượng mắc một rối loạn xác định có thể được sàng lọc, để nhận diện các cá thể có sự biểu hiện và/hoặc sự hoạt hoá alpha4beta7 hoặc MAdCAM-1 bị biến đổi, nhờ đó nhận diện được các đối tượng có thể có lợi nhất từ việc điều trị bằng protein liên kết kháng nguyên liên kết alpha4beta7. Vì vậy, phương pháp điều trị được nêu trong bản mô tả này tùy ý bao gồm bước đầu tiên là xác định mức độ biểu hiện hoặc hoạt hóa alpha4beta7 hoặc MAdCAM-1 của đối tượng. Protein liên kết kháng nguyên được dùng cho đối tượng có mức biểu hiện và/hoặc hoạt hoá alpha4beta7 và/hoặc MAdCAM-1 được tăng cao hơn mức bình thường.

Mức hoạt tính alpha4beta7 hoặc MAdCAM-1 của đối tượng có thể được giám sát trước, trong và/hoặc sau khi điều trị bằng protein liên kết kháng nguyên, để phát hiện sự thay đổi, nếu có, về hoạt tính alpha4beta7 hoặc MAdCAM-1. Đối với một số các rối loạn, tỷ lệ có hoạt tính alpha4beta7 và/hoặc MAdCAM-1 gia tăng có thể khác nhau phụ thuộc vào các yếu tố như giai đoạn bệnh hoặc dạng bệnh cụ thể. Các kỹ thuật đã biết có thể được sử dụng để xác định hoạt tính, như trong mẫu máu hoặc mô của đối

tượng. Hoạt tính alpha4beta7 hoặc MAdCAM1 có thể được xác định bằng các kỹ thuật thích hợp bất kỳ.

Các phương án cụ thể của phương pháp và chế phẩm theo sáng chế bao gồm việc sử dụng protein liên kết kháng nguyên và một hoặc nhiều chất đối kháng alpha4beta7 bổ sung, 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 alpha4beta7 khác. Theo các phương án khác, protein liên kết kháng nguyên được dùng một mình hoặc kết hợp với các 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 chứa protein và thuốc không chứa protein. Khi nhiều chất trị liệu được dùng đồng thời, liều dùng có thể được điều chỉnh phù hợp, như được biết trong lĩnh vực kỹ thuật thích hợp. “Dùng đồng thời” và điều trị phối hợp không giới hạn ở việc dùng cùng lúc, mà còn bao gồm cả chế độ điều trị trong đó protein liên kết kháng nguyên được dùng ít nhất một lần trong đợt điều trị bao gồm việc cho bệnh nhân dùng ít nhất một chất trị liệu khác.

Ví dụ về các chất khác có thể được dùng đồng thời với protein liên kết kháng nguyên là protein liên kết kháng nguyên khác hoặc polypeptit trị liệu được chọn theo tình trạng bệnh cụ thể cần được điều trị. Theo cách khác, các thuốc không chứa protein là hữu dụng để điều trị một trong số các tình trạng bệnh cụ thể như đã nêu trên có thể được dùng đồng thời với chất đối kháng alpha4beta7.

Điều trị phối hợp

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị cho đối tượng bằng protein liên kết kháng nguyên ức chế alpha4beta7 và một hoặc nhiều phương pháp điều trị khác. Theo một phương án, việc điều trị phối hợp này có tác dụng hiệp đồng hoặc tác dụng cộng bằng cách, ví dụ, tấn công vào nhiều vị trí hoặc đích phân tử trong khối u. Các loại điều trị phối hợp có thể được sử dụng liên quan đến sáng chế bao gồm việc ức chế hoặc hoạt hóa (nếu thích hợp) nhiều điểm trên một con đường liên quan đến bệnh đơn lẻ, nhiều con đường trong tế bào đích và nhiều loại tế bào đích trong mô đích.

Theo một phương án khác, phương pháp điều trị phối hợp bao gồm việc cho đối tượng dùng hai, ba, bốn, năm, sáu hoặc nhiều chất chủ vận hoặc chất đối kháng alpha4beta7 được mô tả trong đơn sáng chế này. Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng dùng hai hoặc nhiều phương pháp điều trị để

cùng ức chế hoặc hoạt hóa (trực tiếp hoặc gián tiếp) việc truyền tín hiệu qua trung gian $\alpha_4\beta_7$. Ví dụ về các phương pháp này bao gồm việc sử dụng kết hợp của hai hoặc nhiều protein liên kết kháng nguyên ức chế $\alpha_4\beta_7$, của protein liên kết kháng nguyên ức chế $\alpha_4\beta_7$ và một hoặc nhiều gốc trị liệu khác có đặc tính chống viêm (ví dụ chất chống viêm không steroid, steroid và/hoặc các chất điều biến miễn dịch) hoặc của protein liên kết kháng nguyên ức chế $\alpha_4\beta_7$ và một hoặc nhiều phương pháp điều trị khác (ví dụ, phẫu thuật, siêu âm hoặc việc điều trị có hiệu quả giảm viêm). Các chất hữu dụng có thể được kết hợp với các chất ức chế $\alpha_4\beta_7$ bao gồm các chất được sử dụng để điều trị, ví dụ, bệnh Crohn hoặc viêm loét đại tràng, như aminosalixylat (ví dụ, mesalamin), corticosteroid (bao gồm predison), các chất kháng sinh như metronidazol hoặc ciprofloxacin (hoặc các chất kháng sinh khác hữu dụng để điều trị, ví dụ, cho các bệnh nhân bị đau đường rò) và chất ức chế miễn dịch như azathioprin, 6-mercaptopurin, methotrexat, tacrolimus và cyclosporin. Dạng kết hợp của các chất này cũng có thể được bao gồm để sử dụng với các chất ức chế $\alpha_4\beta_7$ theo sáng chế. (Các) chất này có thể được dùng qua đường miệng hoặc đường dùng khác, ví dụ thuốc đạn hoặc thuốc thụt.

Ngoài ra, một hoặc nhiều kháng thể hoặc dẫn xuất kháng thể kháng $\alpha_4\beta_7$ có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều phân tử hoặc các điều trị khác, trong đó (các) phân tử và/hoặc (các) điều trị khác không liên kết trực tiếp với hoặc có ảnh hưởng đến $\alpha_4\beta_7$, mà dạng kết hợp này có hiệu quả trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh cần được điều trị. Ví dụ, chất ức chế $\alpha_4\beta_7$ có thể được sử dụng kết hợp với phương pháp điều trị bằng men vi sinh (probiotic) hoặc các phương pháp điều trị khác được dùng để khôi phục hoặc duy trì hệ vi sinh đường ruột bình thường. Theo một phương án, một hoặc nhiều phân tử và/hoặc phương pháp điều trị trị liệu hoặc ngăn ngừa tình trạng bệnh gây ra bởi một hoặc nhiều phân tử hoặc phương pháp điều trị khác trong đợt điều trị, như buồn nôn, mệt mỏi, rụng tóc lông, chứng suy mòn, mất ngủ, v.v. Trong từng trường hợp khi dạng kết hợp của các phân tử và/hoặc phương pháp điều trị khác được sử dụng, (các) phân tử và/hoặc phương pháp điều trị riêng lẻ có thể được sử dụng theo thứ tự bất kỳ, trong khoảng thời gian bất kỳ, sao cho có hiệu quả, ví dụ đồng thời, liên tiếp hoặc xen kẽ. Theo một phương án, phương pháp điều trị bao gồm việc hoàn tất đợt điều trị thứ nhất với một phân tử hoặc phương pháp điều trị khác trước khi bắt đầu đợt điều trị thứ hai. Khoảng thời gian giữa thời điểm kết

thúc đợt điều trị thứ nhất và bắt đầu đợt điều trị thứ hai có thể là khoảng thời gian bất kỳ cho phép tổng đợt điều trị đạt hiệu quả, ví dụ hàng giây, hàng phút, hàng giờ, hàng ngày, hàng tuần, hàng tháng hoặc thậm chí hàng năm.

Theo một phương án khác, phương pháp này bao gồm bước dùng một hoặc nhiều chất đối kháng $\alpha 4\beta 7$ được mô tả trong bản mô tả này và một hoặc nhiều phương pháp điều trị khác (ví dụ, điều trị trị liệu hoặc điều trị làm giảm nhẹ). Khi phương pháp bao gồm việc cho đối tượng dùng nhiều hơn một phương pháp điều trị, có thể hiểu rằng thứ tự, thời gian, số lượng, nồng độ và lượng dùng chỉ bị giới hạn bởi các quy định trong y tế và các giới hạn về phương pháp điều trị, nghĩa là, hai phương pháp điều trị có thể được dùng cho đối tượng, ví dụ đồng thời, liên tiếp, xen kẽ hoặc theo theo chế độ khác bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ dưới đây, cả thực tế và tiên đoán, đều nhằm mục đích minh họa các phương án hoặc các dấu hiệu cụ thể của sáng chế và không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Tạo kháng thể

Các kháng thể đơn dòng kháng $\alpha 4\beta 7$ ở người được tạo ra bằng cách gây miễn dịch cho chuột nhắt XG2kapalambda (kl) và XG4kl XenoMouse™ (chuột nhắt biến đổi gen biểu hiện IgG2 hoặc IgG4 của người và các chuỗi nhẹ kapa và lambda của người, tương ứng; Abgenix Inc., Fremont CA) bằng tế bào biểu hiện $\alpha 4\beta 7$ của người, hoặc tế bào 293 thận phôi người (HEK) được chuyển nhiễm tạm thời (293-a4b7) hoặc tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) được chuyển nhiễm ổn định (CHO-a4b7). Hiệu giá huyết thanh được giám sát bằng phân tích phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (fluorescence activated cell sorter - FACS) so sánh tế bào được chuyển nhiễm $\alpha 4\beta 7$ với tế bào đối chứng ban đầu tương ứng. Động vật tăng miễn dịch thu được từ hoạt động gây miễn dịch được giết và mô lách và mô hạch bạch huyết được đưa qua quy trình dung hợp tế bào lai.

Các kháng thể đặc hiệu dị dime $\alpha 4\beta 7$ được nhận diện bằng cách tiến hành loạt thử nghiệm. Dịch nổi bề mặt tế bào lai trước tiên được sàng lọc bằng Công nghệ thuật thử nghiệm vi thể tích đo huỳnh quang (Fluorometric Microvolume Assay Technology) (FMAT™ Applera Corporation, Foster City CA; hệ thống phát hiện tế

bào sàng lọc lưu lượng cao) sự liên kết với tế bào được chuyển nhiễm alpha4beta7 so với tế bào được chuyển nhiễm mô phỏng. Phần dịch nổi bề mặt đã nhận diện là dương tính với liên kết với alpha4beta7 (1001 phần dịch nổi bề mặt liên kết dương tính từ hoạt động gây miễn dịch cho tế bào CHO-a4b7 và 1143 phần dịch nổi bề mặt liên kết dương tính từ hoạt động gây miễn dịch cho tế bào 293-a4b7) được đánh giá khả năng ức chế sự bám dính của tế bào HUT78 trên MAdCAM-1-Fc theo kiểu tương tự như đã được mô tả (Erle, J. Immunol, (1994) 153:517). Trong thử nghiệm này, 60 phần dịch nổi thu được từ hoạt động gây miễn dịch cho tế bào CHO-a4b7 và 174 phần dịch nổi từ hoạt động gây miễn dịch cho tế bào 293-a4b7 đã cho thấy khả năng ức chế cao hơn 90% (n=2) và tiếp tục được tiến hành phân tích tính đặc hiệu và hiệu lực.

Các tế bào 293 được chuyển nhiễm alpha4beta7, alpha4beta1 và alphaEbeta7 được chuẩn bị và sử dụng trong phân tích FACS với phần dịch nổi tế bào lai đã được nhận diện trong thử nghiệm ức chế. Phần dịch nổi bề mặt chứng tỏ sự liên kết chỉ với tế bào được chuyển nhiễm alpha4beta7 được phân loại là đặc hiệu dị đime, do các kháng thể với cấu trúc dưới phân tử alpha4 của integrin này cũng liên kết với tế bào được chuyển nhiễm alpha4beta1 và các kháng thể liên kết với chuỗi beta7 sẽ liên kết với tế bào được chuyển nhiễm alphaEbeta7. Phần dịch nổi bề mặt tế bào lai cũng được phân tích để đánh giá hoạt tính liên kết với tế bào 293 được chuyển nhiễm alpha4beta7 của khỉ cynomologous bằng phân tích FACS. Bảy dòng tế bào thu được từ hoạt động CHO-a4b7 và 25 dòng tế bào thu được từ hoạt động 293-a4b7 được chọn để tách dòng phụ và phân tích thêm.

Ví dụ 2: Phân tích kháng thể

Tế bào tiết kháng thể thu được được tách dòng và các axit nucleic mã hóa kháng thể được phân lập và giải trình tự. Việc gây đột biến điểm được sử dụng để tạo ra các biến thể khác với trình tự được phân lập ở một hoặc nhiều gốc axit amin. Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của các kháng thể và các biến thể được thể hiện trong các Bảng 1 và 2 dưới đây. Đã biết rằng ranh giới của các vùng CDR và FR có thể thay đổi so với dữ liệu được thể hiện dưới đây, như đã được nêu trong bản mô tả.

Bảng 1: Phân tích trình tự các chuỗi nhẹ

Chuỗi nhẹ	FR1	CDR1	FR2
-----------	-----	------	-----

1A10K	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITC	RASQGVSSWLA	WYQQKPGMAPKLLIY
11E7K1	EIVMTQSPATLSVSPGETATLSC	RASQTVSSNLA	WYQQKPGQAPRLLIY
11E7K2	DIQMTQSPSSLSASIGDRVITITC	RASQGIRNYLA	WYQRKPGKVPKLLIY
2F12K	DIQMTQSPSSVFASVGDRVITITC	RASQGISSWLA	WYQQKPGKAPNLLIY
14E4L	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY
3A5K	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITC	RASQGVISWLA	WYQQKPGMAPKLLIY
10D7K	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITC	RASQGVNNWLA	WYQQKPGKAPKLLIF
27D8K	EIVMMQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSTNLA	WYQQKPGQAPRLLIY
18A11K	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITC	RASQGISSWLA	WYQQKPGKAPKLLIY
20D7K	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC	RASQSVSSSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY
23H6K	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVNSNLA	WYQQKPGQAPRLLIY
27G8L	QSVLTQPPSVSEAPRQRTVISC	SGSNSNIGNNPVN	WYQLFPGRAPKLLIY
26C7K	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSDNLA	WYQQKPGQPPRLLIY
26H3K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC	QASQDISNYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
19G6K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITISC	QASQDINTYLN	WYQQKPGKVPKLLIY
22B2K	DVQMTQSPSSLSASVGDRVITITC	QASQDITDYN	WYQQKPGKAPKLLIY
24A2K	EVMMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSSNLA	WYQQKPGQAPRLLIF
26E9K	ELVMTQSPATLSVSPGERATVSC	RASQSVSSDLA	WYQQKPGQAPRLLIY
22F5K	EIVMTQSPATLSVFPGEATLSC	RASQSVSSDLA	WYQQKPGQAPRLLIY
26C10K	EIVLTQSPGTLSPGEGATLSC	RASQTVTSSYLA	WYQQSPSQSPRLLIY
17C8K	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	RASQSVSSNLV	WYQQKPGQAPRLLIY
25C9k	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITC	RASQDISSWLA	WYQRKPGKAPKVLIIY
19E6L	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC	SGDKLGDKYAC	WYQQKPGQSPVLVIY
26G2k	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITC	RASQDISSWLA	WYQQKPGTAPKVLIIY
27G8L (a)	QSVLTQPPSVSGAPRQRTVISC	SGSNSNIGNNPVN	WYQLFPGRAPKLLIY
27G8L (b)	QSVLTQPRSVSGAPRQRTVISC	SGSNSNIGNNPVN	WYQLFPGRAPKLLIY
26H3K (c)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC	QASQDISNYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
1A10K (d)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITC	RASQGVSSWLA	WYQQKPGKAPKLLIY

Bảng 1 (tiếp theo)

Chuỗi nhẹ	CDR2	FR3
1A10K	AASILQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
11E7K1	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
11E7K2	AASTLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYCC
2F12K	GASSLQN	GVPLRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
14E4L	DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSAILDITGLQTGDEADYYC
3A5K	AASILQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
10D7K	ATSSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYC
27D8K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYFC
18A11K	GASNLES	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFANYYYC
20D7K	GASSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
23H6K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
27G8L	HDDLPS	GVSDRFSGSRSGTSASLAISGLQSEDETYYC
26C7K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
26H3K	DASNLET	GVPSRFSGSGSGTDFTFTINSLQPEDATYFC
19G6K	DASNLET	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISGLQPEDATYYC
22B2K	DTSNLEA	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYC
24A2K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYCC
26E9K	GASSRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
22F5K	GASARAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
26C10K	GASTRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
17C8K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLQSEDFAVYYC

25C9k	SASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
19E6L	QDSKRPS	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC
26G2k	SASSLQN	GVPSRFSGRGSGTDFALTISSLQPEDFATYYC
27G8L (a)	HDDLPS	GVSDRFSGRSGTSASLAISGLQSADETYYC
27G8L (b)	HDDLPS	GVSDRFSGRSGTSASLAISGLRSADETYYC
26H3K (c)	DASNLET	GVPSRFSGSGSGTDFTFTINSLQPEDATYFC
1A10K (d)	AASILQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC

Bảng 1 (tiếp theo)

Chuỗi nhẹ	CDR3	FR4
1A10K	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK
11E7K1	QQYDYWPPLT	FGGGTRVEIK
11E7K2	QKYDSAPFT	FGPGTKVDIK
2F12K	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK
14E4L	GTWDDSSLAGRV	FGGGTKLTVL
3A5K	QQANSFPWT	FGQGTNVEIK
10D7K	QQVNSFPWT	FGQGTKVEIK
27D8K	QQYNDWPT	FGGGTKVEIK
18A11K	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK
20D7K	QQYDSSPPT	FGGGTKVAIK
23H6K	QQYDDWPPVT	FGQGTRLEIK
27G8L	TAWDDSLNGWV	FGGGTKLTVL
26C7K	QQYDDWPT	FGGGTRVEIK
26H3K	QQYDNLPCS	FGQGTKLEIK
19G6K	QQFDNLPIT	FGQGTRLEIK
22B2K	QQYDILPYS	FGQGTDLLEIK
24A2K	QQYDDWPT	FGGGTKVEIK
26E9K	QQYNNWPPLT	FGGGTKVEIK
22F5K	QQYHDWPPLS	FGGGTKVEIK
26C10K	QQYDSSPPT	FGGGTKVEIK
17C8K	QQYDDWPPLT	FGGGTTVEIK
25C9k	QQADSFPT	FGQGTKVEIK
19E6L	QAWDSSTVV	FGGGTKLTVL
26G2k	QQADSFPT	FGRGTKVEIK
27G8L (a)	TAWDDSLNGWV	FGGGTKLTVL
27G8L (b)	TAWDDSLNGWV	FGGGTKLTVL
26H3K (c)	QQYDNLPS	FGQGTKLEIK
1A10K (d)	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK

Bảng 2: Phân tích trình tự các chuỗi nặng

Chuỗi nặng	FR1	CDR1	FR2
1A10H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKV SGYTLN	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
11E7H1	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVAS GFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
11E7H2	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAAS GFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
2F12H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKV SGYTVT	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
14E4H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
3A5H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKV	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG

	SGYTLN		
10D7H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
27D8H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFS	DNYMS	WIRQAPGKGLEWVS
18A11H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKV SGYTLS	DLSIH	WVRQAPGKGLEWMG
20D7H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCTAS GFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
23H6H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26G2H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
27G8H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFS	SYWMS	WVRQASGKGLEWVA
26C7H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26H3H	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS GYSFT	GYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
19G6H	QVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCAAS GFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWIS
22B2H	EVQLVQSGAEVKEPGESLKISCKGS GYIFT	SYWIA	WVRQLPGKGLEWMG
24A2H	QVQLVESGGDLVEPGGSLRLSCAAS GFTFR	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26E9H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFR	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
19E6H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFS	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
22F5H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
25C9H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFN	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26C10H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVAS GFTFS	DYYMS	WIRQTPGKGLEWVS
17C8H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWLS
1A10H(a)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKV SGYTLN	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
27G8H(b)	EVQLVESGGGLVKPGRSLRLSCAAS GFTFS	SYWMS	WVRQASGKGLEWVA

Bảng 2 (tiếp theo)

Chuỗi nặng	CDR2	FR3
1A10H	GFDPAEGKIISAQKFQD	RVTMTDDTSTDATYMESSLRSEDSAVYYCAT
11E7H1	YISSSGSAIYYADSVKG	RFTISRDNANKNSLYLQNLRAEDTAVYYCAR
11E7H2	VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNANKNTLHLQMNSLRAEDTAVYYCAR
2F12H	GFDPDGGETIYAQKFQG	RVTMTEDTSTDATYMELSRLSEDTAVYYCTT
14E4H	YISNSGVSYYADSVKG	RFTISRHNANKNSLYLQMNSLRADDTAVYYCAR
3A5H	GFDPAEGKIISAQKFQD	RVTMTDDTSTDATYMESSLRSEDSAVYYCAT
10D7H	YISSTGSAMYDADSVKG	RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
27D8H	YISSSGSATYYADSVKG	RFTISRDNANKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCAR
18A11H	GFDPDGGETIYAQKFQG	RVTMTEDTSTDATYMESSLKSEDTAVYYCAT

20D7H	YISSSGSAIYYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVFYCAR
23H6H	YISSSGSAMYSADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
26G2H	YISSIGSAIHYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
27G8H	NIKQDGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
26C7H	YISRVGSTTYYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
26H3H	IIYPYDSSTRYSPSFQG	QVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAMFYCAS
19G6H	YISSSGSTMYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
22B2H	IIDPNDSSTRYSPSFQG	QVTISADKSIHTAYLQWSSLKASDTAMYCAT
24A2H	YISSSGSAIYYADSVKG	RFTISRDNPKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
26E9H	YISSSGSTSYCADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
19E6H	AISGSGGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
22F5H	YISSTGSTLYYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTR
25C9H	YISSSGSAIHYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
26C10H	YISSSGSAIHYADSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVFYCAR
17C8H	YISNSGSAMYYADSVKG	RFTISRDNARNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
1A10H (a)	GFDPAEGKIISAQKFQD	RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDATVYYCAR
27G8H (b)	NIKQDGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAR

Bảng 2 (tiếp theo)

Chuỗi nặng	CDR3	FR4
1A10H	LDFSSWFDP	WGQGLTVTVSS
11E7H1	DYSSGWFYFDY	WGRGTLTVTVSS
11E7H2	EHWNYAFDI	WGQGTMTVTVSS
2F12H	ESSSAWFDP	WGQGLTVTVSS
14E4H	DRSSAWDEAFDI	WGQGTMTVTVSS
3A5H	LDFSSWFDP	WGQGLTVTVSS
10D7H	EFSSGWSYFDY	WGQGLTVTVSS
27D8H	DYSSGWYFFDY	WGQGLTVTVSS
18A11H	GSSSSWFDP	WGQGLTVTVSS
20D7H	EHSSGYWYFDL	WGRGALTVTVSS
23H6H	EYSSGWYFFDY	WGRGTLTVTVSS
26G2H	EYSSGWAYFDY	WGQGLTVTVSS
27G8H	EGGYDWNADYYGMDV	WGQGTTVTVSS
26C7H	DYSSGWYFFDY	WGQGLTVTVSS
26H3H	HRLWLGEFPGPLNI	WGQGTMTVTVSS
19G6H	DRSSGLVSFDY	WGQGLTVTVSS
22B2H	HRLWLGTLPGGFYI	WGQGTMTVTVSS
24A2H	DFSSGYFFDY	WGHGTLTVTVSS
26E9H	DYSSGWFYFDY	WGQGLTVTVSS
19E6H	APYSSSWALGLGMDV	WGQGTTVTVSS
22F5H	EYSSGWFFFDY	WGQGLTVTVSS
25C9H	EYSSGWAYFDY	WGQGLTVTVSS
26C10H	DHSSGYWYFDL	WGRGTLTVTVSS
17C8H	EYSSGWFFFES	WGQGLTVTVSS
1A10H (a)	LDFSSWFDP	WGQGLTVTVSS
27G8H (b)	EGGYDWNADYYGMDV	WGQGTTVTVSS

Các trình tự axit amin của các kháng thể được phân tích theo bảng cách tương tự. Các chuỗi nhẹ kapa được phân thành ba nhóm và trình tự liên ứng được khai triển

từ mỗi nhóm. Có ba kháng thể có chuỗi nhẹ lambda, không kháng thể nào trong số này có đủ độ tương đồng với nhau để tạo ra nhóm các trình tự liên quan từ đó trình tự liên ứng có thể được khai triển. Hai trong số các biến thể được khai triển thay đổi trong chuỗi nhẹ lambda. Các chuỗi nặng được nhóm vào bốn nhóm với chuỗi nặng đơn được phân loại thành năm nhóm và trình tự liên ứng được khai triển đối với các nhóm từ 1 đến 4. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 3(a) và 3(b) dưới đây; trình tự liên ứng được thể hiện trong Danh mục trình tự. Con số trong dấu ngoặc đơn cho biết SEQ ID NO trong Danh mục trình tự.

Bảng 3(a): Phân nhóm các kháng thể theo chuỗi nhẹ kappa, với chuỗi nặng tương ứng

Nhóm Kapa 1 (10 thành viên)	Nhóm chuỗi nặng (H1 – H5)	Nhóm Kapa 2 (9 thành viên)	Nhóm chuỗi nặng (H1 – H5)	Nhóm Kapa 3 (4 thành viên)	Nhóm chuỗi nặng (H1 – H5)
20D7K (10)	H1 (38)	11E7K2 (3)	H1 (31)	22B2K (16)	H4 (45)
11E7K1 (2)	H1 (30)	10D7K(7)	H1 (35)	19G6K (15)	H1 (44)
26C10K (20)	H1 (51)	3A5K(6)	H2 (34)	26H3K (14)	H4 (43)
23H6K (11)	H1 (39)	1A10K(1)	H2 (29)	26H3K(c) (27)	H4 (43)
26C7K (13)	H1(42)	25C9K (22)	H1 (50)		
24A2K (17)	H1 (46)	26G2K (24)	H1 (40)		
27D8K (8)	H1 (36)	18A11K (9)	H2 (37)		
22F5 (19)	H1 (49)	2F12K (4)	H2 (32)		
26E9K (18)	H1 (47)	1A10K(d) (28)	H2 (53)		
17C8K (21)	H1 (52)				

Bảng 3(b): Phân nhóm các kháng thể theo chuỗi nhẹ lambda, với chuỗi nặng tương ứng

Chuỗi lambda (3 kháng thể, không liên ứng)	Nhóm chuỗi nặng (H1 – H5)
14E4 (5)	H1 (33)
27G8 (12)	H3 (41)
27G8(a) (25)	H3 (54)
27G8(b) (26)	H3 (54)
19E6 (23)	H5 (48)

Các ranh giới CDR nằm trong trình tự liên ứng (có thể thay đổi, như đã nêu trước đó) như sau: Nhóm kapa 1 CDR1 24-35, CDR2 51-57, CDR3 90-99; Nhóm kapa 2 CDR1 24-34, CDR2 51-56, CDR3 89-97; Nhóm kapa 3 CDR1 24-34, CDR2 50-56, CDR3 89-97; Nhóm chuỗi nặng 1 CDR1 31-35, CDR2 50-66, CDR3 99-110; Nhóm chuỗi nặng 2 CDR1 31-35, CDR2 50-66, CDR3 99-107; Nhóm chuỗi nặng 3 CDR1

31-35, CDR2 50-66, CDR3 99-114; và Nhóm chuỗi nặng 4 CDR1 31-35, CDR2 50-66, CDR3 99-114.

Ví dụ 3: Thử nghiệm chức năng

Ví dụ này mô tả các thử nghiệm khác nhau được sử dụng để mô tả đặc điểm kháng thể.

Thử nghiệm bám dính HUT78

Các đĩa được phủ (ví dụ, đĩa 96 lỗ Costar® 3368; Corning Incorporated Life Sciences, Lowell MA) được chuẩn bị bằng cách phủ đĩa 96 lỗ qua đêm ở nhiệt độ 4°C bằng 20µg/ml MAdCAM-1 (hoặc IgG1 của người với nồng độ tương tự làm đối chứng phủ) được pha loãng trong dung dịch đệm phosphat có độ pH=9,0. Lớp phủ được loại bỏ và đĩa được phong bế bằng 100µL BSA 3%/PBS, được ủ trong thời gian 1 giờ hoặc lâu hơn ở nhiệt độ trong phòng. Các đĩa này được rửa ba lần bằng dung dịch muối cân bằng Hank (HBSS).

Tế bào HUT78 (dòng tế bào u lympho tế bào T của người thể hiện các đặc tính của dòng tế bào T trưởng thành với kiểu hình gen cảm ứng/hỗ trợ; ATCC TIB 161), được cho sinh trưởng để nhập dòng, được tạo viên pelet và rửa 3 lần trong HBSS, sau đó được tái tạo huyền phù trong HBSS ở nồng độ thích hợp để thu được khoảng 30.000 tế bào trong 50µL.

Các kháng thể cần được thử nghiệm được pha loãng đến nồng độ gấp đôi nồng độ cuối và sau đó chuẩn độ theo tỷ lệ 1:4 trong HBSS không chứa canxi, không chứa magie, chứa BSA 1% với Mn^{2+} 1mM. 50µL chuẩn độ kháng thể hoặc mẫu đối chứng được cho vào mỗi lỗ của đĩa có đáy VEE, sau đó bổ sung 50µL tế bào HUT78. Tế bào và kháng thể được ủ ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút, sau đó được bổ sung vào các đĩa đã được phủ và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 40 phút. Các tế bào trên các đĩa đã phủ được rửa ba lần bằng HBSS ở nhiệt độ trong phòng, bằng cách búng sạch HBSS giữa các lần rửa. Các tế bào bám dính được làm tan băng ở nhiệt độ -20°C sau đó thêm vào 100µL dung dịch đệm thuốc nhuộm/chất phân giải CyQuant® (dung dịch đệm được sử dụng trong thử nghiệm định lượng tế bào trên cơ sở phát huỳnh quang hữu dụng để sàng lọc số lượng lớn Molecular Probes®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA. Tín hiệu phát huỳnh quang từ mỗi lỗ được định lượng ở bước sóng kích thích

485nm và bước sóng phát 530nm, ví dụ bằng cách sử dụng Tecan GENiosPro, đầu đọc vi đĩa nhiều nhãn (Tecan Group Ltd. Männedorf, Switzerland).

Thử nghiệm bám dính tế bào CD4 + người của người

Các đĩa được phủ MAdCAM-1-Fc của người hoặc IgG của người (3µg/ml trong dung dịch đệm phosphat 20mM, độ pH=9,0, NaCl 130mM), 100µL/lỗ, ở nhiệt độ 4°C qua đêm sau đó được phong bế bằng chất phản ứng phong bế với lượng 200µl/lỗ (albumin huyết thanh bò 3% trong PBS) ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian ít nhất hai giờ. Sau đó rửa sạch đĩa ba lần bằng dung dịch đệm bám dính (HEPES 30mM, độ pH=7,4, NaCl 120mM, MnCl₂ 1mM, IgG của người 10g/ml).

Chuẩn bị các phân pha loãng theo dãy của các kháng thể cần được thử nghiệm và bổ sung vào đĩa (35µL/lỗ); tế bào T CD4⁺ được phân lập (250.000 tế bào/35µL/lỗ) được bổ sung và đĩa được ủ ở nhiệt độ 4°C trong 2 giờ. Sau khi rửa ba lần bằng dung dịch đệm bám dính, các đĩa được để đông lạnh ở nhiệt độ -20°C qua đêm. Các chất phản ứng phát hiện (chất phản ứng CyQUANT® 100µL/lỗ; Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) được bổ sung và các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 45 phút. Các kết quả được xác định bằng cách đọc giá trị phát huỳnh quang ở bước sóng kích thích 485nm và bước sóng phát 530nm.

Giá trị EC50 trong liên kết tế bào T nhớ CD4+CD45RA của người

Các tế bào đơn nhân máu ngoại biên của người (PBMC; tươi hoặc đông lạnh và được rã đông, ví dụ trong muối đệm phosphat với FBS 2%) được rửa và tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm HEPES (HEPES 30mM + NaCl 140mM) với BSA 1%, có hoặc không có MnCl₂ 1mM (tùy thuộc thử nghiệm; Mn²⁺ cần thiết cho liên kết MAdCAM-1) và được cấy vào đĩa 96 lỗ (10⁶ tế bào/lỗ). Các tế bào được ủ với 10µg/ml IgG của người trong 30 phút trên đá lạnh để phong bế liên kết không đặc hiệu. Sau đó các tế bào được ủ với các phân pha loãng theo dãy của các kháng thể kháng alpha4beta7 được biotinyl hóa trong các đĩa 96 lỗ trong thời gian một giờ trên đá lạnh, sau đó bổ sung phân pha loãng theo tỷ lệ 1:100 của streptavidin-phycoerythrin (PE; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA), 4µL CD3-xanh Pacific, CD4-PerCP-Cy5.5 và CD45RA-isothioxyanat phát huỳnh quang (FITC) (BD Biosciences, San Jose CA) để đạt thể tích cuối cùng bằng 100µL và ủ thêm một giờ nữa trên đá lạnh. Các đĩa được rửa hai lần bằng dung dịch đệm HEPES (có MnCl₂

hoặc không, tương ứng) và sau đó được cố định trong 200 μ L dung dịch đệm HEPES + paraformaldehyt 0,5% (một lần nữa, có MnCl₂ hoặc không, tương ứng). Phần trăm kháng thể alpha4beta7 dương tính liên kết tế bào T nhớ CD4+CD45RA được xác định bằng cách sử dụng máy phân loại tế bào được hoạt hóa phát huỳnh quang (FACS), ví dụ, máy đếm tế bào theo dòng để bàn BDTM LSR II (BD Biosciences, San Jose CA). EC50 được xác định là nồng độ của kháng thể alpha4beta7 mà tại đó 50% vị trí alpha4beta7 trên tế bào nhớ CD4CD45RA được liên kết bởi kháng thể alpha4beta7.

Giá trị IC50 trong việc phong bế MAdCAM-1-Fc liên kết với tế bào T nhớ CD4+CD45RA của người

PBMC (tươi hoặc đông lạnh như được mô tả ở trên) được rửa và tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm HEPES (HEPES 30mM + NaCl 140nM) với BSA 1% và MnCl 1mM đến nồng độ cuối là 10⁷ tế bào/ml. Các tế bào được phong bế như đã mô tả ở trên; sau khi phong bế, tế bào được ủ với phần pha loãng theo dãy của kháng thể kháng alpha4beta7 (hoặc mẫu đối chứng thích hợp) trong đĩa 96 lỗ trong thời gian 30 phút trên đá lạnh, và sau đó ủ với 0,3 μ g/ml protein MAdCAM-1-Fc được biotinyl hóa trong một giờ nữa.

Sau hai lần rửa bằng dung dịch đệm HEPES với MnCl 1mM, các tế bào được xử lý bằng phần pha loãng theo tỷ lệ 1:100 của streptavidin-PE, 4 μ L CD3-xanh Pacific, CD4-PerCP-Cy5.5 và CD45RA-FITC như đã mô tả ở trên, trong thể tích cuối cùng là 100 μ L. Sau một giờ ủ trên đá, tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm HEPES với MnCl 1mM và sau đó được cố định trong 200 μ L dung dịch đệm + paraformaldehyt 0,5%. Phần trăm tế bào T nhớ CD4+CD45RA liên kết MAdCAM-1-Fc dương tính được xác định bằng phân tích phân loại tế bào được hoạt hóa phát huỳnh quang (FACS), như đã mô tả ở trên. IC50 được xác định là nồng độ của kháng thể alpha4beta7 mà tại đó MAdCAM-1-Fc liên kết với alpha4beta7 trên tế bào nhớ CD4CD45RA bị ức chế đến 50%.

Cảm ứng alpha4beta7 bằng axit retinoic trên tế bào T hoạt hóa

PBMC của người đã phân lập được hoạt hóa bằng kháng CD3 (đĩa liên kết, 5 μ g/ml), IL-2 của người (20ng/ml) khi có mặt axit retinoic hoặc không (1000nM) trong 7 ngày. Các tế bào đã hoạt hóa được rửa hai lần bằng dung dịch đệm nhuộm màu (PBS + BSA 0,5% và MnCl 1mM) và được ủ với 100 μ g/ml Ig của người trong thời

gian 30 phút để phong bế liên kết không đặc hiệu. Các tế bào trước tiên được ủ trong phân pha loãng theo dãy của kháng thể kháng alpha4beta7 trong thời gian 30 phút trên đá và sau đó được nhuộm bằng MAdCAM-1-Fc được biotinyll hóa 1µg/ml trong 30 phút nữa. Sau hai lần rửa bằng dung dịch đệm nhuộm màu, các tế bào được nhuộm bằng Streptavidin-PE (tỷ lệ 1:1000) trong thời gian 30 phút. Các tế bào được phân tích bằng máy phân loại tế bào được hoạt hóa phát huỳnh quang, ví dụ, với FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose CA). Các tế bào được chuẩn bị theo cách này có thể được dùng cho các thử nghiệm khác như thử nghiệm cạnh tranh.

Thử nghiệm cạnh tranh

Các kháng thể alpha4beta7 cũng được kiểm tra khả năng cạnh tranh của chúng với các kháng thể kháng alpha4beta7 và/hoặc beta7 khác trong việc liên kết với tế bào biểu hiện alpha4 beta7 bằng kỹ thuật thử nghiệm vi thể tích phát huỳnh quang hay FMAT, cơ bản được mô tả trong Fiscella, et al., *Nature Biotechnology* 21:302-307; 2003. Tóm tắt lại là, các tế bào biểu hiện alpha4beta7 mức cao được chuẩn bị, ví dụ bằng cách đồng chuyển nhiễm tạm thời tế bào với các axit nucleic mã hoá alpha4 và axit nucleic biểu hiện beta7. Các dòng tế bào ổn định được chuẩn bị theo cách tương tự, bằng cách sử dụng tế bào và protocol thích hợp cho việc chuyển nhiễm ổn định. Các tế bào đã chuyển nhiễm được sàng lọc, ví dụ, bằng FACS, bằng cách sử dụng kháng thể đối với alpha4, các kháng thể đối với beta7 và/hoặc phối tử (nghĩa là, MAdCAM-1, ví dụ, protein dung hợp MAdCAM-1-Fc). Các tế bào có thể trải qua vài chu trình phân loại và tuyển chọn để thu được các dòng tế bào vô tính có khả năng sinh sản, mức biểu hiện alpha4beta7 cao.

Liên kết với thể đột biến S250N

Các kháng thể cũng được đánh giá khả năng nhận biết thể đột biến điểm S250N trong chuỗi beta7, mà được biết là quan trọng đối với sự liên kết ACT-1 (J Immunol. 159:1497, 1997). Tế bào 293 được đồng biểu hiện tạm thời alpha4beta7 có thể đột biến S250N trong chuỗi beta (ref) được chuẩn bị theo cách tương tự như đã nêu trên để thu được tế bào biểu hiện alpha4beta7 ở mức cao.

Tóm tắt lại là, tổng 1×10^6 tế bào được chuyển nhiễm để tạo profin được thu gom bằng cách sử dụng dung dịch phân ly tế bào và được quay ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 5 phút. Sau đó các tế bào được phong bế bằng 0,5ml dung dịch đệm

phong bế (huyết thanh dê 1%/PBS) trong thời gian từ 30 phút đến 1 giờ ở nhiệt độ 4°C trong khi lắng. Để nhuộm MAdCAM-1-Fc, các tế bào được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 4°C trong khi lắng trong dung dịch đệm Mn^{2+} ($MnCl$ 1mM trong HEPES 30mM + huyết thanh dê 1%). Sau đó các tế bào được quay ở tốc độ 1000 vòng/phút/5 phút và 0,5ml dung dịch đệm phong bế mới cùng với 10µg/ml kháng thể sơ cấp được bổ sung, sau đó ủ trong thời gian từ 30 phút đến 1 giờ ở nhiệt độ 4°C trong khi lắng. Sau hai lần rửa bằng 4ml PBS lạnh (mỗi lần rửa), kháng thể thứ cấp (nghĩa là kháng thể tiếp hợp kháng IgG của dê-phycoerythrin; Southern Biotech, được pha loãng với tỷ lệ 1:250 hoặc 0,1µg/ 10^6 tế bào) trong 0,5ml dung dịch đệm phong bế được bổ sung và tế bào được ủ trong thời gian từ 20 đến 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Các tế bào được rửa một lần cuối bằng 4ml PBS lạnh, sau đó được tái tạo huyền phù trong 0,5ml dung dịch đệm FACS để tạo profin.

Liên kết với các dạng đa hình đơn nucleotit (các SNP)

Để phân tích SNP của cấu trúc dưới phân tử $\alpha 4$, các exon từ 1 đến 28 của gen $\alpha 4$ từ 90 cá thể (180 bộ gen thể đơn bội) đại diện cho các nhóm dân tộc khác nhau được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và sau đó được giải trình tự. Ba SNP ứng cử trong vùng mã hóa của gen $\alpha 4$ được nhận diện và một trong ba SNP này dẫn đến sự thay đổi axit amin (Arg878Gln). Tương tự với việc phân tích SNP cấu trúc dưới phân tử $\beta 7$, vùng mã hóa cho các exon từ 2 đến 15 của gen $\beta 7$ từ 90 cá thể (180 bộ gen thể đơn bội) thuộc các nhóm dân tộc khác nhau được khuếch đại bằng PCR và sau đó được giải trình tự. Ba SNP này được nhận diện và hai trong số chúng dẫn đến sự thay đổi axit amin. Số liệu phân tích SNP nội bộ được so sánh với thông tin trong cơ sở dữ liệu NCBI (NCBI: National Center for Biotechnology Information- Trung tâm Quốc gia về Thông tin Công nghệ sinh học, một bộ phận của thư viện y quốc gia (National Library of Medicine-NLM) thuộc Viện sức khỏe quốc gia (National Institutes of Health-NIH)). Chỉ đột biến A/G tạo thành Gln878Arg trong cấu trúc dưới phân tử $\alpha 4$ xuất hiện ở tần suất xuất hiện cao - 20% hoặc 30% trong cả SNP nội bộ và cơ sở dữ liệu đã công bố tương ứng. Các SNP khác xuất hiện ở tần suất xuất hiện thấp. Thông tin này được tóm tắt trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4: Tần suất xuất hiện của các SNP trong beta7 và alpha4 của người

	SNP	Tần suất xuất hiện alen thay thế – cơ sở dữ liệu NCBI	Tần suất xuất hiện alen thay thế – phân tích nội bộ	Vị trí
beta7	E97V	NA	A(0,989)/T(0,019)	ngoại bào
	R213S	C(0,975)/A(0,25)	Không quan sát thấy	ngoại bào
	G611E	NA	Không quan sát thấy	ngoại bào
	G629S	NA	A(0,989)/T(0,019)	ngoại bào
	H672Y	NA	Không quan sát thấy	ngoại bào
alpha4	V824A	T(0,972)/C(0,028)	Không quan sát thấy	ngoại bào
	Q878R	A(0,648)/G(0,352)	A(0,783)/G(0,217)	ngoại bào
	R1007S	NA	Không quan sát thấy	ngoại bào

Cấu trúc thể đột biến điểm đại diện cho SNP biến đổi axit amin (a4b7(E97V); a4b7(R213S); a4b7(G629S); a4(V824A)b7; a4(Q878R)b7) trong miền ngoại bào của cả alpha4 và beta7 được tạo ra. Mỗi cấu trúc thể đột biến điểm được chuyển nhiễm vào các tế bào 293 cùng với cấu trúc biểu hiện đối tác kiểu đại. Các tế bào 293 đã được chuyển nhiễm đầu tiên được nhuộm bằng 1µg/ml IgG của người hoặc kháng thể kháng alpha4beta7, rửa bằng PBS và được nhuộm bằng kháng thể thứ cấp kháng IgG của người của dê được tiếp hợp với phycoerytherin. Sau khi rửa bằng PBS, tế bào được phân tích bằng cách phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang, ví dụ, bằng FACSCalibur™ (do BD Biosciences, San Jose CA cung cấp). Cường độ nhuộm huỳnh quang (giá trị trung bình hình học) cho mỗi lần nhuộm kháng thể được thể hiện trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5: Liên kết với các SNP

	Trọng lượng	E97V	R213S	G629S	V824A	Q878R
IgG	8	7	7	7	7	7
1A10	122	135	31	80	102	70
3A5	124	135	31	80	110	71
2F12	129	134	37	80	112	73
18A11	92	105	30	63	82	56
22B2	97	108	58	65	85	58
26H3	93	106	49	62	82	55
27G8	102	116	59	68	88	58
26G2	99	113	38	64	86	58
17C8	93	96	49	58	74	51
19G6	94	108	46	59	67	46
25C9	96	106	33	59	77	51

Các kết quả này chỉ ra rằng tất cả các kháng thể được thử nghiệm đều liên kết với các SNP đã biết của alpha4beta7.

Hoạt tính của các kháng thể đặc hiệu dị dime alpha4beta7 khác nhau trong một số thử nghiệm khác được so sánh trong Bảng 6 dưới đây.

Bảng 6: Đặc điểm của các kháng thể đối với alpha4beta7

Kháng thể	Sự bám dính HUT78 IC50 (ng/ml)	Cạnh tranh MAdCAM-1 IC50 (ng/ml)	Liên kết tế bào CD4+CD45RA EC50 (ng/ml)	Liên kết a4b7(S250N)
1A10	6,1	6,2	4,9	-
3A5	7,5	6,2	5,6	-
2F12	11,4	4,6	3,3	-
18A11	7,4	7,3	4,7	-
22B2	3,7	23,2	5,1	-
26H3	8,9	14,1	9,3	-
27G8	14,9	8,7	6,3	-
26G2	6,9	99,6	32,6	+
17C8	6,8	31,1	22,9	+
19G6	12,2	103,3	32,9	+
25C9	13,7	77,6	NA	+

Soler et al. đã báo cáo rằng tính đặc hiệu liên kết của kháng thể kháng alpha4beta7 được làm giống như của người được biết là vedolizumab (J Pharmacol Exp Ther 330:864; 2009). Kháng thể này được báo cáo là có giá trị EC50 trên lympho bào T nhớ CD4+ bằng 0,042µg/ml (42ng/ml). Vedolizumab này cũng ức chế sự liên kết của MAdCAM-1 hòa tan với các tế bào T nhớ alpha4beta7hi với IC50 bằng 0,034µg/ml (34 ng/ml). Ngược lại, nhiều trong số các kháng thể được thể hiện trong Bảng 6 có giá trị EC50 trên các tế bào T nhớ (nghĩa là, tế bào CD4+CD45RA) nhỏ hơn 10ng/ml và tất cả chúng đều có giá trị EC50 nhỏ hơn 35ng/ml (tất cả chúng cũng có giá trị EC50 lớn hơn 0,1ng/ml trong thử nghiệm này). Ngoài ra, một vài trong số các kháng thể được thể hiện trong Bảng 6 cho thấy giá trị IC50 trong thử nghiệm cạnh tranh MAdCAM nhỏ hơn 10ng/ml và nhiều kháng thể cho thấy giá trị IC50 nhỏ hơn 30ng/ml (tất cả chúng đều thể hiện giá trị IC50 lớn hơn 0,1ng/ml trong thử nghiệm này). Mặc dù Soler et al. không đề cập đến khả năng của vedolizumab trong việc liên kết với thể đột biến S250N của alpha4beta7, kháng thể ACT-1 của loài chuột từ đó vedolizumab thu được được biết là không có khả năng liên kết với thể đột biến S250N (Tidswell et al., J Immunol 159:1497; 1997) và theo Soler et al., vedolizumab và ACT-1 thể hiện tính đặc hiệu kháng nguyên tương đương. Vì vậy, vedolizumab cũng không

liên kết với thể đột biến S250N, ngược lại với một vài trong số các kháng thể được thể hiện trong Bảng 6.

Ví dụ 4: Các phân tích bổ sung

Một vài kháng thể đại diện có các đặc tính khác nhau trong thử nghiệm chức năng nêu trên được chọn để tiến hành các phân tích bổ sung như được mô tả dưới đây.

Ái lực liên kết với a4b7 của người

Để đo ái lực liên kết tế bào của các kháng thể kháng alpha4beta7 của người, thử nghiệm loại trừ động học để đo các sự kiện liên kết trong pha dung dịch có thể được sử dụng để tính hằng số phân ly cân bằng, K_d . Công nghệ KinExA® (Sapidyne Instruments, Boise, ID) được sử dụng, về cơ bản như được mô tả trước đây bởi Xie et. al. *J. Imm. Methods* 304:1 (2005) và Rathanaswami et. al. *Anal. Biochem.* 373:52 (2008). Tóm tắt lại, các tế bào HUT78 biểu hiện alpha4beta7 của người được chuẩn độ 1 trong 3 từ khoảng 50^6 tế bào/ml đến khoảng 400 tế bào/ml và sau đó được làm cân bằng với nồng độ cuối là 2 hoặc 30pM của mAb 2F12 hoặc 18A11 và 30 hoặc 500pM đối với 17C8 trong 18 giờ ở nhiệt độ 4°C . Kháng thể tự do vẫn còn trong phần dịch nổi bề mặt ở trạng thái cân bằng được đo bằng công nghệ KinExA® bằng cách cho phần dịch nổi bề mặt đi qua các hạt PMMA được phủ trước kháng thể kháng Fc của người của dê và được phát hiện bằng kháng thể kháng (H+L) Cy5 của người của dê (về cơ bản đã được mô tả bởi Rathanaswami et al. *Biochem Biophys Research Commun*:1004 (2005). Hằng số phân ly cân bằng (K_d) thu được bằng cách sử dụng phần mềm KinExA® bằng “phân tích đường cong n” đồng thời khớp tất cả các đường cong xác định với giá trị K_d đơn (Rathanaswami et al. 2005 và Xie et al., *supra*).; các kết quả được thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 7: Ái lực liên kết của các kháng thể

Kháng thể	K_d (pM)	Tỷ lệ (Ab thấp)	% sai số	K_d thấp	K_d cao
2F12	4,56	0,44	3,80	1,94	11,12
18A11	0,90	2,22	4,40	0,23	2,29
17C8	29,36	1,02	3,58	12,09	74,53

Các kháng thể này cho thấy giá trị K_d trong thử nghiệm KinExA® lớn hơn 0,05pM, nhưng nhỏ hơn 80pM, nhỏ hơn 15pM hoặc nhỏ hơn 5pM.

Đặc điểm PK/PD

Tiến hành nghiên cứu dược động học (PK) và dược lực học (PD) liều đơn của ba kháng thể kháng alpha4beta7 của người đầy đủ ở khỉ cynomologous được sau khi dùng qua đường trong tĩnh mạch (IV; 5mg/kg) hoặc dưới da (SC; 0,5 hoặc 5mg/kg). Sự lộ diện PK ban đầu tương tự (C_0 ; nồng độ tại thời điểm 0) và sự phân bố trong hệ tuần hoàn trung tâm sau khi dùng IV với liều lượng 5 mg/kg được quan sát. Sau khi dùng SC, cả $C_{tối đa}$ (nồng độ tối đa trong huyết thanh) và AUC (vùng dưới đường cong nồng độ-thời gian) thể hiện tính tỷ lệ liều trong khoảng liều SC từ 0,5 đến 5mg/kg ở cả ba kháng thể. Độ sinh khả dụng tuyệt đối sau khi dùng SC của ba kháng thể thử nghiệm nằm trong khoảng từ 44% đến 68%.

Alpha4beta7 tự do trên tế bào T trước và sau khi điều trị bằng kháng thể được định lượng bởi kháng thể kháng alpha4beta7 được tiếp hợp với PE, 27G8. Mức nền được kiểm soát bằng cách nhuộm với kháng thể kháng alpha4beta7 được tiếp hợp với PE 27G8 với sự có mặt của 10mg/ml kháng thể được thử nghiệm trước và sau khi điều trị bằng kháng thể. Độ bão hòa một phần được xác định bằng phần trăm vị trí alpha4beta7 tự do so với điều trị trước đó cho mỗi kháng thể. CD4-PerCP, CD99-APC và CD28-FITC được sử dụng để phân biệt tế bào non, tế bào nhớ trung tâm và tế bào nhớ thực hiện. Độ bão hòa một phần của alpha4beta7 trên tế bào T non được thể hiện do khả năng biến đổi và độ nhạy với thử nghiệm bị hạn chế trong quần thể tế bào của khỉ cynomologous. Đối với điều trị bằng 18A11, cả ba nhóm liều dùng vẫn duy trì trạng thái bão hòa từ ngày 1 đến ngày 14. Ở ngày 29, cả ba nhóm này đều mất lớp bảo vệ. Trong các điều trị bằng 2F12 và 17C8, việc mất lớp bảo vệ đích được quan sát thấy vào ngày 14 ở nhóm liều dùng thấp (0,5mg/Kg).

Ngoài việc phát hiện alpha4beta7 tự do, độ bão hòa đích cũng được xác định bằng cách nhuộm bằng kháng thể kháng kháng thể của người được tiếp hợp với PE A35 trong điều kiện vắng mặt hoặc có mặt 10mg/ml kháng thể. Tổng các vị trí alpha4beta7 được ước tính với sự ủ trước các mẫu với 10mg/ml kháng thể kháng alpha4beta7, sau đó nhuộm với kháng thể kháng kháng thể của người. Độ bão hòa đích được xác định bằng phần trăm tổng các vị trí alpha4beta7 bị chiếm bởi các kháng thể kháng alpha4beta7 của mỗi mẫu. Ba kháng thể kháng alpha4beta7 của người đầy đủ cho thấy độ bão hòa của alpha4beta7 được duy trì ở giá trị trung bình nằm trong khoảng từ 81 đến 100% trong vòng 14 ngày sau khi dùng IV với liều lượng 5 mg/kg.

Tiến hành mô hình hóa PK/PD dựa trên các nồng độ kháng thể kháng alpha4beta7 trong huyết thanh và số liệu bão hòa thụ thể alpha4beta7 tương ứng bằng cách sử dụng mô hình $E_{\max}$ trực tiếp. Mô hình này ước tính các thông số PD là $E_{\max}$ (độ bão hòa thụ thể alpha4beta7 tối đa) bằng 92%, EC_{50} (nồng độ kháng thể kháng alpha4beta7 tại đó đạt được 50% $E_{\max}$) bằng 52ng/ml và E_0 (độ bão hòa thụ thể alpha4beta7 ban đầu) bằng 18%. Cả ba kháng thể này đều thể hiện tác dụng PD *in vivo* tiềm năng trong việc làm bão hòa các thụ thể alpha4beta7 với $t_{1/2}$ trung bình từ 3 đến 5 ngày ở khỉ cynomolgus.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị đime alpha4beta7 được phân lập có vùng thay đổi chuỗi nặng chứa CDR1, CDR2 và CDR3 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1, CDR2 và CDR3, trong đó các vùng thay đổi này là vùng thay đổi chuỗi nặng chứa CDR1, CDR2 và CDR3 từ SEQ ID NO:37, và vùng thay đổi chuỗi nhẹ chứa CDR1, CDR2 và CDR3 từ SEQ ID NO:9.
2. Protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị đime alpha4beta7 được phân lập theo điểm 1, trong đó vùng thay đổi chuỗi nhẹ đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:9 và vùng thay đổi chuỗi nặng đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:37.
3. Protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị đime alpha4beta7 được phân lập theo điểm 2, trong đó vùng thay đổi chuỗi nhẹ bao chứa SEQ ID NO:9 và vùng thay đổi chuỗi nặng chứa SEQ ID NO:37.
4. Protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị đime alpha4beta7 được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó protein này còn chứa vùng ổn định chuỗi nhẹ và vùng ổn định chuỗi nặng.
5. Protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị đime alpha4beta7 được phân lập theo điểm 4, trong đó vùng ổn định chuỗi nhẹ là vùng ổn định chuỗi nhẹ kiểu kappa; và vùng ổn định chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm:
 - a') vùng ổn định từ kháng thể IgD;
 - b') vùng ổn định từ kháng thể IgE;
 - c') vùng ổn định từ kháng thể IgM;
 - d') vùng ổn định từ kháng thể IgG1;
 - e') vùng ổn định từ kháng thể IgG2;
 - f') vùng ổn định từ kháng thể IgG3;
 - g') vùng ổn định từ kháng thể IgG4; và
 - h') vùng ổn định từ kháng thể IgG4 có ít nhất một đột biến trong vùng bản lề làm giảm xu hướng tạo thành liên kết disulfua trong chuỗi H.
6. Protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị đime alpha4beta7 được phân lập theo điểm 4, trong đó vùng ổn định chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm:

- a) polypeptit chứa SEQ ID NO:70;
- b) polypeptit đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:70;
- c) polypeptit của a) kết hợp với một hoặc nhiều cải biến sau dịch mã; và
- d) polypeptit có trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO:70 từ đó một, hai, ba, bốn hoặc năm axit amin đầu tận N và/hoặc đầu tận C được loại bỏ; và vùng ổn định chuỗi nặng được chọn từ nhóm gồm:

- a') polypeptit chứa SEQ ID NO:72;
- b') polypeptit đồng nhất ít nhất 90% với SEQ ID NO:72;
- c') polypeptit của a') kết hợp với một hoặc nhiều cải biến sau dịch mã; và
- d') polypeptit có trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO:72 từ đó một, hai, ba, bốn hoặc năm axit amin đầu tận N và/hoặc đầu tận C được loại bỏ.

7. Protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị dimer alpha4beta7 được phân lập có vùng thay đổi chuỗi nặng và vùng thay đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là vùng chuỗi nhẹ được mã hóa bởi axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 37 và vùng thay đổi chuỗi nhẹ được mã hóa bởi axit nucleic mã hóa SEQ ID NO: 9.

8. Protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị dimer alpha4beta7 được phân lập theo điểm 7, trong đó các axit nucleic mã hóa vùng thay đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là axit nucleic chứa SEQ ID NO:64 và axit nucleic chứa SEQ ID NO:63.

9. Protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị dimer alpha4beta7 được phân lập theo điểm 7 hoặc 8, trong đó protein này còn chứa vùng ổn định chuỗi nhẹ và vùng ổn định chuỗi nặng, trong đó vùng ổn định chuỗi nhẹ được mã hóa bởi axit nucleic mã hóa SEQ ID NO:70 và vùng ổn định chuỗi nặng được mã hóa bởi axit nucleic mã hóa SEQ ID NO:72.

10. Protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị dimer alpha4beta7 được phân lập theo điểm 9, trong đó vùng ổn định chuỗi nặng được mã hóa bởi axit nucleic chứa SEQ ID NO:69, và vùng ổn định chuỗi nhẹ được mã hóa bởi axit nucleic chứa SEQ ID NO:71.

11. Chế phẩm chứa protein liên kết kháng nguyên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10 và chất pha loãng, tá dược hoặc chất mang chấp nhận được về mặt sinh lý.

12. Axit nucleic được phân lập mã hóa protein liên kết kháng nguyên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10.
13. Vector chứa axit nucleic theo điểm 12.
14. Tế bào chủ được phân lập được chuyển nhiễm hoặc được biến nạp với vector theo điểm 13.
15. Phương pháp sản xuất protein liên kết kháng nguyên bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 14 dưới điều kiện tăng cường sự biểu hiện và thu hồi protein này từ môi trường nuôi cấy.
16. Phương pháp ức chế *in vitro* ít nhất một hoạt tính của alpha4beta7 bao gồm bước cho tế bào biểu hiện alpha4beta7 tiếp xúc với protein theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, sao cho sự bám dính của tế bào này với MAdCAM-I bị ức chế một phần hoặc toàn bộ.
17. Phương pháp ức chế *in vitro* sự di chuyển của tế bào biểu hiện alpha4beta7 đến mô chứa tế bào biểu hiện MAdCAM-I bao gồm bước cho tế bào biểu hiện alpha4beta7 tiếp xúc với protein theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, sao cho sự bám dính của tế bào này với MAdCAM-I bị ức chế một phần hoặc toàn bộ.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> AMGEN INC.

HSU, Hailing

FOLTZ, Ian

ARORA, Taruna

JACOBSEN, Frederick W.

<120> Protein liên kết kháng nguyên đặc hiệu dị đime alpha4beta7 và chế phẩm chứa protein này

<130> A-1459-WO-PCT

<140> PCT/US2010/027422

<141> 2010-03-16

<150> 61/306,829

<151> 2010-02-25

<150> 61/162,154

<151> 2009-03-20

<160> 72

<170> Sáng chế trong phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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 Val Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Met Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ile 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 Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1 5 10 15

Glu Thr Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Val Ser Ser Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Tyr Trp Pro Pro
 85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys
100 105

$\langle 210 \rangle$ 3

<211> 107

<212> PRT

<213>: Homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Cys Cys Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

$\langle 210 \rangle$ 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

$\langle 400 \rangle$ 4

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

<210> 5

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
 85 90 95

Ser Ala Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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 Val Ile Ser Trp
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ile 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 Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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 Val Asn Asn Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Phe Ala Thr 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 Asn Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Asn Ser Phe Pro Gly

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asp Trp Pro Thr

85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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 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 Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

$\langle 210 \rangle$ 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Ser Pro

85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Ala Ile Lys

100 105

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Ser Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Trp Pro Pro
 85 90 95

Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 12

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Glu Ala Pro Arg Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Asn Asn

20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr His Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Thr Asp Tyr Tyr Cys Thr Ala Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 13

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Cys

85

90

95

Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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 Ser Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Thr Tyr

20

25

30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asp Asn Leu Pro Ile

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Thr Asp Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ile Leu Pro Tyr

85 90 95

Ser Phe Gly Gln Gly Thr Asp Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Glu Val Met Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

Phe Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65

70

75

80

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

85

90

95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Val Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro

85

90

95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 19

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Phe Pro Gly

1 5 10 15

Glu Gly Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ala Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Asp Trp Pro Pro

85 90 95

Leu Ser Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 20

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

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

<210> 21

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

23969

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Trp Pro Pro

85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Thr Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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 Asp Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser 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 Trp

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 23

<211> 106

<212> . PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala

20 25 30

Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Val

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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 Asp Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ala Pro Lys Val Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Gln Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ala 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 Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 25

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

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

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

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

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Ala Asp Glu Thr Asp Tyr Tyr Cys Thr Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 26

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ala Pro Arg Gln

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

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

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

85 90 95
 Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 28
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 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 Val 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 Ile 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 Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 29
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Asn Asp Leu

20

25

30

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

35

40

45

Gly Gly Phe Asp Pro Ala Glu Gly Lys Ile Ile Ser Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Asp Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Thr Leu Asp Phe Ser Ser Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 30

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala 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 Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 31

<211> 118

<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 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 His

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 His Trp Asn Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 32

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Val Thr Asp Leu

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Gln Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Thr Glu Ser Ser Ser Ala Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 33

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Val Val Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Ser Ser Ala Trp Asp Glu Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 34
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Asn Asp Leu
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Phe Asp Pro Ala Glu Gly Lys Ile Ile Ser Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Asp Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Leu Asp Phe Ser Ser Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 35
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 35
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Thr Gly Ser Ala Met Tyr Asp Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Phe Ser Ser Gly Trp Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 36
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 37

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Ser Asp Leu

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Gln Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Gly Ser Ser Ser Ser Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 38
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 38
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala 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 Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu His Ser Ser Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg
 100 105 110
 Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120
 <210> 39
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 39
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Met Tyr Ser Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

210> 40
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 40

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

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

<210> 41

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Asp Trp Asn Tyr Ala Asp Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

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

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Arg Val Gly Ser Thr Thr 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 43

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Tyr Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser His Arg Leu Trp Leu Gly Glu Phe Pro Gly Pro Leu Asn Ile

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 44

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly

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

<210> 45

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

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

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

<210> 46

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

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

<210> 47

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Ser Ser Gly Trp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 48

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Ala Pro Tyr Ser Ser Ser Trp Ala Leu Gly Leu Gly Met Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 49

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

```

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

```

<210> 50

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

```

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

```

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Ser Ser Gly Trp Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 51

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ala Ile His Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp His Ser Ser Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 52

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Ala Met Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Ser Ser Gly Trp Phe Phe Phe Glu Ser Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 53

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Asn Asp Leu

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Ala Glu Gly Lys Ile Ile Ser Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Asp Phe Ser Ser Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 54

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Asp Trp Asn Tyr Ala Asp Tyr Tyr Gly Met

100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 55

<211> 109

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự liên ứng chuỗi nhẹ

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (2)..(2)

<223> X có thể là Val, Leu hoặc Ile

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (3)..(3)

<223> X có thể là Met hoặc Val

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (4)..(4)

<223> X có thể là Met hoặc Leu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (5)..(5)

<223> X có thể là Met hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (9)..(9)

<223> X có thể là Ala hoặc Gly

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (13)..(13)

<223> X có thể là Leu hoặc Val

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (14)..(14)

<223> X có thể là Phe hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (18)..(18)

<223> X có thể là Gly, Arg hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (21)..(21)

<223> X có thể là Val hoặc Leu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (28)..(28)

<223> X có thể là Thr hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (30)..(30)

<223> X có thể là thr, Asn hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (30)..(30)

<223> X có thể là Thr, Asn hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (31)..(31)

<223> X có thể là Thr, Asp hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (32)..(32)

<223> X có thể là Asn, Asp hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (33)..(33)

<223> X có thể là Tyr hoặc không

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (35)..(35)

<223> X có thể là Val hoặc Ala

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (40)..(40)

<223> X có thể là Ser hoặc Lys

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (42)..(42)

<223> X có thể là Ser hoặc Gly

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (44)..(44)

<223> X có thể là Ser, Pro hoặc Ala

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (50)..(50)

<223> X có thể là Phe hoặc Tyr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (54)..(54)

<223> X có thể là Thr, Ala hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (61)..(61)

<223> X có thể là Ala hoặc Asp

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (71)..(71)

<223> X có thể là Glu hoặc Asp

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (78)..(78)

<223> X có thể là Ser hoặc Arg

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (80)..(80)

<223> X có thể là Gln hoặc Glu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (81)..(81)

<223> X có thể là Pro hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (88)..(88)

<223> X có thể là Phe, Cys hoặc Tyr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (93)..(93)

<223> X có thể là His, Asn hoặc Asp

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (94)..(94)

<223> X có thể là Asp, Asn, Tyr hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (95)..(95)

<223> X có thể là Trp hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (97)..(97)

<223> X có thể là Pro hoặc không

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (98)..(98)

<223> X có thể là Val, Leu hoặc không

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (99)..(99)

<223> X có thể là Thr hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (102)..(102)

<223> X có thể là Gln hoặc Glu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (105)..(105)

<223> X có thể là Arg, Thr hoặc Lys

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (106)..(106)

<223> X có thể là Leu hoặc Val

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (107)..(107)

<223> X có thể là Glu hoặc Ala

<400> 55

Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Ser Pro Xaa Thr Leu Ser Xaa Xaa Pro Gly

1 5 10 15

Glu Xaa Ala Thr Xaa Ser Cys Arg Ala Ser Gln Xaa Val Xaa Xaa Xaa

20 25 30

Xaa Leu Xaa Trp Tyr Gln Gln Xaa Pro Xaa Gln Xaa Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Xaa Gly Ala Ser Xaa Arg Ala Thr Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Xaa Phe Thr Leu Thr Ile Ser Xaa Leu Xaa

65 70 75 80

Xaa Glu Asp Phe Ala Val Tyr Xaa Cys Gln Gln Tyr Xaa Xaa Xaa Pro

85 90 95

Xaa Xaa Xaa Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Xaa Ile Lys

100 105

<210> 56

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự liên ứng chuỗi nhẹ

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (11)..(11)

<223> X có thể là Val hoặc Leu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (12)..(12)

<223> X có thể là Ser hoặc Phe

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (15)..(15)

<223> X có thể là Val hoặc Ile

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (28)..(28)

<223> X có thể là Asp hoặc Gly

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (29)..(29)

<223> X có thể là Ile hoặc Val

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (30)..(30)

<223> X có thể là Ser, Ile, Asn hoặc Arg

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (31)..(31)

<223> X có thể là Ser hoặc Asn

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (32)..(32)

<223> X có thể là Trp hoặc Tyr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (38)..(38)

<223> X có thể là Arg hoặc Gln

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (42)..(42)

<223> X có thể là Lys, Met hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (43)..(43)

<223> X có thể là Ala hoặc Val

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (45)..(45)

<223> X có thể là Lys hoặc Asn

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (46)..(46)

<223> X có thể là Val hoặc Leu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (49)..(49)

<223> X có thể là Tyr hoặc Phe

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (50)..(50)

<223> X có thể là Ser, Ala hoặc Gly

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (51)..(51)

<223> X có thể là Ala hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (53)..(53)

<223> X có thể là Ser, Ile, Asn hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (55)..(55)

<223> X có thể là Gln hoặc Glu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (56)..(56)

<223> X có thể là Ser hoặc Asn

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (60)..(60)

<223> X có thể là Ser hoặc Leu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (65)..(65)

<223> X có thể là Ser hoặc Arg

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (72)..(72)

<223> X có thể là Ala hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (76)..(76)

<223> X có thể là Ser hoặc Asn

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (83)..(83)

<223> X có thể là Phe hoặc Val

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (85)..(85)

<223> X có thể là Thr hoặc Asn

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (87)..(87)

<223> X có thể là Tyr hoặc Cys

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (90)..(90)

<223> X có thể là Gln hoặc Lys

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (91)..(91)

<223> X có thể là Ala, Val hoặc Tyr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (92)..(92)

<223> X có thể là Asp hoặc Asn

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (94)..(94)

<223> X có thể là Phe hoặc Ala

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (96)..(96)

<223> X có thể là Trp, Gly hoặc Phe

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (100)..(100)

<223> X có thể là Gln, Arg hoặc Pro

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (103)..(103)

<223> X có thể là Lys hoặc Asn

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (105)..(105)

<223> X có thể là Glu hoặc Asp

<400> 56

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Xaa Xaa Ala Ser Xaa Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20

25

30

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

<210> 57

<211> 107

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự liên ứng chuỗi nhẹ

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (2)..(2)

<223> X có thể là Ile hoặc Val

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (22)..(22)

<223> X có thể là Ser hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (30)..(30)

<223> X có thể là Ser, Asn hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (31)..(31)

<223> X có thể là Asn, Thr hoặc Asp

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (43)..(43)

<223> X có thể là Ala hoặc Val

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (51)..(51)

<223> X có thể là Ala hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (56)..(56)

<223> X có thể là Thr hoặc Ala

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (76)..(76)

<223> X có thể là Asn hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (77)..(77)

<223> X có thể là Gly hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (87)..(87)

<223> X có thể là Phe hoặc Tyr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (91)..(91)

<223> X có thể là Phe hoặc Tyr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (93)..(93)

<223> X có thể là Asn hoặc Ile

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (96)..(96)

<223> X có thể là Cys, Ser, Ile hoặc Tyr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (97)..(97)

<223> X có thể là Ser hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (103)..(103)

<223> X có thể là Lys, Arg hoặc Asp

<400> 57

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Xaa Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Xaa Xaa Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Xaa Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Xaa Ser Asn Leu Glu Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Xaa Xaa Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Xaa Cys Gln Gln Xaa Asp Xaa Leu Pro Xaa

85 90 95

Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Xaa Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 58

<211> 121

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự liên ứng chuỗi nặng

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (10)..(10)

<223> X có thể là Gly hoặc Asp

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (13)..(13)

<223> X có thể là Lys hoặc Glu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (23)..(23)

<223> X có thể là Thr, Val hoặc Ala

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (30)..(30)

<223> X có thể là Ser, Arg hoặc Asn

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (32)..(32)

<223> X có thể là Tyr hoặc Asn

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (40)..(40)

<223> X có thể là Ala hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (48)..(48)

<223> X có thể là Val, Ile hoặc Leu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (53)..(53)

<223> X có thể là Ser, Arg hoặc Asn

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (54)..(54)

<223> X có thể là Ser, Thr, Val hoặc Ile

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (57)..(57)

<223> X có thể là Ala, Thr hoặc Val

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (58)..(58)

<223> X có thể là Thr, Val, Met, Ile, Leu hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (59)..(59)

<223> X có thể là Tyr hoặc His

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (60)..(60)

<223> X có thể là Tyr, Ser, Asp hoặc Cys

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (73)..(73)

<223> X có thể là Asp, Val hoặc His

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (75)..(75)

<223> X có thể là Ala hoặc Pro

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (76)..(76)

<223> X có thể là Lys hoặc Arg

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (83)..(83)

<223> X có thể là Met hoặc Leu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (84)..(84)

<223> X có thể là Asp, Asn hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (89)..(89)

<223> X có thể là Glu hoặc Asp

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (91)..(91)

<223> X có thể là Thr hoặc Ala

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (94)..(94)

<223> X có thể là Phe hoặc Tyr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (97)..(97)

<223> X có thể là Ala hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (99)..(99)

<223> X có thể là Glu hoặc Asp

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (100)..(100)

<223> X có thể là His, Tyr, Phe hoặc Arg

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (103)..(103)

<223> X có thể là Gly hoặc Ala

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (104)..(104)

<223> X có thể là Tyr, Trp hoặc Leu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (105)..(105)

<223> X có thể là Asp hoặc không

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (106)..(106)

<223> X có thể là Trp, Ala, Phe, Tyr, Ser, Val hoặc Glu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (107)..(107)

<223> X có thể là Tyr, Phe, Ser hoặc Ala

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (109)..(109)

<223> X có thể là Asp hoặc Glu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (110)..(110)

<223> X có thể là Leu, Tyr, Ser hoặc Ile

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (113)..(113)

<223> X có thể là Arg, Gln hoặc His

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (115)..(115)

<223> X có thể là Ala hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (116)..(116)

<223> X có thể là Leu hoặc Met

<400> 58

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Xaa Leu Val Xaa Pro Gly Gly

```

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

```

<210> 59

$$\langle 211 \rangle \quad 118$$

<212> PRT

<213> Nhân tạo

$\langle 220 \rangle$

<223> Trình tự liên ứng chuỗi năng

 $\langle 220 \rangle$

<221> Đặc điểm MISC

<222> (29) . . (29)

<223> X có thể là Leu hoặc Val

 $\langle 220 \rangle$

<221> Đặc điểm MISC

<222> (30)..(30)

<223> X có thể là Asn, Thr hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (34)..(34)

<223> X có thể là Met hoặc Ile

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (54)..(54)

<223> X có thể là Ala hoặc Gln

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (55)..(55)

<223> X có thể là Glu hoặc Asp

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (57)..(57)

<223> X có thể là Lys hoặc Glu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (58)..(58)

<223> X có thể là Ile hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC
<222> (60)..(60)
<223> X có thể là Ser hoặc Tyr

<220>

<221> Đặc điểm MISC
<222> (66)..(66)
<223> X có thể là Asp hoặc Gly

<220>

<221> Đặc điểm MISC
<222> (72)..(72)
<223> X có thể là Asp, Arg hoặc Glu

<220>

<221> Đặc điểm MISC
<222> (77)..(77)
<223> X có thể là Asp hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC
<222> (79)..(79)
<223> X có thể là Ala hoặc Val

<220>

<221> Đặc điểm MISC
<222> (84)..(84)
<223> X có thể là Ser hoặc Arg

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (87)..(87)

<223> X có thể là Arg hoặc Lys

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (91)..(91)

<223> X có thể là Ser hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (97)..(97)

<223> X có thể là Ala hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (98)..(98)

<223> X có thể là Thr hoặc Arg

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (99)..(99)

<223> X có thể là Leu, Glu hoặc Gly

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (100)..(100)

<223> X có thể là Asp hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (101)..(101)

<223> X có thể là Phe hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (103)..(103)

<223> X có thể là Ser hoặc Ala

<400> 59

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Xaa Xaa Asp Leu

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Phe Asp Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Ile Xaa Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Xaa Arg Val Thr Met Thr Xaa Asp Thr Ser Thr Xaa Thr Xaa Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Xaa Ser Leu Xaa Ser Glu Asp Xaa Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 60

<211> 125

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự liên ứng chuỗi nặng

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (13)..(13)

<223> X có thể là Gln hoặc Lys

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (16)..(16)

<223> X có thể là Gly hoặc Arg

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (89)..(89)

<223> X có thể là Glu hoặc Asp

<400> 60

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Xaa Pro Gly Xaa

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

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

<210> 61

<211> 123

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự liên ứng chuỗi nặng

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (13)..(13)

<223> X có thể là Lys hoặc Glu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (28)..(28)

<223> X có thể là Ser hoặc Ile

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (31)..(31)

<223> X có thể là Gly hoặc Ser

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (35)..(35)

<223> X có thể là Gly hoặc Ala

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (40)..(40)

<223> X có thể là Met hoặc Leu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (52)..(52)

<223> X có thể là Tyr hoặc Asp

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (54)..(54)

<223> X có thể là Tyr hoặc Asn

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (77)..(77)

<223> X có thể là Asn hoặc His

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (94)..(94)

<223> X có thể là Phe hoặc Tyr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (98)..(98)

<223> X có thể là Ser hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (105)..(105)

<223> X có thể là Glu hoặc Thr

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (106)..(106)

<223> X có thể là Phe hoặc Leu

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (109)..(109)

<223> X có thể là Pro hoặc Gly

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (110)..(110)

<223> X có thể là Leu hoặc Phe

<220>

<221> Đặc điểm MISC

<222> (111)..(111)

<223> X có thể là Asn hoặc Tyr

<400> 61

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Xaa Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Xaa Phe Thr Xaa Tyr

20 25 30

Trp Ile Xaa Trp Val Arg Gln Xaa Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ile Ile Xaa Pro Xaa Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Xaa Tyr Cys

85 90 95

Ala Xaa His Arg Leu Trp Leu Gly Xaa Xaa Pro Gly Xaa Xaa Xaa Ile

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Peptit FLAG (nhãn hiệu đã đăng ký)

<400> 62

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 63

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 63

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc ggggtattagc agctggtttag cctgggtatca acagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccaatt tggaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caaattacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

```

<210> 64

<211> 354

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 64

```

caggtccagc tggtagagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg tttccgata caccctcagt gatttatcca tccactgggt gcgacaggct 120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt tttgatcctc aagatgggtga aacaatctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgaa atctgaggac acggccgtgt attactgcgc aacggggagc 300
agctcgtcct gggtcgacct ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc tagt 354

```

<210> 65

<211> 324

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 65

```

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctcccgggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagt agcaacttag tctggtatca gcagaaacct      120
ggccaggctc ccaggctcct catttatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc      180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct      240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcaa tatgatgact ggcctccgct cactttcggc      300
ggagggacca cggtaggat caaa                                     324

```

<210> 66

<211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 66

```

caggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc      60
tctgtgagc cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg gctttcatac attagtaata gtggtagtgc catgtactac      180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaggaa ctactgtat      240
ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtgt actactgtgc gagagagtat      300
agcagtggct ggttcttctt tgagtcttgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctctagt      360

```

<210> 67

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 67

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtttgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc ggggtattagc agctggtag cctggatatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaatctcct gatctatggt gcatccagtt tacaaaatgg ggtcccatta 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgtaggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321
```

<210> 68

<211> 354

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 68

```
caggtccagc tggtagagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg tttccggata caccgtcact gatttatcca tgcactgggt gcgacaggct 120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaggt ttgatcctc aagatggtga aacaatctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accgaggaca catctacaga cacagcctac 240
atggagctga gaagcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtac aacagaaagc 300
agctcggcct ggttcgacct ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc tagt 354
```

<210> 69

<211> 324

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 69

```

cgtagcgttg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct      60
ggaactgcct ctgttggttg cctgctgaat aacttctatc ccagagagggc caaagtacag      120
tggaaggttg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac      180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag      240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag      300
agcttcaaca ggggagagtg ttga                                           324

```

<210> 70

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

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

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 71

<211> 981

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 71

```

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag      60
agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg    120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcggtg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca    180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc      240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc      300
aaatgttggtg tcgagtgcc accgtgcccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc      360
ctcttcccc caaaaccaa ggacacctc atgatctccc ggaccttgga ggtcacgtgc      420
gtgggtgggtg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc      480
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt      540
gtggtcagcg tcctcacctg tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc      600
aaggtctcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaggg      660
cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac      720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg      780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac      840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaac      900
gttttctcat gctcgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc      960
tccctgtctc cgggtaaata a                                     981

```

<210> 72

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

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

23969

210 215 220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325