



(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)



1-0025057

(51)⁷ C07K 16/18; C07K 16/24

(13) B

(21) 1-2015-03038

(22) 05/03/2014

(86) PCT/US2014/020605 05/03/2014

(87) WO2014/149733 25/09/2014

(30) 61/792,800 15/03/2013 US

(45) 25/08/2020 389

(43) 25/12/2015 333A

(73) ELI LILLY AND COMPANY (US)

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) BEIDLER, Catherine Brautigam (US); KIKLY, Kristine Kay (US); STRIFLER, Beth Ann (US); WITCHER, Derrick Ryan (US); BOYLES, Jeffrey Streetman (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT VỚI GRO-ALPHA, GRO-BETA, GRO-GAMA, ENA-78, GCP-2, NAP-2 VÀ IL-8 CỦA NGƯỜI, QUY TRÌNH TẠO RA KHÁNG THỂ NÀY, PHÂN TỬ ADN VÀ TẾ BÀO ĐỘNG VẬT CÓ VÚ CHỨA PHÂN TỬ ADN NÀY

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết Gro-alpha, Gro-beta, Gro-gama, ENA-78, GCP-2, NAP-2 và IL-8 của người. Kháng thể theo sáng chế hữu ích để điều trị các bệnh viêm/tự miễn dịch khác nhau, như bệnh viêm ruột (IBD), bệnh vẩy nến thể mảng, và bệnh mụn mủ gan bàn tay chân; và bệnh ung thư như bệnh ung thư thận hoặc bệnh ung thư buồng trứng. Sáng chế cũng đề xuất quy trình tạo ra kháng thể này. Sáng chế còn đề xuất phân tử ADN và tế bào động vật có vú chứa phân tử ADN này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng ELR⁺ CXC chemokin. Các kháng thể này hữu hiệu trong điều trị bệnh trong đó sự phát sinh bệnh là qua trung gian ELR⁺ CXC chemokin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

ELR⁺ CXC chemokin (được gọi như vậy là do tất cả các thành phần thuộc họ chemokin này đều có motif axit amin E-L-R liên kế trực tiếp với motif CXC của chúng) đóng vai trò quan trọng trong nhiều cơ chế gây bệnh, bao gồm sự di trú của bạch cầu trung tính đến vị trí viêm và vị trí hình thành mạch. Bạch cầu trung tính góp phần vào sự phát sinh bệnh của một số bệnh viêm/tự miễn cấp tính và mạn tính, như bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease - IBD), bệnh vẩy nến thể mảng, và bệnh mụn mủ gan bàn tay chân. ELR⁺ CXC chemokin cũng đóng vai trò quyết định trong sự hình thành khối u và di căn khối u. Các chemokin này được biểu hiện ở mức cao trong khối u. Trong môi trường khối u, ELR⁺ CXC chemokin có liên quan đến nhiều con đường khác nhau, ví dụ sự hình thành mạch, sự di chuyển và sự xâm lấn tế bào nội mô và bạch cầu ở vị trí khối u và sự tăng sinh tế bào và sự sống của tế bào khối u.

Chemokin được chia thành bốn phân họ: CXC, CC, (X)C, và CX3C. Trong các CXC chemokin, một axit amin phân tách hai xystein thứ nhất (“motif CXC”). ELR⁺ CXC chemokin là phối tử của thụ thể CXCR1 và/hoặc CXCR2 chemokin, mà là bảy thụ thể kiểu miền chuyển màng ghép cặp với G-protein mà gắn kết một cách đặc hiệu ELR⁺ CXC chemokin. Bảy ELR⁺ CXC chemokin của người này là Gro-alpha của người (còn được biết đến như là CXCL1), Gro-beta của người (còn được biết đến như là CXCL2), Gro-gama của người (còn được biết đến như là CXCL3), ENA-78 của người (còn được biết đến như là CXCL5), GCP-2 của người (còn được biết đến như là CXCL6), NAP-2 của người (còn được biết đến như là CXCL7), và IL-8 của người (còn được biết đến như là CXCL8). Tất cả ELR⁺ CXC chemokin gắn kết với thụ thể

CXCR2; hơn nữa, một vài ELR⁺ CXC chemokin gắn kết với cả thụ thể CXCR1 và CXCR2 (nghĩa là, CXCL6 và CXCL8), tất cả trong số chúng góp phần vào sự dư thừa trong các con đường hoạt hoá.

Các kháng thể mà gắn kết với ELR⁺ CXC chemokin riêng rẽ đã được mô tả trước đây. Hai kháng thể đơn dòng kháng CXCL8 (IL-8) đã được đánh giá trong các thử nghiệm lâm sàng sớm có hiệu quả trong các bệnh viêm. (J Leuk Biol 66:401-410; J Immunol 181:669-679.) Ngoài ra, công bố đơn quốc tế số WO 2008/130969 bộc lộ kháng thể mà gắn kết với IL-8 (CXCL8) của người, Gro-alpha (CXCL1) của người, Gro-beta (CXCL2) của người, Gro-gama (CXCL3) của người và ENA-78 (CXCL5) của người. Tuy nhiên, nội dung bộc lộ này không chứng minh rằng kháng thể này gắn kết một cách chặt chẽ với GCP-2 (CXCL6), và là cam đối với việc gắn kết NAP-2 (CXCL7).

Tuy nhiên, kháng thể mà có khả năng gắn kết và trung hoà tất cả bảy ELR⁺ CXC chemokin của người vẫn chưa được bộc lộ. Việc tạo đích một hoặc một vài ELR⁺ CXC chemokin của người cho phép mở ra cơ hội khám phá nhiều chức năng sinh học đối với các ELR⁺ CXC chemokin khác. Việc trung hoà tất cả bảy ELR⁺ CXC chemokin có thể tác động đến khả năng di trú đến vị trí viêm của tế bào CXCR1⁺ hoặc CXCR2⁺ và có thể ức chế sự hình thành mạch. Mặc dù có sự dư thừa đáng kể trong các con đường hoạt hoá thụ thể CXCR1 và CXCR2, vẫn có nhu cầu đối với kháng thể mà gắn kết tất cả bảy ELR⁺ CXC chemokin của người với tính đặc hiệu và ái lực ở mức cao. Có nhu cầu đối với kháng thể mà trung hoà tất cả bảy ELR⁺ CXC chemokin của người. Cũng có nhu cầu đối với kháng thể mà ổn định về mặt vật lý. Do đó, mong muốn đề xuất kháng thể đặc hiệu vách có khả năng gắn kết và trung hoà tất cả bảy ELR⁺ CXC chemokin của người và ổn định về mặt vật lý.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể mà trung hoà Gro-alpha, Gro-beta, Gro-gama, ENA-78, GCP-2, NAP-2, và IL-8 của người. Sáng chế cũng đề xuất kháng thể mà trung hoà Gro-alpha, Gro-beta, Gro-gama, ENA-78, GCP-2, NAP-2, và IL-8 của người, trong đó kháng thể gắn kết IL-8 (SEQ ID NO: 27) ở các axit amin sau đây: Arg 6, Ile 10, Ala 35, Ile 40. Sáng chế còn đề xuất kháng thể mà trung hoà Gro-alpha, Gro-

beta, Gro-gama, ENA-78, GCP-2, NAP-2, và IL-8 của người, trong đó kháng thể gắn kết IL-8 (SEQ ID NO: 27) ở các axit amin sau đây: Arg 6, Ile 10, Ala 35, Ile 40, và Leu 49.

Sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) và chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), trong đó LCVR bao gồm LCDR1, LCDR2, LCDR3 và HCVR bao gồm HCDR1, HCDR2, HCDR3, trong đó LCDR1 là RASQSISSNNLH (SEQ ID NO: 7), LCDR2 là YTSRSVS (SEQ ID NO: 8), LCDR3 là GQNNEWPEV (SEQ ID NO: 9), HCDR1 là GYEFTSYWIH (SEQ ID NO: 10), HCDR2 là NISPNSGSANYNEKFKS (SEQ ID NO: 11), và HCDR3 là EGPYSYYP SRXaaYYGSDL (SEQ ID NO: 20) trong đó Xaa là E hoặc Q.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể trong đó trình tự axit amin của HCVR là SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 14. Sáng chế còn đề xuất kháng thể trong đó trình tự axit amin của LCVR là SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 16.

Sáng chế đề xuất kháng thể trong đó trình tự axit amin của chuỗi nặng là SEQ ID NO: 1 hoặc 13. Sáng chế cũng đề xuất kháng thể trong đó trình tự axit amin của chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 3 hoặc 15.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit thứ nhất mã hoá polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 hoặc 13; và bao gồm trình tự polynucleotit thứ hai mã hoá polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3 hoặc 15.

Sáng chế đề xuất tế bào động vật có vú bao gồm phân tử ADN được mô tả trên đây, trong đó tế bào có khả năng biểu hiện kháng thể bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 hoặc 13 và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3 hoặc 15. Tế bào vật chủ động vật có vú đã biết có khả năng biểu hiện globulin miễn dịch chức năng bao gồm tế bào buồng trứng chuột túi Trung quốc (CHO), tế bào COS và tế bào NS0. Tế bào vật chủ được ưu tiên để sử dụng trong sáng chế là tế bào NS0.

Sáng chế còn đề xuất quy trình tạo ra kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ mà trình tự axit amin của nó là SEQ ID NO: 3 hoặc 15 và chuỗi nặng mà trình tự axit amin của nó là SEQ ID NO: 1 hoặc 13, bao gồm việc nuôi cấy tế bào động vật có vú được mô tả

trên đây trong các điều kiện sao cho kháng thể được biểu hiện và thu gom kháng thể được biểu hiện này.

Sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh viêm loét ruột kết, bệnh ung thư thận, hoặc bệnh ung thư buồng trứng, bao gồm việc cho người bệnh cần điều trị này dùng lượng hữu hiệu về mặt điều trị của kháng thể của sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể của sáng chế để sử dụng trong liệu pháp điều trị bệnh. Hơn nữa, sáng chế đề xuất kháng thể của sáng chế để sử dụng trong điều trị bệnh viêm loét ruột kết, bệnh ung thư thận, hoặc bệnh ung thư buồng trứng. Ngoài ra, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể của sáng chế trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh viêm loét ruột kết, bệnh ung thư thận, hoặc bệnh ung thư buồng trứng.

Sáng chế đề xuất được phẩm bao gồm kháng thể của sáng chế và một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dùng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “ELR⁺ CXC chemokin của người” được dùng để chỉ bảy CXC chemokin đã biết mà có motif E-L-R và mà gắn kết với thụ thể CXCR1 và/hoặc CXCR2. ELR⁺ CXC chemokin của người là Gro-alpha của người (còn được biết đến như là CXCL1) (SEQ ID NO: 21), Gro-beta của người (còn được biết đến như là CXCL2) (SEQ ID NO: 22), Gro-gama của người (còn được biết đến như là CXCL3) (SEQ ID NO: 23), ENA-78 của người (còn được biết đến như là CXCL5) (SEQ ID NO: 24), GCP-2 của người (còn được biết đến như là CXCL6) (SEQ ID NO: 25), NAP-2 của người (còn được biết đến như là CXCL7) (SEQ ID NO: 26), và IL-8 của người (còn được biết đến như là CXCL8) (SEQ ID NO: 27). Nói chung, tất cả bảy ELR⁺ CXC chemokin của người được gọi là “pan-ELR⁺ CXC chemokin của người” trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “kháng thể,” như được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ các phân tử globulin miễn dịch đơn dòng bao gồm bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được liên kết liên chuỗi bằng các liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và vùng cố định chuỗi nặng. Vùng cố định chuỗi nặng bao gồm ba miền, CH1, CH2, và CH3. Mỗi chuỗi nhẹ gồm

có vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) và vùng cố định chuỗi nhẹ, CL. Các vùng HCVR và LCVR còn có thể được chia thành các vùng siêu biến, được gọi là vùng quyết định bổ trợ (CDR), được đặt rải rác với các vùng mà được bảo tồn nhiều hơn, được gọi là vùng khung (FR). Mỗi HCVR và LCVR gồm có ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu cuối amino đến đầu cuối carboxy theo thứ tự sau đây: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Các vùng CDR trong HCVR được gọi là HCDR1, HCDR2, và HCDR3. Các vùng CDR trong LCVR được gọi là LCDR1, LCDR2, và LCDR3. Các CDR chứa hầu hết các gốc mà tạo thành các tương tác đặc hiệu với kháng nguyên. Hiện nay, có ba hệ thống sắp xếp CDR đối với kháng thể mà được sử dụng để mô tả trình tự. Định nghĩa CDR của Kabat (Kabat *et al.*, “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) được dựa trên tính thay đổi trình tự kháng thể. Định nghĩa CDR của Chothia (Chothia *et al.*, “Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins”, *Journal of Molecular Biology*, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani *et al.*, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, *Journal of Molecular Biology*, 273, 927-948 (1997)) được dựa trên các cấu trúc ba chiều của kháng thể và hình học topo của vòng CDR. Định nghĩa CDR của Chothia là giống với định nghĩa CDR của Kabat với việc loại trừ HCDR1 và HCDR2. Đối với mục đích của sáng chế, việc lai của các định nghĩa Kabat và Chothia được sử dụng để xác định CDR. Việc sắp xếp axit amin trong các vùng HCVR và LCVR là theo quy tắc đánh số Kabat. Sẽ được hiểu rằng thuật ngữ “kháng thể” bao gồm các cải biến sau dịch mã tế bào bất kỳ đối với kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự axyl hoá và glycosyl hoá.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể trung hoà” được dùng để chỉ kháng thể mà việc gắn kết của nó với ELR⁺ CXC chemokin dẫn đến sự ức chế hoạt tính sinh học do chemokin đó gây ra. Việc ức chế ELR⁺ chemokin do hoạt tính sinh học gây ra có thể được đánh giá bằng một hoặc nhiều trong số vài tiêu chuẩn trong các thử nghiệm in vitro đã biết trong lĩnh vực này (xem phần ví dụ thực hiện sáng chế). Sẽ được hiểu rằng các thuật ngữ “ức chế” hoặc “trung hoà” như được sử dụng trong bản mô tả này đối với hoạt tính của kháng thể của sáng chế có nghĩa là khả năng tạo đối kháng, làm giảm hoặc phá vỡ sự tiến triển, cường độ hoặc mức trầm trọng của hoạt tính sinh học do một hoặc nhiều ELR⁺ CXC chemokin gây ra.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể đặc hiệu vách” được dự định bao gồm kháng thể mà gắn kết tất cả bảy ELR⁺ CXC chemokin của người với ái lực ở mức cao (ví dụ, với ái lực gắn kết (K_D) nằm trong khoảng từ 5×10^{-11} M đến 1×10^{-9} M).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “đối tượng mắc bệnh” dùng để chỉ động vật có vú, tốt hơn là con người mắc bệnh, rối loạn hoặc tình trạng bệnh mà sẽ có lợi từ hàm lượng giảm của ELR⁺ CXC chemokin của người hoặc hoạt tính sinh học giảm do ELR⁺ CXC chemokin của người gây ra.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “sự điều trị” hoặc “việc điều trị” được dùng để chỉ tất cả quy trình trong đó có thể là làm chậm, kiểm soát hoặc làm ngừng sự tiến triển của các rối loạn được bộc lộ trong bản mô tả này, nhưng không nhất thiết phải biểu thị loại trừ hoàn toàn tất cả các triệu chứng rối loạn. Việc điều trị bao gồm việc dùng kháng thể của sáng chế để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh ở người bệnh, cụ thể là ở con người.

Kháng thể của sáng chế gắn kết pan-ELR⁺ CXC chemokin của người với ái lực ở mức cao. Ví dụ, kháng thể gắn kết tất cả bảy ELR⁺ CXC chemokin của người với ái lực gắn kết (K_D) nằm trong khoảng từ 5×10^{-11} M đến 1×10^{-9} M, ví dụ khoảng từ $1,0 \times 10^{-10}$ M đến $8,6 \times 10^{-10}$ M, như được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, khi được biểu hiện như kháng thể IgG4 có chiều dài nguyên vẹn. Kháng thể của sáng chế con được đặc trưng ở chỗ, trong khi chúng gắn kết pan-ELR⁺ CXC chemokin của người với tính đặc hiệu, thì chúng không gắn kết một cách đặc hiệu với các CXC chemokin khác, ví dụ nhân tố-1 alpha thu được từ tế bào strom (SDF-1 α , còn được biết đến như là CXCL12).

Theo một phương án, kháng thể của sáng chế có thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các vùng CDR có các trình tự axit amin sau đây: HCDR1 (SEQ ID NO: 10), HCDR2 (SEQ ID NO: 11), và HCDR3 (SEQ ID NO: 12); và trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm vùng CDR có các trình tự axit amin sau đây: LCDR1 (SEQ ID NO: 7), LCDR2 (SEQ ID NO: 8) và LCDR3 (SEQ ID NO: 9).

Theo một phương án khác, kháng thể của sáng chế có thể có vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm vùng CDR có các trình tự axit amin sau đây: HCDR1 (SEQ ID NO: 10), HCDR2 (SEQ ID NO: 11), và HCDR3 (SEQ ID NO: 19); và trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm vùng CDR có các trình tự axit amin sau đây: LCDR1 (SEQ ID NO: 7), LCDR2 (SEQ ID NO: 8) và LCDR3 (SEQ ID NO: 9).

Theo một phương án khác, kháng thể của sáng chế có thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 2 hoặc 14, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 4 hoặc 16.

Theo một phương án khác nữa, kháng thể của sáng chế có thể bao gồm chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 hoặc 13, và chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3 hoặc 15.

Tốt hơn là, kháng thể bao gồm hai chuỗi nhẹ giống nhau và hai chuỗi nặng giống nhau. Tốt hơn là, chuỗi nhẹ có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 được mã hoá bởi axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 6. Tốt hơn là, chuỗi nặng có trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 được mã hoá bởi axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 5. Tốt hơn là, trình tự axit chuỗi nhẹ như được thể hiện trong SEQ ID NO: 15 được mã hoá bởi axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 18. Tốt hơn là, trình tự axit amin chuỗi nặng như được thể hiện trong SEQ ID NO: 13 được mã hoá bởi axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 17.

Phương án được ưu tiên nhất của sáng chế là kháng thể bao gồm hai chuỗi nặng giống nhau có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1, và hai chuỗi nhẹ giống nhau có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3.

Các kháng thể của sáng chế có thể được hợp nhất vào trong dược phẩm thích hợp để dùng cho người bệnh. Thông thường, dược phẩm bao gồm kháng thể của sáng chế và chất mang dược dụng. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “chất mang dược dụng” bao gồm bất kỳ và tất cả dung môi, môi trường phân tán, lớp bao ngoài, chất kháng vi khuẩn và kháng nấm, chất đẳng trương và làm chậm sự hấp thụ và chất

tương tự mà tương thích về mặt sinh lý. Chất mang được dùng còn có thể bao gồm lượng nhỏ của các chất hỗ trợ mà làm tăng cường thời hạn sử dụng hoặc hiệu quả của sáng chế.

Dược phẩm của sáng chế có thể là ở nhiều dạng. Dạng được ưu tiên phụ thuộc vào phương thức dùng định trước và ứng dụng điều trị. Dược phẩm được ưu tiên thông thường là ở dạng dung dịch có thể tiêm hoặc có thể truyền, như dược phẩm tương tự với dược phẩm được sử dụng cho sự gây miễn dịch thụ động của người. Phương thức dùng được ưu tiên là ngoài đường tiêu hoá (ví dụ, trong tĩnh mạch, dưới da, trong màng bụng hoặc trong cơ). Theo phương án, kháng thể được dùng là việc tiêm trong màng bụng hoặc dưới da. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng đường và/hoặc phương thức dùng sẽ thay đổi phụ thuộc vào các kết quả mong muốn.

Các hoạt chất bổ sung cũng có thể được hợp nhất vào trong dược phẩm. Theo một số phương án, kháng thể của sáng chế được đồng bào chế với và/hoặc được dùng đồng thời với một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung mà là hữu ích để điều trị các rối loạn trong đó hoạt tính ELR⁺ CXC chemokine là có hại. Ví dụ, kháng thể của sáng chế có thể được đồng bào chế và/hoặc được dùng đồng thời với một hoặc nhiều chất hoá trị liệu (ví dụ, sunitinib hoặc cisplatin).

Dược phẩm của sáng chế có thể bao gồm “lượng hữu hiệu về mặt điều trị” của kháng thể của sáng chế. “Lượng hữu hiệu về mặt điều trị” đề cập đến lượng hữu hiệu, ở liều và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả điều trị mong muốn. Lượng hữu hiệu về mặt điều trị của kháng thể có thể thay đổi theo các nhân tố như tình trạng bệnh, tuổi, giới tính và trọng lượng của cá thể và khả năng của kháng thể gây ra đáp ứng mong muốn ở cá thể. Lượng hữu hiệu về mặt điều trị cũng là lượng trong đó bởi tác dụng có lợi về mặt điều trị lớn hơn tác dụng gây độc hoặc có hại bất kỳ của kháng thể.

Các chế độ liều có thể được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng điều trị). Ví dụ, liều cao đơn lẻ có thể được dùng, vài liều được chia có thể được dùng theo thời gian hoặc liều có thể được giảm hoặc tăng theo tỷ lệ như được chỉ định bởi tình trạng khẩn cấp của trạng thái điều trị.

Các trị số liều có thể thay đổi với loại và mức trầm trọng của tình trạng bệnh được làm nhẹ bớt. Sẽ được hiểu rằng đối với đối tượng cụ thể bất kỳ, chế độ liều cụ thể sẽ được điều chỉnh theo thời gian theo nhu cầu cá thể và sự phán xét của chuyên gia dùng hoặc quản lý việc dùng được phẩm.

Việc gắn kết đặc hiệu và trung hoà bởi kháng thể của sáng chế đối với ELR⁺ CXC chemokin của người cho phép kháng thể được sử dụng trong điều trị đối với các bệnh và rối loạn mà có lợi từ sự ức chế hoạt tính sinh học ELR⁺ CXC chemokin của người. Đưa ra khả năng của chúng gắn kết và trung hoà tất cả bảy ELR⁺ CXC chemokin của người, kháng thể của sáng chế tạo ra lợi ích so với liệu pháp điều trị đơn tạo đích ELR⁺ CXC chemokin đơn lẻ của người và liệu pháp điều trị tổ hợp tạo đích nhiều ELR⁺ CXC chemokin của người.

Theo phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh viêm loét ruột kết hoặc bệnh ung thư, như bệnh ung thư thận hoặc bệnh ung thư buồng trứng. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể để sử dụng để điều trị bệnh viêm loét ruột kết hoặc bệnh ung thư, như bệnh ung thư thận hoặc bệnh ung thư buồng trứng.

Sáng chế được minh hoạ tiếp bởi các ví dụ không hạn chế sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Biểu hiện và tạo ra kháng thể

Kháng thể của sáng chế có thể được biểu hiện và tinh chế như sau. Vật truyền biểu hiện chứa trình tự ADN của SEQ ID NO: 5 (mã hoá polypeptit chuỗi nặng của SEQ ID NO: 1) và SEQ ID NO: 6 (mã hoá polypeptit chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 3) được sử dụng để truyền nhiễm tế bào NS0. Kháng thể thu được từ vật truyền biểu hiện này là “kháng thể 1.”

Ngoài ra, vật truyền biểu hiện chứa trình tự ADN của SEQ ID NO: 17 (mã hoá polypeptit chuỗi nặng của SEQ ID NO: 13) và SEQ ID NO: 18 (mã hoá polypeptit chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 15) được sử dụng để truyền nhiễm tế bào NS0. Kháng thể thu được từ vật truyền biểu hiện này là “kháng thể 2.”

Đối với kháng thể 1 hoặc kháng thể 2, nhóm được truyền nhiễm được đưa vào đĩa ở mật độ thấp để cho phép sinh trưởng nhanh gần với dòng của tế bào biểu hiện ổn

định. Giếng chính được sàng lọc đối với sự biểu hiện kháng thể và sau đó được cạo và chuyển vào môi trường nuôi cấy huyền phù không chứa huyết thanh được sử dụng cho sản xuất. Gạn môi trường, mà trong đó kháng thể đã được tiết, đưa vào cột Protein A hoặc G mà đã được làm cân bằng với chất đệm tương thích, như nước muối đệm phosphat (độ pH=7,4). Rửa cột để loại bỏ các thành phần gắn kết không đặc hiệu. Kháng thể gắn kết được tách rửa bằng pH gradient (như 0,1M chất đệm natri phosphat độ pH từ 6,8 đến 0,1M chất đệm natri xitrat độ pH=2,5). Các phân đoạn kháng thể được phát hiện bằng SDS-PAGE và sau đó gom lại. Việc tinh chế tiếp là tùy ý, phụ thuộc vào việc sử dụng định trước. Kháng thể có thể được cô đặc và/hoặc lọc vô trùng bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường. Khối ngưng kết có thể hoà tan và multimer có thể được loại bỏ một cách hữu hiệu bằng các kỹ thuật thông thường, bao gồm sắc ký loại trừ theo kích thước, tương tác kỵ nước, trao đổi ion hoặc canxi photphat hydrat hoá. Độ tinh khiết của kháng thể sau các bước sắc ký này có thể lớn hơn 99%. Sản phẩm có thể được làm đông lạnh ngay ở -70°C hoặc có thể được làm khô lạnh.

Ái lực gắn kết với ELR⁺ CXC Chemokin của người

Thiết bị Biacore 2000 và phần mềm đánh giá Biacore 2000 phiên bản 4.1 được sử dụng cho phân tích cộng hưởng plasmon bề mặt. Chip CM5 được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp ghép cặp amin EDC/NHS của nhà sản xuất. Tóm lại, bề mặt của tất cả bốn dòng tế bào được hoạt hoá bằng cách tiêm hỗn hợp 1:1 gồm EDC/NHS trong 7 phút ở $10\mu\text{L}/\text{phút}$. Pha loãng protein A đến $100\mu\text{g}/\text{mL}$ trong 10mM axetat, chất đệm độ pH=4,5 và làm cố định để đạt được khoảng 10.000 RU đối với tất cả 4 dòng tế bào bằng việc bơm 7 phút ở tốc độ dòng $10\mu\text{L}/\text{phút}$. Các vị trí không phản ứng được phong bế bằng việc bơm 7 phút etanolamin ở $10\mu\text{L}/\text{phút}$. Hai lần bơm glyxin (độ pH=1,5) trong 30 giây ở $10\mu\text{L}/\text{phút}$ được sử dụng để loại bỏ protein kết hợp không cộng hoá trị bất kỳ. Chất đệm chạy là HBS-EP+.

Pha loãng kháng thể 1 hoặc kháng thể 2 đến $2\mu\text{g}/\text{mL}$ trong chất đệm chạy và khoảng từ 400 đến 600 RU được bắt giữ trong dòng tế bào (Fc). Pha loãng các phối tử từ $100\mu\text{g}/\text{mL}$ đến 50nM trong chất đệm chạy và sau đó pha loãng theo dãy hai lần trong chất đệm chạy đến 3,125nM. Hai lần bơm của mỗi nồng độ phối tử được bơm ở

100 μ L/phút trong 150 giây tiếp theo pha phân ly. Pha phân ly là 1800 giây đối với tất cả các phối tử. Việc tái sinh được thực hiện bằng cách bơm 10mM glyxin (độ pH=1,5) trong 60 giây ở 50 μ L/phút đối với tất cả các dòng tế bào. Các dữ liệu trừ tham chiếu được gom là Fc2-Fc1, Fc3-Fc1, và Fc4-Fc1. Các phép đo thu được ở 25°C. Tốc độ on (k_{on}) và tốc độ off (k_{off}) đối với mỗi phối tử được đánh giá bằng cách sử dụng mô hình gắn kết “gắn kết 1:1 (chuyển khối)”. Ái lực (K_D) được tính toán dựa vào động học gắn kết theo mối quan hệ: $K_D = k_{off}/k_{on}$.

ELR⁺ CXC chemokin của người tạo ra đáp ứng gắn kết phụ thuộc nồng độ với kháng thể 1 và kháng thể 2. Các bảng 1 và 2 tổng kết các trị số k_{on} , k_{off} , và K_D đối với kháng thể 1 và kháng thể 2. Các kết quả này chứng minh rằng kháng thể 1 và kháng thể 2 gắn kết tất cả bảy ELR⁺ CXC chemokin của người với ái lực ở mức cao.

Bảng 1: Ái lực gắn kết In Vitro với ELR⁺ CXC Chemokin của người đối với kháng thể 1

Chemokin	k_{on} (1/Ms) x 10 ⁵	k_{off} (1/s) x 10 ⁻⁵	K_D (pM)
CXCL1(Gro alpha) của người	9,30 $\pm$ 0,45	10,50 $\pm$ 0,14	113 $\pm$ 4
CXCL2(Gro Beta) của người	7,73 $\pm$ 0,86	13,15 $\pm$ 0,64	171 $\pm$ 11
CXCL3 (Gro gamma) của người	7,16 $\pm$ 0,08	12,35 $\pm$ 1,06	172 $\pm$ 13
CXCL5 (ENA-78) của người	5,43 $\pm$ 0,61	12,20 $\pm$ 0,00	226 $\pm$ 25
CXCL6 (GCP-2) của người	7,07 $\pm$ 0,11	57,80 $\pm$ 3,68	818 $\pm$ 40
CXCL7 (NAP-2) của người	9,00 $\pm$ 0,75	16,15 $\pm$ 1,77	181 $\pm$ 35
CXCL8 (IL-8) của người	3,39 $\pm$ 0,03	13,00 $\pm$ 0,57	384 $\pm$ 13

Bảng 2: Ái lực gắn kết In Vitro với ELR⁺ CXC Chemokin của người đối với kháng thể 2

Chemokin	k_{on} (1/Ms) x 10 ⁵	k_{off} (1/s) x 10 ⁻⁵	K_D (pM)
CXCL1(Gro alpha) của người	6,28	1,53	243
CXCL2 (Gro beta) của người	1,14	2,05	180
CXCL3 (Gro gamma) của người	4,65	1,76	379

CXCL5 (ENA-78) của người	4,27	1,51	354
CXCL6 (GCP-2) của người	7,19	6,11	849
CXCL7 (NAP-2) của người	5,21	2,18	418
CXCL8 (IL-8) của người	2,61	1,24	473

Đánh giá độ ổn định vật lý

Sự kết tụ protein và tự kết hợp là đặc tính không mong muốn ở các kháng thể do nó có thể có khả năng làm trầm trọng các tác dụng không mong muốn, như khởi đầu đáp ứng miễn dịch. Do đó, việc duy trì kháng thể ở trạng thái monome là có thể mong muốn ở mức cao. Tỷ lệ phần trăm khối lượng phân tử ở mức cao (%HMW) là vật chỉ thị sự kết tụ protein và tự kết hợp. % khối lượng phân tử HMW cao hơn cho biết sự kết tụ/kết hợp protein và độ không ổn định vật lý gia tăng. Độ ổn định vật lý của kháng thể 1 và kháng thể 2 được xác định như sau.

Kháng thể được thẩm tách qua đêm ở 4°C vào trong 10mM xitrat, độ pH 6 +/- 150mM NaCl. Vào buổi sáng tiếp theo, cô đặc các mẫu đến 50mg/mL, lọc qua bộ lọc 0,2 micron và sau đó thêm Tween-80 vào đến nồng độ cuối cùng 0,02%. Mỗi mẫu được ủ ở 25°C trong thời gian định trước. Sự hình thành khối kết tụ có thể hoà tan được tiếp theo bởi SEC phân tích bằng cách sử dụng TSK3000SWXL, cột 5 micron với kích thước 30cm x 0,78cm. Pha động là 50mM natri phosphat, độ pH=7, 175mM NaCl, ở tốc độ dòng 0,5mL/phút. Mẫu được đưa vào ở dạng các liều tiêm 1µL và được quan sát ở 280nm để xác định % kết tụ HMW gia tăng (bảng 3).

Ở các chế phẩm có nồng độ 50mg/mL trong 1 và 4 tuần ở 25°C để đánh giá độ ổn định kéo dài trong các điều kiện ứng xuất. Delta % kết tụ HMW được xác định bằng cách lấy % kết tụ HMW tại thời điểm 1 tuần hoặc 4 tuần trừ đi % khối lượng phân tử HMW tại thời gian gốc (được xác định là 'ban đầu' trong bảng 3). Sau 1 và 4 tuần, kháng thể 1 và kháng thể 2 chứng tỏ delta %HMW nhỏ hơn 1%, do đó chứng tỏ độ ổn định vật lý tốt.

Bảng 3: % kết tụ có trọng lượng phân tử cao

<u>Kháng thể 1</u>			
	Ban đầu (4 °C)	50mg/mL % HMW (t=1 tuần)	50mg/mL % HMW (t=4 tuần)
10mM xitrat độ pH=7, 150mM NaCl	0,78 %		
25°C		1,24 %	1,41 %
Δ %HMW		0,46%	0,63%
10mM xitrat độ pH=7, 150mM NaCl, 0,02% Tween-80	1,05		
25°C		1,46 %	1,75 %
Δ %HMW		0,41%	0,7%
<u>Kháng thể 2</u>			
	Ban đầu (4°C)	50mg/mL % HMW (t=1 tuần)	50mg/mL % HMW (t=4 tuần)
10mM xitrat độ pH=7, 150mM NaCl	0,37 %		
25°C		0,48 %	0,59 %
Δ %HMW		0,11%	0,22%
10mM xitrat độ pH=7, 150mM NaCl, 0,02% Tween-80	0,42 %		
25°C		0,55 %	0,74 %
Δ %HMW		0,13%	0,32%

Tạo bản đồ epitop kháng thể đối với kháng thể 1

Nhiều phương pháp được thực hiện để mô tả đặc điểm epitop đối với kháng thể 1, bao gồm phân tích thẩm tách Western, đồng kết tinh kháng thể với vài ELR⁺ CXC chemokin và phân tích đột biến đối với việc gắn kết và trung hoà.

Phân tích thẩm tách Western

Để xác định liệu kháng thể 1 có khả năng gắn kết epitop tuyến tính hoặc cấu hình, phân tích thẩm tách Western được thực hiện bằng cách sử dụng các điều kiện khử và không khử. Phép điện di protein được thực hiện bằng cách sử dụng gel đúc

trước NuPAGE® 4-12% Bis-Tris. Chất đệm chạy NuPAGE® MES SDS được bổ sung vào khoang bên trong (200mL) và bên ngoài (ít nhất 600mL) có các ngăn nhỏ. Dây pha loãng của CXCL8 của người (400ng, 100ng hoặc 25ng/đường) được tạo ra trong chất đệm mẫu NuPAGE® LDS 4X có hoặc không có chất khử mẫu NuPAGE® 10X. Gia nhiệt mẫu ở 95°C trong 2 phút. Thở tích nạp 10µL/đường đối với mẫu và 5µL/đường đối với chất đánh dấu tiêu chuẩn nhuộm sơ bộ SeeBlue Plus2. Gel được chạy ở 200V trong 35 phút ở nhiệt độ trong phòng.

Protein được chuyển vào PVDF bằng cách sử dụng hệ thấm tách khô iBlot® với iBlot® Transfer Stack, Nitrocellulose, Mini. Phong bế màng trong dung dịch phong bế (3% sữa không chứa chất béo trong nước muối đệm phosphat) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Thêm kháng thể 1 vào dung dịch phong bế đến nồng độ cuối cùng 1µg/mL và sau đó ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi ủ sơ bộ, dung dịch kháng thể/dung dịch phong bế được loại bỏ và rửa màng 3 lần trong 15 phút trong chất đệm rửa (nước muối đệm phosphat + 0,05% Tween 20). Sau đó, ủ màng bằng kháng thể thứ cấp IgG đặc hiệu Fc của lừa kháng người được tiếp hợp HRP (0,1µg/mL trong dung dịch phong bế) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi loại bỏ kháng thể thứ cấp, rửa màng 4 lần trong 10 phút bằng chất đệm rửa. Sau đó, ủ màng bằng dung dịch ủ chứa dung dịch peroxid ổn định và dung dịch Luminol/chất tăng cường (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate) trong 5 phút. Đặt màng vào trong thiết bị bảo vệ màng bằng chất dẻo trong cát xét màng tia X với màng CL-X Posure™ trong 30 giây. Phát triển màng bằng cách sử dụng hệ Konica SRX-101.

Trong các điều kiện không khử, ở nồng độ CXCL8 bằng 400ng, hai băng xuất hiện ở khoảng 17kDa và 10kDa. Ở nồng độ CXCL8 bằng 100ng, một băng xuất hiện ở khoảng 10kDa. Ở nồng độ CXCL8 bằng 25ng, không có băng nào xuất hiện. Trong các điều kiện khử, không có băng nào xuất hiện ở bất kỳ trong số các nồng độ thử nghiệm.

Kết quả này chứng minh rằng kháng thể 1 có khả năng gắn kết CXCL8 biến tính, không khử của người, nhưng không có khả năng gắn kết CXCL8 biến tính khử của người. Do đó, hai liên kết disulfua trong CXCL8 cần thiết để duy trì epitop kháng thể. Các kết quả này chứng minh epitop cấu hình đối với kháng thể 1.

Phân tích cấu trúc tinh thể

Cấu trúc tinh thể của phức hệ Fab/kháng nguyên đối với CXCL8 của người và CXCL2, CXCL3, và CXCL7 khi cynomolgus thu được để xác định bề mặt gắn kết đầy đủ của kháng thể 1. CXCL8 1-66 cắt cụt kiểu đại của người, đột biến điểm CXCL8 của người và CXCL7 khi cynomolgus đều được biểu hiện trong *E. coli* với His-SUMO đầu cuối N. Các protein được gấp lại; tag được tách; và protein được tinh chế bằng các kỹ thuật tinh chế tiêu chuẩn. CXCL2 và CXCL3 khi cynomolgus được biểu hiện trong tế bào HEK293 EBNA và được tinh chế bằng các kỹ thuật tinh chế tiêu chuẩn. Sự hình thành liên kết disulfua được xác nhận bằng tiêu hoá tryptic và phân tích dấu chỉ điểm khối lượng và hoạt tính được xác nhận bằng thử nghiệm hóa hướng động của bạch cầu trung tính. Fab của kháng thể 1 được biểu hiện trong tế bào HEK293 EBNA và được tinh chế bằng các kỹ thuật tinh chế tiêu chuẩn. Phức hệ Fab/kháng nguyên được tạo thành bằng cách bổ sung lượng mol quá mức không đáng kể của kháng nguyên vào Fab, tiếp theo tinh chế sắc ký loại trừ theo kích thước để loại bỏ kháng nguyên không quá mức. Phức hệ được kết tinh và cấu trúc tinh thể được phân giải bằng sự thay thế phân tử sử dụng Buster 2.9.5 (Global Phasing Ltd.).

Các cấu trúc tinh thể này xác nhận rằng epitop đối với kháng thể 1 bao gồm đầu cuối N của ELR⁺ CXC chemokin, nhưng chúng cũng thể hiện sự tiếp xúc giữa Fab và vòng β 1- β 2 và sợi β 2 và β 3 của ELR⁺ CXC chemokin. Cấu trúc tinh thể cũng chứng tỏ rằng kháng thể nhận biết một cách đặc hiệu nếp gấp của ELR⁺ CXC chemokin, do cấu trúc tinh thể là có thể chồng khít lên nhau được. Nhiều liên kết hydro và tương tác Van der Waals cũng được quan sát. Đáng chú ý nhất là, mạch bên R6 bảo toàn của motif ELR trong túi gắn kết sâu được tạo thành bởi chuỗi nặng Fab ở các gốc W33, Y102, và Y110, và chuỗi nhẹ Fab ở gốc W94. CXCL8 chemokin cắt cụt kiểu đại của người cũng liên kết hydro với cả chuỗi nặng Fab ở gốc E99 và chuỗi nhẹ Fab ở khung cacbonyl N91. Các liên kết hydro khác được quan sát giữa khung L5 cacbonyl của CXCL8 chemokin cắt cụt kiểu đại của người và amit khung chuỗi nhẹ Fab W94; khung I10 cacbonyl của CXCL8 chemokin cắt cụt kiểu đại của người và chuỗi nặng Fab chuỗi phụ S52; chuỗi phụ K11 của CXCL8 chemokin cắt cụt kiểu đại của người và chuỗi nặng Fab chuỗi phụ T30 và S31; chuỗi phụ H33 của CXCL8 chemokin cắt cụt kiểu đại của người và Fab chuỗi nhẹ khung W94 cacbonyl; amit khung A35 và

chuỗi nặng Fab chuỗi phụ N59; và amit khung C50 của CXCL8 chemokin cắt cụt kiểu đại của người và chuỗi nặng Fab khung Y104 cacbonyl. Hơn nữa, các gốc đầu cuối N từ 5 đến 13 của CXCL8 chemokin cắt cụt kiểu đại của người tạo ra nhiều tiếp xúc với Fab như đầu cuối N đặt ở rãnh giữa chuỗi nặng Fab CDR2 và CDR3. Ngoài ra, vòng CDR3 trên chuỗi nặng Fab kéo dài ra từ rãnh này và tương tác với gốc không đầu cuối N I40 trên sợi $\beta 2$ và gốc Glu48, Leu49, và Cys50 trên sợi $\beta 3$ của CXCL8 chemokin cắt cụt kiểu đại của người. Cuối cùng, các gốc từ 33 đến 36 của vòng $\beta 1$ - $\beta 2$ trong gói CXCL8 chemokin cắt cụt kiểu đại của người đối lại CDR2 chuỗi nặng Fab.

Phân tích đột biến

Vài tiếp xúc then chốt giữa kháng thể 1 Fab và CXCL8 kiểu đại của người được quan sát trong cấu trúc tinh thể và còn được thử nghiệm thông qua các nghiên cứu động học gắn kết và bộ đọc đĩa tạo hình ảnh huỳnh quang U937-huCXCR2 (FLIPR) trung hoà các đột biến điểm CXCL8 của người. Để nghiên cứu các tiếp xúc then chốt này, vài đột biến điểm (R6A, I10A, A35P, I40A, và L49A) được tạo ra dựa trên trình tự CXCL8 của người (SEQ ID NO: 27). Các đột biến điểm CXCL8 của người R6A, I10A, A35P, I40A, và L49A được biểu hiện, gấp lại và tinh chế theo các kỹ thuật tiêu chuẩn. Sự hình thành các liên kết disulfua được xác nhận bằng tiêu hoá trypsin và phân tích dấu chỉ điểm khối lượng và hoạt tính được xác nhận bằng phân tích hóa hướng động của bạch cầu trung tính.

Động lực gắn kết được thử nghiệm trên thiết bị Biacore 2000 bằng phần mềm đánh giá Biacore 2000 phiên bản 4.1 như được mô tả trên đây. CXCL8 kiểu đại và đột biến của người được thử nghiệm đối với hoạt tính sinh học và trung hoà bởi kháng thể 1 bằng cách sử dụng thử nghiệm U937-huCXCR2. U937-huCXCR2 là dòng tế bào bạch cầu đơn nhân được truyền với retrovirus để biểu hiện CXCR2 của người.

Các đột biến CXCL8 được pha loãng theo dãy trong chất đệm thử nghiệm chứa 0,2% BSA trong các giếng của đĩa polypropylen 96 giếng đáy hình chữ v. Nồng độ phối tử bằng 3 lần nồng độ thử nghiệm cuối cùng (nồng độ thử nghiệm cuối cùng nằm trong khoảng từ 300 đến 0,0051nM). Đĩa tế bào và đĩa phối tử được nạp vào trong bộ đọc đĩa tạo hình ảnh huỳnh quang (FLIPR-3, Molecular Devices) được lập trình để chuyển 50 μ L phối tử vào giếng của đĩa tế bào. Huỳnh quang được ghi ghép ở khoảng

thời gian 1 giây trong 90 giây. Sự thay đổi về huỳnh quang [Δ đơn vị huỳnh quang tương đối (DRFU), Max RFU-Min RFU] được tính toán từ các hình ảnh từ 10 đến 90. DRFU đổi lại log (nồng độ phối tử) được tạo biểu đồ và trị số EC_{50} được xác định bằng sự hồi quy không tuyến tính bằng cách sử dụng Graph Pad Prism. Các thử nghiệm được thực hiện ba lần trong ba đĩa thử nghiệm.

Kháng thể 1 được pha loãng theo dãy trong chất đệm thử nghiệm chứa 0,2% BSA. Nồng độ kháng thể bằng 3 lần nồng độ thử nghiệm cuối cùng (nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 10 đến 0,0195 $\mu\text{g/ml}$). Dung dịch gốc chứa các đột biến CXCL8 và CXCL8 kiểu đại của người được tạo ra trong chất đệm thử nghiệm + 0,2% BSA ở 240nM (30x nồng độ thử nghiệm cuối cùng 8nM). 20 μL phối tử được trộn với 180 μL kháng thể 1 trong đĩa polypropylen 96 giếng đáy hình chữ v. Phối tử và kháng thể được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Đĩa tế bào và đĩa phối tử-kháng thể được nạp vào bộ đọc đĩa tạo hình ảnh huỳnh quang (FLIPR-3, Molecular Devices) được lập trình để chuyển 50 μL phối tử-kháng thể vào các giếng của đĩa tế bào. Mức phát huỳnh quang được ghi ở khoảng thời gian 1 giây trong 90 giây. Sự thay đổi mức phát huỳnh quang (DRFU) được tính toán dựa trên các hình ảnh từ 10 đến 90. DRFU đổi lại log (nồng độ kháng thể) được tạo biểu đồ và các trị số IC_{50} được xác định bằng sự hồi quy không tuyến tính bằng cách sử dụng Graph Pad Prism. Các thử nghiệm được thực hiện ba lần trong ba đĩa thử nghiệm.

Động học gắn kết, hoạt tính sinh học và kết quả trung hoà được tổng kết trong bảng 4. Các số đo thu được ở 25°C. Tốc độ on (k_{on}) và tốc độ off (k_{off}) đối với mỗi phối tử được đánh giá bằng cách sử dụng mô hình gắn kết “gắn kết 1:1 (chuyển khối lượng)”. Ái lực (K_D) được tính toán dựa vào động học gắn kết theo mối quan hệ: $K_D = k_{off}/k_{on}$.

Vài trong số các đột biến làm bất hoạt hoạt tính đối với thụ thể (EC_{50}) và do đó, có thể không được thử nghiệm đối với việc trung hoà. Cần lưu ý rằng đột biến A35P huỷ bỏ một cách hoàn toàn hoạt tính trung hoà mặc dù có hoạt tính đầy đủ đối với thụ thể. Các kết quả này nêu bật sự tiếp xúc then chốt (R6, I10, A35, I40, và L49) nằm trong bề mặt chung gắn kết của kháng nguyên CXCL8 mà là quan trọng đối với việc gắn kết kháng thể.

Bảng 4: Động học gắn kết, hoạt tính U937 FLIPR (EC₅₀), và trung hoà U937 FLIPR (IC₅₀) của kiểu đại và thể đột biến CXCR8 của người.

Biến thể	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)	K _D (pM)	EC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
WT	3,03 ± 3,78 x 10 ⁶	4,41 ± 4,55 x 10 ⁻⁴	236 ± 144	1,3 ± 0,8 (n=4)	0,9
R6A	Không gắn kết			Không có hoạt tính	
I10A	2,77 ± 0,39 x 10 ⁵	3,44 ± 0,01 x 10 ⁻⁴	1260 ± 184	Không có hoạt tính	
A35P	1,06 ± 0,07 x 10 ⁶	4,97 ± 1,72 x 10 ⁻³	4740 ± 1920	1,9 ± 0,3 (n=2)	Không trung hoà
I40A	1,61 ± 0,21 x 10 ⁴	4,24 ± 1,16 x 10 ⁻⁴	27100 ± 10700	Không có hoạt tính	
L49A	1,43 ± 0,24 x 10 ⁵	5,44 ± 0,42 x 10 ⁻⁴	3830 ± 354	5,6 ± 1,3 (n=2)	1,5

Nói chung, phép phân tích tạo bản đồ epitop đối với kháng thể 1 chứng minh rằng bề mặt chung gắn kết của kháng nguyên bao gồm đầu cuối N của ELR⁺ CXC chemokin (axit amin từ 5 đến 13), vòng β1-β2 loop (axit amin từ 33 đến 36), và sợi β2 và β3 (axit amin 40, từ 48 đến 50). Sự tiếp xúc then chốt trong bề mặt chung này là quan trọng cho việc gắn kết kháng thể bao gồm axit amin R6, I10, A35, I40, và L49 trong CXCL8 (SEQ ID NO: 27).

Thử nghiệm trung hoà

Việc trung hoà In Vitro của ELR⁺ CXC Chemokin của người bằng cách sử dụng tế bào HMEC được chuyển nhiễm CXCR2 của người

Do tất cả các ELR⁺ CXC chemokin có thể gắn kết thụ thể CXCR2, nên tế bào biểu hiện CXCR2 được chọn cho các nghiên cứu in vitro. HMEC-huCXCR2 là dòng tế bào nội mô được làm bất tử của người được truyền với retrovirus cho sự biểu hiện thụ thể CXCR2 của người. Tế bào HMEC biểu hiện CXCR2 của người có thể làm cho dòng vào Ca²⁺ nội bào đáp ứng với ELR⁺ CXC chemokin của người, khỉ cynomolgus và chuột. Dòng vào Ca²⁺ nội bào có thể được phát hiện bằng bộ đọc đĩa hình ảnh huỳnh quang (FLIPR). Do đó, việc trung hoà chemokin cũng sẽ trung hoà dòng vào Ca²⁺ nội bào do các chemokin gây ra.

HMEC-huCXCR2 được duy trì trong môi trường MCDB 31 được bổ sung với 10% huyết thanh bào thai bò, 2x GlutaMax, 1x axit amin không thiết yếu, 1µg/mL hydrocortison, 10ng/mL nhân tố sinh trưởng biểu bì của người và 0,4µg/mL

puromyxin ở 37°C trong 5% CO₂. Môi trường nuôi cấy được duy trì ở mật độ dưới hợp dòng (từ 50 đến 80% hợp dòng). Tế bào được thu hoạch bằng TrypLE Express, mật độ tế bào được điều chỉnh đến 3×10^5 tế bào/mL trong môi trường nuôi cấy đầy đủ và 100µL huyền phù tế bào được tạo hạt vào trong giếng của đĩa thử nghiệm đáy trong màu đen. Ủ đĩa tế bào ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút để cho phép tế bào lắng xuống đáy của giếng trước khi đĩa được ủ qua đêm ở 37°C trong 5% CO₂. Đối với mỗi đĩa thử nghiệm, lượng thuốc thử của một lọ nhỏ Fluo-4NW được tạo huyền phù trong 10mL chất đệm thử nghiệm và 100µL probenecid để tạo ra thuốc thử 1x Fluo-4NW. Sau khi ủ, môi trường nuôi cấy được hút và thêm 100µL dung dịch 1x Fluo-4NW vào mỗi giếng của đĩa thử nghiệm. Ủ đĩa trong 30 phút ở 37°C, tiếp theo 30 phút nữa ở nhiệt độ trong phòng và được bảo vệ không bị ánh sáng. Pha loãng theo dãy kháng thể 1 trong chất đệm thử nghiệm chứa 0,2% BSA. Nồng độ kháng thể bằng 3x nồng độ thử nghiệm cuối cùng (nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 10 đến 0,0195µg/mL). Dung dịch gốc chứa phối tử được tạo ra trong chất đệm thử nghiệm + 0,2% BSA ở 300nM (30x nồng độ thử nghiệm cuối cùng 10nM). Trộn 20µL phối tử với 180µL kháng thể trong các giếng của đĩa polypropylen 96 giếng đáy hình chữ v. Phối tử và kháng thể được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Nạp đĩa tế bào và phối tử-kháng thể vào trong bộ đọc đĩa hình ảnh huỳnh quang (FLIPR-3, Molecular Devices) được lập trình để chuyển 50µL phối tử-kháng thể vào các giếng của đĩa tế bào. Mức phát huỳnh quang được ghi chép mỗi giây trong 90 giây. Sự thay đổi mức phát huỳnh quang (DRFU) được tính toán dựa vào các hình ảnh từ 10 đến 90. DRFU đổi lại log (nồng độ kháng thể) được lập đồ thị và các trị số IC₅₀ được xác định bằng sự hồi quy không tuyến tính sử dụng Graph Pad Prism. Các thử nghiệm được thực hiện ba lần trong ba đĩa thử nghiệm. Các dữ liệu được biểu hiện ở dạng trị số trung bình của các bản sao.

Các kết quả được tổng kết trong bảng 5. Các kết quả này chứng minh rằng kháng thể 1 có khả năng trung hoà tất cả bảy ELR⁺ CXC chemokine của người. Các trị số IC₅₀ được biểu hiện là µg/mL của kháng thể (độ lệch tiêu chuẩn là trong dấu ngoặc đơn). 72 dạng axit amin và 77 dạng axit amin của CXCL8 được sử dụng. Các dữ liệu là trị số trung bình của từ 2 đến 5 bản sao.

Bảng 5: Nghiên cứu *in vitro* FLIPR bằng cách sử dụng tế bào HMEC biểu hiện CXCR2 của người

	IC ₅₀ (µg/mL)
CXCL1	0,867 (±0,153)
CXCL2	1,281 (±0,449)
CXCL3	0,731 (±0,187)
CXCL5	0,681 (±0,347)
CXCL6	1,122 (±0,523)
CXCL7	1,068 (±0,324)
CXCL8 (72)	0,951 (±0,416)
CXCL8 (77)	0,358 (±0,078)

Trung hoà *in vitro* tính hóa hướng động cảm ứng CXCL8 hoặc CXCL1 của người bằng cách sử dụng bạch cầu trung tính nguyên thủy của người

Thử nghiệm hóa hướng động bằng cách sử dụng bạch cầu trung tính của người được chọn để xác định hoạt tính trung hoà của kháng thể 1 trong tế bào biểu hiện một cách tự nhiên CXCR1 và CXCR2. Máu ngoại vi từ người tình nguyện khoẻ mạnh được rút vào trong hai ống natri heparin 10mL. Để phân lập bạch cầu trung tính, phân lớp 5mL máu trong 5mL Polymorphprep trong bốn ống 15mL. Ly tâm các ống trong 30 phút ở 470xg, 18°C. Huyết tương và băng tế bào dính (tế bào đơn nhân) được lấy ra và loại bỏ. Băng thứ hai (bạch cầu trung tính) được nhóm từ 4 ống và thể tích như nhau của PBS được bổ sung vào. Ly tâm ống trong 10 phút ở 400xg, 18°C. Rửa hạt bằng 12mL PBS, ly tâm như trước đây và tạo tái tạo huyền phù đối với hạt bằng 11mL HBSS/BSA (7,5mg/mL BSA, HBSS). Tạo huyền phù 60x10⁶ tế bào trong 12mL HBSS/BSA và 5µM CMFDA và ủ trong 30 phút ở 37°C. Sau khi ủ, ly tâm ống để tạo hạt tế bào, rửa một lần bằng 12mL HBSS/BSA, và sau đó tái tạo huyền phù đối với tế bào trong 12mL HBSS/BSA (5x10⁶ tế bào/mL).

Pha loãng kháng thể 1 và đối chứng isotyp (kháng thể IgG4 của người) đến 1495nM bằng cách sử dụng HBSS/BSA (dung dịch pha loãng 1) và sau đó pha loãng

theo dãy 1:5 bằng HBSS/BSA. Pha loãng CXCL8 đến 20nM bằng HBSS/BSA. Pha loãng CXCL1 đến 10,1nM bằng HBSS/BSA.

Trộn 70 μ L kháng thể 1 hoặc HBSS/BSA với 70 μ L dung dịch CXCL8 hoặc CXCL1 và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 30 phút. Phân phối 30 μ L hỗn hợp vào trong giếng khoang phía dưới của đĩa ChemoTx ba lần. Các giếng chỉ chứa HBSS/BSA (không có chemokin hoặc kháng thể) sẽ thể hiện tín hiệu cơ bản. Bộ lọc ChemoTx được đặt lên trên khoang phía dưới và phân phối 50 μ L (250.000 tế bào) trên mỗi giếng. Ủ đĩa ChemoTx trong 3 giờ ở 37°C, 5% CO₂. Sau khi ủ, rửa tế bào từ bề mặt đỉnh bằng PBS và loại bỏ bộ lọc ChemoTx. Đọc mức phát huỳnh quang (Wallac Victor³ số lượng 1420) 485/535 bằng cách chỉ sử dụng bộ phát hiện đáy. Mức phát huỳnh quang trung bình của giếng cơ sở (chỉ có HBSS/BSA) được trừ đi từ mức phát huỳnh quang giếng thử nghiệm và độ lệch trung bình và tiêu chuẩn được tính toán trong Excel.

Ở nồng độ CXCL8 là 5nM, IC₅₀ đối với kháng thể 1 (MW 150.000 kDa) là 26,4 ($\pm$ 0,236) nM. Ở nồng độ CXCL8 là 10nM, IC₅₀ đối với kháng thể 1 là 43,7 ($\pm$ 0,086)nM. Ở nồng độ CXCL1 là 5nM, IC₅₀ đối với kháng thể 1 là 18,5 ($\pm$ 0,158)nM. Ở nồng độ CXCL1 là 20nM, IC₅₀ đối với kháng thể 1 là 40,3 ($\pm$ 0,112)nM. Ở tất cả các nồng độ thử nghiệm của CXCL1 và CXCL8, kháng thể đối chứng isotyp không tác động đến hóa hướng động. Các dữ liệu thể hiện rằng kháng thể 1 có thể phong bế hoạt tính hóa hướng động của CXCL8 hoặc CXCL1 của người theo cách phụ thuộc liều trong khi hoạt tính hóa hướng động không bị tác động bởi kháng thể đối chứng đồng hình.

Mô hình viêm ruột kết DSS cấp tính *In Vivo* ở chuột

Natri dextran sulfat (DSS) là mô hình được sử dụng rộng rãi nhất của bệnh viêm loét ruột kết (UC). Trong mô hình này, DSS là chất kích thích hoá học mà được bổ sung vào nước uống để gây ra bệnh cấp tính mà tương tự với UC. Pha cấp tính của viêm ruột kết DSS được đặc trưng bởi việc nhận bạch cầu trung tính vào màng nhầy và dưới màng nhầy và biểu hiện gia tăng ELR⁺ CXCL chemokin. Tuy nhiên, sự phơi trần mạn tính với DSS gây ra tổn hại ruột trầm trọng và mất trọng lượng đáng kể, mà không thích hợp trong mô hình viêm ruột kết. Để thích ứng với bản chất cấp tính của

mô hình này, kháng thể 1 được sử dụng theo cách phòng bệnh để thử nghiệm khả năng của nó ức chế việc nhận bạch cầu trung tính và sự phát triển viêm ruột kết. Lưu ý trong mô hình này, protein CXCL5 (LIX) của chuột được gia tăng một cách đáng kể trong mô ruột kết (Kwon 2005); tuy nhiên, kháng thể 1 không trung hoà chemokin của chuột này.

Chuột C57BL/6, từ 8 đến 10 tuần tuổi, cân nặng từ 18 đến 22g, thu được. Gom máu bằng việc chọc tim và phân tích để thiết lập đường cơ sở. Để gây viêm ruột kết, chuột nhận 2,5% DSS (MW=36.000-50.000) trong nước uống trong 5 ngày (từ ngày 1 đến 5) tiếp theo 6 ngày nước không chứa DSS (phản ứng viêm cấp tính). Chuột có sức khoẻ đối chứng chỉ nhận nước (nhóm “không DSS”). Chuột nhận DSS được dùng liều bằng việc tiêm dưới da vào ngày 0, 2, 4, và 8 với kháng thể đối chứng IgG4 của người (25mg/kg) hoặc kháng thể 1 (25mg/kg). Thử trọng được ghi chép hàng ngày. Số lượng chuột được sử dụng đối với mỗi điều trị là 9 (ngoại trừ 5 chuột khoẻ mạnh được sử dụng trong nhóm “không DSS” khoẻ mạnh.) Nghiên cứu được thực hiện trong bốn bản sao.

Như được thể hiện trong bảng 6, chuột DSS mà nhận kháng thể đối chứng IgG4 của người bị mất trọng lượng đáng kể trong khoảng từ ngày 5 đến ngày 8. Chuột DSS mà nhận kháng thể 1 trước khi gây viêm ruột kết và trong thời gian pha cấp tính của bệnh thể hiện việc mất trọng lượng ít hơn từ ngày 5 đến ngày 8 so với chuột DSS được điều trị bằng kháng thể đối chứng IgG4 của người (94,0% thể trọng ban đầu đối với kháng thể 1 đối lại 85,3% thể trọng ban đầu đối với IgG4 đối chứng vào ngày 8). Các kết quả này chứng minh rằng việc dùng hệ thống kháng thể 1 làm giảm một cách hữu hiệu việc mất trọng lượng trong viêm ruột kết do DSS gây ra, trợ giúp việc kết luận rằng kháng thể 1 trung hoà hoạt tính của một số ELR⁺ CXC chemokin của chuột và làm giảm việc lấy thêm bạch cầu trung tính vào ruột kết.

Bảng 6:

	% thể trọng ban đầu		
Ngày	không DSS	IgG4	Kháng thể 1
1	104,4	99,9	100,0
2	103,9	99,8	102,9

3	103,0	100,3	101,4
4	101,0	99,5	100,9
5	101,2	97,5	96,9
8	102,2	85,3	94,0
9	99,8	89,6	93,5
10	100,7	93,7	93,6
11	101,3	98,2	97,0

Trung hoà In Vivo trong mô hình ghép khác loài tế bào thận tế bào sạch 786-O

Tế bào ung thư biểu mô tế bào thận 786-O (RCC) được trộn 1:1 với matrigel và ghép dưới da vào hông phía sau bên phải của chuột cái trụi lông bị cắt tuyến ức ở $3,0 \times 10^6$ tế bào/lần tiêm. Chuột mang mô ghép khác loại 786-O có thể tích khối u mà đạt đến 100mm^3 được dùng ống thông qua đường miệng với 10mg/kg sunitinib hai lần dưới chế độ dùng liều liên tục cho đến khi chuột bắt đầu tiến triển với sự sinh trưởng khối u thậm chí dưới sự điều trị sunitinib tương tự chuột được điều trị đối chứng (IgG4 và 10% tá dược dạng lỏng). Chuột mà tiến triển với sự sinh trưởng khối u đối với liệu pháp điều trị sunitinib được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm. Một nhóm nhận sunitinib ở 10mg/kg hai lần một ngày cộng với kháng thể IgG4 đối chứng ở 20mg/kg một lần một tuần. Nhóm khác nhận sunitinib ở 10mg/kg hai lần một ngày cộng với kháng thể 1 ở 20mg/kg một lần một tuần. Thể tích khối u trung bình (sai số tiêu chuẩn trong dấu ngoặc đơn) được thể hiện trong bảng 7. Việc bổ sung kháng thể 1 vào điều trị sunitinib làm giảm sự sinh trưởng khối u một cách đáng kể theo thời gian ($p < 0,0001$), cho biết rằng kháng thể 1 làm nhạy lại khối u RCC tế bào sạch với việc điều trị sunitinib.

Bảng 7:

Ngày	Thể tích khối u trung bình (mm^3)		
	IgG4 và 10% tá dược dạng lỏng	IgG4 và Sunitinib	Kháng thể 1 và Sunitinib
11	82,84 ($\pm 18,52$)	73,21 ($\pm 8,91$)	72,54 ($\pm 40,89$)
17	112,12 ($\pm 25,06$)	95,34 ($\pm 11,6$)	95,99 ($\pm 54,11$)
24	148,41 ($\pm 33,17$)	124,86 ($\pm 15,19$)	138,32 ($\pm 77,97$)

27	180,24 ($\pm 40,29$)	138,08 ($\pm 16,8$)	152,87 ($\pm 86,18$)
34	205,22 ($\pm 45,87$)	183,2 ($\pm 22,29$)	181,08 ($\pm 102,08$)
38	221,66 ($\pm 49,55$)	207,46 ($\pm 25,25$)	211,1 (± 119)
41	255,46 ($\pm 57,1$)	210,04 ($\pm 25,56$)	222,01 ($\pm 125,15$)
46	267,75 ($\pm 59,85$)	267,53 ($\pm 32,55$)	248,74 ($\pm 140,22$)
48	292,17 ($\pm 65,31$)	268,24 ($\pm 32,64$)	276,78 ($\pm 156,03$)
52	325,13 ($\pm 72,68$)	301,1 ($\pm 36,64$)	286,57 ($\pm 161,55$)
55	331,39 ($\pm 74,37$)	328,55 ($\pm 39,98$)	262,9 ($\pm 148,21$)
59	373,91 ($\pm 84,32$)	371,36 ($\pm 45,19$)	304,06 ($\pm 171,41$)
62	413,09 ($\pm 93,47$)	387,79 ($\pm 47,19$)	313,16 ($\pm 176,54$)
66	479,4 ($\pm 108,92$)	417,33 ($\pm 50,78$)	285,85 ($\pm 161,14$)
69	537,74 ($\pm 122,53$)	494,68 ($\pm 60,19$)	276,64 ($\pm 155,95$)
73	520,11 ($\pm 118,92$)	527,88 ($\pm 64,23$)	244,07 ($\pm 137,59$)
76	532,57 ($\pm 122,53$)	595,93 ($\pm 72,52$)	228,91 ($\pm 129,04$)
81	597,7 ($\pm 137,49$)	601,51 ($\pm 73,19$)	196,06 ($\pm 110,52$)
84	720,91 ($\pm 166,16$)	652,01 ($\pm 79,34$)	193,08 ($\pm 108,84$)
87	713,64 ($\pm 164,79$)	663,62 ($\pm 80,75$)	181,85 ($\pm 102,51$)
90	785,88 ($\pm 181,79$)	775,05 ($\pm 94,31$)	175,88 ($\pm 99,15$)
94	891,11 ($\pm 206,57$)	836,89 ($\pm 101,84$)	192,57 ($\pm 108,56$)
97	1073,86 ($\pm 249,3$)	1010,26 ($\pm 122,93$)	210,16 ($\pm 118,47$)

Trung hoà *In Vivo* trong mô hình ghép khác loài SKOV3-Luc ung thư buồng trứng

SKOV3-Luc là dòng tế bào ung thư buồng trứng của người mà biểu hiện gen luciferaza đom đóm. Tế bào SKOV3-Luc thường được sử dụng *In Vivo* để thiết lập sự sinh trưởng khối u ung thư tuyến buồng trứng của người.

Tế bào ung thư buồng trứng SKOV3-Luc được trộn 1:1 với matrigel và được ghép dưới da vào hông phía sau bên phải của chuột cái trụi lông bị cắt tuyến ức ở $3,0 \times 10^6$ tế bào/lần tiêm. Chuột được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm ở đường cơ sở theo thể

tích khối u sau khi mảnh ghép khác loài được sinh trưởng đến thể tích khối u trung bình bằng 200mm³. Chuột nhận kháng thể IgG4 đối chứng (2,5mg/kg một lần một tuần), cisplatin (2,5mg/kg một lần một tuần), kháng thể 1 (20mg/kg một lần một tuần), hoặc tổ hợp của cisplatin (2,5mg/kg một lần một tuần) và kháng thể 1 (20mg/kg một lần một tuần) bằng việc tiêm trong màng bụng. Sự sinh trưởng của khối u được thể hiện trong bảng 8. Liệu pháp điều trị đơn cisplatin không thể hiện sự ức chế sinh trưởng khối u có nghĩa thống kê so với đối chứng isotyp. Tuy nhiên, tổ hợp của cisplatin và kháng thể 1 thể hiện sự ức chế sinh trưởng khối u có nghĩa thống kê ($p \leq 0,001$) so với đối chứng isotyp và liệu pháp điều trị đơn cisplatin cho thấy kháng thể 1 làm tăng theo cách hiệp đồng hoá học trị liệu trong mô hình ghép khác loài ung thư buồng trứng SKOV3-Luc.

Bảng 8:

	Thể tích khối u trung bình (mm ³)			
Ngày	IgG4	Cisplatin	Kháng thể 1	Kháng thể 1 và Cisplatin
14	128,45 (±7,25)	122,65 (±12,2)	109,35 (±12,7)	127,17 (±26,72)
19	182,92 (±10,33)	190,65 (±18,97)	173,95 (±20,2)	167,94 (±35,29)
22	269,83 (±15,23)	289,15 (±28,77)	234,58 (±27,25)	218,81 (±45,98)
26	507,66 (±28,66)	484,72 (±48,23)	364,42 (±42,33)	349,81 (±73,51)
32	904,66 (±51,07)	806,31 (±80,23)	739,26 (±85,86)	530,63 (±111,5)
35	1052,88(±59,44)	923,02 (±91,85)	821,83 (±95,45)	579,7 (±121,81)
40	1143,39(±64,55)	941,42 (±93,68)	1026,68(±119,25)	585,37 (±123)
43	1382,03(±78,03)	1047,34(±104,22)	1098,72(±127,61)	626,99(±131,75)

Trình tự

Trình tự axit amin chuỗi nặng kháng thể 1: SEQ ID NO: 1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYEFTSYWIHWVRQAPGQGLEWMGNI
SPNSGSANYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREGPYSY
YPSREYYGSDLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD

YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV
 DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
 TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV
 SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
 WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

Vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể 1: SEQ ID NO: 2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYEFTSYWIHWVRQAPGQGLEWMGNI
 SPNSGSANYNEKFKSRTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREGPYSY
 YPSREYYGSDLWGQGTLVTVSS

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ kháng thể 1: SEQ ID NO: 3

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSISNNLHWYQQKPGQAPRLLIYYTSRSV
 SGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCGQNNEWPEVFGGGTKVEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể 1: SEQ ID NO: 4

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSISNNLHWYQQKPGQAPRLLIYYTSRSV
 SGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCGQNNEWPEVFGGGTKVEIK

Trình tự ADN chuỗi nặng kháng thể 1: SEQ ID NO: 5

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGTGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTC
 AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCATCTGGCTACGAGTTCACCAGCTACTGGAT
 TCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAATA
 TTTCTCCTAATAGTGGTAGTGCTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAGAG
 TCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGC
 AGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGCCC
 TTACAGTTATTATCCGAGTAGGGAGTACTATGGCTCTGACCTCTGGGGGCA
 AGGGACCCTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTT
 CCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGG
 GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGA

CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT
 CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG
 GCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAG
 GTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCCTGCCCA
 GCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCC AAAACCC
 AAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTG
 GACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGG
 CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACA
 GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
 ACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCC
 ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGT
 GTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCC
 TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG
 AAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
 GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGC
 AGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
 CACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT

Trình tự ADN chuỗi nhẹ kháng thể 1: SEQ ID NO: 6

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA
 AGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAAGTATCAGCAATAACCTACA
 CTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATTATAC
 TTCCCGGTCCGTCTCTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG
 GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGT
 TTATTACTGTGGACAGAATAACGAGTGGCCTGAGGTGTTCCGGCGGAGGGA
 CCAAGGTGGAGATCAAACGAACGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC
 CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGC
 TGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAAC
 GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA
 GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT
 ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC
 TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

Kháng thể 1/Kháng thể 2 LCDR1: SEQ ID NO: 7

RASQSIENNHL

Kháng thể 1/Kháng thể 2 LCDR2: SEQ ID NO: 8

YTSRSVS

Kháng thể 1/Kháng thể 2 LCDR3: SEQ ID NO: 9

GQNNEWPEV

Kháng thể 1/Kháng thể 2 HCDR1: SEQ ID NO: 10

GYEFTSYWIH

Kháng thể 1/Kháng thể 2 HCDR2: SEQ ID NO: 11

NISPNSGSANYNEKFKS

Kháng thể 1 HCDR3: SEQ ID NO: 12

EGPYSYPSREYYGSDL

Trình tự axit amin chuỗi nặng kháng thể 2: SEQ ID NO: 13

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYEFTSYWIHWVRQAPGQGLEWMGNI
SPNSGSANYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREGPYSY
YPSRQYYGSDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV
DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

Vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể 2: SEQ ID NO: 14

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYEFTSYWIHWVRQAPGQGLEWMGNI
SPNSGSANYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREGPYSY
YPSRQYYGSDLWGQGTLVTVSS

Trình tự axit amin chuỗi nhẹ kháng thể 2: SEQ ID NO: 15

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSISNNLHWYQQKPGQAPRLLIYYTSRSV
 SGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCGQNNEWPEVFGGGGTKVEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể 2: SEQ ID NO: 16

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSISNNLHWYQQKPGQAPRLLIYYTSRSV
 SGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCGQNNEWPEVFGGGGTKVEIK

Trình tự ADN chuỗi nặng kháng thể 2: SEQ ID NO: 17

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGTGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTC
 AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCATCTGGCTACGAGTTCACCAGCTACTGGAT
 TCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAATA
 TTTCTCCTAATAGTGGTAGTGCTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAGAG
 TCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGC
 AGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGCCC
 TTACAGTTATTATCCGAGTAGGCAGTACTATGGCTCTGACCTCTGGGGGCA
 AGGGACCCTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGGCCCATCGGTCTT
 CCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGG
 GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAAC
 CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCT
 CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG
 GCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAG
 GTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCCTGCCCA
 GCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCC AAAACCC
 AAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTG
 GACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGG
 CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACA
 GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
 ACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCC
 ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGT
 GTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCC

TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG
 AAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
 GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGC
 AGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
 CACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT

Trình tự ADN chuỗi nhẹ kháng thể 2: SEQ ID NO: 18

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA
 AGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAAGTATCAGCAATAACCTACA
 CTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATTATAC
 TTCCCGGTCCGTCTCTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG
 GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGT
 TTATTACTGTGGACAGAATAACGAGTGGCCTGAGGTGTTTCGGCGGAGGGA
 CCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC
 CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGC
 TGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAAC
 GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA
 GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT
 ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC
 TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

Kháng thể 2 HCDR3: SEQ ID NO: 19

EGPYSYYPSPRQYYGSDL

Trình tự liên ứng HCDR3: SEQ ID NO: 20

EGPYSYYPSPRXaaYYGSDL

trong đó Xaa là E hoặc Q

Gro-alpha (CXCL1) của người: SEQ ID NO: 21

ASVATELRCQCLQTLQGIHPKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKNRKAACLN
 PASPIVKKIIEKMLNSDKSN

Gro-beta (CXCL2) của người: SEQ ID NO: 22

APLATELRCQCLQTLQGIHLKNIQSVKVKSPGPHCAQTEVIATLKNGQKACLN
PASPMVKKIIEKMLKNGKSN

Gro-gamma (CXCL3) của người: SEQ ID NO: 23

ASVVTELRCQCLQTLQGIHLKNIQSVNVRSPGPHCAQTEVIATLKNGKKACLN
PASPMVQKIIEKILNKGSTN

ENA-78 (CXCL5) của người: SEQ ID NO: 24

AAVLRELRCVCLQTTQGVHPKMISNLQVFAIGPQCSKVEVVASLKNGKEICLD
PEAPFLKKVIQKILDGGNKEN

GCP-2 (CXCL6) của người: SEQ ID NO: 25

VSAVLTELRCTCLRVTLRVNPKTIGKLQVFPAGPQCSKVEVVASLKNGKQVCL
DPEAPFLKKVIQKILDSGNKKN

NAP-2 (CXCL7) của người: SEQ ID NO: 26

AELRCMCIKTTSGIHPKNIQSLEVIGKGTHCNQVEVIATLKDGRKICLDPDAPRI
KKIVQKKLAGDESAD

IL-8 (CXCL8) của người: SEQ ID NO: 27

SAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGRELCCLDPKE
NWVQRVVEKFLKRAENS

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể, trong đó kháng thể này gắn kết với Gro-alpha, Gro-beta, Gro-gamma, ENA-78, GCP-2, NAP-2, và IL-8 của người, kháng thể này bao gồm chuỗi nhẹ và chuỗi nặng, trong đó chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) và chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), trong đó LCVR bao gồm các vùng quyết định bổ trợ chuỗi nhẹ ("LCDR") LCDR1, LCDR2, LCDR3 và HCVR bao gồm các vùng quyết định bổ trợ chuỗi nặng ("HCDR") HCDR1, HCDR2, HCDR3, trong đó LCDR1 là RASQSIENNHL (SEQ ID NO: 7), LCDR2 là YTSRSVS (SEQ ID NO: 8), LCDR3 là GQNNEWPEV (SEQ ID NO: 9), HCDR1 là GYEFTSYWIH (SEQ ID NO: 10), HCDR2 là NISPNSGSANYNEKFKS (SEQ ID NO: 11), và HCDR3 là EGPYSYPSRXaaYYGSDL (SEQ ID NO: 20) trong đó Xaa là E hoặc Q.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin của HCVR là SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 14.
3. Kháng thể theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin của LCVR là SEQ ID NO: 4 hoặc 16.
4. Kháng thể theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin của HCVR là SEQ ID NO: 2 và trình tự axit amin của LCVR là SEQ ID NO: 4.
5. Kháng thể theo điểm 1, trong đó trình tự axit amin của chuỗi nặng là SEQ ID NO: 1 và trình tự axit amin của chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 3.
6. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này bao gồm hai chuỗi nặng có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 và hai chuỗi nhẹ có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3.
7. Phân tử ADN bao gồm trình tự polynucleotit thứ nhất mã hoá polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 13; và bao gồm trình tự polynucleotit thứ hai mã hoá polypeptit có trình tự axit amin SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 15.
8. Tế bào động vật có vú chứa phân tử ADN theo điểm 7, trong đó tế bào này có khả năng biểu hiện kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6.
9. Quy trình tạo ra kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, quy trình này bao gồm bước nuôi cấy tế bào động vật có vú theo điểm 8 trong các điều kiện sao cho kháng thể này được biểu hiện và thu gom kháng thể được biểu hiện này.

10. Kháng thể được tạo ra bằng quy trình theo điểm 9.
11. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 và điểm 10 với lượng hữu hiệu có tác dụng trị liệu để điều trị bệnh viêm loét ruột kết, bệnh ung thư thận, hoặc bệnh ung thư buồng trứng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ.

<110> Eli Lilly and Company

<120> Kháng thể gắn kết Gro-alpha, Gro-beta, Gro-gama, ENA-78, GCP-2, NAP-2 và IL-8 của người, quy trình tạo ra kháng thể này, phân tử ADN và tế bào động vật có vú chứa phân tử ADN này

<130> X19897

<150> 61/792800

<151> 2013-03-15

<150> PCT/US2014/020605

<151> 2014-03-05

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 452

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 1

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

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Glu	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		

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

Gly	Asn	Ile	Ser	Pro	Asn	Ser	Gly	Ser	Ala	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				

Lys	Ser	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	Glu	Gly	Pro	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Pro	Ser	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Gly
			100					105					110		

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

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
 130 135 140

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr
 195 200 205

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
 210 215 220

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 325 330 335

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Leu Gly
 450

<210> 2

<211> 126

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 2

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Asn Ile Ser Pro Asn Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser 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 Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Arg Glu Tyr Tyr Gly
 100 105 110

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

<210> 3

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
 20 25 30

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

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

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

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

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 4

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 5
 <211> 1356
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<400> 5
 caggtgcagc tgggtgcagtc tgggtgctgaa gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggtg
 60

tcttgcaagg catctggcta cgagttcacc agctactgga ttcactgggt gcgacaggcc
 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaaat atttctccta atagtggtag tgctaactac
 180

aatgagaagt tcaagagcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac
 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagagggc
 300

ccttacagtt attatccgag tagggagtac tatggctctg acctctgggg gcaagggacc
 360

ctagtcacag tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttcccgt agcgccctgc
 420

tccaggagca cctccgagag cacagccgcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc
 480

gaaccgggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc

540

gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc
600

agcttgaggca cgaagaccta cacctgcaac gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg
660

gacaagagag ttgagtcctaa atatgggtccc ccatgcccac cctgcccagc acctgagttc
720

ctgggggggac catcagtctt cctgttcccc ccaaaaccca aggacactct catgatctcc
780

cggacccctg aggtcacgtg cgtgggtggtg gacgtgagcc aggaagaccc cgagggtccag
840

ttcaactggt acgtggatgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag
900

cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcttcaccg tcctgcacca ggactgggtg
960

aacggcaagg agtacaagtg caagggtctcc aacaaaggcc tcccgtcttc catcgagaaa
1020

accatctcca aagccaaagg gcagccccga gagccacagg tgtacaccct gcccccatcc
1080

caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc
1140

agcgacatcg ccgtggagtg ggaaagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg
1200

cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaggctaac cgtggacaag
1260

agcagggtggc aggaggggaa tgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac
1320

cactacacac agaagagcct ctccctgtct ctgggt
1356

<210> 6

<211> 642

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 6

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca aagtatcagc aataacctac actggtacca acagaaacct
120

ggccaggctc ccaggctcct catctattat acttcccggt ccgtctctgg catcccagcc
180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct
240

gaagattttg cagtttatta ctgtggacag aataacgagt ggcttgaggt gttcggcgga
300

gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca
360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat
420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag
480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc
642

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 7

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Asn	Asn	Leu	His
1				5					10	

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 8

Tyr Thr Ser Arg Ser Val Ser
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 9

Gly Gln Asn Asn Glu Trp Pro Glu Val
1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 10

Gly Tyr Glu Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His
1 5 10

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 11

Asn Ile Ser Pro Asn Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<400> 12

Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Arg Glu Tyr Tyr Gly Ser Asp
 1 5 10 15

Leu

<210> 13
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<400> 13

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Asn Ile Ser Pro Asn Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser 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 Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Arg Gln Tyr Tyr Gly
 100 105 110

Ser	Asp	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser		
		115					120					125					
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr		
	130					135					140						
Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro		
145					150					155					160		
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val		
				165					170					175			
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser		
			180					185					190				
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr		
		195					200					205					
Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val		
	210					215					220						
Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe		
225					230					235					240		
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr		
				245					250					255			
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val		
			260					265						270			
Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val		
		275					280					285					
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser		
	290					295					300						
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu		
305					310					315					320		

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 325 330 335

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Leu Gly
 450

<210> 14

<211> 126

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 14

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Asn Ile Ser Pro Asn Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser 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 Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Arg Gln Tyr Tyr Gly
 100 105 110

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

<210> 15

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 15

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
 20 25 30

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

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

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

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

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 16

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 17
 <211> 1356
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<400> 17
 caggtgcagc tgggtgcagtc tgggtgctgaa gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagggtg
 60

tcctgcaagg catctggcta cgagttcacc agctactgga ttcactgggt gcgacaggcc
 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaaat atttctccta atagtggtag tgctaactac
 180

aatgagaagt tcaagagcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac
 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagagggc
 300

ccttacagtt attatccgag taggcagtac tatggctctg acctctgggg gcaagggacc
 360

ctagtcacag tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttcccgt agcgccctgc
 420

tccaggagca cctccgagag cacagccgcc ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc
 480

gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc

540

gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc
600

agcttgggca cgaagaccta cacctgcaac gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg
660

gacaagagag ttgagtccaa atatgggtccc ccatgcccac cctgcccagc acctgagttc
720

ctgggggggac catcagtctt cctgttcccc ccaaaaccca aggacactct catgatctcc
780

cggacccctg aggtcacgtg cgtgggtggtg gacgtgagcc aggaagaccc cgagggtccag
840

ttcaactggt acgtggatgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag
900

cagttcaaca gcacgtaccg tgtgggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg
960

aacggcaagg agtacaagtg caagggtctcc aacaaaggcc tcccgctctc catcgagaaa
1020

accatctcca aagccaaagg gcagccccga gagccacagg tgtacaccct gcccccatcc
1080

caggaggaga tgaccaagaa ccagggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc
1140

agcgacatcg ccgtggagtg ggaaagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg
1200

cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctcttaca gcaggctaac cgtggacaag
1260

agcagggtggc aggaggggaa tgtctttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac
1320

cactacacac agaagagcct ctccctgtct ctgggt
1356

<210> 18

<211> 642

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 18

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca aagtatcagc aataacctac actggtacca acagaaacct
120

ggccaggctc ccaggctcct catctattat acttcccggg ccgtctctgg catcccagcc
180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct
240

gaagattttg cagtttatta ctgtggacag aataacgagt ggcttgaggt gttcggcgga
300

gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccggca
360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat
420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag
480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc
642

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cấu trúc tổng hợp

<400> 19

Glu	Gly	Pro	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Pro	Ser	Arg	Gln	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Asp
1				5					10					15	

Leu

<210> 20

<211> 17

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa vị trí 11 là Glu hoặc Gln

<400> 20

Glu	Gly	Pro	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Pro	Ser	Arg	Xaa	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Asp
1				5					10					15	

Leu

<210> 21
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Ala	Ser	Val	Ala	Thr	Glu	Leu	Arg	Cys	Gln	Cys	Leu	Gln	Thr	Leu	Gln
1				5					10					15	

Gly	Ile	His	Pro	Lys	Asn	Ile	Gln	Ser	Val	Asn	Val	Lys	Ser	Pro	Gly
			20					25					30		

Pro	His	Cys	Ala	Gln	Thr	Glu	Val	Ile	Ala	Thr	Leu	Lys	Asn	Gly	Arg
		35					40					45			

Lys	Ala	Cys	Leu	Asn	Pro	Ala	Ser	Pro	Ile	Val	Lys	Lys	Ile	Ile	Glu
	50					55					60				

Lys	Met	Leu	Asn	Ser	Asp	Lys	Ser	Asn
65					70			

<210> 22
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Ala Pro Leu Ala Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln
 1 5 10 15

Gly Ile His Leu Lys Asn Ile Gln Ser Val Lys Val Lys Ser Pro Gly
 20 25 30

Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Gln
 35 40 45

Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Met Val Lys Lys Ile Ile Glu
 50 55 60

Lys Met Leu Lys Asn Gly Lys Ser Asn
 65 70

<210> 23

<211> 73

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ala Ser Val Val Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln
 1 5 10 15

Gly Ile His Leu Lys Asn Ile Gln Ser Val Asn Val Arg Ser Pro Gly
 20 25 30

Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Lys
 35 40 45

Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Met Val Gln Lys Ile Ile Glu
 50 55 60

Lys Ile Leu Asn Lys Gly Ser Thr Asn
 65 70

<210> 24

<211> 74

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Ala Val Leu Arg Glu Leu Arg Cys Val Cys Leu Gln Thr Thr Gln
 1 5 10 15

Gly Val His Pro Lys Met Ile Ser Asn Leu Gln Val Phe Ala Ile Gly
 20 25 30

Pro Gln Cys Ser Lys Val Glu Val Val Ala Ser Leu Lys Asn Gly Lys
 35 40 45

Glu Ile Cys Leu Asp Pro Glu Ala Pro Phe Leu Lys Lys Val Ile Gln
 50 55 60

Lys Ile Leu Asp Gly Gly Asn Lys Glu Asn
 65 70

<210> 25

<211> 75

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Val Ser Ala Val Leu Thr Glu Leu Arg Cys Thr Cys Leu Arg Val Thr
 1 5 10 15

Leu Arg Val Asn Pro Lys Thr Ile Gly Lys Leu Gln Val Phe Pro Ala
 20 25 30

Gly Pro Gln Cys Ser Lys Val Glu Val Val Ala Ser Leu Lys Asn Gly
 35 40 45

Lys Gln Val Cys Leu Asp Pro Glu Ala Pro Phe Leu Lys Lys Val Ile
 50 55 60

Gln Lys Ile Leu Asp Ser Gly Asn Lys Lys Asn
 65 70 75

<210> 26

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro
 1 5 10 15

Lys Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val Ile Gly Lys Gly Thr His Cys Asn
 20 25 30

Gln Val Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asp Gly Arg Lys Ile Cys Leu
 35 40 45

Asp Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys Lys Ile Val Gln Lys Lys Leu Ala
 50 55 60

Gly Asp Glu Ser Ala Asp
 65 70

<210> 27

<211> 72

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro
 1 5 10 15

Phe His Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro
 20 25 30

His Cys Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu
 35 40 45

Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys
 50 55 60

Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser
 65 70