



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

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

(11)



1-0026217

(51)⁷ C07K 16/28; A61K 39/395; A61K 49/00; A61K 51/10; G01N 33/68; C07K 16/18; C07K 16/22; A61K 39/00; C07B 59/00 (13) B

(21) 1-2014-02879

(22) 25/01/2013

(86) PCT/US2013/023277 25/01/2013

(87) WO/2013/112922 01/08/2013

(30) 61/591,324 27/01/2012 US

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/02/2015 323A

(73) 1. AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG (DE)

Mainzer Str. 81, 65189 Wiesbaden, Germany

2. ABBVIE INC. (US)

1 North Waukegan Road, North Chicago, Illinois 60064, USA

(72) MUELLER, Bernhard (DE); HUANG, Lili (US); BARDWELL, Philip D. (US); KUTSKOVA, Yuliya (US); MEMMOTT, John (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG PHÂN TỬ DẪN HƯỚNG ĐẦY A (RGMa) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể kháng phân tử dẫn hướng đầy a (Repulsive Guidance Molecule a - “RGMa”) đơn dòng phân lập được hữu ích để điều trị và chẩn đoán các bệnh và các rối loạn thoái hóa thần kinh. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng phân tử dẫn hướng đẩy a (Repulsive Guidance Molecule a – RGMa) được dùng trong điều trị và chẩn đoán các bệnh đi kèm với bệnh thoái hóa thần kinh, như đa xơ cứng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Giai đoạn sớm của nhiều bệnh thoái hóa thần kinh đặc trưng bởi sự tổn thương neuron thần kinh và rối loạn synap thỏa hiệp. Bệnh thoái hóa thần kinh thường dẫn tới việc chết tế bào thần kinh và có thể ảnh hưởng đến sự dẫn truyền các tín hiệu tại các sợi thần kinh bị ảnh hưởng, làm giảm cảm giác, sự vận động, nhận thức hoặc các chức năng khác tùy thuộc vào các sợi thần kinh liên quan đến các chức năng này. Bệnh thoái hóa thần kinh cũng là dấu hiệu bệnh lý của bệnh đa xơ cứng (“MS”). MS là một bệnh tự miễn, thoái hóa thần kinh ảnh hưởng đến khoảng 350,000 người ở Mỹ và là nguyên nhân chính dẫn đến chứng liệt thần kinh hoặc dẫn đến tử vong ở người trưởng thành trẻ. Tình trạng bệnh lâm sàng phổ biến ở người mắc MS là sự hình thành các tổn thương thần kinh có tính chất thoái hóa do sự phân hủy mạnh vỏ myelin bao xung quanh các sợi trục của neuron tế bào thần kinh, và cuối cùng là phân hủy chính các sợi trục này. Việc phân hủy vỏ myelin xảy ra trong MS được tin là được khởi đầu bởi sự tấn công của các enzym proteaza đối với ba protein thần kinh chính: protein gốc myelin (myelin basic protein - MBP), protein proteo-lipit (proteo-lipid protein - PLP) và glycoprotein tế bào thần kinh đệm ít đuôi gai myelin (myelin oligodendrocyte glycoprotein - MOG). Mấy mớ mà nói thì MS là một bệnh hủy myelin gây viêm, được gây ra ít nhất một phần do đáp ứng tự miễn đối với sản phẩm phân hủy myelin. Các nghiên cứu gần đây đã nhấn mạnh vai trò của sợi trục thần kinh và sự tổn thương sợi trục thần kinh ngoài việc hủy myelin và cơ chế gây viêm đã được biết rõ.

Các bệnh nhân thường được chẩn đoán là mắc bệnh thoái hóa thần kinh dựa trên sự tổng hợp tiền sử bệnh và kiểm tra thần kinh, bao gồm chụp cộng hưởng từ (magnetic resonance imaging - MRI) não và cột sống, điện chẩn đoán (ví dụ, khám nghiệm điện thế gọi như điện thế gọi thị giác, điện thế gọi thính giác thân não, hoặc điện thế gọi cảm giác thân thể), và chọc dò tủy sống để tìm ra bằng chứng cho thấy sự tổng hợp globulin miễn dịch trong dịch não tủy.

Hiện nay, chưa thể chữa khỏi các bệnh đi kèm với sự thoái hóa thần kinh, vì vậy việc điều trị chủ yếu tập trung vào việc kiểm soát các triệu chứng và điều trị giảm tần suất tái phát và mức độ trầm trọng khi tái phát.

US 2011/0135664 A1 mô tả các protein liên kết RGMa, cụ thể là các kháng thể đơn dòng và cụ thể là các phiên bản ghép CDR được làm cho giống với của người của chúng, mà có khả năng liên kết RGMa và ngăn cản liên kết của các protein RGM với thụ thể RGMa và các protein liên kết RGMa khác, và do đó trung hòa chức năng của RGMa để sử dụng trong điều trị thoái hóa lớp sợi thần kinh võng mạc (retinal nerve fiber layer - RNLF). WO 02/051438 A2 đề cập đến việc sử dụng RGM và các chất điều biến của nó và mô tả các kháng thể đa dòng kháng RGM1 và kháng RGM2 cũng như kháng thể đơn dòng kháng RGM F3D4. WO 2004/003150 A2 đề cập đến các chất điều biến của sự tương tác giữa RGM và Neogenin và cũng mô tả kháng thể đơn dòng kháng RGM F3D4. Brinks et al. (J Neurosci 24(15):3862-3869, 2004) báo cáo rằng RGMa đã ức chế sự sinh trưởng quá mức của các sợi trục thần kinh nội khướu *in vitro* và tác dụng ức chế bị loại trừ khi có mặt của kháng thể kháng RGMa đa dòng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng phân tử dẫn hướng đẩy a (Repulsive Guidance Molecule a - RGMa) ("RGMa") đơn dòng phân lập được. Kháng thể này chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa vùng xác định bổ trợ (CDR)1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2, CDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3, và CDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa CDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6, CDR2 chứa trình

tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7 và CDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8 hoặc trình tự nêu trong SEQ ID NO:73. Theo các phương án cụ thể, kháng thể này chứa miền hoặc vùng được chọn từ (a) vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:5, (b) vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa CDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2, CDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3, và CDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa CDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6, CDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7, và CDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8, (c) vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa CDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2, CDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3, và CDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa CDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6, CDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7, và CDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:73.

Kháng thể này có thể có ở người. Kháng thể này có thể chứa miền cố định của chuỗi nặng của globulin miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm miền cố định của IgM ở người, miền cố định của IgG4 ở người, miền cố định của IgG1 ở người, miền cố định của IgE ở người, miền cố định của IgG2 ở người, miền cố định của IgG3 ở người, hoặc miền cố định của IgA ở người. Miền cố định của IgG1 ở người có thể chứa, hoặc bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:140.

Kháng thể này có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:1.

Kháng thể phân lập được theo sáng chế có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:5.

Kháng thể phân lập được theo sáng chế chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ mà chứa các gốc của vùng xác định bổ trợ (complementarity-determining domain - CDR) của các trình tự nêu trong SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, và SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, và SEQ ID NO:73.

Kháng thể phân lập được theo sáng chế chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa các gốc của CDR của các trình tự nêu trong SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, và SEQ ID NO:4.

Kháng thể phân lập được theo sáng chế chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng mà chứa các gốc của CDR của các trình tự nêu trong SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, và SEQ ID NO:4, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa các gốc của CDR của các trình tự nêu trong SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, và SEQ ID NO:8.

Kháng thể phân lập được theo sáng chế chứa chất được chọn từ nhóm bao gồm: phân tử kết dính miễn dịch, tác nhân để chụp hình, và tác nhân điều trị. Tác nhân để chụp hình có thể được là chất đánh dấu phóng xạ, enzym, chất đánh dấu phát huỳnh quang, chất đánh dấu phát quang, chất đánh dấu phát quang sinh học, chất đánh dấu từ, hoặc biotin. Chất đánh dấu phóng xạ là ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , hoặc ^{153}Sm .

Kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với RGMa epitop PCKILKCENSEFWSATSGSHAPAS (hRGMa 47-69) (trình tự nêu trong SEQ ID NO:79). Kháng thể liên kết với epitop của RGMa PCKILKCENSEFWSATSGSHAPAS (hRGMa 47-69) (trình tự nêu trong SEQ ID NO:79), có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa các gốc của CDR của các trình tự nêu trong SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, và SEQ ID NO:4, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa các gốc của CDR của các trình tự nêu trong SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, và SEQ ID NO:8.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể được mô tả ở đây hoặc hỗn hợp của nó.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp điều trị, ngăn ngừa, điều biến, hoặc làm giảm bệnh hoặc rối loạn đi kèm với bệnh thoái hóa thần kinh, bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị dùng lượng hữu hiệu kháng thể được mô tả ở đây. Rối loạn thoái hóa thần kinh có thể là bệnh đa xơ cứng, bệnh Parkinson; bệnh Alzheimer; bệnh Huntington; hội chứng xơ cứng teo cơ một bên và các bệnh thần kinh vận động khác; bệnh Tay-Sachs; bệnh

Niemann-Pick; bệnh Gaucher; hội chứng Hurler; các bệnh thoái hóa myelin viêm tự phát; thiếu hụt vitamin B12; hội chứng tan cầu não trung tâm; giang mai biến chứng thần kinh; viêm tủy ngang; bệnh Devic, bệnh lý não chất trắng đa ổ tiến triển; viêm thần kinh thị giác; tổn thương CNS do chấn thương; đột quỵ do thiếu máu não cục bộ; bệnh lý võng mạc; như glaucoma, bệnh lý võng mạc do đái tháo đường hoặc thoái hóa võng mạc do tuổi; và chứng loạn dưỡng chất trắng não.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp xác định đối tượng có rối loạn thoái hóa thần kinh. Phương pháp này có thể bao gồm việc xác định mức RGMa trong mẫu lấy từ đối tượng này; và so sánh mức RGMa trong mẫu với đối chứng bình thường. Mức RGMa thay đổi cho thấy đối tượng này có rối loạn thoái hóa thần kinh. Mức RGMa tăng so với đối chứng bình thường cho thấy đối tượng có rối loạn thoái hóa thần kinh. Mẫu có thể là mẫu máu hoặc mẫu huyết thanh hoặc mẫu dịch não tủy. Bước xác định mức RGMa trong mẫu có thể được tiến hành bằng thử nghiệm miễn dịch. Thử nghiệm miễn dịch này có thể là thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA). Thử nghiệm ELISA có thể là ELISA kẹp (sandwich ELISA).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập được chứa các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1-7 và 73.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng phân lập được chứa các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1-7 và liên kết với epitop của RGMa PCKILKCNSEFW SATSGSHAPAS (hRGMa 47-69) (trình tự nêu trong SEQ ID NO:79).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện kết quả thử nghiệm từ thử nghiệm sinh trưởng sợi trục thần kinh sử dụng 50 $\mu\text{g/ml}$ của mảnh hRGMa. Mảnh này bao gồm các axit amin 47-127 ở đầu N của trình tự nêu trong SEQ ID NO:65 (xem trình tự nêu trong SEQ ID NO:139) và chứa cả miền neogenin - ái lực cao lẫn miền tương tác protein tạo hình thái xương.

Fig.2 thể hiện kết quả thử nghiệm sinh trưởng sợi trục thần kinh sử dụng 50 $\mu\text{g/ml}$ hRGMA có chiều dài đầy đủ.

Fig.3 là biểu đồ cột phản ánh mức sự sinh trưởng *in vivo* có tính tái tạo của sợi trục tế bào hạch võng mạc quanh thương tổn (0-500 μm) khi có mặt kháng thể AE12-1.

Fig.4 là biểu đồ cột phản ánh mức sinh trưởng *in vivo* có tính tái tạo của sợi trục tế bào hạch võng mạc (500-1000 μm) với sự có mặt của kháng thể AE12-1 khi so sánh trực tiếp với 5F9. 23 người.

Fig.5 là phổ MS của phần E1 được khử bằng kháng thể AE12-1 của hRGMA do *E.coli* tạo ra được cắt bằng trypsin/Asp-N thể hiện trạng thái điện tích +3 và +4 (được đóng khung) của hai peptit tương ứng với các trình tự (SEQ ID NO 74 và 80, tương ứng theo trình tự xuất hiện) được thể hiện trên phổ này. Các đỉnh được đánh dấu * là các peptit không được gán cho kháng thể hRGMA và có thể liên quan với kháng thể này.

Fig.6 là phổ MS (hình trên) và MS/MS (hình dưới) từ phần E1 của hRGMA (cấu trúc MYC) được khử và làm biến tính bằng AE12-1 mAb, được cắt bằng trypsin và Asp-N, phổ này khẳng định trình tự peptit được cắt là KAGSPCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (trình tự nêu trong SEQ ID NO:81).

Fig.7 là phổ MS (hình trên) và MS/MS (hình dưới) của phần E1 của hRGMA (cấu trúc MYC) được khử và làm biến tính bằng AE12-1 mAb, và được cắt bằng trypsin và Asp-N, phổ này khẳng định trình tự peptit được thử là AGSPCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (trình tự nêu trong SEQ ID NO:89).

Fig.8 là vi ảnh các thương tổn thần kinh ở chuột nhắt được xử lý bằng kháng thể đối chứng (hlgG ở 10 mg/kg; xem bảng ở trên), kháng thể AE12-1 ở 1 mg/kg (xem bảng ở giữa), hoặc kháng thể h5F9.23 ở 1 mg/kg (xem bảng ở dưới).

Fig.9 thể hiện kết quả phân tích sự phát triển sợi trục thần kinh của các tế bào SH-SY5Y trên đĩa 96 lỗ được phủ bằng fibronectin làm cơ chất sau khi xử lý bằng RGMA người có chiều dài đầy đủ và kết quả trung hòa nó bằng AE12-1 (đồ thị cột bên trái) và

AE12-1-H (đồ thị cột bên phải). Kháng thể và hRGMA có chiều dài đầy đủ được bổ sung vào cùng thời điểm và sau đó canh trường được ủ trong 24 giờ.

Fig.10 thể hiện kết quả phân tích sự phát triển sợi trục thần kinh của các tế bào SH-SY5Y trên đĩa 96 lỗ được phủ bằng fibronectin làm cơ chất sau khi xử lý bằng RGMA người có chiều dài đầy đủ và kết quả trung hòa nó bằng AE12-1-K (đồ thị cột bên trái) và AE12-1-F (đồ thị cột bên phải). Kháng thể và hRGMA có chiều dài đầy đủ được bổ sung vào cùng thời điểm và sau đó canh trường được ủ trong 24 giờ.

Fig.11 thể hiện kết quả phân tích sự phát triển sợi trục thần kinh của các tế bào SH-SY5Y trên đĩa 96 lỗ được phủ bằng fibronectin làm cơ chất sau khi xử lý bằng RGMA người có chiều dài đầy đủ và kết quả trung hòa nó bằng AE-12-1-I (đồ thị cột bên trái) và AE-12-L (đồ thị cột bên phải). Kháng thể và hRGMA có chiều dài đầy đủ được bổ sung vào cùng thời điểm và sau đó canh trường được ủ trong 24 giờ.

Fig.12 thể hiện kết quả phân tích sự phát triển sợi trục thần kinh của các tế bào SH-SY5Y trên đĩa 96 lỗ được phủ bằng fibronectin làm cơ chất sau khi xử lý bằng RGMA người có chiều dài đầy đủ và kết quả trung hòa nó bằng AE12-1-V (đồ thị cột bên trái) và AE-12-1-Y (đồ thị cột bên phải). Kháng thể và hRGMA có chiều dài đầy đủ được bổ sung vào cùng thời điểm và sau đó canh trường được ủ trong 24 giờ.

Fig.13 thể hiện các kết quả của RGMA liên kết thử nghiệm trên các tế bào SH-SY5Y và các tế bào thần kinh phổ biến (phân tích nồng độ cao HCA) sử dụng AE12-6, AE12-15 và AE12-23.

Fig.14 thể hiện các kết quả của thử nghiệm ức chế liên kết RGMA trên các tế bào SH-SY5Y (nhờ phân tích nồng độ cao HCA) sử dụng AE12-1 và các biến thể AE12-1 xystein.

Fig.15 thể hiện tác dụng trung hòa của AE12-1 và AE12-6 trong thử nghiệm tái tạo xung sinh trưởng sợi trục thần kinh RGMA trong thử nghiệm sinh trưởng sợi trục thần

kinh trên vùng hải mã của các tế bào thần kinh phổ biến chuột nhắt. Kháng thể r5F9 được sử dụng làm đối chứng.

Fig.16 thể hiện ba (3) kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu và chọn lọc với RGMa, AE12-1, AE12-1Y và h5F9. 23, làm thoái hóa hàng loạt sợi dương tính với GAP-43 phía trên vị trí chèn ép như được mô tả trong Ví dụ 9. Trục Y = số bó sợi axon trong diện tích 0-500 μm phía trên vị trí chèn ép. *** $p < 0,001$: mức ý nghĩa so với hIgG, ** $p < 0,01$: mức ý nghĩa so với hIgG, * $p < 0,05$: mức ý nghĩa so với hIgG.

Fig.17 là hình vẽ thể hiện ba (3) kháng thể đơn dòng liên kết đặc hiệu và chọn lọc với RGMa, AE12-1, AE12-1Y và h5F9. 23, làm tăng số bó axon vòng mạc, nhờ đó bảo vệ lớp sợi thần kinh vòng mạc. Trục Y = số bó sợi trong vòng mạc như được mô tả trong Ví dụ 10. ** $p < 0,01$: mức ý nghĩa so với hIgG, * $p < 0,05$: mức ý nghĩa so với hIgG.

Fig.18 là hình vẽ thể hiện kháng thể kháng RGMa, AE12-1, AE12-1Y và h5F9. 23 làm tăng sự khôi phục chức năng ở mô hình tEAE tùy sống như được mô tả trong Ví dụ 11. Việc xử lý bằng kháng thể (iv) được bắt đầu khoảng 1 tuần sau khi tiêm xytokin và được lặp lại một tuần một lần. Liều được nhân là 10 mg/kg. *** $p < 0,001$: mức ý nghĩa so với hIgG, ** $p < 0,01$: mức ý nghĩa so với hIgG, * $p < 0,05$: mức ý nghĩa so với hIgG.

Fig.19 là hình vẽ thể hiện kháng thể kháng RGMa, AE12-1, AE12-1Y và ABT-207 (h5F9. 23) làm tăng diện tích GAP-43 và MBP và làm giảm sự thương tổn do viêm khi so sánh trực tiếp với kháng thể đối với kháng thể đối chứng hIgG như được mô tả trong Ví dụ 11. *** $p < 0,001$: mức ý nghĩa so với hIgG, ** $p < 0,01$: mức ý nghĩa so với hIgG, * $p < 0,05$: mức ý nghĩa so với hIgG.

Fig.20 là hình vẽ thể hiện RGMa mAb AE12-1Y-QL làm tăng sự khôi phục chức năng ở mô hình tEAE tùy sống ở ba liều khác nhau 0,1; 1 và 10 mg/kg được nhận một lần một tuần trong tĩnh mạch như được mô tả trong Ví dụ 11. Việc xử lý bằng kháng thể (iv) được bắt đầu khoảng 1 tuần sau khi tiêm xytokin và được lặp lại một tuần một lần. *** $p < 0,001$: mức ý nghĩa so với hIgG, ** $p < 0,01$: mức ý nghĩa so với hIgG, * $p < 0,05$: mức ý nghĩa so với hIgG.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra các kháng thể mới liên kết với RGMa và có thể được dùng để điều trị các bệnh liên quan đến bệnh thoái hóa thần kinh. Các kháng thể được phát hiện là các kháng thể đặc hiệu và không đặc hiệu, có khả năng làm giảm các dấu hiệu lâm sàng đi kèm với các bệnh liên quan đến bệnh thoái hóa thần kinh.

Định nghĩa

Các thuật ngữ được sử dụng ở đây chỉ được dùng để mô tả các phương án cụ thể và không được dùng để giới hạn phạm vi sáng chế. Như được sử dụng trong phần mô tả và các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm, dạng số ít “và” cũng bao gồm dạng số nhiều trừ khi nội dung có thông báo khác.

Khoảng

“Khoảng” như được sử dụng ở đây có thể chỉ mức thay đổi xấp xỉ $\pm 10\%$ so với giá trị được thông báo. Cần hiểu rằng mức thay đổi này luôn nằm trong giá trị bất kỳ được nêu ở đây, bất kể nó có được chỉ rõ hay không.

Kháng thể được xử lý để có ái lực đầy đủ (kháng thể được làm thành thực ái lực)

“Kháng thể được xử lý để có ái lực đầy đủ” được sử dụng ở đây chỉ kháng thể có một hoặc nhiều thay đổi trong một hoặc nhiều CDR, tạo ra ái lực (ví dụ, K_D , k_d hoặc k_a) của kháng thể đối với kháng nguyên đích cải thiện hơn so với kháng thể gốc không có (các) thay đổi này. Các kháng thể được xử lý để có ái lực đầy đủ được lấy làm ví dụ sẽ có ái lực cấp độ nanomol hoặc thậm chí là picomol đối với kháng nguyên đích. Rất nhiều quy trình khác nhau dùng để tạo ra kháng thể được xử lý để có ái lực đầy đủ đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm sàng lọc thư viện kháng thể tổ hợp mà được chuẩn bị bằng cách biểu hiện sinh học. Ví dụ, tài liệu Marks et al., BioTechnology, 10: 779-783 (1992) mô tả việc xử lý để kháng thể có ái lực đầy đủ bằng cách sắp xếp lại miền VH và VL. Việc gây đột biến ngẫu nhiên đối với CDR và/hoặc các gốc trong khung hoạt động được mô tả trong tài liệu: Barbas et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 91: 3809-3813 (1994);

Schier et al., Gene, 169: 147-155 (1995); Yelton et al., J. Immunol. , 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. , 154(7): 3310-3319 (1995); và Hawkins et al, J. Mol. Biol. , 226: 889-896 (1992). Sự đột biến chọn lọc tại các vị trí gây đột biến chọn lọc và ở vị trí nguyên vẹn hoặc siêu đột biến bằng gốc axit amin để làm tăng hoạt tính đã được mô tả trong US 6,914,128 B1.

Kháng thể và các kháng thể

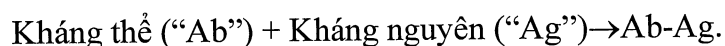
“Kháng thể” và “các kháng thể” như được sử dụng ở đây chỉ các kháng thể đơn dòng, kháng thể đa đặc hiệu, kháng thể của người, kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người (được làm cho giống với của người toàn bộ hoặc một phần), kháng thể của động vật như, nhưng không chỉ giới hạn ở, chim (ví dụ, vịt hoặc ngỗng), cá mập, cá heo, và động vật có vú, bao gồm động vật không phải là động vật linh trưởng (ví dụ, bò, lợn, lạc đà, lạc đà không bướu, ngựa, dê, thỏ, cừu, động vật gặm nhấm, chuột lang, mèo, chó, chuột nhắt, chuột đồng, v.v.) hoặc động vật linh trưởng không phải là người (ví dụ, khỉ, tinh tinh, v.v.), kháng thể tái tổ hợp, kháng thể khảm, Fv mạch đơn (“scFv”), kháng thể mạch đơn, kháng thể miền đơn, các mảnh Fab, các mảnh F(ab'), các mảnh F(ab')₂, Fv được tạo liên kết disulfua (“sdFv”), và các kháng thể kháng idiotyp (“kháng-Id”), kháng thể hai miền, kháng thể hai vùng biến đổi (DVD) hoặc ba vùng biến đổi (TVD) (globulin miễn dịch hai vùng biến đổi và phương pháp tạo ra chúng được mô tả trong tài liệu: Wu, C. , et al., Nature Biotechnology, 25(11):1290-1297 (2007) và WO 2001/058956), và các mảnh liên kết epitop có hoạt tính chức năng của loại bất kỳ nêu trên. Cụ thể, các kháng thể bao gồm các phân tử globulin miễn dịch và các mảnh có hoạt tính miễn dịch của các phân tử globulin miễn dịch, cụ thể là các phân tử chứa vị trí liên kết với chất phân tích. Các phân tử globulin miễn dịch có thể là loại bất kỳ (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA và IgY), nhóm bất kỳ (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2) hoặc phân nhóm bất kỳ. Để đơn giản, kháng thể kháng chất phân tích ở đây thường được gọi là “kháng thể kháng chất phân tích” hoặc đơn giản chỉ là “kháng thể phân tích” (ví dụ, kháng thể kháng-RGMA hoặc kháng thể RGMA).

Mảnh kháng thể

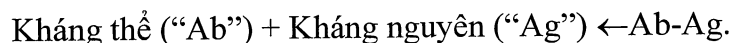
“Mảnh kháng thể” như được sử dụng ở đây chỉ một phần của kháng thể nguyên vẹn chứa vị trí liên kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi. Phần này không bao gồm miền cố định của chuỗi nặng (nghĩa là, CH₂, CH₃ hoặc CH₄, phụ thuộc vào isotyp của kháng thể) của vùng Fc của kháng thể nguyên vẹn. Ví dụ về các mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các mảnh Fab, các mảnh Fab', các mảnh Fab'-SH, các mảnh F(ab')₂, các mảnh Fd, các mảnh Fv, kháng thể đôi, các phân tử Fv mạch đơn (scFv), polypeptit mạch đơn chỉ chứa một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ, polypeptit mạch đơn chứa ba CDR của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ, polypeptit mạch đơn chỉ chứa một vùng biến đổi của chuỗi nặng, và polypeptit mạch đơn chứa ba CDR của vùng biến đổi của chuỗi nặng.

Hằng số liên kết

“Hằng số liên kết” được mô tả ở đây. Thuật ngữ “hằng số tốc độ kết hợp”, "Kon", hoặc “K_a” như được sử dụng ở đây chỉ tốc độ liên kết của kháng thể với kháng nguyên đích của nó hoặc tốc độ tạo thành phức hệ giữa kháng thể và kháng nguyên cũng được thể hiện bằng phương trình:



Thuật ngữ "hằng số tốc độ phân rã" hoặc “K_d” được sử dụng thay thế cho nhau ở đây chỉ thấy tốc độ phân ly của kháng thể khỏi kháng nguyên đích của nó hoặc tốc độ phân tách phức hệ Ab-Ag theo thời gian thành kháng thể và kháng nguyên tự do như được thể hiện bằng phương trình sau:



Các phương pháp để xác định hằng số tốc độ kết hợp và phân ly là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Việc sử dụng các kỹ thuật cho độ nhạy cao và tạo khả năng xem xét các mẫu trong các dung dịch đậm sinh lý khi cân bằng. Các phương pháp thử nghiệm khác và các thiết bị như BIAcore® (phân tích tương tác sinh học phân tử) có thể được sử dụng (ví dụ, thiết bị sẵn có từ BIAcore International AB, công ty GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

Ngoài ra, thử nghiệm sử dụng hệ thống KinExA® (Kinetic Exclusion Assay), sẵn có từ Sapidne Instruments (Boise, Idaho) có thể cũng được sử dụng.

Thuật ngữ “hằng số phân ly cân bằng hoặc “ K_D ” như được sử dụng thay thế ở đây chỉ giá trị thu được trong phép đo chuẩn độ khi cân bằng, hoặc bằng cách chia hằng số tốc độ phân ly (k_{off}) cho hằng số tốc độ kết hợp (k_{on}). Hằng số tốc độ kết hợp, hằng số tốc độ phân ly và hằng số phân ly cân bằng được sử dụng để thể hiện ái lực liên kết của kháng thể với kháng nguyên.

Protein liên kết

“Protein liên kết” được sử dụng ở đây chỉ protein ở dạng monome hoặc multime, liên kết và tạo ra phức chất với phân tử liên kết, ví dụ polypeptit, kháng nguyên, hợp chất hóa học hoặc phân tử khác, hoặc cơ chất thuộc loại bất kỳ. Protein liên kết liên kết đặc hiệu với phân tử liên kết. Protein liên kết bao gồm các kháng thể, cũng như các mảnh liên kết kháng nguyên và các dạng khác nhau và các dẫn xuất của chúng như đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả dưới đây, và các phân tử khác chứa một hoặc nhiều miền liên kết kháng nguyên liên kết với phân tử kháng nguyên hoặc vị trí cụ thể (epitop) trên phân tử kháng nguyên. Do đó, protein liên kết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể, globulin miễn dịch ở dạng tetrame, phân tử IgG, phân tử IgG1, kháng thể đơn dòng, kháng thể khảm, kháng thể ghép CDR, kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người, kháng thể có ái lực được làm thành thực, và các mảnh của kháng thể bất kỳ nêu trên mà giữ lại khả năng liên kết với kháng nguyên.

Kháng thể đặc hiệu kép

Thuật ngữ "kháng thể đặc hiệu kép" như được sử dụng ở đây chỉ kháng thể có chiều dài đầy đủ được tạo ra bằng công nghệ tế bào lai (xem tài liệu: Milstein et al., *Nature*, 305(5934): 537-540 (1983), bằng cách dung hợp hóa học của hai kháng thể đơn dòng khác nhau (xem tài liệu: Staerz et al., *Nature*, 314(6012): 628-631 (1985), hoặc bằng phương pháp “mẫu trong giếng” hoặc phương pháp tương tự dùng để đưa các đột biến vào trong vùng Fc (xem tài liệu: Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(14): 6444-6448 (1993), tạo ra nhiều loại globulin miễn dịch khác nhau, trong đó chỉ có một globulin

miễn dịch là kháng thể đặc hiệu kép có chức năng. Nhờ chức năng ở cấp độ phân tử, kháng thể đặc hiệu kép liên kết với chỉ một kháng nguyên (hoặc epitop) trên một trong hai nhánh liên kết của nó (một cặp HC/LC), và liên kết với kháng nguyên khác (hoặc epitop) trên nhánh thứ hai của nó (cặp HC/LC khác). Kháng thể đặc hiệu kép có hai nhánh liên kết kháng nguyên tách biệt (ở cả trình tự xác định tính đặc hiệu lẫn trình tự xác định tính hỗ trợ), và có hóa trị một đối với mỗi kháng nguyên liên kết với nó.

CDR

Thuật ngữ "CDR" chỉ vùng xác định hỗ trợ nằm trong trình tự của vùng biến đổi của kháng thể. Có ba CDR trong mỗi vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, được gọi là CDR1, CDR2 và CDR3, cho mỗi vùng biến đổi. Thuật ngữ "bộ CDR" như được sử dụng ở đây chỉ nhóm gồm ba CDR nằm trong một vùng biến đổi liên kết với kháng nguyên. Ranh giới chính xác của ba CDR này đã được xác định khác nhau theo các hệ thống khác nhau. Hệ thống được mô tả bởi Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) và (1991)) không chỉ cung cấp hệ thống đánh số gốc rõ ràng có thể áp dụng cho vùng biến đổi bất kỳ của kháng thể, mà còn cung cấp các ranh giới gốc chính xác xác định ba CDR nêu trên. Các CDR này có thể được gọi là các CDR Kabat. Chothia và cộng sự (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) và Chothia et al., *Nature* 342:877-883 (1989)) cũng đã phát hiện ra rằng một số vị trí phụ nhất định trong CDR Kabat thu nhận các cấu hình có khung xương peptit gần giống nhau, mặc dù có sự khác nhau nhiều ở cấp độ trình tự axit amin. Các vị trí phụ này được gọi là L1, L2 và L3 hoặc H1, H2 và H3, trong đó "L" và "H" lần lượt được gọi là chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Các vùng này có thể được gọi là các CDR Chothia, có ranh giới chồng lên các CDR Kabat. Các ranh giới khác xác định các CDR chồng lên các CDR Kabat được Padlan (*FASEB J.* 9:133-139 (1995)) và MacCallum (*J Mol Biol* 262(5):732-45 (1996)) mô tả. Tuy nhiên, các định nghĩa khác về ranh giới CDR có thể không liên hệ mật thiết với các hệ thống ở đây, tuy nhiên, sẽ chồng lên các CDR Kabat, mặc dù chúng có thể bị rút ngắn hoặc kéo dài hơn so với dự đoán hoặc các phát hiện trong thử nghiệm mà một số gốc cụ thể hoặc một số nhóm gốc hoặc thậm chí là toàn bộ các CDR không ảnh hưởng nhiều đến liên kết kháng nguyên. Các

phương pháp được sử dụng ở đây có thể sử dụng các CDR được định nghĩa theo hệ thống bất kỳ trong số các hệ thống nêu trên mặc dù một số phương án nhất định sử dụng các CDR được định nghĩa Kabat hoặc Chothia.

Thành phần hoặc các thành phần

“Thành phần”, “các thành phần” và “ít nhất một thành phần” thường đề cập đến kháng thể bất giữ, kháng thể phát hiện hoặc tiếp hợp, đối chứng, bảng độ nhạy, vật chứa, đệm, chất pha loãng, muối, enzym, đồng yếu tố cho enzym, thuốc thử để phát hiện, thuốc thử/dung dịch xử lý trước, cơ chất (ví dụ, dưới dạng dung dịch), dung dịch làm ngừng, và thành phần tương tự có thể được đưa vào trong bộ kit dùng cho thử nghiệm mẫu xét nghiệm như mẫu nước tiểu bệnh nhân, huyết tương hoặc huyết thanh, theo các phương pháp được mô tả ở đây và các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một số thành phần này có thể ở trong dung dịch hoặc được đông khô để hoàn nguyên khi sử dụng trong thử nghiệm.

Liên ứng hoặc trình tự liên ứng

“Liên ứng” hoặc “trình tự liên ứng” như được sử dụng ở đây chỉ trình tự axit nucleic tổng hợp, hoặc trình tự polypeptit tương ứng, được tạo cấu trúc dựa trên kết quả phân tích sự thẳng hàng của nhiều loại kháng nguyên cụ thể. Trình tự có thể được dùng để tạo ra phổ miễn dịch rộng dựa trên nhiều tiểu loại và týp huyết thanh của kháng nguyên cụ thể. Các kháng nguyên tổng hợp như protein dung hợp có thể được xử lý thành trình tự liên ứng (hoặc kháng nguyên liên ứng).

Đối chứng

“Đối chứng” như được sử dụng ở đây chỉ thành phần được biết là không chứa chất phân tích (“đối chứng âm”), ví dụ RGMa (như RGMa kết hợp màng tế bào, RGMa tan, các mảnh của RGMa kết hợp màng tế bào, các mảnh của RGMa tan, các biến thể của RGMa (RGMa kết hợp màng tế bào, RGMa tan hoặc hỗn hợp của chúng) hoặc chứa một chất phân tích quan tâm (“đối chứng dương”), ví dụ RGMa (như RGMa kết hợp màng tế bào, RGMa tan, các mảnh của RGMa kết hợp màng tế bào, các mảnh của RGMa tan, các biến thể của RGMa (RGMa kết hợp màng tế bào, RGMa tan) hoặc hỗn hợp của chúng).

Đối chứng dương có thể chứa RGMa với nồng độ đã biết. Thuật ngữ “đối chứng”, “đối chứng dương” và “chất chuẩn hóa” có thể được sử dụng thay thế cho nhau ở đây và đề cập đến thành phần chứa RGMa với nồng độ đã biết. “Đối chứng dương” có thể được dùng để xác định đặc trưng của thử nghiệm và là chất chỉ thị hữu ích về tính nguyên vẹn của các thuốc thử (ví dụ, chất phân tích). “Đối chứng bình thường” có thể chỉ mẫu hoặc đối tượng không mắc bệnh hoặc rối loạn liên quan.

Các dẫn xuất

“Dẫn xuất” theo kháng thể như được sử dụng ở đây có thể chỉ kháng thể có một hoặc nhiều cải biến về trình tự axit amin so với kháng thể tham chiếu hoặc kháng thể gốc và có cấu trúc miền được cải biến. Dẫn xuất này có thể cũng có khả năng thích ứng với cấu hình điển hình của miền mà phát hiện thấy trong kháng thể tự nhiên, cũng như trình tự axit amin, có khả năng liên kết đặc hiệu với các đích (các kháng nguyên). Ví dụ điển hình về dẫn xuất của kháng thể là các kháng thể liên kết với polypeptit khác, miền kháng thể hoặc các mảnh được tái cấu trúc của các kháng thể. Dẫn xuất này cũng có thể chứa ít nhất một hợp chất khác, ví dụ, một miền của protein, miền protein này được liên kết đồng hóa trị hoặc không đồng hóa trị. Liên kết này có thể dựa trên sự dung hợp gen theo các phương pháp này đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Miền bổ sung có mặt trong protein dung hợp chứa kháng thể được dùng theo sáng chế tốt hơn là được liên kết bằng một liên kết linh động, tốt hơn là liên kết peptit, trong đó liên kết peptit này chứa nhiều axit amin được liên kết với nhau bằng liên kết peptit và ưa nước, với chiều dài đủ để mở rộng khoảng cách giữa đầu C của miền bổ sung của protein và đầu N của kháng thể hoặc ngược lại. Kháng thể này có thể liên kết với phân tử tác động có cấu dạng thích hợp cho hoạt tính sinh học hoặc tính liên kết chọn lọc với chất mang rắn, hợp chất có hoạt tính sinh học (ví dụ, xytokin hoặc hormone sinh trưởng), chất hóa học, peptit, protein hoặc được chất, chẳng hạn.

Kháng thể lưỡng đặc hiệu

Thuật ngữ “kháng thể lưỡng đặc hiệu”, như được sử dụng ở đây, chỉ kháng thể có chiều dài đầy đủ có thể liên kết với hai kháng nguyên khác nhau (hoặc các epitop) trong

một trong hai nhánh gắn kết của nó (cặp HC/LC) (xem WO 02/02773). Do đó, protein liên kết lưỡng đặc hiệu có hai nhánh liên kết kháng nguyên giống nhau có trình tự xác định tính đặc hiệu giống nhau và trình tự xác định tính hỗ trợ giống nhau, và có hóa trị hai đối với mỗi kháng nguyên liên kết với nó.

Vùng biến đổi kép

"Vùng biến đổi kép" ("DVD") được sử dụng ở đây chỉ hai hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên trên protein liên kết mà có thể là protein liên kết hóa trị hai (hai vị trí liên kết kháng nguyên), hóa trị bốn (bốn vị trí liên kết kháng nguyên) hoặc đa hóa trị. Các DVD có thể đơn đặc hiệu, nghĩa là, có khả năng liên kết với một kháng nguyên (hoặc một epitop cụ thể) hoặc đa đặc hiệu, nghĩa là, có khả năng liên kết với hai hoặc hai kháng nguyên (nghĩa là, hai hoặc nhiều epitop của cùng một phân tử kháng nguyên đích hoặc hai hoặc nhiều epitop của các kháng nguyên đích khác nhau. Protein liên kết DVD được ưu tiên bao gồm hai polypeptit DVD của chuỗi nặng và hai polypeptit DVD của chuỗi nhẹ và hai polypeptit DVD và ở đây gọi là "globulin miễn dịch DVD" hoặc "DVD-Ig". Do đó, protein liên kết DVD-Ig này là một tetrame và mô phỏng lại phân tử IgG nhưng lại có nhiều vị trí liên kết kháng nguyên hơn so với phân tử IgG. Do đó, một nửa của phân tử DVD-Ig ở dạng tetrame là hình ảnh mô phỏng của một nửa phân tử IgG và chứa polypeptit DVD của chuỗi nặng và polypeptit DVD của chuỗi nhẹ, nhưng không giống như cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của phân tử IgG có vùng liên kết kháng nguyên đơn, cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của DVD-Ig có hai hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên.

Mỗi vị trí liên kết kháng nguyên của protein liên kết DVD thu được từ kháng thể đơn dòng cho "gốc" và do đó, chứa VH của chuỗi nặng và VL của chuỗi nhẹ với tổng số là sáu CDR liên quan đến việc liên kết với kháng nguyên trong một vị trí liên kết kháng nguyên. Do đó, protein liên kết DVD-Ig liên kết với hai epitop khác nhau (nghĩa là, hai epitop khác nhau của hai phân tử kháng nguyên khác nhau hoặc hai epitop khác nhau của cùng một phân tử kháng nguyên mang vị trí liên kết kháng nguyên thu được từ kháng thể đơn dòng cho gốc và vị trí liên kết của kháng thể đơn dòng gốc thứ hai.

Phần mô tả về việc thiết kế, biểu hiện và phân tích đặc tính của các phân tử liên kết DVD-Ig được cung cấp trong công bố đơn quốc tế số WO 2007/024715, patent Mỹ số

7,612,181, và tài liệu: Wu et al., *Nature Biotech.*, 25: 1290-1297 (2007). Ví dụ được ưu tiên về các phân tử DVD-Ig này bao gồm chuỗi nặng có công thức cấu tạo: VD1-(X1) n -VD2-C-(X2) n , trong đó VD1 là vùng biến đổi của chuỗi nặng thứ nhất, VD2 là vùng biến đổi của chuỗi nặng thứ hai, C là vùng cố định của chuỗi nặng, X1 là chất liên kết với điều kiện nó không phải là CH1, X2 là vùng Fc, và n bằng 0 hoặc 1, nhưng tốt hơn nếu bằng 1; và chuỗi nhẹ có công thức cấu tạo: VD1-(X1) n -VD2-C-(X2) n , trong đó VD1 là vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thứ nhất, VD2 là vùng biến đổi của chuỗi nhẹ thứ hai, C là vùng cố định của chuỗi nhẹ, X1 là chất liên kết với điều kiện nó không phải là CH1, và X2 không chứa vùng Fc; và n bằng 0 hoặc 1, nhưng tốt hơn nếu bằng 1. DVD-Ig này có thể bao gồm hai chuỗi nặng nêu trên và hai chuỗi nhẹ nêu trên, trong đó mỗi chuỗi chứa các vùng biến đổi liên kết liên tiếp mà không xen vùng cố định vào giữa các vùng biến đổi, trong đó chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kết hợp để tạo ra các vị trí liên kết kháng nguyên chức năng liên tiếp và cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể kết hợp với cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ khác để tạo thành protein liên kết dạng tetrame có 4 vị trí liên kết kháng nguyên chức năng. Trong một ví dụ khác, phân tử DVD-Ig có thể bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mà mỗi chuỗi chứa ba vùng biến đổi (VD1, VD2, VD3) liên kết liên tiếp nhau mà không xen vùng cố định vào giữa các vùng biến đổi, trong đó chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kết hợp để tạo ra ba vị trí liên kết kháng nguyên, và trong đó cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể kết hợp với cặp chuỗi nặng và chuỗi nhẹ khác để tạo thành protein liên kết dạng tetrame có 6 vị trí liên kết kháng nguyên chức năng.

Theo một phương án được ưu tiên, protein liên kết DVD-Ig theo sáng chế không chỉ liên kết với cùng các phân tử đích được liên kết bởi các kháng thể đơn dòng gốc mà còn có một hoặc nhiều đặc tính mong muốn của một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng gốc của chúng. Tốt hơn, nếu đặc tính bổ sung này là một thông số kháng thể của một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng gốc. Các thông số kháng thể có thể do một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng gốc tạo ra cho protein liên kết DVD-Ig bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tính đặc hiệu kháng nguyên, ái lực với kháng nguyên, hoạt lực, chức năng sinh học, nhận diện epitop, độ ổn định của protein, độ tan của protein, hiệu quả sản xuất, tính sinh miễn dịch, được động học, độ sinh khả dụng, tính phản ứng chéo với mô, và liên kết kháng nguyên cùng nguồn.

Protein liên kết DVD-Ig liên kết với ít nhất một epitop của RGMa. Ví dụ không giới hạn về protein liên kết DVD-Ig bao gồm protein liên kết DVD-Ig liên kết với một hoặc nhiều epitop của RGMa, protein liên kết DVD-Ig liên kết với epitop của RGMa và epitop của các loài khác (ví dụ, chuột nhắt), và protein liên kết DVD-Ig liên kết với epitop của RGMa và epitop của phân tử đích khác (ví dụ, VEGFR2 hoặc VEGFR1).

Epitop hoặc các epitop

“Epitop” hoặc “các epitop”, hoặc “các epitop quan tâm” chỉ (các) vị trí trên phân tử bất kỳ được nhận biết và có thể liên kết với (các) vị trí bổ trợ trên phân tử liên kết đặc hiệu. Phân tử và phân tử liên kết đặc hiệu là một phần của cặp liên kết đặc hiệu. Ví dụ, epitop có thể là polypeptit, protein, hapten, kháng nguyên carbohydrat (như, nhưng không chỉ giới hạn ở, các glycolipit, các glycoprotein hoặc các lipopolysacarit), hoặc polysacarit. Phân tử liên kết đặc hiệu có thể là, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể.

Khung hoạt động và trình tự vùng khung hoạt động

Thuật ngữ "khung hoạt động" hoặc "trình tự khung hoạt động" như được sử dụng ở đây có thể chỉ các trình tự còn lại của vùng biến đổi trừ các CDR. Do có thể xác định chính xác trình tự CDR bằng các hệ thống khác nhau (ví dụ, xem ở trên) nên nghĩa của trình tự khung hoạt động được giải thích theo nhiều cách khác nhau nhưng tương ứng. Sáu CDR (CDR-L1, -L2, và -L3 của chuỗi nhẹ và CDR-H1, -H2, và -H3 của chuỗi nặng) cũng chia các vùng khung trên chuỗi nhẹ và chuỗi nặng thành bốn vùng phụ (FR1, FR2, FR3 và FR4) trên mỗi chuỗi, trong đó CDR1 nằm giữa FR1 và FR2, CDR2 giữa FR2 và FR3, và CDR3 giữa FR3 và FR4. Nếu không chỉ rõ các vùng phụ cụ thể như FR1, FR2, FR3 hoặc FR4 thì vùng khung hoạt động như được đề cập bởi các hệ thống khác, là FR kết hợp trong vùng biến đổi của một mạch đơn globulin miễn dịch có trong tự nhiên. Như được sử dụng ở đây, FR là một trong số bốn vùng phụ, và các FR là hai hoặc nhiều trong số bốn vùng phụ cấu thành nên vùng khung hoạt động.

Các trình tự FR của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở người đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được dùng dưới dạng trình tự khung hoạt động “nhận” của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (hoặc đơn giản là trình tự “nhận”) để nhân hóa kháng thể không phải ở

người sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án, trình tự nhận của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở người được chọn từ các trình tự vùng khung hoạt động được liệt kê ở cơ sở dữ liệu đã công bố như cơ sở dữ liệu V ([www://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/](http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/)) hoặc trong ImMunoGeneTics® quốc tế (hệ thống thông tin IMGT®) ([www://imgt.cines.fr/texts/IMGTrepertoire/LocusGenes/](http://imgt.cines.fr/texts/IMGTrepertoire/LocusGenes/)).

Vị trí liên kết kháng nguyên chức năng

"Vị trí liên kết kháng nguyên chức năng" như được sử dụng ở đây có thể chỉ vị trí có khả năng liên kết với kháng nguyên đích. Ái lực liên kết với kháng nguyên đích của vị trí liên kết kháng nguyên này không nhất thiết phải mạnh như kháng thể gốc từ đó thu được vị trí liên kết kháng nguyên nêu trên, nhưng khả năng liên kết kháng nguyên phải đo được sử dụng một trong số phương pháp bất kỳ sẵn có để đánh giá mức độ liên kết của kháng thể với kháng nguyên. Hơn nữa, ái lực liên kết kháng nguyên của mỗi vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể đa hóa trị ở đây không nhất thiết phải mạnh như nhau.

Kháng thể của người

Thuật ngữ "kháng thể của người" như được sử dụng ở đây có thể bao gồm các kháng thể có vùng cố định và biến đổi thu được từ các trình tự globulin miễn dịch của tế bào dòng mầm ở người. Các kháng thể của người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm ở người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu điểm *in vitro* hoặc bằng đột biến soma *in vivo*). Tuy nhiên, thuật ngữ "kháng thể của người", như được sử dụng ở đây, không bao gồm các kháng thể trong đó các trình tự CDR thu được từ tế bào dòng mầm của các loại động vật có vú khác như chuột, đã được ghép lên trên trình tự vùng khung hoạt động ở người.

Kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người

Thuật ngữ "kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người" chỉ kháng thể chứa trình tự của vùng biến đổi của chuỗi nặng và nhẹ của loài không phải là người (ví dụ, chuột nhắt) nhưng trong đó ít nhất một phần của trình tự VH và/hoặc VL đã được thay đổi để "giống người" hơn, nghĩa là giống hơn với trình tự của vùng biến đổi của tế bào

dòng mầm ở người. Do đó, "kháng thể làm cho giống với kháng thể của người" là kháng thể hoặc biến thể, dẫn xuất, chất tương tự hoặc mảnh của nó liên kết đặc hiệu miễn dịch với kháng nguyên quan tâm và chứa vùng khung hoạt động (FR) có trình tự axit amin gần giống như của kháng thể ở người và trình tự axit amin của vùng xác định bổ trợ (CDR) gần như trình tự axit amin của kháng thể không phải của người. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "gần như" khi đề cập đến CDR chỉ CDR có trình tự axit amin giống ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của CDR của kháng thể không phải của người. Kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người gần như tất cả trong số ít nhất một, và thường là hai vùng biến đổi (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv), trong đó tất cả hoặc gần như tất cả các vùng CDR tương ứng với các vùng CDR của globulin miễn dịch không phải ở người (nghĩa là, kháng thể cho) và tất cả hoặc gần như tất cả các vùng khung hoạt động là các vùng khung hoạt động của trình tự phổ biến của globulin miễn dịch ở người. Theo một phương án, kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người cũng chứa ít nhất là một phần của vùng cố định của phân tử globulin miễn dịch (Fc), thường là vùng cố định của phân tử globulin miễn dịch ở người. Theo một số phương án, kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người chứa cả chuỗi nhẹ cũng như ít nhất vùng biến đổi của chuỗi nặng. Kháng thể này cũng có thể bao gồm CH1, vùng khớp nối, các vùng CH2, CH3, và CH4 của chuỗi nặng. Theo một số phương án, kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người chỉ chứa chuỗi nhẹ được nhân hóa. Theo một số phương án, kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người chỉ chứa chuỗi nặng được nhân hóa. Trong phương án cụ thể, kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người chỉ chứa vùng biến đổi được nhân hóa của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng được nhân hóa.

Kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người có thể được lựa chọn từ lớp globulin miễn dịch bất kỳ, bao gồm IgM, IgG, IgD, IgA, và IgE, và isotyp bất kỳ, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4. Kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người có thể chứa các trình tự của nhiều hơn một lớp hoặc một isotyp, và các vùng cố định cụ thể có thể được chọn để tối ưu các chức năng tác động mong muốn sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Các vùng khung hoạt động và các CDR của kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người không cần phải tương ứng một cách chính xác với trình tự gốc, ví dụ CDR của kháng thể cho hoặc khung hoạt động phổ biến có thể được gây đột biến bằng cách thay thế, xen và/hoặc cắt bỏ ít nhất một gốc axit amin sao cho gốc trong CDR hoặc gốc trong khung hoạt động không tương ứng với kháng thể cho hoặc khung hoạt động phổ biến. Tuy nhiên, theo một phương án được ưu tiên, các đột biến này, sẽ không phải là đột biến rộng. Thông thường, ít nhất 80%, tốt hơn nếu ít nhất 85%, tốt hơn nữa nếu ít nhất 90%, và tốt nhất nếu ít nhất 95% các gốc kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người tương ứng với các gốc thuộc trình tự của FR và CDR gốc. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khung hoạt động phổ biến" chỉ vùng khung hoạt động trong trình tự của globulin miễn dịch phổ biến. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "trình tự của globulin miễn dịch phổ biến" chỉ trình tự được tạo thành từ các axit amin (hoặc các nucleotit) xuất hiện nhiều nhất trong họ các trình tự globulin miễn dịch liên quan (xem, ví dụ tài liệu: Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987)). Do đó, "trình tự của globulin miễn dịch phổ biến" có thể chứa "(các) vùng khung hoạt động phổ biến" và/hoặc "(các) CDR phổ biến". Trong họ các globulin miễn dịch, mỗi vị trí trong trình tự phổ biến là vị trí của axit amin xuất hiện nhiều nhất ở vị trí đó trong họ. Nếu hai axit amin có tần xuất xuất hiện tương đương nhau thì chúng cũng có thể có mặt trong trình tự phổ biến.

Giống nhau hoặc tính giống nhau

Thuật ngữ "giống nhau" hoặc "tính giống nhau" được sử dụng trong sáng chế khi đề cập đến hai hoặc nhiều trình tự polypeptit hoặc polynucleotit có thể có nghĩa rằng các trình tự này có % gốc cụ thể giống nhau trên một vùng cụ thể. % này có thể được tính bằng cách làm thẳng tối ưu hai trình tự, so sánh hai trình tự này trên một vùng cụ thể, xác định số vị trí tại đó các gốc giống nhau xuất hiện ở cả hai trình tự để thu được số vị trí tương ứng, chia số vị trí tương ứng này cho tổng số vị trí trong vùng cụ thể đó, và nhân kết quả với 100 thì thu được % mức độ giống về mặt trình tự. Trong trường hợp hai trình tự có chiều dài khác nhau hoặc việc làm thẳng tạo ra một hoặc nhiều đầu so le nhau và

vùng cụ thể được so sánh chỉ bao gồm trình tự đơn thì các gốc trong trình tự đơn này được bao gồm trong mẫu số chứ không phải là tử số khi tính.

Polynucleotit phân lập được

Thuật ngữ "polynucleotit phân lập được" chỉ polynucleotit (ví dụ, polynucleotit hệ gen, ADN bổ trợ, hoặc có nguồn gốc tổng hợp, hoặc một số dạng kết hợp của chúng) do nguồn gốc của nó nên "polynucleotit phân lập được" không gắn với toàn bộ hoặc một phần polynucleotit được phát hiện trong tự nhiên đã tạo ra "polynucleotit phân lập được"; liên kết động với polynucleotit không liên kết với nó trong tự nhiên; hoặc không phát hiện thấy trong tự nhiên dưới dạng một phần của trình tự lớn hơn.

Chất đánh dấu và chất đánh dấu có thể phát hiện được

“Chất đánh dấu” và “chất đánh dấu có thể phát hiện được” như được sử dụng ở đây chỉ nhóm được gắn với kháng thể hoặc chất phân tích làm cho phản ứng giữa kháng thể và chất phân tích phát hiện được, và kháng thể hoặc chất phân tích được đánh dấu gọi là “được đánh dấu để phát hiện được”. Chất đánh dấu có thể tạo ra tín hiệu có thể quan sát được bằng mắt thường hoặc các dụng cụ. Rất nhiều chất đánh dấu khác nhau bao gồm hợp chất tạo tín hiệu như các chất sinh màu, các chất phát ánh sáng huỳnh quang, các chất phát quang hóa học, các chất có hoạt tính phóng xạ, và các chất khác tương tự. Ví dụ đại diện về các chất đánh dấu bao gồm các nhóm có thể tạo ra ánh sáng, ví dụ, các hợp chất acridin, và các nhóm tạo ra ánh sáng huỳnh quang, ví dụ fluorescein. Các chất đánh dấu khác được mô tả ở đây. Về khía cạnh này, bản thân nhóm này có thể không phải là nhóm có thể phát hiện được tuy nhiên nó có thể phát hiện được khi phản ứng với nhóm khác. Việc sử dụng thuật ngữ “được đánh dấu để phát hiện được” được dùng với dự định bao gồm việc đánh dấu này.

Chất đánh dấu thích hợp phát hiện được bất kỳ đã biết trong lĩnh vực có thể được sử dụng. Ví dụ, chất đánh dấu phát hiện được có thể là chất đánh dấu hoạt động phóng xạ (như ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , và ^{33}P), chất đánh dấu enzym (như peroxidaza cải ngựa, alkaline peroxidaza, glucoza 6-phosphat dehydrogenaza, và chất tương tự), chất đánh dấu hóa phát quang (như acridini este, thioeste, hoặc sulfonamid; luminol, isoluminol, phenanthridini

este, và tương tự), chất đánh dấu huỳnh quang (như floesxein (ví dụ, 5-floesxein, 6-carboxyfloesxein, 3'6-carboxyfloesxein, 5(6)-carboxyfloesxein, 6-hexaclo-floesxein, 6-tetraclofloeisxein, floesxein isothioxyanat, và tương tự)), rhodamin, phycobiliprotein, R-phycoerythrin, chấm lượng tử (ví dụ, cadimi selenit có nắp kẽm sulfua), chất đánh dấu đo nhiệt, hoặc chất đánh dấu phản ứng chuỗi polymeraza miễn dịch. Giới thiệu về chất đánh dấu, quy trình đánh dấu và việc phát hiện chất đánh dấu được tìm thấy trong Polak và Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 2nd ed., Springer Verlag, N.Y. (1997), và trong Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1996), là sổ tay và danh mục kết hợp được công bố bởi Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon. Chất đánh dấu huỳnh quang có thể được sử dụng trong FPIA (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5,593,896, 5,573,904, 5,496,925, 5,359,093, và 5,352,803, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Hợp chất acridini có thể được sử dụng làm chất đánh dấu phát hiện được trong thử nghiệm hóa phát quang đồng nhất (xem, ví dụ, Adamczyk et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 1324-1328 (2006); Adamczyk et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4: 2313-2317 (2004); Adamczyk et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 3917-3921 (2004); và Adamczyk et al., *Org. Lett.* 5: 3779-3782 (2003)).

Theo một khía cạnh, hợp chất acridini là acridini-9-carboxamit. Phương pháp để điều chế các acridini 9-carboxamit được mô tả trong tài liệu: Mattingly, J. *Biolumin. Chemilumin.* 6: 107-114 (1991); Adamczyk et al., *J. Org. Chem.* 63: 5636-5639 (1998); Adamczyk et al., *Tetrahedron* 55: 10899-10914 (1999); Adamczyk et al., *Org. Lett.* 1: 779-781 (1999); Adamczyk et al., *Bioconjugat Chem.* 11: 714-724 (2000); Mattingly et al., In *Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications*; Dyke, K. V. Ed.; CRC Press: Boca Raton, pp. 77-105 (2002); Adamczyk et al., *Org. Lett.* 5: 3779-3782 (2003); và Patent Mỹ số 5,468,646, 5,543,524 và 5,783,699.

Một ví dụ khác về hợp chất acridini là este arylic của acridini-9-carboxylat. Ví dụ về este arylic của acridini-9-carboxylat có công thức II là 10-metyl-9-(phenoxycarbonyl)acridini flosulfonat (có bán trên thị trường bởi Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Phương pháp điều chế este arylic của acridini 9-carboxylat được mô tả trong McCapra et al., *Photochem. Photobiol.* 4: 1111-21 (1965); Razavi et al., *Luminescence* 15:

245-249 (2000); Razavi et al., *Luminescence* 15: 239-244 (2000); và Patent Mỹ số 5,241,070.

Các este aryl của acridini-9-carboxylat là một chất chỉ thị phát quang hóa học hiệu quả cho việc tạo ra hydro peroxit trong quá trình oxy hóa chất phân tích bằng ít nhất một enzym oxidaza xét về cường độ tín hiệu và/hoặc tốc độ của tín hiệu. Thời gian phát xạ phát quang hóa học đối với acridini-9-carboxylat aryl este rất nhanh, nghĩa là, chưa đến 1 giây, trong khi đó thời gian phát xạ phát quang hóa học của acridini-9-carboxamit kéo dài trên 2 giây. Tuy nhiên, acridini-9-carboxylat aryl este mất đặc tính phát quang hóa học của nó khi có mặt protein. Do đó, khi sử dụng nó cần loại bỏ protein trong khi tạo tín hiệu và phát hiện. Các phương pháp để tách hoặc loại bỏ protein trong mẫu là đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, siêu lọc, chiết, kết tủa, thẩm tách, sắc ký và/hoặc tiêu hóa (xem, ví dụ tài liệu: Wells, *High Throughput Bioanalytical Sample Preparation. Methods and Automation Strategies*, Elsevier (2003)). Lượng protein được loại bỏ hoặc phân tách từ mẫu thử có thể vào khoảng 40%, khoảng 45%, khoảng 50%, khoảng 55%, khoảng 60%, khoảng 65%, khoảng 70%, khoảng 75%, khoảng 80%, khoảng 85%, khoảng 90%, hoặc khoảng 95%. Chi tiết hơn về acridini-9-carboxylat aryl este và việc sử dụng nó được nêu trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 11/697,835, nộp ngày 9/4/2007. Acridini-9-carboxylat aryl este có thể được hòa tan trong dung môi thích hợp như trong *N,N*-dimethylformamit (DMF) khan đã loại khí hoặc natri cholat khan.

Trình tự liên kết và trình tự peptit liên kết

“Trình tự liên kết” hoặc “trình tự liên kết peptit” chỉ trình tự polypeptit tự nhiên hoặc nhân tạo liên kết với một hoặc nhiều trình tự polypeptit quan tâm (ví dụ, có chiều dài đầy đủ, các mảnh). Thuật ngữ “liên kết” chỉ việc gắn kết giữa trình tự liên kết với trình tự polypeptit quan tâm. Các trình tự polypeptit này tốt hơn là được gắn bằng một hoặc nhiều liên kết peptit. Các trình tự liên kết có thể có chiều dài khoảng từ 4 đến 50 axit amin. Tốt hơn nếu chiều dài của trình tự liên kết nằm trong khoảng từ 6 đến 30 axit amin. Trình tự liên kết tự nhiên có thể được cải biến bằng cách thay thế, bổ sung hoặc loại bỏ axit amin

để tạo ra trình tự liên kết nhân tạo. Ví dụ về trình tự liên kết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: (i) đuôi Histidin (His), như đuôi 6X His (trình tự nêu trong SEQ ID NO: 148), có trình tự axit amin HHHHHH (trình tự nêu trong SEQ ID NO:148), hữu ích làm thụ thể liên kết để hỗ trợ việc phân tách và tinh chế polypeptit và các kháng thể quan tâm; (ii) vị trí phân cắt enterokinaza, như các đuôi His, được dùng để phân tách và tinh chế protein và các kháng thể quan tâm. Thông thường, vị trí phân cắt enterokinaza được dùng cùng với các đuôi His để phân tách và tinh chế protein và các kháng thể quan tâm. Rất nhiều vị trí phân cắt enterokinaza đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ về vị trí phân cắt enterokinaza bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự axit amin DDDDK (trình tự nêu trong SEQ ID NO:149) và các dẫn xuất của chúng (ví dụ, ADDDDK (trình tự nêu trong SEQ ID NO:150), v.v.); (iii) các trình tự hỗn hợp có thể được dùng để liên kết hoặc gắn vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và/hoặc vùng biến đổi của chuỗi nặng của các mảnh có vùng biến đổi mạch đơn. Ví dụ về các trình tự liên kết khác có thể được tìm thấy trong tài liệu: Bird et al., Science 242: 423-426 (1988); Huston et al., PNAS USA 85: 5879-5883 (1988); và McCafferty et al., Nature 348: 552-554 (1990). Các trình tự liên kết cũng có thể được cải biến để có các chức năng bổ sung như gắn vào được chất hoặc gắn vào chất mang rắn. Trong sáng chế, kháng thể đơn dòng, ví dụ có thể chứa trình tự liên kết như đuôi His, vị trí phân cắt enterokinaza, hoặc cả hai.

Protein liên kết đa hóa trị

Thuật ngữ "protein liên kết đa hóa trị" chỉ protein liên kết chứa hai hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên (ở đây cũng được đề cập là "các vùng liên kết kháng nguyên"). Tốt hơn, nếu protein liên kết đa hóa trị được xử lý kỹ thuật để có hai hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên, và thường không phải là kháng thể xuất hiện trong tự nhiên. Thuật ngữ "protein liên kết đa đặc hiệu" chỉ protein liên kết có khả năng liên kết với hai hoặc nhiều các đích liên quan hoặc không liên quan với nhau, bao gồm protein liên kết có khả năng liên kết với hai hoặc nhiều epitop khác nhau của cùng một phân tử đích.

Ngưỡng được xác định trước và mức được xác định trước

"Ngưỡng được xác định trước" và "mức được xác định trước" đề cập chung đến giá trị ngưỡng của thử nghiệm được sử dụng để đánh giá các kết quả về hiệu quả chặn

đoán/tiên đoán/chữa bệnh bằng cách so sánh các kết quả thử nghiệm với ngưỡng/mức được xác định trước, trong đó ngưỡng/mức được xác định trước liên kết hoặc kết hợp với các thông số lâm sàng khác nhau (ví dụ, mức độ trầm trọng của bệnh, sự tiến triển/sự không tiến triển/sự cải thiện, v.v.). Mặc dù phần mô tả của sáng chế có thể đề xuất nhiều mức xác định trước để làm ví dụ, tuy nhiên đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng các giá trị ngưỡng có thể thay đổi tùy thuộc vào bản chất của thử nghiệm miễn dịch (ví dụ, kháng thể được sử dụng v.v.). Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ biết điều chỉnh phần mô tả ở đây cho phù hợp với các thử nghiệm miễn dịch khác để thu được các giá trị ngưỡng riêng cho thử nghiệm miễn dịch đó. Tuy các giá trị chính xác của ngưỡng/mức được xác định trước có thể thay đổi trong các thử nghiệm nhưng các mối tương quan như được mô tả ở đây nên áp dụng.

Thuốc thử xử lý trước

“Thuốc thử xử lý trước”, ví dụ thuốc thử làm tan, kết tủa và/hoặc hòa tan được sử dụng trong thử nghiệm chẩn đoán, như được mô tả ở đây là thuốc thử làm tan tế bào bất kỳ và/hoặc hòa tan chất phân tích bất kỳ có mặt trong mẫu thử nghiệm. Việc xử lý trước có thể không cần thiết đối với tất cả các mẫu như được mô tả tiếp ở đây. Trong số các loại thuốc thử này, thuốc thử hòa tan chất phân tích (ví dụ, RGMa (như RGMa kết hợp màng tế bào, RGMa tan, các mảnh của RGMa kết hợp màng tế bào, các mảnh của RGMa tan, các biến thể của RGMa (RGMa kết hợp màng tế bào, RGMa tan) giải phóng chất phân tích khỏi protein liên kết ngoại sinh bất kỳ có mặt trong mẫu. Thuốc thử xử lý trước có thể đồng nhất (không cần bước tách) hoặc không đồng nhất (cần bước tách). Khi sử dụng thuốc thử xử lý trước đồng nhất, cần loại bỏ protein liên kết với chất phân tích bị kết tủa bất kỳ khỏi mẫu thử nghiệm trước khi tiến hành bước tiếp theo của thử nghiệm. Chất thử xử lý trước tùy ý chứa: (a) một hoặc nhiều dung môi và muối, (b) một hoặc nhiều dung môi, muối và chất tẩy rửa, (c) chất tẩy rửa, (d) chất tẩy rửa và muối, hoặc (e) chất tẩy rửa bất kỳ hoặc hỗn hợp của các chất thử thích hợp để làm tan tế bào và/hoặc làm tan chất phân tích.

Các thuốc thử đối chứng chất lượng

Thuật ngữ “các thuốc thử đối chứng chất lượng” trong phạm vi thử nghiệm miễn dịch và bộ kit được mô tả ở đây bao gồm, nhưng chỉ không giới hạn ở, chất chuẩn hóa, chất đối chứng, và các bảng độ nhạy. “Chất chuẩn hóa” hoặc “tiêu chuẩn” thường được sử dụng (ví dụ, một hoặc nhiều, như rất nhiều) để thiết lập đường cong chuẩn hóa (chuẩn) nhằm nội suy nồng độ chất phân tích như kháng thể hoặc chất phân tích. Theo cách khác, có thể sử dụng một chất chuẩn hóa gần với ngưỡng dương tính/âm tính đã xác định trước. Nhiều chất chuẩn hóa (nghĩa là, nhiều hơn một chất chuẩn hóa hoặc lượng thay đổi của (các) chất chuẩn hóa) có thể được sử dụng kết hợp để xây dựng nên “bảng độ nhạy.”

Kháng thể tái tổ hợp và các kháng thể tái tổ hợp

“Kháng thể tái tổ hợp” và “các kháng thể tái tổ hợp” chỉ các kháng thể được tạo ra bằng một hoặc nhiều bước, bao gồm tách dòng trình tự axit nucleic mã hóa toàn bộ hoặc một phần một hoặc nhiều kháng thể đơn dòng vào trong vectơ biểu hiện thích hợp bằng kỹ thuật tái tổ hợp và sau đó, biểu hiện kháng thể này trong vật chủ thích hợp. Thuật ngữ này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các kháng thể đơn dòng được tạo ra bằng công nghệ tái tổ hợp, các kháng thể khảm, các kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người (toàn bộ hoặc một phần kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người), các cấu trúc đa đặc hiệu hoặc đa hóa trị được tạo ra từ các mảnh kháng thể, các kháng thể hai chức năng, các kháng thể dị tiếp hợp, DVD-Ig®, và các kháng thể khác như được mô tả trong (i). (Miền globulin miễn dịch vùng biến đổi kép và phương pháp tạo ra chúng được mô tả trong tài liệu: Wu, C., et al., *Nature Biotechnology*, 25:1290-1297 (2007)). Thuật ngữ “kháng thể hai chức năng” như được sử dụng ở đây, chỉ kháng thể chứa nhánh đầu tiên có tính đặc hiệu với một vị trí kháng nguyên và nhánh thứ hai có tính đặc hiệu với vị trí kháng nguyên khác, nghĩa là, các kháng thể hai chức năng có tính lưỡng đặc hiệu.

Mẫu, mẫu thử và mẫu bệnh phẩm

“Mẫu”, “mẫu thử” và “mẫu bệnh phẩm” có thể được dùng thay thế cho nhau ở đây. Mẫu như mẫu nước tiểu, huyết thanh, huyết tương, dịch ối, dịch não tủy, tế bào hoặc mô nhau thai, tế bào màng trong, tế bào bạch cầu, hoặc tế bào đơn nhân to, có thể được dùng

trực tiếp khi thu được từ bệnh nhân hoặc có thể được xử lý trước, như bằng cách lọc, chưng cất, chiết, cô, ly tâm, bất hoạt thành phần gây nhiễu, bổ sung chất thử, và các cách khác để cải biến đặc tính của mẫu theo một số cách được thảo luận ở đây hoặc đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các chế phẩm hiệu chuẩn

“Các chế phẩm hiệu chuẩn” chỉ rất nhiều chế phẩm chứa Cys-CRGMA với nồng độ đã biết, trong đó mỗi chế phẩm khác với chế phẩm khác theo bậc nồng độ Cys-CRGMA.

Pha rắn

“Pha rắn” chỉ nguyên liệu bất kỳ không tan, hoặc có thể được làm cho không tan bằng phản ứng sau đó. Pha rắn có thể được chọn theo khả năng hấp dẫn và cố định chất bắt giữ vốn có của nó. Theo cách khác, pha rắn có thể được gắn vào đó chất liên kết có khả năng hấp dẫn và cố định chất bắt giữ. Chất liên kết này có thể ví dụ, bao gồm hợp chất mang điện có điện tích trái dấu so với chính chất bắt giữ hoặc với hợp chất mang điện được dung hợp với chất bắt giữ. Nói chung, chất liên kết có thể là phân tử liên kết bất kỳ (tốt hơn là đặc hiệu) được cố định trên (gắn vào) pha rắn và có khả năng cố định chất bắt giữ thông qua phản ứng tạo liên kết. Chất liên kết khiến liên kết của chất bắt giữ với vật liệu dùng làm pha rắn trở thành gián tiếp trước khi thực hiện thử nghiệm hoặc trong khi thực hiện thử nghiệm. Pha rắn có thể, ví dụ là vật liệu nhựa, nhựa được tạo dẫn xuất, kim loại có từ tính hoặc không có từ tính, thủy tinh hoặc silicon, bao gồm, ví dụ, ống thử nghiệm, lỗ của đĩa vi chuẩn độ, tấm, hạt, vi hạt, chip và các cấu hình khác đã biết đối với người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Liên kết đặc hiệu

“Liên kết đặc hiệu” như được sử dụng ở đây có thể chỉ tương tác của kháng thể, protein, hoặc peptit với các loại hóa chất thứ hai, trong đó tương tác này phụ thuộc vào sự có mặt của một cấu trúc cụ thể (ví dụ, vùng quyết định tính kháng nguyên hoặc epitop) trên các loại hóa chất này; ví dụ, kháng thể nhận biết và liên kết với cấu trúc protein đặc hiệu hơn là các protein thông thường. Nếu kháng thể đặc hiệu với epitop “A”, thì sự có

mặt của phân tử chứa epitop A (hoặc A tự do, không được đánh dấu), trong phản ứng chứa “A” được đánh dấu và kháng thể này sẽ làm giảm lượng A được đánh dấu liên kết với với kháng thể này.

Phân tử liên kết đặc hiệu

“Phân tử liên kết đặc hiệu” là thành phần của cặp liên kết đặc hiệu. Phân tử liên kết đặc hiệu gồm hai phân tử khác nhau, liên kết đặc hiệu hóa học hoặc vật lý với thành phần khác. Do đó, ngoài các cặp liên kết đặc hiệu kháng thể và kháng nguyên của các thử nghiệm miễn dịch thông thường, các cặp liên kết đặc hiệu khác có thể bao gồm biotin và avidin (hoặc streptavidin), các carbohydrat và lectin, các trình tự nucleotit bổ sung, chất hiệu ứng và các phân tử thụ thể, các đồng yếu tố và enzym và chất ức chế enzym, và chất tương tự. Hơn nữa, cặp liên kết đặc hiệu có thể bao gồm các thành viên là chất tương tự của các thành viên liên kết đặc hiệu ban đầu, ví dụ chất tương tự chất phân tích. Các thành viên liên kết đặc hiệu phản ứng miễn dịch, bao gồm các kháng nguyên, các mảnh kháng nguyên, và kháng thể, bao gồm kháng thể đơn dòng và đa dòng cũng như các phức hệ, và các mảnh, trong đó được tách ra hoặc được tạo ra bằng công nghệ tái tổ hợp.

Các điều kiện nghiêm ngặt

“Các điều kiện nghiêm ngặt” được sử dụng ở đây để mô tả việc lai với ADN liên kết chất lọc trong 6x natri clorua/natri xitrat (SSC) ở khoảng 45°C, sau đó rửa một hoặc nhiều lần trong 0,2xSSC/0,1% SDS ở khoảng 50-65°C. Thuật ngữ “trong điều kiện có độ nghiêm ngặt cao” chỉ việc lai với axit nucleic với chất lọc ở 6xSSC ở khoảng 45°C, sau đó rửa một hoặc nhiều lần trong 0,1xSSC/0,2% SDS ở khoảng 68°C, hoặc trong các điều kiện lai nghiêm ngặt khác. Xem, ví dụ tài liệu: Ausubel, F. M. et al., eds., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. và John Wiley & Sons, Inc., New York at pages 6,3. 1-6,3. 6 và 2. 10,3.

Điều trị

Thuật ngữ “điều trị” ở dạng động từ, danh từ ở đây được dùng thay thế cho nhau để mô tả việc làm đảo ngược, làm giảm, hoặc ức chế sự tiến triển của bệnh, hoặc một

hoặc nhiều triệu chứng của bệnh được điều trị. Phụ thuộc vào tình trạng của bệnh nhân thuật ngữ này cũng chỉ việc ngăn ngừa bệnh, và bao gồm ngăn ngừa sự khởi phát của bệnh, hoặc ngăn ngừa các triệu chứng đi kèm với bệnh. Việc điều trị có thể được thực hiện cấp tính hoặc mạn tính. Thuật ngữ cũng chỉ việc làm giảm mức độ trầm trọng của bệnh hoặc các triệu chứng đi kèm với bệnh này trước khi chịu đau đớn do bệnh. Việc ngăn ngừa hoặc làm giảm sự trầm trọng của bệnh trước khi chịu đau đớn do bệnh chỉ việc dùng kháng thể hoặc được phẩm theo sáng chế cho đối tượng mà không phải ở thời điểm dùng bị mắc bệnh. "Ngăn ngừa" cũng chỉ việc ngăn ngừa sự tái phát của bệnh hoặc một hoặc nhiều triệu chứng đi kèm với bệnh này. "Điều trị" và "có tác dụng điều trị" chỉ hoạt động điều trị như được xác định ở đây.

Vết

“Vết” như được sử dụng ở đây chỉ chất phân tích hoặc mảnh của chất phân tích được tiếp hợp với chất đánh dấu, như Cys-CRGMA được tiếp hợp với nhóm phát ánh sáng huỳnh quang, trong đó chất phân tích được tiếp hợp với chất đánh dấu có thể cạnh tranh hiệu quả với chất phân tích ở các vị trí trên kháng thể đặc hiệu với chất phân tích.

Biến thể

“Biến thể” như được sử dụng ở đây chỉ peptit hoặc polypeptit khác về trình tự axit amin do sự xen vào, bỏ bớt, hoặc thay thế bảo toàn các axit amin, nhưng vẫn giữ lại, ít nhất là hoạt tính sinh học. Các ví dụ đại diện về “hoạt tính sinh học” bao gồm khả năng liên kết với một kháng thể đặc hiệu hoặc khả năng tăng cường đáp ứng miễn dịch. Biến thể cũng được sử dụng ở đây để mô tả trình tự axit amin gần giống với protein tham chiếu với trình tự axit amin mà giữ lại ít nhất là hoạt tính sinh học. Sự thay thế bảo toàn axit amin, nghĩa là, thay thế một axit amin bằng axit amin khác có các đặc tính tương tự (ví dụ, tính ưa nước và mức độ và sự phân bố các vùng tích điện) được nhận biết trong lĩnh vực kỹ thuật như thường liên quan đến các thay đổi nhỏ. Các thay đổi này có thể được xác định một phần bằng cách đánh giá chỉ số nước của axit amin như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (Kyte et al., J. Mol. Biol. 157: 105-132 (1982)). Chỉ số nước của axit amin dựa trên đánh giá tính kỵ nước và điện tích của nó. Trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rằng

các axit amin có chỉ số nước tương tự nhau có thể được thay thế cho nhau và vẫn giữ lại chức năng của protein. Theo một khía cạnh, các axit amin có chỉ số nước ± 2 được dùng để thay thế cho nhau. Tính ưa nước của axit amin cũng được sử dụng để phát triển các thay thế sẽ tạo ra protein giữ được chức năng sinh học. Việc đánh giá tính ưa nước của axit amin trong phạm vi peptit cho phép tính toán mức độ ưa nước trung bình cục bộ lớn nhất của peptit này, đây là một phương pháp hữu ích đã biết để thiết lập mối tương quan giữa tính kháng nguyên và tính sinh miễn dịch (Patent Mỹ số 4,554,101). Việc thay thế axit amin bằng axit amin có chỉ số ưa nước tương tự có thể tạo ra các peptit giữ được chức năng sinh học, ví dụ tính sinh miễn dịch, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Việc thay thế lẫn nhau được thực hiện đối với các axit amin có chỉ số ưa nước trong khoảng ± 2 . Cả chỉ số kỵ nước lẫn chỉ số ưa nước của axit amin đều bị ảnh hưởng bởi một chuỗi bên (mạnh nhánh) cụ thể của axit amin này. Phù hợp với kết quả quan sát này, các thay thế axit amin tương hợp với chức năng sinh học phụ thuộc vào tính tương tự tương đối của chúng, và cụ thể là các chuỗi bên của chúng, như được biểu thị bằng tính kỵ nước, tính ưa nước, điện tích, kích thước, và các đặc tính khác. "Biến thể" có thể cũng được sử dụng để chỉ mảnh có phản ứng kháng nguyên của kháng thể kháng RGMa khác về mặt trình tự axit amin với mảnh tương ứng của kháng thể kháng RGMa nhưng vẫn có phản ứng với kháng nguyên và cạnh tranh liên kết với RGMa với mảnh tương ứng của kháng thể kháng RGMa. "Biến thể" có thể cũng được sử dụng để mô tả polypeptit hoặc mảnh của nó đã qua nhiều bước xử lý khác nhau như bằng cách thủy phân, phosphoryl hóa, hoặc các cải biến khác sau dịch mã và vẫn giữ được tính phản ứng với kháng nguyên của nó.

Vector

"Vector" chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác liên kết với nó. Một loại vector là "plasmid", vector này chỉ vòng ADN sợi kép mạch vòng, trong đó các mảnh ADN bổ sung có thể được nối vào trong vòng ADN này. Một loại vector khác là vector virus, trong đó các mảnh ADN bổ sung có thể được nối vào trong hệ gen virus. Một số vector nhất định có khả năng tự sao chép trong tế bào vật chủ mà chúng được đưa vào (ví dụ, các vector vi khuẩn có điểm khởi đầu sao chép của vi khuẩn và các vector động vật

có vú episom). Các vector khác (ví dụ, các vector động vật có vú không phải episom) có thể được gài vào trong hệ gen của tế bào vật chủ khi đưa vào trong tế bào vật chủ, và nhờ đó, được sao chép cùng với hệ gen của vật chủ. Ngoài ra, một số vector nhất định có khả năng điều khiển sự biểu hiện của các gen liên kết động với chúng. Các vector này ở đây gọi là "các vector biểu hiện tái tổ hợp" (hoặc đơn giản là "các vector biểu hiện"). Nhìn chung, các vector biểu hiện được sử dụng trong kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng plasmid. "Plasmid" và "vector" có thể được sử dụng thay thế cho nhau, và plasmid là dạng vector thường được sử dụng nhất. Tuy nhiên, các dạng vector biểu hiện khác như các vector virus (ví dụ, các retrovirus không sao chép, adenovirus và các virus kết hợp với virus adeno) có các chức năng tương đương có thể được sử dụng. Về khía cạnh này, các phiên bản ARN của vector khác (bao gồm các vector virus ARN) có thể cũng được sử dụng trong sáng chế.

Đối với việc trích dẫn khoảng số liệu ở đây, mỗi số trong khoảng có cùng độ chính xác cũng được dự định bao gồm. Ví dụ, đối với khoảng 6-9, số 7 và 8 được dự định ngoài 6 và 9, và đối với 6,0-7,0, số 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, và 7,0 cũng được dự định bao gồm.

Kháng thể kháng RGMa

Sáng chế đề cập đến kháng thể để sử dụng trong các phương pháp điều trị các bệnh và rối loạn thoái hóa sợi trục thần kinh. Một số kháng thể được mô tả ở đây đã được chọn để liên kết với RGMa, đồng thời giảm thiểu hoặc loại bỏ phản ứng với phân tử dẫn dắt (Repulsive Guidance Molecule c - RGMc). Ví dụ, xem Bảng 4, trong đó kháng thể đơn dòng thu được bằng công nghệ PROfusion AE12-1 và các biến thể của AE12-1 (AE12-1F, AE12-1H, AE12-1L, AE12-1V, AE12-1I, AE12-1K, và AE12-1Y) có hoạt tính trung hòa RGMa mà không phản ứng chéo với RGMc (mức phát hiện thấp). Do các kháng thể phát triển dựa trên RGMa có thể thường phản ứng chéo với RGMc và ở liều dùng trong tĩnh mạch cao có thể dẫn đến hiện tượng tích lũy sắt trong tế bào gan nên các kháng thể liên kết đặc hiệu với RGMa được mô tả ở đây có lợi ích trong điều trị bệnh. Ngoài ra, tính chọn lọc cao của kháng thể này đem tới khoảng liều điều trị rộng.

RGMa

RGMa người, có thể tồn tại dưới dạng protein gồm 450 axit amin có peptit tín hiệu ở đầu N được phỏng đoán gồm 47 axit amin và tín hiệu gắn GPI ở đầu C, đầu tiên được cho là điều chỉnh việc dẫn các axon võng mạc bằng liên kết với neogenin, một protein xuyên màng cũng là một thụ thể của netrin, mà là các phân tử được tiết có vai trò trong việc phát triển noron và sự sống sót của tế bào. Ngoài việc điều hòa sự dẫn axon võng mạc, RGMa được chỉ ra là ức chế sự phát triển axon ở chuột thành thục. Xem tài liệu: Yamashita et al., *Current Opinion in Neurobiology* (2007)17:1-6. Phù hợp với các cơ chế này, sự biểu hiện RGMa tăng lên sau khi cột sống bị tổn thương, trong thời gian này sự ức chế RGMa làm tăng sự phát triển của axon. Xem tài liệu: Kitayama et al., *PLoS One*, (2011) Vol. 6 (9), trang 1-9; và Hata et al., *J. Cell Biol.* (2006)173:47-58. Sự biểu hiện RGMa cũng được điều hòa tăng tại vị trí thương tổn và ở mô sẹo ở người mắc bệnh thiếu máu cục bộ tập trung ở não hoặc tổn thương não do chấn thương. Xem tài liệu: Yamashita et al., *Current Opinion in Neurobiology* (2007)17:1-6; Schwab et al., *Arch Neurol* (2005)22:2134-2144; và Muramatsu et al., *Nat. Medicine* (2011) 17:488-94.

RGMa có thể có trình tự axit amin sau:

MQPPRERLVV TGRAGWMGMG RGAGRSALGF WPTLAFL LCS
 FPAATSPCKI LKCNSEFWSA TSGSHA PASDDTPEFC AALRSYALCT
 RRTARTCRGD LAYHSAVHGI EDLMSQHNCS KDGPTSQPRL RTLPPAGDSQ
 ERSDSPEICH YEKS FHKHSA TPNYTHCGLF GDPHLRTFTD RFQTCKVQGA
 WPLIDNNYLN VQVTNTPVLP GSAATATSKL TIFKNFQEC VDQKVYQAEM
 DELPAAFVDG SKNGGDKHGA NSLKITEKVS GQHVEIQAKY IGT TIVVRQV
 GRYLTFVRM PEEVVNAVED WDSQGLYLCL RGCPLNQID FQAFHTNAEG
 TGARRLAAAS PAPTAPETFP YETAVAKCKE KLPVEDLYYQ ACVFDLLTTG
 DVNFTLAAYY ALEDVKMLHS NKDKLHLYER TRDLPGRAAA GLPLAPRPLL
 GALVPLLALL PVFC (SEQ ID NO:65). RGMa có thể là mảnh hoặc biến thể của trình tự
 nêu trong SEQ ID NO:65.

Mảnh của RGMa có thể có chiều dài từ 5 đến 425 axit amin, 10 đến 400 axit amin, từ 50 đến 350 axit amin, từ 100 đến 300 axit amin, từ 150 đến 250 axit amin, từ 200 đến 300 axit amin, hoặc từ 75 đến 150 axit amin. Mảnh này có thể chứa nhiều axit amin liên kề nhau từ trình tự nêu trong SEQ ID NO:65.

Mảnh của RGMa có thể có trình tự axit amin sau:

PCKI LKCNSEFWSA TSGSHA PASDDTPEFC AALRSYALCT
RRTARTCRGD LAYHSAVHGI EDLMSQHNCS KDGPTSQPRL RTLPPAGDSQ
ERSDSPEICH YEKS FHKHSA TPNYTHCGLF GD (SEQ ID NO:66), tương ứng với các
axit amin 47-168 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:65. Mảnh RGMa có thể là mảnh của
trình tự nêu trong SEQ ID NO:66. Mảnh RGMa có thể là biến thể của trình tự nêu trong
SEQ ID NO:66. Mảnh RGMa có thể có trình tự RGM sau:
PCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (trình tự nêu trong SEQ ID NO:74).

RGMa có thể tồn tại dưới dạng liên kết với màng tế bào và/hoặc dưới dạng tan.

Kháng thể nhận biết RGMa

Kháng thể này là kháng thể liên kết với RGMa, mảnh của nó, hoặc biến thể của nó. Ngoài ra, các mảnh kháng thể kháng RGMa, các biến thể và các dẫn xuất của nó được bộc lộ ở đây cũng như kháng thể kháng RGMa này là kháng thể đa dòng hoặc đơn dòng, kháng thể khảm, kháng thể mạch đơn, kháng thể có ái lực được làm thành thực, kháng thể người, kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người, kháng thể hoặc mảnh kháng thể của người có chiều dài đầy đủ, như mảnh Fab, hoặc hỗn hợp của chúng. Mảnh kháng thể hoặc dẫn xuất của nó có thể chứa các mảnh $F(ab')_2$, Fv hoặc scFv. Dẫn xuất của kháng thể có thể được tạo ra bằng phương pháp mô phỏng peptit. Ngoài ra, các kỹ thuật được mô tả dùng để tạo ra kháng thể mạch đơn có thể được điều chỉnh để tạo ra kháng thể mạch đơn.

Các kháng thể của người có thể thu được bằng công nghệ biểu hiện thể thực khuẩn hoặc sử dụng chuột chuyển gen biểu hiện các gen globulin miễn dịch ở người. Kháng thể của người có thể được tạo ra dưới dạng đáp ứng miễn dịch *in vivo* ở người và được phân

lập. Xem, ví dụ tài liệu: Funaro et al., BMC Biotechnology, 2008(8):85. Do đó, kháng thể này có thể là sản phẩm của người và không phải ở động vật. Do nó có nguồn gốc từ người nên nguy cơ phản ứng trên chính kháng nguyên này có thể được giảm thiểu. Theo cách khác, thư viện biểu hiện nấm men và công nghệ biểu hiện được dùng để chọn lọc và phân lập các kháng thể kháng RGMa ở người. Ví dụ, các thư viện gồm các mảnh (scFv) biến đổi ở người tự nhiên có thể được dùng để chọn lọc kháng thể kháng RGMa ở người. Động vật chuyển gen có thể được dùng để biểu hiện các kháng thể của người.

Các kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người có thể là các phân tử kháng thể từ kháng thể của các loài khác người liên kết với kháng nguyên mong muốn có một hoặc nhiều từ các loài không phải là người và các vùng khung hoạt động từ phân tử globulin miễn dịch ở người.

Kháng thể này khác với các kháng thể đã biết ở chỗ nó có nhiều chức năng sinh học khác với các chức năng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế không chỉ nhận biết và liên kết với RGMa mà chúng còn đặc trưng bởi việc có hoạt tính sinh học bổ sung, ví dụ, khả năng làm giảm các dấu hiệu lâm sàng đi kèm với các bệnh liên quan đến bệnh thoái hóa thần kinh.

Kháng thể này có thể liên kết với RGMa. Kháng thể RGMa đặc hiệu với RGMa có thể chứa các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 và 5; SEQ ID NO:2-4 và 6-8 hoặc SEQ ID NO:2-4, 6, 7, và 73. Kháng thể này liên kết với các trình tự nêu trong SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:74, hoặc mảnh hoặc biến thể của nó. Kháng thể này có thể nhận biết và liên kết đặc hiệu với epitop có mặt trên polypeptit RGMa hoặc biến thể như được mô tả ở trên. Epitop có thể là các trình tự nêu trong SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:74, hoặc biến thể của nó.

Đặc tính liên kết của kháng thể

Kháng thể này có thể liên kết đặc hiệu miễn dịch với RGMa (trình tự nêu trong SEQ ID NO:65), SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:74, mảnh của nó, hoặc biến thể của nó và có k_{off} (hoặc k_d) ít nhất bằng $1,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, ít nhất bằng $1,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, ít nhất bằng $1,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$,

ít nhất bằng $1,0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ hoặc có k_{off} (hoặc k_d) nằm trong khoảng $1,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ đến $1,0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, từ $1,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ đến $1,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ hoặc từ $1,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ đến $1,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Mảnh này có thể là trình tự nêu trong SEQ ID NO:66 hoặc SEQ ID NO:74.

Kháng thể có thể liên kết đặc hiệu miễn dịch với RGMa (trình tự nêu trong SEQ ID NO:65), SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:74, mảnh của nó, hoặc biến thể của nó và có k_{on} (hoặc k_a) ít nhất bằng $2,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ít nhất bằng khoảng $2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ít nhất bằng khoảng $3,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ít nhất bằng khoảng $5,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ít nhất bằng khoảng $1,25 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ít nhất bằng khoảng $1,35 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ít nhất bằng khoảng $1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ít nhất bằng khoảng $1,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, hoặc có k_{on} (hoặc k_a) nằm trong khoảng từ $5,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ đến $1,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, khoảng từ $3,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ đến $1,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, khoảng từ $2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ đến $1,25 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, khoảng từ $2,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ đến $1,35 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Mảnh này có thể là trình tự nêu trong SEQ ID NO:66 hoặc SEQ ID NO:74.

Cấu trúc của kháng thể

Các CDR của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

Kháng thể theo sáng chế có thể liên kết đặc hiệu miễn dịch với RGMa (trình tự nêu trong SEQ ID NO:65), SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:74, mảnh của nó, hoặc biến thể của nó và chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được thể hiện trong Bảng 1. Kháng thể theo sáng chế có thể liên kết đặc hiệu miễn dịch với RGMa, mảnh của nó, hoặc biến thể của nó và chứa một hoặc nhiều trình tự CDR của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ cũng được thể hiện trong Bảng 1. Chuỗi nhẹ của kháng thể này có thể là chuỗi kappa hoặc chuỗi lambda. Ví dụ, xem bảng 1.

Sáng chế cung cấp axit nucleic phân lập được mã hóa kháng thể liên kết đặc hiệu miễn dịch với RGMa, mảnh của nó, hoặc biến thể của nó. Axit nucleic phân lập được có thể chứa trình tự nucleotit mã lai, trong điều kiện nghiêm ngặt, với phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể chứa trình tự CDR của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1: Danh sách các trình tự axit amin của vùng VH và VL của kháng thể đơn dòng kháng RGMa ở người có chiều dài đầy đủ (AE12-1 đến AE12-8, AE12-13, AE12-15, AE12-20, AE12-21, AE12-23, và AE12-24).

PROTEIN VÙNG	SEQ ID NO.	Trình tự
AE12-1 (VH)	1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAS GYTFTSHGISWVRQAPGQGLDWMG WISPYSGNTNYAQLQGRVTMTTD TSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR VGSGPYYYMDVWGQGLTVTVSS
AE12-1 (VH) CDR-H1	2	SHGIS
AE12-1 (VH) CDR-H2	3	WISPYSGNTNYAQLQGG
AE12-1 (VH) CDR-H3	4	VGSGPYYYMDV
AE12-1 (VL) (chuỗi Lambda)	5	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTG TSSSVGDSIYVSWYQQHPGKAPK LMLYDVTKRPSGVPDRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCCSY AGTDTLFGGGTKVTVL
AE12-1 (VL) CDR-L1	6	TGTSSSVGDSIYVS
AE12-1 (VL) CDR-L2	7	DVTKRPS
AE12-1 (VL) CDR-L3	8	CSYAGTDTL
AE12-2 (VH)	9	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYDINWVRQATGQG LEWMGWMNPNSGNTGYAQLKFG GRVTMTNRTSISTAYMELSSLRSE DTAVYYCARSTSLSVWGQGLTVT VSS
AE12-2 (VH) CDR-H1	10	SYDIN
AE12-2 (VH) CDR-H2	11	WMNPNSGNTGYAQLKFG
AE12-2 (VH) CDR-H3	12	STLSV
AE12-2 (VL) (chuỗi Lambda)	13	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGD KLGDYACWYQQKPGQSPVLVIY QDSKRPSGIPKRFSGSNSGDTATLT ISGTQAMDEADYYCQAWDSSTGV FGPGTKVTVL
AE12-2 (VL) CDR-L1	14	SGDKLGDYAC
AE12-2 (VL) CDR-L2	15	QDSKRPS
AE12-2 (VL) CDR-L3	16	QAWDSSTGV
AE12-3 (VH)	17	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCA ASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVAVISYDGSNKYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARERVYSSGKEGYYYG MDVWGQGTMTVTVSS
AE12-3 (VH) CDR-H1	18	DYAMH
AE12-3 (VH) CDR-H2	19	VISYDGSNKYYADSVKG
AE12-3 (VH) CDR-H3	20	ERVYSSGKEGYYYGMDV
AE12-3 (VL) (chuỗi Lambda)	21	QSGLTQPPSVSAAPGQRTISCTG SGSNIGAGYGVHWYQQLPATAPK ILYGDYNRPSGVPDRFSGSRSGTS ASLTITGLQAEDEADYYCQSYDNS LRGVLFGGGTKLTVL
AE12-3 (VL) CDR-L1	22	TGSGSNIGAGYGVH
AE12-3 (VL) CDR-L2	23	GDYNRPS

AE12-3 (VL) CDR-L3	24	QSYDNSLRGVL
AE12-4 (VH)	25	EVQLVESGGGVVQPGTSL RLSCAASGFPFSSYGMHW VRQAPGKGLEWVAAISG DGILKYYTDSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNNLSGEDTG LYYCARNYDNSLDYWGQGT LTVSS
AE12-4 (VH) CDR-H1	26	SYGMH
AE12-4 (VH) CDR-H2	27	AISGDGILKYYTDSVKG
AE12-4 (VH) CDR-H3	28	NYDNSLDY
AE12-4 (VL) (chuỗi Lambda)	29	QPVLTSQSPSVASLGASVKV TCTLSSGHSAYAIWHQQP EKGPRLMKVNSDGSNKG GDGVPDRFSGSSGAERYL IISGLQSEDEADYYCQTWG PGIRVFGGGTKLTVL
AE12-4 (VL) CDR-L1	30	TLSSGHSAYAIA
AE12-4 (VL) CDR-L2	31	VNSDGSNKG
AE12-4 (VL) CDR-L3	32	QTWGPGIRV
AE12-5 (VH)	33	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV VSGHSLSELTIHVVRQAPGK MGGFDPEDGRGTYAPNFRG TETSTDTAYMELSLRSEDA VYCATLLGEYDSYFDLWGR GTLTVSS
AE12-5 (VH) CDR-H1	34	ELTIH
AE12-5 (VH) CDR-H2	35	GFDPEDGRGTYAPNFRG
AE12-5 (VH) CDR-H3	36	LLGEYDSYFDL
AE12-5 (VL) (chuỗi Kappa)	37	DVVMTQSPDFQSVTPEDKV TICR ASQSIGSLHWYQKPK DQSPKLLI KYASQSIGVPS RFSGSGSGTDFTL TINS LEAEDAATYYCHQSSSLPY T FGQGTKLEIK
AE12-5 (VL) CDR-L1	38	RASQSIGSLH
AE12-5 (VL) CDR-L2	39	YASQSIG
AE12-5 (VL) CDR-L3	40	HQSSSLPYT
AE12-6 (VH)	41	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASG YIFTNYDIAWVRQ APGQGLEWMGWM NPDSGNT GFVQKFKGRVTATSNITD IT AYMELSSLTSEDTAVYYC ARDRFGSGY DLDHWGQGT LTVSS
AE12-6 (VH) CDR-H1	42	NYDIA
AE12-6 (VH) CDR-H2	43	WMNPDSGNTGFVQKFKG
AE12-6 (VH) CDR-H3	44	DRFGSGYDLDH
AE12-6 (VL) (chuỗi Lambda)	45	SYELTQPPSVSVAPGQTARIT CGNNIGS KSVHWYQKPKGP QAPVLVYDDSDRPSG IPE RFSGSNSGNTATLTISRVEA GDEADY YCQVWGSSSDHYV FGTGTKTVL
AE12-6 (VL) CDR-L1	46	GGNNIGSKSVH
AE12-6 (VL) CDR-L2	47	DDSDRPS
AE12-6 (VL) CDR-L3	48	QVWGSSSDHYV
AE12-7 (VH)	49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGF TSSSYAMTWVRQ APGKGLEWVSGISGS GESTY YADSVKGRFTISRDNKNTLY LQ MNSLRVEDTAIYYCARQ GYGAHDYWG QGT LTVSS

AE12-7 (VH) CDR-H1	50	SYAMT
AE12-7 (VH) CDR-H2	51	GISGSGESTYYADSVKG
AE12-7 (VH) CDR-H3	52	QGYGAHDY
AE12-7 (VL) (chuỗi Lambda)	53	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGASSNVG SNRVNWYQQFPGMAPKLLIYSNNQRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCA AWDDSLNGYVFGTGTKVTVL
AE12-7 (VL) CDR-L1	54	SGASSNVGSNRVN
AE12-7 (VL) CDR-L2	55	SNNQRPS
AE12-7 (VL) CDR-L3	56	AAWDDSLNGYV
AE12-8 (VH)	57	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFD DYAMHWVRQAPGKGLEWVSLISWDGG STYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCAKDIPKVGGSYGYG ALGYWGQGPVTVSS
AE12-8 (VH) CDR-H1	58	DYAMH
AE12-8 (VH) CDR-H2	59	LISWDGGSTYYADSVKG
AE12-8 (VH) CDR-H3	60	DIPKVGGSYGYGALGY
AE12-8 (VL) (chuỗi Lambda)	61	SYELTQPPSVSVAPQTARITCGGNNIGD ISVHWYQQKSGQAPMLVHDDSDRPSG IPERFSGSNSGSSATLTISRVEAGDEAD YHCQVWDSGSGHHVFGTGTKVTVL
AE12-8 (VL) CDR-L1	62	GGNNIGDISVH
AE12-8 (VL) CDR-L2	63	DDSDRPS
AE12-8 (VL) CDR-L3	64	QVWDSGSGHHV
AE12-13 (VH)	91	EVQLQESGAGLLKPSETLSLTCVYGG SFGSYYSWIRQPPGKGLEWIGEINHS GSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARDGAGVFDLW GRGTLVTVSS
AE12-13 (VH) CDR-H1	92	GYYSWS
AE12-13 (VH) CDR-H2	93	EINHSGSTNYPNPSLKS
AE12-13 (VH) CDR-H3	94	DDGAGVFDL
AE12-13 (VL) (chuỗi Kappa)	95	DIQLTQSPSSLSASVGDGVTITCQASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASN LETGPVSRFSGSGSGTFFTLTINNLQPE DFATYYCQQSGNTPWTFGQGTKVEINR
AE12-13 (VL) CDR-L1	96	QASQDISNYLN
AE12-13 (VL) CDR-L2	97	DASNLET
AE12-13 (VL) CDR-L3	98	QQSGNTPWT
AE12-15 (VH)	99	EVQLVQSGAEVKEPGASVKVSCA SGYTFTDYYIQWVRQAPGHGLEWM GWINPKTGGTNYLQKFQGRVTMTR DTSTRTAYMELSSLRSDDTAFYYCV REDMNTVLATSWFDPWGQGLTVTVSS
AE12-15 (VH) CDR-H1	100	DYYIQ
AE12-15 (VH) CDR-H2	101	WINPKTGGTNYLQKFQG
AE12-15 (VH) CDR-H3	102	EDMNTVLATSWFDP
AE12-15 (VL) (chuỗi Lambda)	103	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGNQ LGHKFASWYQQKPGQSPVVIYED KKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISG TQAMDEADYYCQVWDVITDHYVF GTGTKVTVLG
AE12-15 (VL) CDR-L1	104	SGNQLGHKFAS
AE12-15 (VL) CDR-L2	105	EDKKRPS
AE12-15 (VL) CDR-L3	106	QVWDVITDHYV
AE12-20 (VH)	107	EVQLVQSGSEVKKPGASVKLSCKT

		SGYTFTNSAIHWVRQAPGQRLEWM GWINAGNGNTKYSQKFQGRVTITR DTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCA WAYCGGDCYSLDYWGQGLTVTVSS
AE12-20 (VH) CDR-H1	108	NSAIH
AE12-20 (VH) CDR-H2	109	WINAGNGNTKYSQKFQG
AE12-20 (VH) CDR-H3	110	AYCGGDCYSLDY
AE12-20 (VL) (chuđi Kappa)	111	DIQVTQSPSSLAASVGDRVTITCQAS QDISNYLNWYQQRPGKAPKLLIYDA SNLETGVPPRFSGDGSHTFSFTITNV QPEDVGTYCQYDSLPLTFGQGR LEIKR
AE12-20 (VL) CDR-L1	112	QASQDISNYLN
AE12-20 (VL) CDR-L2	113	DASNLET
AE12-20 (VL) CDR-L3	114	QQYDSLPLT
AE12-21 (VH)	115	EVQLLESGGDLVRPGGSLRLTCEGSG FNFFTQTIHWVRQAPGKLEWVASIS SDSNYIYHADSLKGRFTVSRDNAQDS VFLQMNSLRVEDTAVYYCARDILLEP LAPHYYYGLDVWGQGTITVTVSS
AE12-21 (VH) CDR-H1	116	TQTIH
AE12-21 (VH) CDR-H2	117	SISSDSNYIYHADSLKG
AE12-21 (VH) CDR-H3	118	DILLEPLAPHYYYGLDV
AE12-21 (VL) (chuđi Kappa)	119	DIQVTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QPISTYVNWYQKPGKAPKLLIYDA STLEIGVPSRISGSGSGTDFTFITSLQ PEDIATYYCQYDNFPLTFGGGTV DIKR
AE12-21 (VL) CDR-L1	120	RASQPISTYVN
AE12-21 (VL) CDR-L2	121	DASTLEI
AE12-21 (VL) CDR-L3	122	QQYDNFPLT
AE12-23 (VH)	123	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISGYYWSWIRQSPGKLEWIGEIFH TGRTYYNPSLRSRLTISVDTSKNQFSL KLSSLTAADTAVYYCARDSAFGSFD YWGQGLTVTVSS
AE12-23 (VH) CDR-H1	124	GYYSWS
AE12-23 (VH) CDR-H2	125	EIFHTGRTYYNPSLRS
AE12-23 (VH) CDR-H3	126	DSAFGSFDY
AE12-23 (VL) (chuđi Kappa)	127	DIRVTQSPSSLSASVGDRVTITCQAN EDISIYLNWYQQRPGKAPKLLIYDA SNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFITSS LQPEDFATYYCQYHTYPFTFGGGT KVDIKR
AE12-23 (VL) CDR-L1	128	QANEDISIYLN
AE12-23 (VL) CDR-L2	129	DASNLET
AE12-23 (VL) CDR-L3	130	QQYHTYPFT
AE12-24 (VH)	131	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTNCVSG GSISSYYWSWIRQPPGKLEWIGNIYY SGSTNYNPSLKSRTISVDTSKSKQFSLK LSSVTAADTAVYYCARALDFWSGQY FDYWGQGLTVTVSS
AE12-24 (VH) CDR-H1	132	SYYSWS
AE12-24 (VH) CDR-H2	133	NIYYSGSTNYNPSLKS
AE12-24 (VH) CDR-H3	134	ALDFWSGQYFDY
AE12-24 (VL) (chuđi Kappa)	135	DIVMTQTPSSLSASVGDRVTITCQASQD ISDYLNWYQKPGKAPKLLIYDASTLE

		SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDF ATYYCQQSYSIPPTFGPGTRLEIKR
AE12-24 (VL) CDR-L1	136	QASQDISDYLN
AE12-24 (VL) CDR-L2	137	DASTLES
AE12-24 (VL) CDR-L3	138	QQSYSIPT

Kháng thể theo sáng chế hoặc biến thể hoặc dẫn xuất của nó có thể chứa một hoặc nhiều trình tự axit amin có mức độ giống lớn hơn 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, hoặc 50% với một hoặc nhiều trình tự nêu trong SEQ ID NO:1-64 và 67-73. Kháng thể theo sáng chế hoặc biến thể hoặc dẫn xuất của nó có thể được mã hóa bằng một hoặc nhiều trình tự axit nucleic có mức độ giống lớn hơn 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, hoặc 50% với một hoặc nhiều trình tự nêu trong SEQ ID NO:1-64 và 67-73. Mức độ giống và tương đồng của polypeptit có thể được xác định, ví dụ bằng thuật toán trong báo cáo: Wilbur, W. J. và Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 726-730 (1983). Kháng thể được mô tả ở đây, biến thể hoặc dẫn xuất của nó có thể được mã hóa bằng axit nucleic mà lai trong điều kiện nghiêm ngặt với bộ thể của một hoặc nhiều trình tự nêu trong SEQ ID NO:3-42. Kháng thể được mô tả ở đây, biến thể hoặc dẫn xuất của nó có thể được mã hóa bằng axit nucleic mà lai trong các điều kiện có độ nghiêm ngặt cao với bộ thể của một hoặc nhiều axit nucleic mã hóa một hoặc nhiều trình tự nêu trong SEQ ID NO:1-64 và 67-73.

Kháng thể này có thể chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:8, trong đó gốc Cys của trình tự nêu trong SEQ ID NO:8 được thay thế cho axit amin khác. Kháng thể này có thể chứa các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 và 5, hoặc 2-4 và 6-8, trong đó gốc Cys của trình tự nêu trong SEQ ID NO:8 được thay thế cho axit amin khác, hoặc trong đó gốc Cys ở vị trí 91 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:5 được thay thế bằng axit amin khác. Gốc Cys ở vị trí 91 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:5 có thể được thế bằng phenylalanin, histidin, leuxin, valin, isoleuxin, lysin, hoặc tyrosin, chẳng hạn. Gốc Cys của trình tự nêu trong SEQ ID NO:8 có thể được thế bằng phenylalanin (xem trình tự nêu trong SEQ ID NO:67), histidin (xem trình tự nêu trong SEQ ID NO:68), leuxin (xem trình tự nêu trong SEQ ID NO:69), valin (xem trình tự nêu trong SEQ ID NO:70), isoleuxin (xem trình tự nêu trong SEQ ID NO:71), lysin (xem trình tự nêu trong SEQ ID NO:72), hoặc tyrosin (xem trình tự nêu trong SEQ ID NO:73), chẳng hạn. Xem Bảng 2.

Kháng thể theo sáng chế có thể là nhóm phân tử IgG, IgE, IgM, IgD, IgA và IgY (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2) hoặc phân nhóm của chúng. Ví dụ, kháng thể này có thể là phân tử IgG1 có trình tự vùng cố định sau:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTCP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK (SEQ ID NO:140).

Vùng cố định nêu trên trong SEQ ID NO:140 chứa hai (2) đột biến của trình tự vùng cố định kiểu đại ở vị trí 234 và 235. Cụ thể, các đột biến này là thay đổi leuxin thành alanin ở vị trí 234 và 235 (chúng được gọi là đột biến “LLAA”). Các đột biến này được thể hiện ở trên bằng cách in đậm và gạch chân. Mục đích của các đột biến này là loại bỏ các chức năng tác động.

Theo cách khác, phân tử IgG1 có thể có trình tự vùng cố định nêu trên (SEQ ID NO:140) chứa một hoặc nhiều đột biến. Ví dụ, trình tự vùng cố định của SEQ ID NO:140 có thể chứa đột biến ở axit amin 250 trong đó threonin được thay thế bằng glutamin (trình tự nêu trong SEQ ID NO:141), đột biến ở axit amin 428 trong đó methionin được thay thế bằng leuxin (trình tự nêu trong SEQ ID NO:142) hoặc các đột biến ở axit amin 250 trong đó threonin được thay thế bằng glutamin và đột biến ở axit amin 428 trong đó methionin được thay thế bằng leuxin (trình tự nêu trong SEQ ID NO:143) như được thể hiện trong Bảng 2A.

Theo cách khác, phân tử IgG1 có thể chứa chuỗi nặng chứa: AE12-1 (VH) CDR-H1 (trình tự nêu trong SEQ ID NO:2), AE12-1 (VH) CDR-H2 (trình tự nêu trong SEQ ID NO:3), AE12-1 (VH) CDR-H3 (trình tự nêu trong SEQ ID NO:4) và chuỗi nhẹ chứa: AE12-1 (VL) CDR-L1 (trình tự nêu trong SEQ ID NO:6), AE12-1 (VL) CDR-L2 (trình tự nêu trong SEQ ID NO:7) và AE12-1-V (VL) CDR-L3 (trình tự nêu trong SEQ ID

NO:70) và trình tự cố định của SEQ ID NO:143 như được thể hiện trong Bảng 2B (kháng thể này được gọi là AE12-1V-QL và có trình tự chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:144 và trình tự cố định nêu trong SEQ ID NO:145).

Theo cách khác, phân tử IgG1 có thể chứa chuỗi nặng chứa: AE12-1 (VH) CDR-H1 (trình tự nêu trong SEQ ID NO:2), AE12-1 (VH) CDR-H2 (trình tự nêu trong SEQ ID NO:3), AE12-1 (VH) CDR-H3 (trình tự nêu trong SEQ ID NO:4) và chuỗi nhẹ chứa: AE12-1 (VL) CDR-L1 (trình tự nêu trong SEQ ID NO:6), AE12-1 (VL) CDR-L2 (trình tự nêu trong SEQ ID NO:7) và AE12-1-Y (VL) CDR-L3 (trình tự nêu trong SEQ ID NO:73) và trình tự cố định nêu trong SEQ ID NO:143 như được thể hiện trong Bảng 2B (kháng thể này được gọi là AE12-1Y-QL và có trình tự chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:146 và trình tự cố định nêu trong SEQ ID NO: 147).

Bảng 2

VÙNG PROTEIN	SEQ ID NO.	Trình tự
AE12-1-F (VL) CDR-L3	67	FSYAGTDTL
AE12-1-H (VL) CDR-L3	68	HSYAGTDTL
AE12-1-L (VL) CDR-L3	69	LSYAGTDTL
AE12-1-V (VL) CDR-L3	70	VSYAGTDTL
AE12-1-I (VL) CDR-L3	71	ISYAGTDTL
AE12-1-K (VL) CDR-L3	72	KSYAGTDTL
AE12-1-Y (VL) CDR-L3	73	YSYAGTDTL

Bảng 2A

Đột biến axit amin	SEQ ID NO:	Trình tự
Không	140	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCSTMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
T250Q	141	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN

		SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK
M428L	142	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK
T250Q và M428L	143	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Bảng 2B

VÙNG PROTEIN	SEQ ID NO:	Trình tự
Chuỗi nhẹ của AE12-1V-QL (CDR được gạch chân và các đột biến được in đậm)	144	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSSVGDSIYVSWYQQHPGKAPK LMLYDVTKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCVSYA GTDTLFGGGTKVTVLGQPKAAPSVTLFPPSXEMQLANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS*
Chuỗi nặng của AE12-1V-QL (CDR được gạch chân và các đột biến được in đậm)	145	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSHGISWVRQAPGQGLDW MGWISPYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARVSGSPYYMDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VLHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
Chuỗi nhẹ của AE12-1Y-QL (CDR được gạch chân và các đột biến được in đậm)	146	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSSVGDSIYVSWYQQHPGKAP KLMLYDVTKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCYS YAGTDTLFGGGTKVTVLGQPKAAPSVTLFPPSXEMQLANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSTPE QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS*
Chuỗi nặng của AE12-1Y-QL (CDR được gạch chân và các đột biến được in đậm)	147	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSHGISWVRQAPGQGLDW GWISPYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARVSGSPYYMDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKG

		QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCLVHEALHNHYTQKSL SLSPGK*
--	--	--

Chuẩn bị/sản xuất kháng thể

Các kháng thể có thể được sản xuất bằng một trong số các kỹ thuật bất kỳ. Nói chung, kháng thể có thể được sản xuất bằng kỹ thuật nuôi cấy tế bào, bất kỳ tạo ra kháng thể đơn dòng thông qua các kỹ thuật thông thường, hoặc thông qua chuyển nhiễm các gen kháng thể, các chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ vào trong các tế bào chủ là tế bào vi khuẩn hoặc tế bào động vật có vú thích hợp, để cho phép sản xuất kháng thể. Các dạng khác nhau của thuật ngữ "chuyển nhiễm" được dùng để đưa ADN ngoại sinh vào trong tế bào vật chủ nhân không điển hình hoặc nhân điển hình, ví dụ, mở lỗ bằng điện, kết tủa bằng canxi-phosphat, chuyển nhiễm DEAE-dextran và kỹ thuật tương tự. Mặc dù có thể biểu hiện kháng thể theo sáng chế trong tế bào vật chủ nhân không điển hình hoặc tế bào nhân điển hình nhưng việc biểu hiện kháng thể trong tế bào nhân điển hình được ưu tiên, và được ưu tiên nhất trong tế bào vật chủ động vật có vú do các tế bào nhân điển hình như vậy (và trong các tế bào động vật có vú cụ thể) thích hợp hơn tế bào nhân không điển hình trong việc tập hợp và tiết ra kháng thể gấp nếp hợp lý và có hoạt tính miễn dịch.

Tế bào vật chủ động vật có vú được lấy làm ví dụ để biểu hiện kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm tế bào CHO (bao gồm tế bào dhfr- CHO, được mô tả trong tài liệu: Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220 (1980), được sử dụng cùng với chất đánh dấu có thể chọn lọc DHFR, ví dụ chất đánh dấu như được mô tả trong tài liệu: Kaufman and Sharp, *J. Mol. Biol.* 159:601-621 (1982), tế bào u tủy NS0, tế bào COS và tế bào SP2. Khi các vectơ biểu hiện tái tổ hợp mã hóa kháng thể được đưa vào trong tế bào vật chủ của động vật có vú, kháng thể này được tạo ra bằng cách nuôi cấy tế bào vật chủ này trong một khoảng thời gian đủ để biểu hiện kháng thể trong tế bào vật chủ hoặc tốt hơn là đủ để tiết kháng thể vào trong môi trường nuôi cấy tế bào chủ. Kháng thể có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy bằng các kỹ thuật tinh chế protein chuẩn.

Các tế bào chủ cũng có thể được sử dụng để tạo ra các mảnh kháng thể chức năng, như các mảnh Fab hoặc các phân tử scFv. Cần hiểu rằng các cải biến đối với quy trình

nêu trên là nằm trong phạm vi của sáng chế. Ví dụ, có thể mong muốn để chuyển nhiễm tế bào bằng ADN mã hóa các mảnh chức năng của chuỗi nhẹ và/hoặc của chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế. Công nghệ ADN tái tổ hợp cũng có thể được sử dụng để loại bỏ một số, hoặc toàn bộ ADN mã hóa cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng mà không cần cho việc liên kết với các kháng nguyên quan tâm. Các phân tử này được biểu hiện từ các phân tử ADN bị cắt như vậy cũng nằm trong phạm vi của các kháng thể theo sáng chế. Ngoài ra, các kháng thể hai chức năng có thể được tạo ra, trong đó một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ là của kháng thể theo sáng chế (nghĩa là, RGMa người) và chuỗi nhẹ và chuỗi nặng còn lại đặc hiệu đối với kháng nguyên không phải là RGMa người bằng cách tạo liên kết chéo của kháng thể theo sáng chế với kháng thể thứ hai bằng phương pháp hóa học tạo liên kết tiêu chuẩn.

Trong hệ tái tổ hợp được ưu tiên của kháng thể theo sáng chế, vector biểu hiện tái tổ hợp mã hóa cả chuỗi nặng lẫn chuỗi nhẹ của kháng thể được đưa vào trong tế bào dhfr-CHO bằng cách chuyển nhiễm qua trung gian canxi phosphat. Trong vector biểu hiện tái tổ hợp, mỗi gen chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể được liên kết động với yếu tố điều hòa đoạn tăng cường CMV/đoạn khởi đầu AdMLP để đẩy mạnh mức sao chép của các đoạn gen này. Vector biểu hiện tái tổ hợp cũng mang gen DHFR, gen này cho phép chọn lọc các tế bào CHO đã được chuyển nhiễm bằng vector này bằng cách sử dụng phương pháp khuyếch đại/chọn lọc metotrexat. Các tế bào biến nạp đã chọn được nuôi cấy để biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể và kháng thể nguyên vẹn được thu hồi từ môi trường nuôi cấy. Các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn được sử dụng để điều chế vector biểu hiện tái tổ hợp, chuyển nhiễm các tế bào vật chủ, lựa chọn để biến nạp, nuôi cấy các tế bào vật chủ và thu hồi kháng thể từ môi trường nuôi cấy. Sáng chế còn bộc lộ phương pháp tổng hợp kháng thể tái tổ hợp bằng cách nuôi cấy tế bào vật chủ theo sáng chế trong môi trường nuôi cấy thích hợp cho đến khi kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế được tổng hợp. Phương pháp này có thể còn bao gồm việc tách kháng thể tái tổ hợp từ môi trường nuôi cấy.

Phương pháp sản xuất các kháng thể đơn dòng bao gồm việc chuẩn bị dòng tế bào bất tử có khả năng tạo ra các kháng thể có tính đặc hiệu mong muốn. Dòng tế bào này có

thể được tạo ra từ các tế bào lá lách thu được từ động vật đã gây miễn dịch. Động vật có thể được gây miễn dịch bằng RGMa hoặc mảnh và/hoặc biến thể của nó. Ví dụ, trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:74, mảnh SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66 hoặc SEQ ID NO:74, hoặc biến thể của các trình tự nêu trong SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66 SEQ ID NO:74 có thể được dùng để gây miễn dịch cho động vật. Peptit được dùng để gây miễn dịch cho động vật có thể chứa các axit amin mã hóa Fc ở người, ví dụ mảnh có khả năng kết tinh một vùng hoặc vùng đuôi của kháng thể người. Các tế bào lá lách sau đó có thể được làm bất tử bằng cách, ví dụ, dung hợp với phần tử dung hợp là tế bào u tủy. Rất nhiều kỹ thuật dung hợp có thể được sử dụng. Ví dụ, các tế bào lá lách và tế bào u tủy có thể được kết hợp với chất tẩy không ion hóa trong vài phút và sau đó đặt vào môi trường chọn lọc với mật độ thấp, môi trường chọn lọc này hỗ trợ sự sinh trưởng của các tế bào lai, nhưng không hỗ trợ sự sinh trưởng cho các tế bào u tủy. Một kỹ thuật như vậy sử dụng việc chọn lọc hypoxanthin, aminopterin, thymidin (HAT). Sau một thời gian vừa đủ, thường 1 đến 2 tuần, các khuẩn lạc của tế bào lai được quan sát thấy. Một khuẩn lạc được chọn và dịch nổi nuôi cấy chúng được thử nghiệm hoạt tính liên kết dựa trên polypeptit. Tế bào lai có tính phản ứng và tính đặc hiệu cao có thể được dùng đến.

Các kháng thể đơn dòng có thể được phân lập từ dịch nổi nuôi cấy khuẩn lạc của tế bào lai. Ngoài ra, rất nhiều kỹ thuật khác nhau có thể được sử dụng để tăng hiệu suất, như tiêm dòng tế bào lai vào khoang bụng của vật chủ có xương sống thích hợp, như chuột nhắt. Các kháng thể đơn dòng sau đó có thể được thu hoạch từ dịch hạch hoặc máu. Các tạp chất có thể được loại bỏ khỏi các kháng thể bằng các kỹ thuật thông thường như sắc ký, lọc gel, kết tủa, và chiết. Sắc ký ái lực là một ví dụ về phương pháp có thể được dùng trong quy trình tinh chế các kháng thể.

Enzym phân cắt protein papain ưu tiên phân cắt các phân tử IgG để tạo ra vài mảnh, hai trong số các mảnh này (các mảnh F(ab)) từng mảnh chứa dị dime đồng hóa trị chứa vị trí liên kết kháng nguyên nguyên vẹn. Enzym pepsin cũng có khả năng cắt các phân tử IgG để vài mảnh, bao gồm mảnh F(ab')₂, chứa cả hai vị trí liên kết kháng nguyên.

Mảnh Fv có thể được tạo ra bằng cách phân cắt ưu tiên protein của IgM, và hiếm khi là các phân tử IgG hoặc IgA globulin miễn dịch. Mảnh Fv có thể thu được sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp. Mảnh Fv bao gồm dị dime VH::VL không đồng hóa trị bao gồm vị trí liên kết kháng nguyên mà giữ lại nhiều khả năng nhận biết kháng nguyên và khả năng liên kết của phân tử kháng thể tự nhiên.

Kháng thể, mảnh kháng thể, hoặc dẫn xuất của nó có thể chứa bộ CDR của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, lần lượt được xen giữa bộ khung hoạt động của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mà hỗ trợ cho các CDR và xác định mối quan hệ về mặt không gian giữa các CDR với nhau. Bộ CDR có thể chứa ba vùng siêu biến của vùng V của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ. Bắt đầu từ đầu N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, các vùng này lần lượt được ký hiệu là “CDR1”, “CDR2” và “CDR3”. Do đó, vị trí liên kết kháng nguyên, có thể bao gồm 6 CDR, chứa bộ CDR từ mỗi trong số các vùng V của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Polypeptit chứa CDR đơn (ví dụ, CDR1, CDR2 hoặc CDR3) có thể được gọi là “đơn vị nhận biết phân tử”. Phân tích hình học tinh thể phức chất kháng nguyên-kháng thể đã chứng minh rằng các gốc axit amin của CDR tạo ra sự tiếp xúc sâu rộng với kháng nguyên liên kết, trong đó việc tiếp xúc sâu rộng nhất với kháng nguyên là với CDR3 của chuỗi nặng. Do đó, các đơn vị nhận biết phân tử có thể chịu trách nhiệm chính về tính đặc hiệu của vị trí liên kết kháng nguyên. Nói chung, các gốc CDR liên quan trực tiếp và hầu như tác động đến liên kết của kháng nguyên.

Các phương pháp thích hợp khác để tạo ra và phân lập các kháng thể có tính đặc hiệu cần thiết có thể được dùng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp chọn lọc kháng thể tái tổ hợp từ peptit hoặc thư viện protein (ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, thể thực khuẩn, ribosom, oligonucleotit, ARN, ADN hỗ trợ, nấm men hoặc các phân tử tương tự, thư viện biểu hiện); ví dụ, như có sẵn từ nhiều nhà cung cấp trên thị trường như Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, UK), MorphoSys (Martinsreid/Planegg, Del.), Biovation (Aberdeen, Scotland, UK) BioInvent (Lund, Sweden), sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem patent Mỹ số 4,704,692; 5,723,323; 5,763,192; 5,814,476; 5,817,483; 5,824,514; 5,976,862. Các phương pháp khác dựa trên việc gây miễn dịch các động vật chuyển gen (ví dụ, chuột

SCID, Nguyen et al.(1997) Microbiol. Immunol. 41:901-907; Sandhu et al.(1996) Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118; Eren et al.(1998) Immunol. 93:154-161) có khả năng tạo ra kho kháng thể ở người, như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và/hoặc như được mô tả ở đây. Các kỹ thuật này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, biểu hiện ribosom (Hanes et al.(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942; Hanes et al.(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135); công nghệ sản xuất kháng thể đơn tế bào (ví dụ, phương pháp kháng thể lympho bào chọn lọc ("SLAM") (patent Mỹ số 5,627,052, Wen et al.(1987) J. Immunol. 17:887-892; Babcook et al.(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848); vi giọt gel và đo dòng tế bào (Powell et al.(1990) Biotechnol. 8:333-337; One Cell Systems, (Cambridge, Mass).; Gray et al.(1995) J. Imm. Meth. 182:155-163; Kenny et al.(1995) Bio/Technol. 13:787-790); chọn lọc tế bào B (Steenbakkers et al.(1994) Molec. Biol. Reports 19:125-134 (1994)).

Kháng thể có ái lực được làm thành thực có thể được tạo ra bằng một trong số nhiều quy trình bất kỳ đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem Marks et al., BioTechnology, 10: 779-783 (1992) mô tả việc làm thành thực ái lực bằng cách sắp xếp lại miền VH và VL. Gây đột biến ngẫu nhiên đối với CDR và/hoặc các gốc trong khung hoạt động được mô tả trong tài liệu: Barbas et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 91: 3809-3813 (1994); Schier et al., Gene, 169: 147-155 (1995); Yelton et al., J. Immunol. , 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. , 154(7): 3310-3319 (1995); Hawkins et al, J. Mol. Biol. , 226: 889-896 (1992). Đột biến chọn lọc ở các vị trí gây đột biến chọn lọc và ở vị trí tiếp xúc hoặc siêu đột biến có gốc axit amin tăng cường hoạt tính được mô tả trong patent Mỹ số 6,914,128 B1.

Các biến thể của kháng thể theo sáng chế cũng có thể được tạo ra sử dụng việc phân phối polynucleotit mã hóa kháng thể theo sáng chế vào vật chủ thích hợp để cung cấp các động vật hoặc động vật có vú chuyển gen, như dê, bò, ngựa, và các động vật khác tương tự, mà tạo ra các kháng thể này trong sữa của chúng. Các phương pháp này là đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả trong patent Mỹ số 5,827,690; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616; 5,565,362; và 5,304,489.

Các biến thể của kháng thể theo sáng chế cũng có thể được tạo ra bằng cách phân phối polynucleotit theo sáng chế để tạo ra các thực vật chuyển gen và nuôi cấy các tế bào thực vật (ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, thuốc lá, ngô và bèo tấm) mà tạo ra các kháng thể này, các phần đặc hiệu hoặc các biến thể trong các bộ phận của thực vật hoặc trong các tế bào được nuôi cấy. Ví dụ, Cramer et al.(1999) Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95-118 và các tài liệu viện dẫn được trích dẫn ở đây, mô tả việc sản xuất các lá thuốc lá chuyển gen biểu hiện lượng lớn protein tái tổ hợp, ví dụ, sử dụng gen khởi động gây cảm ứng. Ngô chuyển gen đã được dùng để biểu hiện protein ở động vật có vú ở quy mô sản xuất thương mại, với hoạt tính sinh học tương đương với hoạt tính được tạo ra trong các hệ thống tái tổ hợp khác hoặc được tinh chế từ các nguồn tự nhiên. Xem, ví dụ, Hood et al., Adv. Exp. Med. Biol. (1999) 464:127-147 và các tài liệu được trích dẫn ở đây. Các biến thể của kháng thể cũng được tạo ra với lượng lớn từ hạt của thực vật chuyển gen bao gồm mảnh kháng thể, như các kháng thể mạch đơn (scFv's), bao gồm các hạt của thuốc lá và củ khoai tây. Xem, ví dụ, Conrad et al.(1998) Plant Mol. Biol. 38:101-109 và các tài liệu viện dẫn ở đây. Do đó, các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được tạo ra sử dụng các thực vật chuyển gen, theo phương pháp đã biết.

Các dẫn xuất của kháng thể có thể tạo ra, ví dụ, bằng cách bổ sung các trình tự ngoại sinh để cải biến tính sinh miễn dịch, hoặc làm giảm, tăng cường, hoặc cải biến liên kết, ái lực, tốc độ kết hợp, tốc độ phân ly, sự hấp dẫn, tính đặc hiệu, thời gian bán hủy, hoặc các đặc tính thích hợp khác. Nói chung, một phần hoặc toàn bộ trình tự CDR ở người hoặc không phải ở người được giữ lại đồng thời các trình tự không phải ở người của vùng biến đổi và vùng cố định được thay bằng các axit amin ở người hoặc các axit amin khác.

Các kháng thể mảnh nhỏ có thể ở thể đôi có hai vị trí liên kết kháng nguyên, trong đó các mảnh chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) liên kết với vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) trong cùng chuỗi polypeptit (VH VL). Xem, ví dụ EP 404,097; WO 93/11161; và Hollinger et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448. Bằng cách sử dụng chất liên kết cực ngắn để cho phép ghép cặp giữa hai miền trên cùng một chuỗi, các miền này buộc phải ghép cặp với miền bổ trợ của chuỗi khác và tạo ra hai vị trí

liên kết kháng nguyên. Cũng xem patent Mỹ số 6,632,926 được cấp cho Chen và các đồng tác giả và patent này mô tả biến thể của kháng thể có một hoặc nhiều axit amin được xen vào vùng siêu biến của kháng thể gốc và có ái lực liên kết với kháng nguyên đích mạnh hơn ít nhất khoảng hai lần so với ái lực của kháng thể gốc đối với kháng nguyên đó.

Kháng thể có thể là kháng thể thẳng. Quy trình tạo ra kháng thể thẳng là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả trong tài liệu: Zapata et al.(1995) Protein Eng. 8(10):1057-1062. Vắn tắt như sau, các kháng thể này chứa một cặp của đoạn Fd liên tiếp (VH-CH1-VH-CH1) mà tạo ra cặp vùng liên kết kháng nguyên. Các kháng thể thẳng có thể có tính đặc hiệu đôi hoặc đơn đặc hiệu.

Các kháng thể có thể được thu hồi và tinh chế từ việc nuôi cấy tế bào tái tổ hợp bằng các phương pháp đã biết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tinh chế protein A, ammoni sulfat hoặc kết tủa bằng etanol, chiết bằng axit, sắc ký trao đổi anion hoặc cation, sắc ký phosphoxenluloza, sắc ký tương tác kỵ nước, sắc ký ái lực, sắc ký hydroxylapatit và sắc ký lectin. Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High performance liquid chromatography - HPLC) cũng có thể được dùng để tinh chế.

Có thể sẽ hữu ích khi đánh dấu kháng thể bằng chất đánh dấu có thể phát hiện được hoặc có tác dụng điều trị. Các phương pháp để kết hợp các kháng thể vào các chất này là đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Để minh họa, các kháng thể có thể được đánh dấu bằng nhóm có thể phát hiện được như nguyên tử có hoạt tính phóng xạ, nhóm mang màu, nhóm phát ánh sáng huỳnh quang, hoặc các nhóm khác tương tự. Các kháng thể được đánh dấu này có thể được dùng cho các kỹ thuật chẩn đoán, *in vivo*, hoặc trong các mẫu thử đã phân tách. Các kháng thể cũng có thể được tiếp hợp, ví dụ với dược chất, như hóa chất trị liệu hoặc chất độc. Chúng có thể được cho liên kết với xytokin, với phối tử, với kháng thể khác. Các chất thích hợp dùng để kết hợp với các kháng thể để tạo ra tác dụng kháng u bao gồm các xytokin như interleukin 2 (IL-2) và yếu tố hoại tử u (Tumor Necrosis Factor - TNF); các chất nhạy sáng, để sử dụng trong liệu pháp quang động học, bao gồm nhôm (III) phtaloxyanin tetrasulfonat, hematoporphyrin, và phtaloxyanin; nuclit phóng xạ, như iot-131 (131I), yttri-90 (90Y), bismuth-212 (212Bi), bismuth-213 (213Bi),

techneti-99m (^{99m}Tc), rheni-186 (^{186}Re), và rheni-188 (^{188}Re); các chất kháng sinh, như doxorubixin, adriamycin, daunorubixin, metotrexat, daunomycin, neocarzinostatin, và carboplatin; độc tố vi khuẩn, thực vật, và các chất độc khác, như độc tố bạch hầu, ngoại độc tố A của vi khuẩn hình que, độc tố ruột A của khuẩn tụ cầu, độc tố abrin-A, rixin A (rixin A loại nhóm glycosyl và rixin A tự nhiên), độc tố TGF- α , độc tố tế bào từ rắn hổ mang Trung Quốc (*naja naja atra*), và gelonin (độc tố thực vật); protein vô hoạt ribosom từ thực vật, vi khuẩn và nấm, như restrictoxin (một loại protein vô hoạt ribosom do *Aspergillus restrictus* tạo ra), saporin (một loại protein vô hoạt ribosom *Saponaria officinalis* tạo ra), và RNaza; chất ức chế tyrosin kinaza; ly207702 (purin nucleosit được flo hóa hai lần); liposom chứa các chất chống cystic agents (ví dụ, các oligonucleotit đối nghĩa, các plasmit mã hóa độc tố, methotrexat, v. v.); và các kháng thể hoặc mảnh kháng thể khác như F(ab).

Các kháng thể có thể được đọc trình tự và sao chép bằng phương tiện tái tổ hợp hoặc phương tiện tổng hợp. Chúng cũng có thể được đọc trình tự tiếp xuôi xuống trình tự nucleotit thẳng mã hóa chúng. Do đó, sáng chế đề cập đến các polynucleotit này, một mình hoặc kết hợp với chất mang, vectơ hoặc tế bào chủ như được mô tả ở trên, mã hóa trình tự kháng thể theo sáng chế.

Việc sản xuất kháng thể thông qua việc sử dụng công nghệ tế bào lai, phương pháp SLAM, động vật chuyển gen, và thư viện kháng thể tái tổ hợp được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

(1) Sản xuất các kháng thể đơn dòng kháng RGMa sử dụng công nghệ lai.

Các kháng thể đơn dòng có thể được sản xuất sử dụng rất nhiều kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật bao gồm sử dụng công nghệ lai, tái tổ hợp và biểu hiện thể thực khuẩn, hoặc kết hợp các kỹ thuật này. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra sử dụng các kỹ thuật lai bao gồm các kỹ thuật lai đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và được hướng dẫn, ví dụ trong tài liệu: Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Second edition, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988); Hammerling, et al., In Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, (Elsevier, N.Y,

1981). Cần lưu ý rằng thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” được sử dụng ở đây không chỉ giới hạn ở các kháng thể được tạo ra bằng công nghệ lai. Thuật ngữ ‘kháng thể đơn dòng’ chỉ kháng thể thu được từ một dòng duy nhất, bao gồm dòng tế bào nhân chuẩn, tiền nhân hoặc thể thực khuẩn và không phụ thuộc vào phương pháp tạo ra chúng.

Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp tạo ra các kháng thể đơn dòng cũng như các kháng thể được tạo ra bằng phương pháp này. Phương pháp này bao gồm nuôi cấy tế bào lai tiết ra kháng thể theo sáng chế trong đó, tốt hơn là tế bào lai được tạo ra bằng cách dung hợp các tế bào lá lách được phân lập từ động vật, ví dụ chuột nhắt hoặc chuột đồng, đã gây miễn dịch bằng RGMa theo sáng chế với các tế bào u tủy và sau đó, sàng lọc các tế bào lai khỏi thể dung hợp cho các dòng tế bào lai tiết kháng thể có khả năng liên kết với polypeptit theo sáng chế. Tóm lại, chuột đồng có thể được gây miễn dịch bằng kháng nguyên RGMa. Ưu tiên là, kháng nguyên RGMa được dùng cùng với tá chất để kích thích đáp ứng miễn dịch. Các tá chất này bao gồm chất điều chỉnh Freund hoàn chỉnh hoặc không hoàn chỉnh, RIBI (muramyl dipeptit) hoặc ISCOM (các phức kích thích miễn dịch). Các tá chất này có thể bảo vệ polypeptit khỏi sự phân tán nhanh bằng cách cang hóa nó ở dạng kết tủa tại chỗ, hoặc chúng có thể chứa hợp chất kích thích vật chủ tiết ra các tác nhân có tính chất hướng hóa đối với các đại thực bào và các thành phần khác của hệ miễn dịch. Tốt hơn, nếu polypeptit được dùng thì chế độ gây miễn dịch sẽ bao gồm hai hoặc nhiều lần dùng polypeptit, kéo dài trong vài tuần; tuy nhiên, việc dùng một lần polypeptit cũng có thể được sử dụng.

Sau khi gây miễn dịch động vật bằng kháng nguyên RGMa, các kháng thể và/hoặc các tế bào sinh kháng thể có thể thu được từ động vật này. Huyết thanh chứa kháng thể kháng RGMa thu được từ động vật này bằng cách lấy máu hoặc giết động vật này. Huyết thanh có thể được sử dụng nguyên dạng như khi thu được từ động vật, phân globulin miễn dịch có thể thu được từ huyết thanh, hoặc các kháng thể kháng RGMa có thể được tinh chế từ huyết thanh. Huyết thanh hoặc các globulin miễn dịch thu được theo cách này ở dạng đa dòng, do đó có ma trận đặc tính khác nhau.

Ngay sau khi đáp ứng miễn dịch được phát hiện, ví dụ các kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên RGMa được phát hiện trong huyết thanh của chuột đồng, tiến hành lấy lá lách của chúng và phân lập tế bào lá lách. Những tế bào lá lách này sau đó được dung hợp

bằng các kỹ thuật đã biết rõ với các tế bào u tủy bất kỳ thích hợp, ví dụ các tế bào từ dòng tế bào SP20 có sẵn từ Bộ sưu tập chủng giống Hoa Kỳ (American Type Culture Collection - ATCC, Manassas, Va., US). Các tế bào lai được chọn lọc và tách dòng bằng cách pha loãng có giới hạn. Các dòng tế bào lai sau đó được thử nghiệm bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật đối với các tế bào tiết ra các kháng thể có khả năng liên kết với RGMa. Dịch cổ trướng, mà thường chứa các kháng thể với mức cao có thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch chuột đồng bằng các dòng tế bào lai dương tính.

Các tế bào lai được làm bất tử tạo ra kháng thể có thể được tạo ra từ động vật đã gây miễn dịch. Sau khi gây miễn dịch, động vật này bị giết và các tế bào lá lách B được cho dung hợp với các tế bào u tủy đã làm bất tử như đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Xem, ví dụ tài liệu: Harlow and Lane, *ở trên*. Ưu tiên là, các tế bào u tủy không tiết các polypeptit globulin miễn dịch (dòng tế bào không tiết). Sau khi dung hợp và chọn lọc bằng kháng sinh, các tế bào lai được sàng lọc sử dụng RGMa, hoặc phần của nó, hoặc tế bào biểu hiện RGMa. Cũng ưu tiên là, việc sàng lọc ban đầu được tiến hành sử dụng thử nghiệm hấp thu miễn dịch liên kết enzym (enzym-linked immunosorbent assay - ELISA) hoặc thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay - RIA), tốt hơn nếu là ELISA. Một ví dụ về sàng lọc sử dụng ELISA được cung cấp trong công bố đơn quốc tế số WO 00/37504.

Các tế bào lai tạo ra kháng thể kháng RGMa được chọn lọc, tách dòng và sàng lọc tiếp dựa trên đặc điểm mong muốn, bao gồm khả năng sinh trưởng mạnh của tế bào, hiệu suất tạo ra kháng thể cao và các đặc điểm mong muốn của kháng thể như được thảo luận trong Ví dụ 1 dưới đây. Các tế bào lai có thể được nuôi cấy và nhân lên *in vivo* trong các động vật cùng nguồn, trong các động vật thiếu hệ miễn dịch, ví dụ chuột trụi lông, hoặc trong môi trường nuôi cấy tế bào *in vitro*. Phương pháp chọn lọc, tách dòng và nhân các tế bào lai là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật

Ưu tiên là, các tế bào lai là các tế bào lai ở chuột đồng. Theo cách khác, các tế bào lai có thể được tạo ra ở các loài không phải là chuột đồng, không phải là người như chuột nhắt, cừu, lợn, dê, gia súc hoặc ngựa. Cũng ưu tiên là, tế bào lai là tế bào lai ở người, trong đó tế bào u tủy không tiết ở người được dung hợp với tế bào ở người biểu hiện kháng thể có khả năng liên kết với kháng nguyên đặc hiệu.

Các mảnh kháng thể nhận biết các epitop đặc hiệu có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết. Ví dụ, các mảnh Fab và F(ab')₂ có thể được tạo ra bằng cách phân cắt phân giải protein phân tử globulin miễn dịch sử dụng các enzym như papain (để tạo ra hai mảnh Fab giống nhau) hoặc pepsin (để tạo ra mảnh F(ab')₂). Mảnh F(ab')₂ của phân tử IgG giữ lại hai vị trí liên kết kháng nguyên của phân tử IgG lớn hơn (phân tử gốc) bao gồm cả hai chuỗi nhẹ (chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và vùng cố định của chuỗi nặng), vùng CH1 của các chuỗi nặng và vùng khớp tạo liên kết disulfua của phân tử IgG gốc. Do đó, mảnh F(ab')₂ vẫn có khả năng liên kết ngang với các phân tử kháng thể giống như phân tử IgG gốc.

(2) Sản xuất các kháng thể đơn dòng kháng RGMa sử dụng SLAM.

Các kháng thể tái tổ hợp cũng có thể được tạo ra từ các lympho bào đã tách, riêng rẽ sử dụng quy trình được đề cập đến trong lĩnh vực kỹ thuật dưới dạng phương pháp kháng thể lymphô bào chọn lọc (selected lymphocyte antibody method - SLAM), như được mô tả trong Patent Mỹ số 5,627,052, WO 92/02551 và Babcock, J.S. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848. Trong phương pháp này, các tế bào riêng rẽ tiết kháng thể quan tâm, ví dụ các lymphô bào có nguồn gốc từ động vật đã gây miễn dịch, được sàng lọc sử dụng thử nghiệm mảng tan huyết đặc hiệu kháng nguyên, trong đó kháng thể RGMa, tiểu đơn vị của RGMa hoặc mảnh của nó được liên kết với các tế bào máu đỏ ở cừu sử dụng chất liên kết như biotin, và được dùng để xác định các tế bào đơn mà tiết ra các kháng thể có tính đặc hiệu với RGMa. Sau khi xác định các tế bào tiết kháng thể quan tâm, ADN bổ trợ của vùng biến đổi của chuỗi nặng và nhẹ được thu từ các tế bào này bằng enzym PCR transcriptaza ngược và các vùng biến đổi này sau đó có thể được biểu hiện, trong phạm vi các vùng cố định globulin miễn dịch thích hợp (ví dụ, các vùng cố định ở người), trong các tế bào vật chủ của động vật có vú, như các tế bào COS hoặc CHO. Các tế bào vật chủ được chuyển nhiễm bằng trình tự globulin miễn dịch đã khuếch đại, có nguồn gốc từ lymphô bào chọn lọc *in vivo*, sau đó có thể được phân tích và chọn lọc tiếp *in vitro*, ví dụ bằng cách sàng lọc tế bào chuyển nhiễm để tách ra tế bào biểu hiện RGMa. Trình tự globulin miễn dịch đã khuếch đại có thể còn được thao tác *in vitro* như bằng các phương pháp làm thành thực ái lực *in vitro* như các phương pháp được mô tả trong WO 97/29131 và WO 00/56772.

(3) Sản xuất các kháng thể đơn dòng kháng RGMa sử dụng động vật chuyển gen

Các kháng thể đơn dòng cũng có thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch động vật không phải người chứa một số hoặc tất cả các vị trí (locus) liên kết với kháng nguyên RGMa. Theo một ví dụ, động vật không phải là người này là chuột chuyển gen XENOMOUSE®, chủng chuột được cải biến di truyền mang nhiều mảnh lớn của các vị trí globulin miễn dịch ở người và không tạo ra kháng thể ở chuột nhất. Xem, ví dụ tài liệu: Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994) và các Patent Mỹ số 5,916,771, 5,939,598, 5,985,615, 5,998,209, 6,075,181, 6,091,001, 6,114,598 và 6,130,364. Cũng xem tài liệu: WO 91/10741, được công bố ngày 25.7.1991, WO 94/02602, được công bố ngày 3.2.1994, WO 96/34096 và WO 96/33735, cả hai được công bố ngày 31.10.1996, WO 98/16654, được công bố ngày 23.4.1998, WO 98/24893, được công bố ngày 11.6 1998, WO 98/50433, được công bố ngày 12.11.1998, WO 99/45031, được công bố ngày 10.9.1999, WO 99/53049, được công bố ngày 21.10.1999, WO 00 09560, được công bố ngày 24.2.2000 và WO 00/037504, được công bố ngày 29.6.2000. Chuột chuyển gen XENOMOUSE® tạo ra kho kháng thể ở người thành thực hoàn toàn, và tạo ra kháng thể đơn dòng ở người đặc hiệu kháng nguyên. Chuột chuyển gen XENOMOUSE® chứa khoảng 80% kho kháng thể ở người bằng cách đưa vào megabazo có kích thước, mảnh YAC cấu hình dòng mầm của các vị trí chuỗi nặng ở người và vị trí x của chuỗi nhẹ. Xem tài liệu: Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green và Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998).

(4) Sản xuất các kháng thể đơn dòng kháng RGMa sử dụng thư viện kháng thể tái tổ hợp

Các phương pháp *in vitro* có thể cũng được sử dụng để tạo ra các kháng thể gốc, trong đó thư viện kháng thể được sàng lọc để xác định kháng thể có tính liên kết đặc hiệu RGMa mong muốn. Các phương pháp sàng lọc thư viện kháng thể tái tổ hợp là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm các phương pháp được mô tả trong, ví dụ tài liệu: Ladner et al. Patent Mỹ số 5,223,409; Kang et al. WO 92/18619; Dower et al. WO 91/17271; Winter et al. WO 92/20791; Markland et al. WO 92/15679; Breitling et al. WO 93/01288; McCafferty et al. WO 92/01047; Garrard et al. WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-

85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; và Barbas *et al.* (1991) *PNAS* 88:7978-7982, US 20030186374, và WO 97/29131.

Thư viện kháng thể tái tổ hợp có thể thu được từ đối tượng được gây miễn dịch bằng RGMA, hoặc một phần của RGMA. Theo cách khác, thư viện kháng thể tái tổ hợp có thể thu được từ động vật tự nhiên, nghĩa là, đối tượng không được gây miễn dịch bằng RGMA, như thư viện kháng thể người từ đối tượng là người không được gây miễn dịch bằng RGMA của người. Kháng thể theo sáng chế được chọn bằng cách sàng lọc thư viện kháng thể tái tổ hợp bằng peptit chứa RGMA của người, nhờ đó chọn được các kháng thể nhận biết RGMA. Phương pháp để tiến hành việc sàng lọc và lựa chọn là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như được mô tả trong các tài liệu tham khảo ở trên. Để lựa chọn các kháng thể theo sáng chế có ái lực liên kết cụ thể đối với RGMA, như các kháng thể phân ly khỏi RGMA của người có hằng số tốc độ K_{off} cụ thể, phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt đã biết có thể được dùng để lựa chọn kháng thể có hằng số tốc độ K_{off} mong muốn. Để lựa chọn kháng thể theo sáng chế có hoạt tính trung hòa cụ thể đối với hRGMA, như kháng thể có một giá trị IC_{50} cụ thể, các phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này dùng để đánh giá hoạt tính của RGMA có thể được sử dụng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập được, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với RGMA của người. Tốt hơn, nếu kháng thể là kháng thể trung hòa. Theo các phương án khác, kháng thể này là kháng thể tái tổ hợp hoặc kháng thể đơn dòng.

Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể cũng được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trong phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn, các vùng có chức năng của kháng thể được biểu hiện trên bề mặt của hạt thể thực khuẩn mang trình tự polynucleotit mã hóa chúng. Cụ thể là, thể thực khuẩn này có thể được sử dụng để biểu hiện vùng liên kết kháng nguyên đã biểu hiện

từ kho hoặc thư viện kháng thể tổ hợp (ví dụ, người hoặc chuột). Thể thực khuẩn biểu hiện vùng liên kết kháng nguyên quan tâm có thể được chọn lọc hoặc được xác định đối với kháng nguyên, ví dụ, sử dụng kháng nguyên được đánh dấu hoặc kháng nguyên được gắn kết hoặc được bắt giữ trên bề mặt rắn hoặc hạt. Thể thực khuẩn được sử dụng trong các phương pháp này thường là thể thực khuẩn dạng sợi bao gồm các vùng gắn kết fd và M13 được biểu hiện từ thể thực khuẩn có Fab, Fv hoặc các vùng kháng thể Fv được làm ổn định bằng liên kết disulfua được dung hợp tái tổ hợp với protein thể thực khuẩn gen III hoặc gen VIII. Ví dụ về các phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể theo sáng chế bao gồm phương pháp và kháng thể được nêu trong tài liệu: Brinkman et al., *J. Immunol. Methods* 182:41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods* 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic et al., *Gene* 187 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994); PCT/GB91/01134; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; và các patent Mỹ số 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780, 225; 5,658,727; 5,733,743 và 5,969,108.

Như được nêu trong nhiều tài liệu viện dẫn được trích dẫn ở đây, sau khi chọn lọc thể thực khuẩn, các vùng mã hóa kháng thể từ thể thực khuẩn có thể được tách ra và sử dụng để tạo ra kháng thể toàn phần bao gồm các kháng thể của người hoặc mảnh gắn kết kháng thể mong muốn khác bất kỳ, và được biểu hiện trong vật chủ mong muốn bất kỳ, bao gồm tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng, tế bào thực vật, nấm men, và vi khuẩn, ví dụ như được mô tả chi tiết dưới đây. Ví dụ, kỹ thuật để sản xuất tái tổ hợp mảnh Fab, Fab' và F(ab')₂ có thể cũng được sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như phương pháp được bộc lộ trong WO 92/22324; tài liệu: Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992); và tài liệu: Sawai et al., *AJRI* 34:26-34 (1995); và Better et al., *Science* 240:1041-1043 (1988). Ví dụ về kỹ thuật có thể được sử dụng để sản xuất Fv mạch đơn và kháng thể bao gồm kháng thể được nêu trong Patent Mỹ số 4,946,778 và 5,258, 498; các tài liệu: Huston et al., *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu et al., *PNAS* 90:7995-7999 (1993); và Skerra et al., *Science* 240:1038-1040 (1988).

Phương án khác để sàng lọc thư viện kháng thể tái tổ hợp bằng cách biểu hiện thể thực khuẩn, các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này dùng để sàng lọc các thư viện tổ hợp lớn có thể được sử dụng để xác định các kháng thể gốc. Một loại hệ thống biểu hiện khác là hệ thống trong đó thư viện kháng thể tái tổ hợp được biểu hiện dưới dạng thể dung hợp ARN-protein, như được mô tả trong WO 98/31700 của Szostak và Roberts, và trong tài liệu: Roberts, R.W. and Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302. Trong hệ thống này, thể dung hợp đồng hóa trị được tạo nên giữa mARN và peptit hoặc protein mà nó mã hóa bằng cách dịch mã *in vitro* ARN thông tin tổng hợp mang puromycin, một chất kháng sinh tiếp nhận peptidyl, ở đầu 3' của chúng. Do đó, ARN thông tin đặc hiệu có thể được làm giàu từ phức hợp gồm các ARN thông tin (ví dụ, thư viện tổ hợp) dựa trên các đặc điểm của peptit hoặc protein được mã hóa, ví dụ, kháng thể hoặc phần của nó, như gắn kết của kháng thể này, hoặc phần của nó, với kháng nguyên đặc hiệu kép. Các trình tự axit nucleic mã hóa các kháng thể, hoặc các phần của nó, được thu hồi từ sự sàng lọc các thư viện này có thể được biểu hiện bằng phương pháp tái tổ hợp như được mô tả ở đây (ví dụ, trong các tế bào vật chủ động vật có vú) và, hơn nữa, có thể được tiếp tục trải qua quá trình thành thực ái lực tiếp bằng các vòng sàng lọc bổ sung các thể dung hợp mARN-peptit trong đó các sự đột biến đã được đưa vào trong (các) trình tự chọn lọc ban đầu, hoặc bằng các phương pháp khác để thành thực ái lực *in vitro* các kháng thể tái tổ hợp, như được mô tả ở đây.

Theo phương pháp khác, các kháng thể gốc có thể cũng được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp biểu hiện nấm men đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trong phương pháp biểu hiện nấm men, các phương pháp di truyền được sử dụng để gắn các vùng kháng thể vào thành tế bào nấm men và biểu hiện chúng trên bề mặt nấm men. Cụ thể, nấm men có thể được sử dụng để biểu hiện các vùng liên kết kháng nguyên được biểu hiện từ kho hoặc thư viện kháng thể tổ hợp (ví dụ, người hoặc chuột). Các ví dụ về các phương pháp biểu hiện nấm men có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể gốc bao gồm các kháng thể được nêu trong Patent Mỹ số 6,699,658 của Wittrup và đồng tác giả.

Sản xuất các kháng thể RGMa tái tổ hợp

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất bằng một trong số các kỹ thuật bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, biểu hiện từ các tế bào chủ, trong đó (các) vector mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ được chuyển nhiễm vào trong các tế bào chủ bằng các kỹ thuật chuẩn. Các dạng khác nhau của thuật ngữ "chuyển nhiễm" được dùng để bao gồm rất nhiều kỹ thuật được thường sử dụng để đưa ADN ngoại sinh vào trong tế bào vật chủ nhân không điển hình hoặc nhân điển hình, ví dụ, mở lỗ bằng điện, kết tủa bằng canxi-phosphat, chuyển nhiễm DEAE-dextran và kỹ thuật tương tự. Mặc dù có thể biểu hiện kháng thể theo sáng chế trong tế bào vật chủ nhân không điển hình hoặc tế bào nhân điển hình nhưng việc biểu hiện kháng thể trong tế bào nhân điển hình được ưu tiên, và được ưu tiên nhất trong tế bào vật chủ động vật có vú do các tế bào nhân điển hình như vậy (và trong các tế bào động vật có vú cụ thể) thích hợp hơn tế bào nhân không điển hình trong việc tập hợp và tiết ra kháng thể gấp nếp hợp lý và có hoạt tính miễn dịch.

Tế bào vật chủ động vật có vú được lấy làm ví dụ để biểu hiện kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm tế bào CHO (bao gồm tế bào dhfr- CHO, được mô tả trong tài liệu: Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220 (1980), được sử dụng cùng với chất đánh dấu có thể chọn lọc DHFR, ví dụ chất đánh dấu như được mô tả trong tài liệu: Kaufman and Sharp, *J. Mol. Biol.* 159:601-621 (1982), tế bào u tủy NS0, tế bào COS, và tế bào SP2. Khi các vector biểu hiện tái tổ hợp mã hóa kháng thể được đưa vào trong tế bào vật chủ động vật có vú, kháng thể này được tạo ra bằng cách nuôi cấy tế bào vật chủ này trong một khoảng thời gian đủ để biểu hiện kháng thể trong tế bào vật chủ hoặc tốt hơn là đủ để tiết kháng thể vào trong môi trường nuôi cấy tế bào chủ. Kháng thể có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy bằng các kỹ thuật tinh chế protein chuẩn.

Các tế bào chủ cũng có thể được sử dụng để tạo ra các mảnh kháng thể chức năng, như các mảnh Fab hoặc các phân tử scFv. Cần hiểu rằng các cải biến đối với quy trình nêu trên là nằm trong phạm vi của sáng chế. Ví dụ, có thể mong muốn để chuyển nhiễm tế bào bằng ADN mã hóa các mảnh chức năng của chuỗi nhẹ và/hoặc của chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế. Công nghệ ADN tái tổ hợp cũng có thể được sử dụng để loại bỏ

một số, hoặc toàn bộ ADN mã hóa cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng mà không cần cho việc liên kết với các kháng nguyên quan tâm. Các phân tử này được biểu hiện từ các phân tử ADN bị cắt như vậy cũng nằm trong phạm vi của các kháng thể theo sáng chế. Ngoài ra, các kháng thể hai chức năng có thể được tạo ra, trong đó một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ là của kháng thể theo sáng chế (nghĩa là, RGMa của người) và chuỗi nhẹ và chuỗi nặng còn lại đặc hiệu đối với kháng nguyên không phải là RGMa của người bằng cách tạo liên kết chéo của kháng thể theo sáng chế với kháng thể thứ hai bằng phương pháp hóa học tạo liên kết tiêu chuẩn.

Trong hệ tái tổ hợp được ưu tiên của kháng thể hoặc phần liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế, vector biểu hiện tái tổ hợp mã hóa cả chuỗi nặng lẫn chuỗi nhẹ của kháng thể được đưa vào trong tế bào dhfr- CHO bằng cách chuyển nhiễm qua trung gian canxi phosphat. Trong vector biểu hiện tái tổ hợp, mỗi gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được liên kết động với yếu tố điều hòa đoạn tăng cường CMV/đoạn khởi đầu AdMLP để đẩy mạnh mức sao chép của các đoạn gen này. Vector biểu hiện tái tổ hợp cũng mang gen DHFR, gen này cho phép chọn lọc các tế bào CHO đã được chuyển nhiễm bằng vector này bằng cách sử dụng phương pháp khuyếch đại/chọn lọc metotrexat. Các tế bào biến nạp đã chọn được nuôi cấy để biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể và kháng thể nguyên vẹn được thu hồi từ môi trường nuôi cấy. Các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn được sử dụng để tạo ra vector biểu hiện tái tổ hợp, chuyển nhiễm các tế bào vật chủ, lựa chọn để biến nạp, nuôi cấy các tế bào vật chủ và thu hồi kháng thể từ môi trường nuôi cấy. Sáng chế còn mô tả phương pháp tổng hợp kháng thể tái tổ hợp được mô tả ở đây bằng cách nuôi cấy tế bào vật chủ theo sáng chế trong môi trường nuôi cấy thích hợp cho đến khi kháng thể tái tổ hợp theo sáng chế được tổng hợp. Phương pháp này có thể còn bao gồm việc tách kháng thể tái tổ hợp từ môi trường nuôi cấy.

Kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người

Kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người có thể là kháng thể hoặc biến thể, dẫn xuất, chất tương tự hoặc phần của nó liên kết đặc hiệu miễn dịch với kháng nguyên quan tâm và chứa vùng khung hoạt động (FR) có trình tự axit amin gần giống như

của kháng thể ở người và trình tự axit amin của vùng xác định hỗ trợ (CDR) gần như trình tự axit amin của kháng thể không phải ở người.

Kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người có thể thu được từ kháng thể từ các loài không phải là người liên kết với kháng nguyên mong muốn có một hoặc nhiều vùng xác định hỗ trợ (CDR) từ các loài không phải ở người và các vùng khung hoạt động từ phân tử globulin miễn dịch ở người.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "gần như" khi đề cập đến CDR chỉ CDR có trình tự axit amin giống ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% với trình tự axit amin của CDR của kháng thể không phải ở người. Kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người gần như tất cả trong số ít nhất một, và thường là hai vùng biến đổi (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv), trong đó tất cả hoặc gần như tất cả các vùng CDR tương ứng với các vùng CDR của globulin miễn dịch không phải ở người (nghĩa là, kháng thể cho) và tất cả hoặc gần như tất cả các vùng khung hoạt động là các vùng khung hoạt động của trình tự liên ứng của globulin miễn dịch ở người. Theo một khía cạnh, kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người cũng chứa ít nhất là một phần của vùng cố định của phân tử globulin miễn dịch (Fc), thường là vùng cố định của phân tử globulin miễn dịch ở người. Theo một số phương án, kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người chứa cả chuỗi nhẹ cũng như ít nhất vùng biến đổi của chuỗi nặng. Kháng thể này cũng có thể bao gồm CH1, vùng khớp nối, các vùng CH2, CH3, và CH4 của chuỗi nặng. Theo một số phương án, kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người chỉ chứa chuỗi nhẹ được làm cho giống với của người. Theo một số phương án, kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người chỉ chứa chuỗi nặng được làm cho giống với của người. Theo phương án cụ thể, kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người chỉ chứa vùng biến đổi được làm cho giống với của người của chuỗi nhẹ và/hoặc của chuỗi nặng được làm cho giống với của người.

Kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người có thể được chọn từ nhóm globulin miễn dịch bất kỳ, bao gồm IgM, IgG, IgD, IgA và IgE, và isotyp bất kỳ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, IgG 1, IgG2, IgG3 và IgG4. Kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người có thể chứa trình tự từ nhiều hơn một nhóm hoặc isotyp,

và các miền cố định cụ thể có thể được chọn để tối ưu các chức năng tác động mong muốn sử dụng các kỹ thuật đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Vùng khung hoạt động hoặc vùng CDR của kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người không cần phải tương ứng một cách chính xác với các trình tự gốc, ví dụ CDR của kháng thể cho hoặc vùng khung hoạt động liên ứng có thể được gây đột biến bằng cách thay thế, chèn, và/hoặc loại bỏ ít nhất một gốc axit amin sao cho gốc này trong CDR hoặc khung hoạt động ở vị trí đó không tương ứng với khung hoạt động của kháng thể cho hoặc khung hoạt động liên ứng. Tuy nhiên, theo một ví dụ, các đột biến này sẽ không phổ biến. Thông thường, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99% gốc trong kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người sẽ tương ứng với các gốc của FR và trình tự CDR gốc. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khung hoạt động liên ứng" chỉ vùng khung hoạt động trong trình tự globulin miễn dịch liên ứng. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "trình tự globulin miễn dịch liên ứng" chỉ trình tự được tạo thành từ axit amin (hoặc nucleotit) xuất hiện thường xuyên nhất trong họ trình tự globulin miễn dịch liên quan (xem, ví dụ tài liệu: Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987)). Trong họ các globulin miễn dịch, mỗi vị trí trong trình tự liên ứng đều của axit amin xuất hiện nhiều nhất ở vị trí này trong họ. Nếu hai axit amin xuất hiện với tần suất như nhau thì chúng đều có thể có mặt trong trình tự liên ứng.

Kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người có thể được thiết kế để giảm thiểu đáp ứng miễn dịch không mong muốn đối với các kháng thể ở loài ngậm nhấm kháng người, mà giới hạn thời gian và hiệu quả của ứng dụng điều trị của các nhóm kháng thể này ở người nhận. Kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người có thể có một hoặc nhiều gốc axit amin được đưa vào từ nguồn không phải là người. Các gốc không có ở người này thường gọi là các gốc "nhập khẩu", mà thường được lấy từ vùng biến đổi. Việc làm cho giống với của người có thể được thực hiện bằng cách thay thế trình tự vùng siêu biến cho trình tự tương ứng của kháng thể ở người. Do đó, các kháng thể "được làm cho giống với của người" là các kháng thể khảm trong đó gần như ít hơn vùng biến đổi hoàn toàn ở người được thay thế bằng trình tự tương ứng từ loài không phải

là người. Ví dụ, xem patent Mỹ số 4,816,567. Kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người có thể là kháng thể của người trong đó một vài gốc ở vùng siêu biến, và có thể là vài gốc trong vùng khung hoạt động được thay thế bằng các gốc từ vị trí tương tự trong kháng thể của loài gặm nhấm. Việc làm cho giống với của người và xử lý di truyền đối với kháng thể theo sáng chế có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp được mô tả trong patent Mỹ số 5,723,323; 5,976,862; 5,824,514; 5,817,483; 5,814,476; 5,763,192; 5,723,323; 5,766,886; 5,714,352; 6,204,023; 6,180,370; 5,693,762; 5,530,101; 5,585,089; 5,225,539; và 4,816,567.

Kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người có thể giữ lại ái lực cao đối với RGMa và các đặc tính sinh học có lợi khác. Kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người có thể được sản xuất bằng quy trình phân tích trình tự gốc và rất nhiều sản phẩm được nhân hóa khác nhau sử dụng mô hình ba chiều của trình tự gốc và trình tự được nhân hóa. Mô hình globulin miễn dịch ba chiều có thể mua trên thị trường. Các chương trình máy tính có sẵn cũng minh họa và thể hiện các cấu trúc cấu dạng ba chiều có thể có của trình tự globulin miễn dịch được chọn để thử nghiệm. Việc xem xét cách biểu hiện cho phép phân tích vai trò chắc chắn của các gốc trong việc thực hiện chức năng của trình tự globulin quan tâm, nghĩa là, phân tích các gốc mà ảnh hưởng đến khả năng liên kết của globulin miễn dịch quan tâm với kháng nguyên của nó. Theo cách này, các gốc trong vùng khung hoạt động có thể được chọn và kết hợp từ trình tự nhận và trình tự nhập khẩu sao cho thu được đặc tính mong muốn của kháng thể như ái lực với RGMa tăng lên. Nói chung, các gốc trong vùng siêu biến trực tiếp và hầu hết đều ảnh hưởng đến khả năng liên kết của kháng nguyên.

Theo cách khác thay thế cho việc nhân hóa, các kháng thể của người (cũng được gọi là “kháng thể của người có chiều dài đầy đủ”) có thể được tạo ra. Ví dụ, có thể phân lập các kháng thể của người từ thư viện thông qua công nghệ PROfusion và/hoặc công nghệ liên quan đến nấm men. Xem các ví dụ được cung cấp ở đây. Cũng có thể tạo ra các động vật chuyển gen (ví dụ, chuột nhắt khi gây miễn dịch có khả năng tạo ra kho đầy đủ của kháng thể người khi không sản xuất globulin miễn dịch ngoại sinh. Ví dụ, việc loại bỏ

đồng hợp tử gen thuộc vùng nối của chuỗi nặng của kháng thể (J_H) ở chuột đột biến dạng khảm và dòng mầm sẽ ức chế hoàn toàn việc sản xuất kháng thể ngoại sinh. Việc chuyển mảng gen globulin miễn dịch dòng mầm ở người trong chuột nhất đột biến dòng mầm sẽ sản sinh ra kháng thể của người khi thử bằng kháng nguyên. Các kháng thể được làm cho giống với kháng thể của người hoặc kháng thể của người có chiều dài đầy đủ có thể được tạo ra theo các phương pháp được mô tả trong patent Mỹ số 5,770,429; 5,833,985; 5,837,243; 5,922,845; 6,017,517; 6,096,311; 6,111,166; 6,270,765; 6,303,755; 6,365,116; 6,410,690; 6,682,928; và 6,984,720.

Dược phẩm

Kháng thể theo sáng chế có thể là một thành phần trong dược phẩm. Dược phẩm này có thể cũng chứa chất mang dược dụng. Các dược phẩm chứa kháng thể RGMa theo sáng chế được sử dụng trong, nhưng không chỉ giới hạn ở, chẩn đoán, phát hiện, hoặc theo dõi bệnh, trong phòng ngừa, điều trị, kiểm soát, hoặc làm giảm bệnh hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó, và/hoặc trong nghiên cứu. Theo một phương án cụ thể, dược phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế. Theo phương án khác, dược phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế và một hoặc nhiều kháng thể không phải là các kháng thể theo sáng chế để điều trị rối loạn, trong đó hoạt tính của RGMa được tạo đích là có hại. Theo phương án khác, kháng thể này được biết là hữu dụng hoặc có tác dụng hoặc hiện được dùng để phòng bệnh, điều trị bệnh, quản lý, hoặc làm giảm rối loạn hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó. Theo các phương án này, dược phẩm còn có thể chứa chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược.

Kháng thể theo sáng chế có thể được kết hợp vào dược phẩm thích hợp để dùng cho đối tượng. Thông thường, dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế và chất mang dược dụng. Như sử dụng trong đây, "chất mang dược dụng" bao gồm dung môi bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, các chất bao, các chất kháng sinh và kháng nấm, chất đẳng trương và chất làm chậm quá trình hấp thu, và các chất tương tự tương thích về mặt sinh lý. Ví dụ về chất mang dược dụng bao gồm một hoặc nhiều chất sau: nước, nước muối, nước muối đệm phosphat, dextroza, glyxerol, etanol và các chất tương tự, cũng như hỗn hợp của chúng. Theo nhiều trường hợp, ưu tiên hơn nếu bao gồm các

chất đẳng trương, ví dụ đường, rượu đa chức như manitol, sorbitol, hoặc natri clorua trong dược phẩm. Các chất mang dược dụng có thể còn bao gồm chất phụ gia với lượng nhỏ như chất làm ẩm hoặc chất nhũ hóa, chất bảo quản hoặc chất đệm, đó là các chất làm tăng thời gian sử dụng hoặc hiệu quả của kháng thể.

Theo phương án khác, dược phẩm chứa ít nhất một tác nhân điều trị khác dùng để điều trị rối loạn như được mô tả ở trên.

Các hệ thống phân phối khác nhau là đã biết và có thể được sử dụng để dùng một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế hoặc hỗn hợp chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế và tác nhân phòng rối loạn hoặc tác nhân điều trị hữu dụng để phòng ngừa, kiểm soát, điều trị, hoặc làm giảm rối loạn hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó, ví dụ được bao nang trong liposom, vi hạt, vi nang, các tế bào tái tổ hợp có thể biểu hiện kháng thể, sự nhập bào qua trung gian thụ thể (xem, ví dụ tài liệu: Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), xây dựng cấu trúc axit nucleic dưới dạng một phần của vector retrovirus hoặc vector khác, v.v.. Các phương pháp dùng chất phòng hoặc điều trị bệnh theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dùng ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, trong da, trong cơ, trong màng bụng, trong tĩnh mạch và dưới da), sử dụng trong màng cứng, sử dụng trong khối u và sử dụng tại niêm mạc (ví dụ, trong mũi và trong miệng). Ngoài ra, có thể sử dụng tại phổi, ví dụ bằng cách sử dụng thiết bị xông hít hoặc khí dung, và tạo chế phẩm với tác nhân sol khí. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6,019,968; 5,985,320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; và 4,880,078; và WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; và WO 99/66903. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế, liệu pháp phối hợp hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng bằng kỹ thuật Alkermes AIR® phân phối dược chất vào phổi (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass., US). Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong khối u, qua đường uống, trong mũi, tại phổi, hoặc dưới da. Tác nhân phòng bệnh hoặc chữa bệnh có thể được sử dụng bằng đường thuận tiện bất kỳ, ví dụ bằng cách truyền hoặc tiêm thể tích lớn, bằng cách hấp thu qua nếp gấp biểu mô hoặc niêm mạc da (ví dụ, niêm mạc miệng, trực tràng và niêm mạc ruột, v.v.) và có thể được sử dụng cùng với các tác nhân khác có tác dụng sinh học. Việc sử dụng có thể là toàn thân hoặc khu trú.

Theo các trường hợp cụ thể, có thể mong muốn sử dụng kháng thể theo sáng chế tại vùng cần được điều trị; điều này có thể đạt được bằng cách, ví dụ và không chỉ giới hạn ở, truyền tại chỗ, bằng cách tiêm, hoặc bằng cách cấy, thiết bị cấy này là nguyên liệu xốp hoặc không xốp, bao gồm các màng và hệ cốt, như màng silastic, polyme, hệ cốt dạng sợi (ví dụ, Tissuel®), hoặc hệ cốt collagen. Ví dụ, lượng có hiệu quả của một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế được sử dụng tại chỗ ở vùng bị tác động cho đối tượng để phòng ngừa, điều trị, quản lý và/hoặc cải thiện rối loạn hoặc triệu chứng của nó. Ngoài ra, lượng có hiệu quả của một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng tại chỗ cho vùng bị ảnh hưởng kết hợp với lượng có hiệu quả của một hoặc nhiều thuốc điều trị (ví dụ, một hoặc nhiều tác nhân phòng rối loạn hoặc chữa rối loạn) không phải là kháng thể theo sáng chế cho đối tượng để phòng ngừa, điều trị, quản lý và/hoặc cải thiện rối loạn hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó.

Kháng thể cũng có thể được phân phối trong hệ giải phóng kiểm soát hoặc giải phóng duy trì. Ví dụ, có thể sử dụng bơm để tạo ra đặc tính giải phóng kiểm soát hoặc duy trì (xem tài liệu: Langer supra; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.*, 14:20; Buchwald et al., 1980, *Surgery*, 88:507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.*, 321:574. Theo ví dụ khác, nguyên liệu polyme có thể được sử dụng để thu được đặc tính giải phóng kiểm soát hoặc duy trì cho liệu pháp (xem tài liệu: ví dụ, Medical Applications of Controlled Release, (Langer and Wise, eds.), (CRC, Boca Raton, Fla (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.) (Wiley, New York, 1984); Ranger and Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; cũng xem tài liệu: Levy et al., 1985, *Science*, 228:190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.*, 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.*, 71:105; các patent Mỹ số 5.679.377; 5.916.597; 5.912.015; 5.989.463; and 5.128.326; và WO 99/15154 và WO 99/20253. Ví dụ về các polyme được sử dụng trong chế phẩm giải phóng duy trì bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, poly(2-hydroxy etyl metacrylat), poly(metyl metacrylat), poly(axit acrylic), poly(etylen-co-vinyl axetat), poly(axit metacrylic), polyglycolit (PLG), polyanhydrit, poly(N- vinyl pyrrolidon), poly(vinyl), polyacrylamit, poly(etylen glycol), polylactit (PLA), poly(lactide-co-glycolit) (PLGA), và polyorthoeste. Theo một phương án cụ thể, polyme được sử dụng trong chế phẩm giải phóng duy trì thường trơ, không

chứa tạp chất, lọc được, ổn định khi bảo quản, vô khuẩn, và có thể phân hủy sinh học. Theo phương án được ưu tiên, hệ giải phóng duy trì hoặc kiểm soát có thể được đặt gần đích điều trị hoặc phòng bệnh, do đó chỉ cần một phần của liều toàn thân (xem, ví dụ tài liệu: Goodson, in *Medical Applications of controlled release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Các hệ giải phóng kiểm soát được thảo luận trong tạp chí (1990, Langer, *Science* 249:1527-1533). Kỹ thuật bất kỳ đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để bào chế chế phẩm giải phóng duy trì chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế. Xem, ví dụ patent Mỹ số 4.526.938, WO 91/05548, WO 96/20698, Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," 179-189; Song et al., "Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 50: 372-397; Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," *Proceed. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 24: 853-854, và Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," *Proceed. Intl. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*: 24: 759-760.

Khi chế phẩm là axit nucleic axit mã hóa kháng thể, axit nucleic này có thể được sử dụng *in vivo* để tăng cường sự biểu hiện của kháng thể được mã hóa của nó, bằng cách thiết kế nó dưới dạng một phần của vectơ biểu hiện axit nucleic thích hợp và sử dụng sao cho nó ở trong tế bào, ví dụ bằng cách sử dụng vectơ retrovirut (xem tài liệu: patent Mỹ số 4,980,286), hoặc bằng cách tiêm trực tiếp, hoặc bằng cách sử dụng cách bắn vi hạt (ví dụ, súng bắn gen; Biolistic, Dupont), hoặc bao bằng lipid hoặc các thụ thể bề mặt tế bào hoặc tác nhân chuyển nhiễm, hoặc bằng cách sử dụng nó liên kết với một peptit tương tự gen tự đột biến đã được biết là đi vào trong nhân (xem, ví dụ, Joliot et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868). Theo cách khác, axit nucleic có thể được đưa vào trong tế bào và đưa vào trong ADN của tế bào vật chủ để biểu hiện bằng cách tái tổ hợp tương đồng.

Dược phẩm theo sáng chế được tạo bào chế để tương thích với đường dùng dự tính. Ví dụ về đường dùng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ngoài đường tiêu hóa, ví dụ, trong tĩnh mạch, trong da, dưới da, qua miệng, trong mũi (ví dụ, xông hít), qua da (ví dụ, tại chỗ), qua niêm mạc, và tại trực tràng. Theo một phương án cụ thể, chế phẩm được tạo công thức phù hợp với các quy trình thông thường do dược phẩm phù hợp để sử dụng trong tĩnh mạch, dưới da, trong cơ, đường uống, trong mũi, hoặc tại chỗ cho người. Thông thường, chế phẩm để dùng trong tĩnh mạch là các dung dịch trong đệm nước đẳng trương vô khuẩn. Khi cần, chế phẩm này cũng có thể chứa tác nhân hòa tan và chất gây mê tại chỗ như lignocain để giảm đau ở vị trí tiêm.

Nếu chế phẩm theo sáng chế được sử dụng tại chỗ, các chế phẩm có thể được tạo công thức ở dạng thuốc mỡ, kem, cao dán qua da, nước xúc, gel, dầu gội đầu, thuốc xịt, sol khí, dung dịch, nhũ tương, hoặc dạng khác đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết rõ. Xem, ví dụ tài liệu: Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Đối với các dạng liều tại chỗ không phun được, dạng rắn hoặc từ nhót đến bán rắn bao gồm chất mang hoặc một hoặc nhiều tá dược tương thích với việc sử dụng tại chỗ và có độ nhót động học cao hơn nước thường được sử dụng. Các chế phẩm thích hợp bao gồm, mà không giới hạn ở, dung dịch, huyền phù, nhũ tương, kem, thuốc mỡ, bột, dầu xoa bóp, cao, và tương tự, các chế phẩm này nếu muốn, được tiệt khuẩn hoặc kết hợp với các chất phụ gia (ví dụ, chất bảo quản, chất ổn định, tác nhân tạo ẩm, hệ đệm, hoặc muối) để tác động đến các đặc điểm khác nhau, như, ví dụ, áp suất thẩm thấu. Các dạng liều tại chỗ thích hợp khác bao gồm các chế phẩm sol khí phun được trong đó hoạt chất, ví dụ kết hợp với chất mang rắn hoặc lỏng, được đóng gói trong hỗn hợp với chất dễ bay hơi được nén (ví dụ, khí đẩy, như FREON®) hoặc trong một lọ được nén. Các chất giữ ẩm hoặc làm ẩm cũng có thể được bổ sung vào các dược phẩm và các dạng liều nếu muốn. Ví dụ về các thành phần bổ sung này đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật.

Nếu chế phẩm được sử dụng trong mũi, chế phẩm này có thể được tạo công thức ở dạng sol khí, thuốc xịt, dạng phun mù hoặc ở dạng thuốc nhỏ. Cụ thể, kháng thể để sử dụng theo sáng chế có thể được phân phối thuận tiện vào dạng trình bày phun sol khí từ các gói định áp hoặc thiết bị khí dung, cùng với việc sử dụng chất đẩy thích hợp (ví dụ,

diclodiflometan, tricloflometan, diclotetrafloetan, carbon dioxit hoặc khí thích hợp khác). Trong trường hợp sol khí định áp, đơn vị liều có thể được xác định bằng cách tạo một van để phân phối lượng đã được đo. Viên nang và thuốc đạn (bao gồm, ví dụ, gelatin) để sử dụng trong ống hít hoặc thiết bị bơm bột có thể được tạo công thức chứa hỗn hợp bột của hợp chất và bột nền thích hợp như lactoza hoặc tinh bột.

Nếu chế phẩm được sử dụng qua đường uống, các chế phẩm cps thể được tạo công thức sử dụng qua đường uống ở dạng viên nén, viên nang, viên nhện, viên nang gelatin, dung dịch, huyền phù, và tương tự. Viên nén hoặc viên nang có thể được điều chế bằng các phương thức thông thường với các tá dược được dùng như tác nhân gắn kết (ví dụ, tinh bột ngô tiền gelatin hóa, polyvinylpyrrolidon, hoặc hydroxypropyl methylxenluloza); chất độn (ví dụ, lactoza, xenluloza vi tinh thể, hoặc canxi hydro phosphat); tá dược trơn (ví dụ, magie stearat, hoạt thạch, hoặc silic oxit); tá dược rã (ví dụ, tinh bột khoai tây hoặc natri tinh bột glycolat); hoặc tác nhân tạo ẩm (ví dụ, natri lauryl sulphat). Viên nén có thể được bao bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này. Các chế phẩm lỏng để sử dụng qua đường uống có thể ở dạng, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch, sirô hoặc huyền phù, hoặc chúng có thể được trình bày ở dạng sản phẩm khô để kết hợp với nước hoặc tá dược lỏng thích hợp trước khi sử dụng. Các chế phẩm lỏng như vậy có thể được điều chế bằng các phương pháp thích hợp với các tá dược được dùng như tác nhân tạo huyền phù (ví dụ, sirô sorbitol, dẫn xuất xenluloza, hoặc các chất béo hydro hóa tiêu hóa được); tác nhân nhũ hóa (ví dụ, lexitin hoặc acaxia); các tá dược lỏng không phải nước (ví dụ, dầu hạnh, este béo, rượu etylic, hoặc dầu thực vật phân đoạn); và chất bảo quản (ví dụ, methyl hoặc propyl-p- hydroxybenzoat hoặc axit sorbic). Các chế phẩm này cũng có thể chứa muối đệm, tác nhân điều vị, chất tạo màu, và chất làm ngọt thích hợp. Các chế phẩm để sử dụng qua đường uống có thể được tạo công thức thích hợp để giải phóng chậm, giải phóng kiểm soát, hoặc giải phóng duy trì (các) kháng thể.

Đối với việc sử dụng tại phổi, ví dụ bằng cách sử dụng thiết bị xông hít hoặc thiết bị khí dung, các chế phẩm có thể được bào chế cùng với tác nhân tạo sol khí. Xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6,019,968; 5,985,320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; và 4,880,078; và WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; và WO 99/66903. Cụ thể là, kháng thể theo sáng chế, liệu pháp kết hợp, và/hoặc chế

phẩm có thể được sử dụng bằng kỹ thuật phân phối được chất tại chỗ Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass., USA).

Các chế phẩm có thể được tạo công thức để sử dụng ngoài đường tiêu hóa bằng cách tiêm (ví dụ, bằng cách tiêm thể tích lớn hoặc tiêm liên tục). Các chế phẩm để tiêm có thể được trình bày ở dạng liều đơn vị (ví dụ, trong các ống hoặc trong các vật chứa nhiều liều) với chất bảo quản bổ sung. Chế phẩm có thể ở các dạng như huyền phù, dung dịch hoặc nhũ tương trong tá dược lỏng dầu hoặc nước, và có thể chứa các tá dược như tác nhân tạo huyền phù, tác nhân ổn định và/hoặc tác nhân phân tán. Theo cách khác, thành phần có hoạt tính có thể ở dạng bột để kết hợp với tá dược lỏng thích hợp (ví dụ, nước vô trùng không chứa chất gây sốt) trước khi sử dụng.

Ngoài ra, các chế phẩm có thể được bào chế dưới dạng chế phẩm giải phóng kéo dài. Các chế phẩm tác dụng kéo dài này có thể được sử dụng bằng cách cấy (ví dụ, dưới da hoặc trong cơ) hoặc bằng cách tiêm trong cơ. Do đó, ví dụ, các chế phẩm này có thể được bào chế cùng với nguyên liệu là polyme hoặc nguyên liệu kỵ nước thích hợp (ví dụ, nhũ tương trong dầu dược dụng) hoặc nhựa trao đổi ion, hoặc các dẫn xuất ít tan (ví dụ, muối ít tan).

Các chế phẩm có thể được bào chế ở dạng trung tính hoặc muối. Các muối được dụng bao gồm các dạng với các anion như anion thu được từ axit clohydric, axit phosphoric, axit axetic, axit oxalic, axit tartaric, v.v., và các muối được tạo thành từ các cation như cation từ natri, kali, amoni, canxi, sắt hydroxit, isopropylamin, triethylamin, 2-ethylamino etanol, histidin, procain, v.v..

Nói chung, các thành phần của chế phẩm được cung cấp riêng biệt hoặc được phối hợp cùng nhau ở dạng liều đơn vị, ví dụ dưới dạng bột đông khô hoặc dịch đặc không chứa nước đựng trong các vật chứa được hàn kín như ống tiêm hoặc các gói ghi rõ lượng thành phần có hoạt tính. Khi đường dùng là truyền, chế phẩm có thể được pha chế với một chai truyền chứa nước hoặc nước muối tiêu chuẩn vô khuẩn. Khi đường dùng là tiêm, một ống tiêm chứa nước vô khuẩn để tiêm hoặc nước muối có thể được cung cấp sao cho các thành phần có thể được trộn trước khi dùng.

Cụ thể, sáng chế cũng đề xuất một hoặc nhiều kháng thể, hoặc dược phẩm theo sáng chế được đóng gói trong vật chứa hàn kín như ống tiêm hoặc gói ghi rõ lượng kháng thể. Theo một phương án, một hoặc nhiều kháng thể, hoặc dược phẩm theo sáng chế được cung cấp ở dạng bột đông khô vô khuẩn hoặc các sản phẩm cô không có nước trong vật chứa được hàn kín và có thể được hoàn nguyên (ví dụ, với nước hoặc nước muối) đến nồng độ thích hợp để sử dụng cho đối tượng. Theo một phương án, một hoặc nhiều kháng thể hoặc dược phẩm theo sáng chế được cung cấp ở dạng bột đông khô vô khuẩn trong vật chứa hàn kín ở liều đơn vị chứa ít nhất 5mg, ví dụ ít nhất là 10mg, ít nhất 15mg, ít nhất 25mg, ít nhất 35mg, ít nhất 45mg, ít nhất 50mg, ít nhất 75mg, hoặc ít nhất 100 mg. Kháng thể hoặc dược phẩm đông khô theo sáng chế nên được bảo quản ở nhiệt độ trong khoảng từ 2°C đến 8°C. trong vật chứa ban đầu của nó và kháng thể, hoặc dược phẩm theo sáng chế được sử dụng, ví dụ trong vòng 1 tuần, ví dụ, trong vòng 5 ngày, trong vòng 72 giờ, trong vòng 48 giờ, trong vòng 24 giờ, trong vòng 12 giờ, trong vòng 6 giờ, trong vòng 5 giờ, trong vòng 3 giờ, hoặc trong vòng 1 giờ sau khi được phục hồi. Theo một phương án khác, một hoặc nhiều kháng thể hoặc dược phẩm theo sáng chế được cung cấp ở dạng lỏng trong vật chứa hàn kín chỉ rõ lượng và nồng độ của kháng thể. Theo một phương án khác, các dạng lỏng của chế phẩm sử dụng được cung cấp ở trong vật chứa hàn kín với lượng ít nhất 0,25mg/ml, ví dụ ít nhất 0,5mg/ml, ít nhất 1mg/ml, ít nhất 2,5mg/ml, ít nhất 5mg/ml, ít nhất 8mg/ml, ít nhất 10mg/ml, ít nhất 15mg/kg, ít nhất 25mg/mL, ít nhất 50mg/ml, ít nhất 75mg/ml hoặc ít nhất 100mg/ml. Dạng lỏng nên được bảo quản ở nhiệt độ trong khoảng từ 2°C đến 8°C trong vật chứa ban đầu của nó.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được đưa vào trong dược phẩm thích hợp để sử dụng ngoài đường tiêu hóa. Theo một khía cạnh, kháng thể sẽ được điều chế thành các dung dịch tiêm được chứa 0,1-250mg/ml kháng thể. Dung dịch tiêm có thể ở dạng liều lỏng hoặc đông khô trong các ống màu hổ phách hoặc ống cứng, ống tiêm hoặc xilanh đã đóng thuốc. Đệm có thể là L-histidin (1-50 mM), tốt nhất là 5-10mM, ở độ pH = 5,0 đến 7,0 (tốt nhất là độ pH = 6,0). Các đệm thích hợp khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, natri succinat, natri xitrat, natri phosphat hoặc kali phosphat. Natri clorua có thể được sử dụng để điều chỉnh độc tính của dung dịch ở nồng độ 0-300 mM (tốt nhất là 150mM đối với dạng liều lỏng). Các chất bảo quản đông khô có thể được kết hợp vào dạng liều

đông khô, chủ yếu là 0-10% sucroza (tốt nhất là 0,5-1,0%). Các chất bảo quản đông khô thích hợp khác bao gồm trehaloza và lactoza. Các tác nhân tạo khối có thể được đưa vào dạng liều đông khô, chủ yếu là 1-10% manitol (tốt nhất là 2-4%). Chất ổn định có thể được sử dụng trong cả các dạng liều lỏng và đông khô, chủ yếu là L-Metionin 1-50 mM (tốt nhất là 5-10 mM). Các tác nhân tạo khối thích hợp khác bao gồm glyxin, arginin, có thể được đưa vào là 0-0,05% polysorbat-80 (tốt nhất là 0,005-0,01%). Các chất hoạt động bề mặt khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polysorbat 20 và chất hoạt động bề mặt BRIJ. Dược phẩm chứa kháng thể theo sáng chế được bào chế dưới dạng dung dịch tiêm để dùng ngoài đường tiêu hóa, có thể chứa thêm chất hữu ích làm chất điều chỉnh, như các chất được dùng để làm tăng độ hấp thụ, hoặc phân tán của kháng thể. Chất điều chỉnh hữu ích cụ thể là hyaluronidaza, như Helenex® (hyaluronidaza tái tổ hợp ở người). Việc bổ sung hyaluronidaza vào dung dịch tiêm sẽ cải thiện tính sinh khả dụng trên người sau khi dùng ngoài đường tiêu hóa, đặc biệt khi dùng dưới da. Nó cũng cho phép thể tích tiêm tại chỗ lớn hơn (ví dụ, lớn hơn 1 ml) và đau ít hơn, thoải mái hơn, và giảm thiểu các phản ứng tại vị trí tiêm (xem WO04/078140 và US2006104968).

Các dược phẩm theo sáng chế có thể có nhiều dạng. Chúng bao gồm, ví dụ các dạng liều lỏng, bán rắn và rắn, như dung dịch lỏng (ví dụ, dung dịch tiêm được và truyền được), hệ phân tán hoặc huyền phù, viên nén, viên ngậm, bột, liposom và thuốc đặt. Dạng được ưu tiên phụ thuộc vào đường dùng dự tính và áp dụng điều trị. Các dược phẩm có thể ở dạng dung dịch tiêm được hoặc truyền được, như các chế phẩm tương tự để sử dụng gây miễn dịch thụ động cho người với các kháng thể khác. Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể được mô tả ở đây được sử dụng bằng cách tiêm hoặc truyền trong tĩnh mạch. Theo phương án khác, kháng thể được sử dụng bằng cách tiêm trong cơ hoặc dưới da.

Các chế phẩm điều trị đặc trưng phải vô khuẩn và ổn định trong các điều kiện sản xuất và bảo quản. Chế phẩm này có thể được tạo công thức là một dung dịch, vi nhũ tương, hệ phân tán, liposom, hoặc các cấu trúc trật tự khác thích hợp với nồng độ dược chất cao. Các dung dịch vô khuẩn tiêm được có thể được bào chế bằng cách đưa hoạt chất (nghĩa là, protein liên kết, ví dụ kháng thể theo sáng chế) với lượng yêu cầu vào trong dung môi thích hợp với một hoặc một hỗn hợp các thành phần đã nêu ở trên, như yêu cầu, sau đó lọc tiệt

khuẩn. Thông thường, các hệ phân tán được bào chế bằng cách đưa hoạt chất vào trong một tá dược lỏng vô khuẩn chứa một môi trường phân tán bazơ và các thành phần đòi hỏi khác từ các thành phần đã nêu trong đây. Trong trường hợp vô khuẩn, bột đông khô để bào chế dung dịch vô khuẩn tiêm được, các phương pháp bào chế bao gồm sấy chân không và sấy phun để thu được bột chứa thành phần có hoạt tính với thành phần mong muốn bất kỳ khác nữa từ dung dịch được lọc vô khuẩn trước đó của chúng. Độ lỏng thích hợp của dung dịch có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng màng bao như lexitin, bằng cách duy trì cỡ hạt yêu cầu trong trường hợp hệ phân tán và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt. Đặc tính hấp thu kéo dài của chế phẩm tiêm được có thể thu được bằng cách đưa vào trong chế phẩm, tác nhân làm chậm quá trình hấp thu, ví dụ muối monostearat và gelatin.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng bằng nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Đối với nhiều ứng dụng điều trị, theo một phương án, đường/cách dùng có thể là tiêm dưới da, tiêm trong tĩnh mạch hoặc truyền. Các chuyên gia biết rõ rằng, đường dùng và/hoặc kiểu dùng phụ thuộc vào kết quả mong muốn. Theo một số phương án, hoạt chất có thể được bào chế cùng với một chất mang có tác dụng bảo vệ hợp chất này khỏi việc giải phóng nhanh chóng, như chế phẩm giải phóng kiểm soát, bao gồm các hệ thuốc cấy, miếng dán qua da, và hệ phân phối viên nang. Polyme tương thích sinh học, có thể thoái biến sinh học, có thể được sử dụng, như etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste, và axit polylactic. Nhiều phương pháp để bào chế các chế phẩm như vậy đã được cấp bằng sáng chế hoặc đã được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng qua đường uống, ví dụ cùng với một chất pha loãng trợ hoặc chất mang có thể tiêu hóa được. Kháng thể (và các thành phần khác, nếu muốn) cũng có thể được bao trong viên nang vỏ cứng hoặc mềm, nén thành viên nén, hoặc được đưa trực tiếp vào trong thức ăn của bệnh nhân. Đối với đường dùng qua đường uống, các hợp chất có thể được đưa vào cùng với tá dược và sử dụng ở dạng viên nén tiêu hóa được, viên nén ngậm trong má, viên ngậm, viên nang, viên ngọt, huyền phù, sirô, viên hình trứng nhện và các dạng tương tự. Để sử dụng kháng thể theo sáng chế bằng đường dùng ngoài đường tiêu hóa khác, có thể cần thiết

phải bao kháng thể này bằng hoặc sử dụng đồng thời kháng thể này với một nguyên liệu để ngăn nó mất hoạt tính.

Các hợp chất bổ sung có hoạt tính cũng có thể được đưa vào trong các chế phẩm. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế được bào chế cùng với và/hoặc được sử dụng đồng thời với một hoặc nhiều tác nhân điều trị bổ sung hữu dụng để điều trị các rối loạn hoặc bệnh được mô tả ở đây. Ví dụ, kháng thể kháng RGMa theo sáng chế có thể được tạo công thức đồng thời và/hoặc sử dụng đồng thời với một hoặc nhiều kháng thể khác gắn kết các đích khác (ví dụ, các kháng thể gắn kết các kháng nguyên tan khác hoặc gắn kết các phân tử bề mặt tế bào). Hơn nữa, một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng kết hợp với hai hoặc nhiều tác nhân điều trị đã nêu trên. Liệu pháp kết hợp này có thể sử dụng thuận lợi các liều tác nhân điều trị được sử dụng thấp hơn, do đó tránh được độc tính có thể hoặc các biến chứng thường gặp của các liệu pháp đơn khác nhau.

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế được liên kết với một tá dược lỏng kéo dài thời gian bán thải đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Các tá dược như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vùng Fc, polyetylen glycol, và dextran. Các tá dược lỏng như vậy được mô tả, ví dụ, trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 09/428083 và WO 99/25044.

Các trình tự axit nucleic mã hóa kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị, phòng ngừa, quản lý, hoặc cải thiện rối loạn hoặc một hoặc nhiều triệu chứng của nó bằng liệu pháp gen. Liệu pháp gen chỉ liệu pháp được tiến hành bằng cách sử dụng cho một đối tượng axit nucleic được biểu hiện hoặc có thể được biểu hiện. Các axit nucleic có thể sản sinh kháng thể được mã hóa theo sáng chế mà chúng làm trung gian cho hiệu quả phòng rối loạn hoặc chữa rối loạn.

Phương pháp bất kỳ của liệu pháp gen đã có trong lĩnh vực này có thể được sử dụng theo sáng chế. Phần nêu tổng quát về các phương pháp của liệu pháp gen được nêu trong tài liệu: Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy*, 12: 488-505; Wu and Wu, 1991, *Biotherapy*, 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32: 573-596; Mulligan, 1993, *Science*, 260: 926- 932; và Morgan and Anderson, *Ann. Rev. Biochem.*,

62: 191-217, có thể (1993) TIBTECH 11(5):155-215. Các phương pháp thường được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật ADN tái tổ hợp có thể được sử dụng đến, được mô tả trong tài liệu: Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY, 1993); và Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, (Stockton Press, NY, 1990). Phần mô tả chi tiết về nhiều phương pháp sử dụng liệu pháp gen khác nhau được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số A1.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được dùng một mình hoặc trong hỗn hợp để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh đi kèm với sự thoái hóa sợi trục thần kinh, như đa xơ cứng, bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm trí nhớ, bệnh Parkinson, tổn thương do chấn thương ở hệ thần kinh trung ương, hoặc bệnh bất kỳ khác đi kèm với RGMa.

Cần hiểu rằng kháng thể có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc kết hợp với một tác nhân bổ sung, ví dụ, tác nhân điều trị, hoạt chất này nêu trên được chọn bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này theo mục đích sử dụng dự tính. Ví dụ, hoạt chất bổ sung có thể là chất ức chế miễn dịch hoặc tác nhân điều trị một hoặc nhiều triệu chứng đi kèm bệnh đa xơ cứng. Hoạt chất bổ sung này có thể là beta interferon. Beta interferon, như Avonex, Betaseron, Extavia and Rebif, có thể làm chậm tốc độ tiến triển của các triệu chứng đa xơ cứng theo thời gian. Hoạt chất bổ sung này có thể là Glatiramer (Copaxon), chất này phong bế sự tấn công vào hệ miễn dịch trên myelin. Hoạt chất bổ sung này cũng có thể là Fingolimod (Gilenya), một chất bẫy tế bào miễn dịch ở hạch bạch huyết. Hoạt chất bổ sung này có thể là Natalizumab (Tysabri), mà có thể can thiệp vào sự di chuyển của các tế bào miễn dịch có nguy cơ tổn thương khỏi dòng máu vào não và tủy sống. Dược chất bổ sung này có thể là Mitoxantrone (Novantrone), một thuốc ức chế miễn dịch.

Tác nhân điều trị bổ sung có thể là “thuốc tăng cường nhận thức”, một thuốc tăng khả năng nhận thức của não (gọi tên, suy nghĩ, học tập và ghi nhớ) ở người bị suy giảm. Các thuốc tăng cường nhận thức hoạt động bằng cách làm thay đổi tính sẵn có của các chất hóa học thần kinh (ví dụ, các chất dẫn truyền thần kinh, enzym, và hormon), bằng cách cải thiện nguồn cung cấp oxy, bằng cách kích thích sự phát triển thần kinh, hoặc bằng cách ức chế sự tổn thương thần kinh. Ví dụ về các thuốc tăng cường nhận thức bao gồm hợp chất làm tăng hoạt động của axetylcholin như nhưng không chỉ giới hạn ở, chất

chủ vận thụ thể axetylcholin (ví dụ, chất chủ vận thụ thể nicotinic α -7 hoặc chất điều biến khác nhau về lập thể, chất chủ vận thụ thể α 4 β 2 nicotinic hoặc chất điều biến khác nhau về lập thể), chất ức chế axetylcholinesteraza (ví dụ, donepezil, rivastigmin, and galantamin), chất ức chế butyrylcholinesteraza, chất ức chế thụ thể N-metyl-D-aspartat (NMDA) (ví dụ, memantin), chất chủ vận protetin bảo vệ thần kinh phụ thuộc hoạt tính (activity-dependent neuroprotective protein - ADNP), chất chủ vận thụ thể serotonin 5-HT1A (ví dụ, xaliproden), chất chủ vận thụ thể 5-HT4, chất đối kháng thụ thể 5-HT6, chất đối kháng thụ thể serotonin 1A, chất đối kháng thụ thể histamin H3, chất ức chế calpain, protein hoặc chất chủ vận yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch máu (vascular endothelial growth factor - VEGF), yếu tố sinh trưởng sinh dưỡng, hợp chất chống lại quá trình chết tế bào theo chương trình, chất hoạt hóa thụ thể glutamat loại AMPA, chất chặn hoặc điều biến kênh canxi loại L hoặc N, chất chặn kênh kali, chất hoạt hóa yếu tố gây giảm oxy huyết (hypoxia inducible factor - HIF), chất ức chế HIF prolyl 4-hydroxylaza, chất chống viêm, chất ức chế A β peptit dạng tinh bột hoặc mảng bám dạng tinh bột, chất ức chế quá trình siêu phosphoryl hóa protein Tau, chất ức chế enzym phosphodiesteraza 5 (ví dụ, tadalafil, sildenafil), chất ức chế enzym phosphodiesteraza 4, chất ức chế monoamin oxidaza, hoặc muối được dụng của nó. Ví dụ cụ thể về các thuốc tăng cường nhận thức này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất ức chế enzym cholinesteraza như donepezil (Aricept®), rivastigmin (Exelon®), galanthamin (Reminyl®), chất đối kháng N-metyl-D-aspartat như memantin (Namenda®). Ít nhất một thuốc tăng cường nhận thức có thể được dùng đồng thời với các kháng thể theo sáng chế hoặc liên tiếp với kháng thể theo sáng chế (và theo trình tự bất kỳ) kể cả các chất hiện đã được phát hiện, hoặc trong tương lai phát hiện thấy, hữu ích để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh được điều trị bằng kháng thể theo sáng chế). Do đó, hỗn hợp được mô tả ở đây có thể có tác dụng cộng hợp hoặc hiệp đồng khi được sử dụng trong trường hợp điều trị nêu trên. Chất bổ sung này cũng có thể là chất đóng góp lợi ích cho được phẩm, ví dụ chất ảnh hưởng đến độ nhớt của chế phẩm.

Cần hiểu rằng các hỗn hợp được đưa vào trong sáng chế là các hợp chất hữu dụng cho mục đích mong muốn của chúng. Các chất nêu trên chỉ để minh họa cho mục đích và không giới hạn phạm vi sáng chế. Các hỗn hợp nằm trong sáng chế có thể bao gồm kháng

thể theo sáng chế và ít nhất một hoạt chất bổ trợ được chọn từ danh sách nêu dưới đây. Hỗn hợp này cũng có thể bao gồm nhiều hơn một hoạt chất bổ trợ, ví dụ, hai hoặc ba hoạt chất bổ trợ nếu việc kết hợp sao cho chế phẩm thu được có thể thực hiện chức năng dự kiến của nó.

Dược phẩm có thể chứa "lượng có hiệu quả điều trị" hoặc "lượng có hiệu quả phòng bệnh" kháng thể theo sáng chế. "Lượng có hiệu quả điều trị" để chỉ lượng có hiệu quả, ở liều lượng và thời gian cần thiết, có thể đạt được kết quả điều trị mong muốn. Lượng có hiệu quả điều trị của protein liên kết có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh lý, tuổi, giới tính, thể trọng, và khả năng gây ra đáp ứng mong muốn trên đối tượng điều trị của protein liên kết. Lượng có hiệu quả điều trị cũng là lượng trong đó độc tính hoặc tác dụng có hại bất kỳ của kháng thể, hoặc mảnh kháng thể là không đáng kể so với các tác dụng có lợi trong điều trị. "Lượng có hiệu quả phòng bệnh" để chỉ lượng có hiệu quả, ở liều lượng và thời gian cần thiết, có thể đạt được kết quả phòng bệnh mong muốn. Thông thường, do liều phòng bệnh sẽ được sử dụng cho đối tượng trước khi hoặc ở giai đoạn sớm của bệnh, nên lượng có hiệu quả phòng bệnh sẽ nhỏ hơn lượng có hiệu quả điều trị.

Chế độ liều có thể được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng điều trị hoặc đáp ứng phòng bệnh). Ví dụ, có thể sử dụng một liều đơn nhất, nhiều liều chia nhỏ theo thời gian hoặc có thể giảm hoặc tăng liều theo tỷ lệ dựa vào tình trạng điều trị. Sẽ là rất ưu việt khi tạo ra dược phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa ở dạng liều đơn vị để có thể dễ dàng sử dụng và có sự đồng đều về liều lượng. Dạng liều đơn vị như sử dụng ở đây dùng để chỉ các đơn vị riêng biệt về mặt vật lý như liều đơn vị cho đối tượng là động vật có vú được điều trị; mỗi đơn vị chứa một lượng định trước hoạt chất đã được tính toán để tạo ra hiệu quả điều trị cùng với chất mang dược dụng cần thiết. Việc mô tả các dạng liều đơn vị theo sáng chế sẽ được diễn giải và phụ thuộc trực tiếp vào (a) đặc điểm đặc trưng của hoạt chất và hiệu quả điều trị hoặc phòng bệnh cụ thể cần đạt được, và (b) các hạn chế vốn có trong lĩnh vực bào chế như hợp chất có hoạt tính dùng để điều trị tình trạng nhạy cảm của bệnh nhân.

Khoảng ví dụ, không giới hạn phạm vi, về lượng cho hiệu quả điều trị hoặc lượng cho hiệu quả phòng bệnh của kháng thể theo sáng chế là liều nằm trong khoảng từ 0,1 đến 200mg/kg, ví dụ, 0,1 đến 10mg/kg. Lượng cho hiệu quả điều trị hoặc phòng ngừa có thể nằm trong khoảng 1 đến 200 mg/kg, 10 đến 200 mg/kg, 20 đến 200 mg/kg, 50 đến 200 mg/kg, 75 đến 200 mg/kg, 100 đến 200 mg/kg, 150 đến 200 mg/kg, 50 đến 100 mg/kg, 5 đến 10 mg/kg, hoặc 1 đến 10 mg/kg. Cần lưu ý rằng giá trị liều này có thể thay đổi tùy thuộc vào loại và mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh được làm giảm. Hơn thế nữa, liều kháng thể có thể được xác định bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính và trọng lượng của cá thể, và khả năng của kháng thể trong việc tạo ra đáp ứng mong muốn ở cá thể đó. Liều này cũng là liều trong đó hiệu quả điều trị của kháng thể lớn hơn tác động độc hoặc có hại bất kỳ, nếu có. Cũng cần hiểu rằng đối với một đối tượng cụ thể bất kỳ, chế độ liều đặc hiệu nên được điều chỉnh theo thời gian dựa theo nhu cầu của đối tượng và đánh giá chuyên môn của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và khoảng liều lượng nêu trên chỉ là ví dụ.

Phương pháp điều trị, ngăn ngừa, điều biến hoặc làm giảm bệnh đi kèm với bệnh thoái hóa thần kinh

Ở đối tượng bất kỳ, có thể đánh giá được đối tượng này có rối loạn thoái hóa thần kinh hay không. Việc đánh giá có thể chỉ rõ chế độ điều trị thích hợp như điều trị phòng ngừa, điều trị duy trì hoặc điều trị điều chỉnh. Do đó, sáng chế mô tả phương pháp điều trị, ngăn ngừa, điều biến, hoặc làm giảm bệnh/rối loạn của bệnh thoái hóa thần kinh. Kháng thể này có thể được dùng cho đối tượng cần điều trị. Kháng thể này có thể được dùng với lượng cho hiệu quả điều trị.

Nói chung, liều dùng các kháng thể sẽ thay đổi phụ thuộc vào các yếu tố như độ tuổi của bệnh nhân, trọng lượng, chiều cao, giới tính, tình trạng sức khỏe chung và tiền sử dùng thuốc trước đó. Thông thường, mong muốn cung cấp cho người dùng liều chứa thành phần kháng thể, protein tiếp hợp hoặc dung hợp miễn dịch nằm trong khoảng từ 1 pg/kg đến 10 mg/kg (lượng chất/thể trọng bệnh nhân), mặc dù liều thấp hơn hoặc cao hơn

cũng có thể được dùng theo yêu cầu cụ thể. Chế độ liều có thể được điều chỉnh để tạo ra đáp ứng mong muốn tối ưu (ví dụ, đáp ứng điều trị hoặc đáp ứng phòng bệnh). Ví dụ, có thể sử dụng một liều đơn nhất, nhiều liều chia nhỏ theo thời gian hoặc có thể giảm hoặc tăng liều theo tỷ lệ dựa vào tình trạng điều trị. Sẽ là rất ưu việt khi tạo ra được phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa ở dạng liều đơn vị để có thể dễ dàng sử dụng và có sự đồng đều về liều lượng. Dạng liều đơn vị như sử dụng ở đây dùng để chỉ các đơn vị riêng biệt về mặt vật lý như liều đơn vị cho đối tượng là động vật có vú được điều trị; mỗi đơn vị chứa một lượng định trước hoạt chất đã được tính toán để tạo ra hiệu quả điều trị cùng với chất mang được dùng cần thiết. Việc mô tả các dạng liều đơn vị theo sáng chế sẽ được diễn giải và phụ thuộc trực tiếp vào (a) đặc điểm đặc trưng của hoạt chất và hiệu quả điều trị hoặc phòng bệnh cụ thể cần đạt được, và (b) các hạn chế vốn có trong lĩnh vực bào chế như hợp chất có hoạt tính dùng để điều trị tình trạng nhạy cảm của bệnh nhân.

Khoảng ví dụ nhưng không giới hạn phạm vi về lượng cho hiệu quả điều trị hoặc lượng cho hiệu quả phòng bệnh của kháng thể theo sáng chế là liều nằm trong khoảng từ 0,1 đến 200mg/kg, ví dụ, 0,1 đến 10mg/kg. Cần lưu ý rằng giá trị liều này có thể thay đổi tùy thuộc vào loại và mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh được làm giảm. Hơn thế nữa, liều kháng thể có thể được xác định bởi người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính và trọng lượng của cá thể, và khả năng của kháng thể trong việc tạo ra đáp ứng mong muốn ở cá thể đó. Liều này cũng là liều trong đó hiệu quả điều trị của kháng thể lớn hơn tác động độc hoặc có hại bất kỳ, nếu có. Cũng cần hiểu rằng đối với một đối tượng cụ thể bất kỳ, chế độ liều đặc hiệu nên được điều chỉnh theo thời gian dựa theo nhu cầu của đối tượng và đánh giá chuyên môn của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và khoảng liều lượng nêu trên chỉ là ví dụ.

Việc dùng các kháng thể cho bệnh nhân có thể là trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong cơ, dưới da, trong màng phổi, nội tủy mạc, trong máu, trong thủy tinh thể, bằng cách truyền thông qua một ống thông vùng, hoặc bằng cách truyền trực tiếp vào vùng thương tổn. Khi dùng protein trị liệu bằng cách tiêm, việc dùng có thể là truyền liên tục hoặc bằng cách tiêm một liều hoặc nhiều liều. Việc tiêm trong tĩnh mạch là đường

dùng hữu ích do kháng thể đi vào vòng tuần hoàn và được phân bố nhanh. Kháng thể có thể được dùng qua đường uống, ví dụ, cùng với chất pha loãng trợ hoặc chất mang ăn được và có thể đông hóa được. Kháng thể và các thành phần khác, nếu cần, có thể được đóng vào viên nang gelatin vỏ cứng hoặc mềm, dập thành viên nén, viên nén ngậm, thuốc trứng, viên nang, cốm ngọt, huyền phù, sirô, viên hình trứng nhện, và các dạng tương tự khác.

Kháng thể kháng RGMa có thể được dùng ở liều protein thấp như 20 mg đến 2 g protein trong một liều, dùng một lần, hoặc nhiều lần, ngoài đường tiêu hóa. Theo cách khác, kháng thể có thể được dùng ở liều từ 20 đến 1000 mg protein trong một liều, hoặc từ 20 đến 500 mg protein trong một liều, hoặc từ 20 đến 100 mg protein trong một liều.

Các kháng thể có thể được dùng một mình hoặc chúng có thể được tiếp hợp với các liposom, và có thể được bào chế theo các phương pháp đã biết dùng để bào chế các dược phẩm hữu ích, theo đó kháng thể được kết hợp vào trong hỗn hợp với chất mang dược dụng. Thuật ngữ “chất mang dược dụng” có thể được dung nạp bởi bệnh nhân nhận. Nước muối được đệm phosphat vô trùng là một ví dụ về chất mang dược dụng. Các chất mang thích hợp khác cũng được người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ. Xem, ví dụ tài liệu: REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed. (1995).

Để điều trị, các kháng thể được dùng cho bệnh nhân với lượng cho hiệu quả điều trị trong chất mang dược dụng. Thuật ngữ “lượng cho hiệu quả điều trị” là lượng có ý nghĩa về mặt sinh lý. Kháng thể có ý nghĩa về mặt sinh lý nếu dạng trình bày của nó tạo ra sự thay đổi có thể phát hiện được trong sinh lý ở bệnh nhân nhận. Trong sáng chế, kháng thể có thể có ý nghĩa sinh lý nếu dạng trình bày của nó, ví dụ, làm giảm việc tiết interferon- γ (INF- γ), interleukin-2 (IL-2), IL-4 và/hoặc IL-17 từ các tế bào T dương tính với CD4. Một chất có ý nghĩa sinh lý nếu dạng trình bày của nó, ví dụ làm giảm đáp ứng tăng sinh và/hoặc mức biểu hiện xytokin tiền viêm trong các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell - PBMC).

Phương pháp điều trị khác có thể được sử dụng để kiểm soát thời gian tác động của kháng thể trong ứng dụng điều trị. Các chế phẩm giải phóng có kiểm soát có thể được bào chế bằng cách sử dụng các polyme để tạo phức hoặc hấp thụ kháng thể. Ví dụ, các polyme tương hợp sinh học bao gồm chất nền poly(etylen-co-vinyl axetat) và chất nền từ polyanhydrit copolyme của dime axit stearic và axit sebacic. Sherwood et al., *Bio/Technology* 10:1446 (1992). Tốc độ giải phóng kháng thể khỏi chất nền này phụ thuộc vào phân tử lượng của protein, lượng kháng thể trong chất nền, và cỡ hạt được phân tán. Saltzman et al., *Biophys. J.* 55:163 (1989); Sherwood et al., ở trên. Các dạng liều khác được mô tả trong REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th ed. (1995).

Các rối loạn/các bệnh thoái hóa thần kinh

Bệnh/rối loạn sợi trục có thể là bệnh hoặc rối loạn bất kỳ, trong đó, có tổn thương sợi trục và chức năng synap bị tổn thương. Sự tổn thương và chức năng bị tổn thương này có thể do dây thần kinh không được myelin hóa đầy đủ và/hoặc cắt ngang sợi trục. Rối loạn hoặc bệnh thoái hóa thần kinh có thể là bệnh đa xơ cứng, bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, hội chứng xơ cứng teo cơ một bên và các bệnh thần kinh vận động khác, bệnh Huntington, bệnh Tay-Sachs, bệnh Niemann-Pick, bệnh Gaucher, hội chứng Hurler, các bệnh thoái hóa myelin viêm tự phát, thiếu hụt vitamin B12, hội chứng tan cầu não trung tâm, bệnh giang mai biến chứng thần kinh, bệnh viêm tủy ngang, bệnh Devic, bệnh lý não chất trắng đa ổ tiến triển, bệnh viêm thần kinh thị giác và các bệnh võng mạc khác đi kèm với bệnh thoái hóa thần kinh, như bệnh glaucoma, bệnh thần kinh do đái tháo đường và thoái hóa võng mạc do tuổi, tổn thương do chấn thương hệ thần kinh trung ương, hoặc các bệnh rối loạn dưỡng chất trắng. Bệnh hoặc rối loạn thoái hóa thần kinh có thể do các sợi thần kinh không được bọc đầy đủ bằng các lớp mô tạo bởi chất béo (lipoprotein) được gọi là myelin. Các lớp này tạo ra vỏ myelin. Vỏ myelin này có thể cho phép các xung điện được dẫn truyền dọc theo sợi thần kinh nhanh và chính xác. Khi vỏ myelin bị tổn thương hoặc bị mất, các dây thần kinh không dẫn truyền các xung điện một cách bình thường. Đôi khi, do vỏ myelin bị mất hoặc tổn thương, mà các sợi thần kinh cũng có thể bị tổn thương.

Bình thường, trẻ sơ sinh ít tháng có thể thiếu vỏ myelin hoàn chỉnh. Do đó, các chuyển động của chúng thường giật giật, không phối hợp và vụng về. Khi vỏ myelin đã phát triển, các chuyển động trở nên uyển chuyển hơn, có chủ đích hơn và phối hợp tốt hơn. Tuy nhiên, vỏ myelin không phát triển một cách bình thường ở trẻ em bị một số bệnh, như bệnh Tay-Sachs, bệnh Niemann-Pick, bệnh Gaucher và hội chứng Hurler.

Ở người trưởng thành, vỏ myelin có thể bị phá hủy do chấn thương, viêm, rối loạn miễn dịch, rối loạn chuyển hóa và suy dinh dưỡng (như thiếu vitamin B12). Chất độc, thuốc (như kháng sinh ethambutol), và việc sử dụng quá mức rượu có thể gây tổn thương hoặc phá hủy vỏ myelin. Nếu vỏ này có thể tự phục hồi và tái tạo, chức năng dây thần kinh bình thường có thể phục hồi. Tuy nhiên, nếu vỏ này bị tổn thương nặng, sợi thần kinh nằm bên dưới có thể chết. Vì các sợi thần kinh trong hệ thần kinh trung ương (não và tủy sống) hiếm khi tái tạo, nên tổn thương này là không thể phục hồi.

Một số rối loạn thoái hóa sợi trục mà gây ra hủy myelin tác động chủ yếu đến hệ thần kinh trung ương. Các rối loạn khác ảnh hưởng chủ yếu đến dây thần kinh ở các phần khác của cơ thể. Các rối loạn thoái hóa sợi trục mà gây hủy myelin ở hệ thần kinh trung ương và không có nguyên nhân rõ ràng được gọi là rối loạn hủy myelin nguyên phát. Đa xơ cứng là rối loạn phổ biến nhất trong số các rối loạn này.

Đa xơ cứng

Bệnh cảnh lâm sàng của MS có thể được chia thành 4 nhóm chính (hoặc typ phụ): phục hồi tái phát (RRMS), tiến triển thứ phát (SPMS), tiến triển nguyên phát (PMS) và tái phát tiến triển (PRMS). Bệnh nhân có sự tái phát lâm sàng mỗi vài tháng hoặc vài năm với các khoảng thời gian gián đoạn có sự ổn định lâm sàng gọi là RRMS. RRMS có thể là phổ biến ở nữ gấp hai lần ở nam trong mười năm thứ hai hoặc thứ ba của cuộc đời. Ngược lại với RRMS, bệnh nhân bị SPMS thể hiện tình trạng tiến triển xấu đi giữa các lần tái phát. Bệnh nhân RRMS có thể chuyển sang SPMS theo thời gian được đặc trưng bởi sự suy giảm dần chức năng thần kinh. Khoảng 15% bệnh nhân MS có PPMS được đặc trưng bởi sự tấn công muộn và tình trạng xấu đi liên tục của chức năng thần kinh từ khi bệnh khởi phát. MS lành được định nghĩa tùy tiện là các bệnh nhân RRMS mà sau hơn 15 năm,

sau khi được chẩn đoán ban đầu, vẫn cử động được và chỉ thể hiện các khiếm khuyết nhẹ (Expanded Disability Status Scale [EDSS]). Thông thường, các bệnh nhân này thể hiện ít hoặc không thể hiện sự tiến triển nặng lên sau cơn bệnh đầu tiên của họ và không cần can thiệp điều trị; tuy nhiên, không thể chẩn đoán dạng MS này cho đến 5 năm sau khi khởi phát MS.

Bệnh Parkinson

Bệnh Parkinson là bệnh phổ biến ở nửa bán cầu Tây Âu và lần đầu được thông báo bởi bác sĩ James Parkinson in 1817. Bệnh Parkinson có thể đầu tiên được phát hiện dưới dạng bệnh liệt chi, và cuối cùng có thể tiến triển thành ba triệu chứng: (i) cứng cơ, đặc trưng bởi độ cứng giống "bánh xe" và "ống chì"; (ii) vận động chậm hoặc chậm vận động, và (iii) không ổn định tư thế đi kèm với tư thế gập lại và dáng đi khiếm khuyết. Các thay đổi vận động này là đặc trưng của tình trạng rối loạn chức năng vận động, nhưng ngoài ra cũng có thể có dấu hiệu suy giảm tinh thần ở nhiều bệnh nhân, khoảng 40% số bệnh nhân mắc Parkinson.

Bệnh Parkinson có thể do trạng thái thiếu hụt levodopamin trong não gây ra. Cụ thể hơn, levodopamin có thể gây rối loạn vận động ở bệnh nhân Parkinson và dẫn đến loại bỏ chất xám. Đến nay, y học chưa phát hiện ra chất nền cho phép dạng có thể tiêm vào não và đi qua thành công hàng rào máu não. Liệu pháp thay thế dopamin hiện nay nhằm vào việc thay thế trực tiếp hoặc mô phỏng tác dụng ở vị trí thụ thể dopamin trong não. Trong khi liệu pháp levodopa có thể tạo ra một số thay đổi có lợi ban đầu nhưng những thay đổi này có thể giảm dần theo thời gian, và tạo ra nhiều vấn đề khác như rối loạn giấc ngủ trầm trọng, rối loạn chức năng vận động, và buồn nôn liên tục. Phương pháp y tế điều trị bệnh Parkinson bao gồm mổ cắt bỏ mô não và đưa vào các vi điện cực (kích thích điện não sâu) vào phần não bị ảnh hưởng. Việc đưa các vi điện cực này vào có ưu điểm là làm đảo ngược sự tiến triển của bệnh. Tuy nhiên, các biện pháp can thiệp này thường là tạm thời, và chúng cũng không tạo ra sự thay đổi lâu dài trạng thái bệnh Parkinson và cũng không đảo ngược tác động của bệnh. Bệnh Parkinson có thể rối loạn nhiều yếu tố, thoái hóa thần kinh, và rối loạn này làm tiến triển sự oxy hóa quá mức. Chất xám của xương dễ bị tổn thương do quá trình oxy hóa, việc này cung cấp lý thuyết về sự hình thành bệnh

Parkinson. Các bất thường của quá trình phosphoryl hóa bằng cách oxy hóa làm suy yếu ty nập thể của chất xám, và tạo ra các gốc tự do.

Tổn thương do các chất chứa oxy phản ứng (gốc tự do)

Các chất chứa oxy phản ứng (Reactive oxygen species - ROS) có thể tấn công một vài mô và việc tiếp xúc thường xuyên với ROS có thể làm suy yếu các chức năng sinh lý khác nhau và làm tăng nguy cơ mắc một số loại rối loạn trầm trọng, bao gồm các rối loạn và các bệnh thoái hóa sợi trục thần kinh. ROS có thể tấn công các tế bào thần kinh và gây chết tế bào. Ví dụ, việc xử lý các tế bào thần kinh bằng hydro peroxit nồng độ thấp có thể làm tổn thương sợi trục thần kinh do tác động đến sự thay đổi bất lợi về hình thái học của sợi trục thần kinh, đôi khi gọi là gấp nếp sợi trục thần kinh. Việc gấp nếp sợi trục thần kinh có thể là một trong số các sự kiện sớm của quá trình thoái hóa thần kinh trước khi gây chết các tế bào thần kinh được xử lý bằng hydro peroxit.

Bệnh Alzheimer

Bệnh Alzheimer (Alzheimer's disease - AD) là nguyên nhân chính gây suy giảm trí nhớ ở người già. Mặc dù các dạng di truyền hiếm gặp của AD vẫn tồn tại nhưng hầu hết bệnh nhân được phân loại là có AD không thường xuyên do không có tiền sử gia đình thường được ghi nhận. Về mặt bệnh lý, AD được đặc trưng bởi sự thoái hóa thần kinh và synap với số lượng mảng bám và đám rối tơ thần kinh tăng lên theo tuổi so với các cá thể không bị suy giảm trí nhớ ở cùng độ tuổi

Các mảng bám do tuổi, đặc trưng của bệnh Alzheimer, được cấu thành từ nhân trung tâm của beta-amyloid tích tụ, một sản phẩm phân cắt của protein tiền chất dạng tinh bột (amyloid precursor protein - APP). Các đám rối tơ thần kinh là các cấu trúc giống sợi chỉ không tan bên trong tế bào được tạo ra từ dạng được siêu phosphoryl hóa của một protein được gọi là Tau, mà thường đi kèm với vi cấu trúc hình ống.

Các lát cắt sau khi chết của mô não ở những nạn nhân của bệnh Alzheimer có xuất hiện sự có mặt của dạng tinh bột trong dạng của nhân ngoại bào protein của mảng bám viêm dây thần kinh, một đặc trưng của AD. Nhân dạng tinh bột của các mảng bám viêm

dây thần kinh này được cấu thành từ một protein gọi là dạng tinh bột β mà được sắp xếp ở cấu hình dạng tấm gấp nếp chủ yếu. Mori et al., *Journal of Biological Chemistry* 267: 17082 (1992); Kirschner et al., *PNAS* 83: 503 (1986). Các mảng bám viêm dây thần kinh này là biểu hiện sớm và không thay đổi của bệnh. Mann et al., *J. Neurol. Sci.* 89: 169; Mann, *Mech. Ageing Dev.* 31: 213 (1985); Terry et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 46: 262 (1987).

Sự lắng đọng ban đầu của $A\beta$ có thể xuất hiện trước khi các triệu chứng lâm sàng được nhận biết. “Tiêu chuẩn tế vi tối thiểu” được khuyến cáo hiện nay để chẩn đoán AD là dựa trên số mảng bám viêm dây thần kinh được phát hiện thấy ở não. Khachaturian, *Arch. Neurol.* , *supra* (1985). Không may là công việc đánh giá số đếm mảng bám viêm dây thần kinh phải chỉ được tiến hành sau khi bệnh nhân chết.

Các mảng bám viêm dây thần kinh chứa amyloid – một dạng giống tinh bột – là đặc tính nổi bật của các khu vực chọn lọc của não trong bệnh AD cũng như trong hội chứng Down và ở người đồng hợp tử cho alen apolipoprotein E4, người mà rất có thể phát triển AD. Corder et al., *Science* 261: 921 (1993); Divry, P. , *J. Neurol. Psych.* 27: 643-657 (1927); Wisniewski et al., in Zimmerman, H. M. (ed.): *PROGRESS IN NEUROPATHOLOGY* (Grune and Stratton, N. Y. 1973) pp. 1-26. Amyloid trong não được chứng minh dễ dàng bằng cách nhuộm các lát cắt não bằng thioflavin S hoặc đỏ Congo. Puchtler et al., *J. Histochem. Cytochem.* 10: 35 (1962). Amyloid được nhuộm màu bằng đỏ Congo được đặc trưng bởi hình dáng lưỡng hướng sắc, thể hiện màu phân cực vàng-xanh. Liên kết lưỡng hướng sắc là kết quả của cấu trúc dạng tấm gấp nếp beta của protein dạng tinh bột. Glenner, G. N. *Eng. J. Med.* 302: 1283 (1980). Phần thảo luận chi tiết về hóa sinh và hóa mô của protein dạng tinh bột có thể được tìm thấy trong tài liệu: Glenner, N. *Eng. J. Med.* , 302: 1333 (1980).

Tồn thương do chấn thương đối với hệ thần kinh trung ương

Tỷ lệ mắc TBI ở Mỹ được ước tính sơ bộ là hơn 2 triệu người hằng năm với khoảng 500,000 bệnh nhân nhập viện. Trong số này, khoảng 70,000 đến 90,000 ca sống sót liên quan đến tổn thương đầu bị liệt vĩnh viễn.

Các đường thần kinh trong CNS của đối tượng có nguy cơ nếu các tế bào thần kinh bị chấn thương cơ học hoặc hóa học hoặc mức độ thoái hóa bệnh thần kinh đủ để đưa các tế bào thần kinh này vào nguy cơ bị chết. Chủ của bệnh lý thần kinh, một trong số đó chỉ ảnh hưởng đến quần thể bên dưới hoặc hệ thống tế bào thần kinh ở CNS hoặc hệ thần kinh ngoại biên đến nay đã xác định được. Các bệnh lý thần kinh, mà có thể tác động đến bản thân tế bào thần kinh hoặc các tế bào thần kinh đệm đi kèm, có thể là kết quả của việc rối loạn chuyển hóa tế bào, nhiễm khuẩn, tiếp xúc với chất độc, rối loạn chức năng tự miễn, suy dinh dưỡng hoặc thiếu máu cục bộ. Trong một số trường hợp, rối loạn chức năng tế bào được cho là trực tiếp giết chết tế bào. Trong một số trường hợp, bệnh lý thần kinh có thể gây ra hoại tử mô với lượng đủ để kích thích hệ miễn dịch/hệ thống viêm của cơ thể và cơ chế đáp ứng miễn dịch của cơ thể với tổn thương thần kinh ban đầu sẽ phát huy tế bào thần kinh và con đường được định dạng bởi các tế bào thần kinh này.

Đối tượng

Đối tượng có thể là động vật có vú, mà có thể là người. Đối tượng có thể có, hoặc đang có nguy cơ mắc rối loạn hoặc bệnh thoái hóa sợi trục thần kinh. Đối tượng có thể đã trải qua việc điều trị rối loạn hoặc bệnh thoái hóa sợi trục thần kinh.

Phương pháp chẩn đoán

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp xác định đối tượng mắc rối loạn hoặc bệnh thoái hóa sợi trục thần kinh. Mức RGMA gắn vào màng tế bào có thể được đo và so với mức RGMA trong mẫu đối chứng. Mẫu đối chứng có thể thu được từ mô bình thường. Mức thay đổi RGMA so với đối chứng có thể cho thấy đối tượng có rối loạn hoặc bệnh thoái hóa sợi trục thần kinh. Ví dụ, mức tăng RGMA, so với đối chứng bình thường, có thể cho thấy đối tượng có rối loạn hoặc bệnh thoái hóa sợi trục thần kinh. Mức RGMA có thể được đo bằng cách sử dụng các kháng thể được mô tả ở đây.

Mẫu

Mẫu có thể là mẫu mô bất kỳ từ đối tượng. Mẫu có thể chứa protein từ đối tượng. Mẫu có thể là huyết thanh, huyết tương của máu hoặc sinh thiết mô. Mẫu có thể được

dùng trực tiếp khi thu được từ đối tượng hoặc sau khi xử lý trước để thay đổi đặc tính của mẫu. Việc xử lý trước có thể bao gồm chiết, cô, bất hoạt các thành phần gây nhiễu, và/hoặc bổ sung chất thử.

Loại tế bào, mô, dịch cơ thể bất kỳ có thể được sử dụng để thu được mẫu. Tế bào, mô, dịch cơ thể có thể bao gồm các lát cắt mô như sinh thiết và mẫu tử thi, các lát cắt đông lạnh lấy cho mục đích xác định mô học, máu, huyết thanh, huyết tương, phân, nước mắt, dịch nhầy, nước bọt, tóc và da. Các loại tế bào và mô có thể còn bao gồm dịch bạch huyết, dịch cổ trướng, dịch âm đạo, nước tiểu, dịch màng bụng, dịch não tủy, dịch thu được bằng cách rửa âm đạo, hoặc thu được bằng cách phun âm đạo. Loại mô hoặc tế bào có thể được cung cấp bằng cách loại bỏ mẫu tế bào từ động vật, nhưng cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các tế bào đã phân lập trước đó (ví dụ, phân lập bằng người khác, ở thời điểm khác và/hoặc cho mục đích khác). Các mô hoạt động, như các mô có tiền sử điều trị hoặc hiệu quả, cũng có thể được dùng. Việc tinh chế protein có thể không cần thiết.

Phát hiện RGMa

Sự có mặt hoặc lượng RGMa có mặt trong mẫu máu có thể được xác định dễ dàng bằng, ví dụ, phương pháp khối phổ, các thử nghiệm miễn dịch hoặc hóa mô miễn dịch (ví dụ, nhờ các lát cắt từ sinh thiết mô) bằng cách sử dụng các kháng thể được mô tả ở đây (đơn dòng hoặc đa dòng) hoặc các mảnh của nó kháng RGMa. Kháng thể kháng RGMa và các mảnh của nó có thể được tạo ra như được mô tả ở trên. Các phương pháp phát hiện khác bao gồm các phương pháp được mô tả trong, ví dụ, patent Mỹ số 6,143,576; 6,113,855; 6,019,944; 5,985,579; 5,947,124; 5,939,272; 5,922,615; 5,885,527; 5,851,776; 5,824,799; 5,679,526; 5,525,524; và 5,480,792.

(1) Thử nghiệm miễn dịch

RGMa, và/hoặc các peptit của nó, có thể được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch. Sự có mặt hoặc lượng RGMa có thể được xác định bằng cách sử dụng các kháng thể được mô tả ở đây và phát hiện liên kết đặc hiệu với RGMa. Ví dụ, kháng thể, hoặc mảnh của nó, có thể liên kết đặc hiệu với polypeptit chứa trình tự nêu trong SEQ

ID NO:65, hoặc mảnh của nó. Kháng thể, hoặc mảnh của nó, có thể liên kết đặc hiệu với polypeptit chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:66, hoặc mảnh của nó.

Thử nghiệm miễn dịch bất kỳ có thể được sử dụng. Thử nghiệm miễn dịch có thể là thử nghiệm miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm ức chế cạnh tranh, thử nghiệm ức chế cạnh tranh xuôi hoặc ngược, thử nghiệm phân cực ánh sáng huỳnh quang, hoặc thử nghiệm liên kết cạnh tranh, chẳng hạn. Thử nghiệm ELISA có thể là thử nghiệm ELISA kẹp. Liên kết miễn dịch đặc hiệu của kháng thể này với RGMa có thể được phát hiện thông qua chất đánh dấu trực tiếp, như đuôi phát huỳnh quang hoặc đuôi phát quang, kim loại và nuclit phóng xạ được gắn với kháng thể hoặc thông qua các chất đánh dấu gián tiếp, như kiềm phosphatase hoặc peroxidaza cải ngựa.

Việc sử dụng các kháng thể được cố định hoặc các mảnh của chúng có thể được kết hợp vào thử nghiệm miễn dịch. Các kháng thể có thể được cố định trên rất nhiều chất mang khác nhau, như các hạt chất nền có từ tính hoặc chất nền làm sắc ký, bề mặt của đĩa thử nghiệm (như các lỗ của đĩa vi chuẩn độ), các mảnh của nguyên liệu làm cơ chất rắn, và các chất mang khác tương tự. Bảng thử nghiệm có thể được tạo ra bằng cách phủ kháng thể hoặc rất nhiều kháng thể trong mảng trên chất dẫn. Bảng này sau đó được nhúng vào trong mẫu sinh học thử nghiệm và sau đó thử nghiệm nhanh bằng cách rửa và các bước phát hiện để tạo ra tín hiệu đo được, như các vết có màu.

Thử nghiệm ELISA kẹp

Thử nghiệm ELISA kẹp đo lượng kháng nguyên giữa hai lớp kháng thể (nghĩa là, kháng thể bắt giữ và kháng thể phát hiện). RGMa được đo có thể chứa ít nhất hai vị trí kháng nguyên có khả năng liên kết với kháng thể. Kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng có thể được dùng làm kháng thể bắt giữ và kháng thể phát hiện trong thử nghiệm ELISA kẹp.

Thông thường, ít nhất hai kháng thể được dùng để phân tách và định lượng RGMa hoặc mảnh RGMa trong mẫu thử. Cụ thể hơn, ít nhất hai kháng thể liên kết với các epitop

nhất định của mảnh RGMa hoặc RGMa tạo thành phức miễn dịch được gọi là "kẹp". Một hoặc nhiều kháng thể có thể được dùng để bắt giữ RGMa hoặc mảnh RGMa trong mẫu thử (các kháng thể này thường được gọi là kháng thể "bắt giữ" hoặc các kháng thể "bắt giữ") và một hoặc nhiều kháng thể được dùng để liên kết với chất đánh dấu phát hiện được (nghĩa là, có thể định lượng được) với hỗn hợp (các kháng thể này thường được gọi là kháng thể "phát hiện" hoặc các kháng thể "phát hiện"). Trong thử nghiệm kẹp, cả các kháng thể liên kết với epitop của chúng có thể không bị giảm khả năng liên kết do liên kết của kháng thể bất kỳ khác trong thử nghiệm với epitop tương ứng của nó. Nói cách khác, các kháng thể có thể được chọn một hoặc nhiều kháng thể đầu tiên được cho tiếp xúc với mẫu thử nghi ngờ chứa RGMa hoặc mảnh RGMa không liên kết với toàn bộ hoặc một phần của epitop được nhận diện bởi kháng thể thứ hai hoặc kháng thể sau đó, nhờ đó ảnh hưởng đến khả năng liên kết với RGMa hoặc mảnh RGMa của một hoặc nhiều kháng thể phát hiện thứ hai.

Các kháng thể có thể được dùng làm kháng thể đầu tiên trong thử nghiệm miễn dịch nêu trên. Tốt hơn, nếu kháng thể liên kết đặc hiệu miễn dịch với các epitop chứa ít nhất ba (3) các axit amin liên tiếp của trình tự nêu trong SEQ ID NO:65, 66 hoặc 74. Ngoài các kháng thể theo sáng chế, thử nghiệm miễn dịch nêu trên có thể bao gồm kháng thể thứ hai liên kết đặc hiệu miễn dịch với các epitop có trình tự axit amin chứa ít nhất ba (3) axit amin liên tiếp của các trình tự nêu trong SEQ ID NO:65, 66 hoặc 74, trong đó (3) axit amin liên tiếp liên kết với kháng thể thứ hai khác ba axit amin liên tiếp (3) liên kết với kháng thể thứ nhất.

Ưu tiên là, mẫu thử nghi ngờ chứa RGMa hoặc mảnh RGMa có thể được cho tiếp xúc với ít nhất một kháng thể bắt giữ đầu tiên (hoặc các kháng thể) và ít nhất một kháng thể thứ hai đồng thời hoặc lần lượt. Trong dạng thử nghiệm kẹp, mẫu thử bị nghi ngờ chứa RGMa hoặc mảnh RGMa đầu tiên được cho tiếp xúc với ít nhất một kháng thể bắt giữ đầu tiên liên kết đặc hiệu với epitop cụ thể trong các điều kiện cho phép tạo ra phức kháng thể đầu tiên-RGMa. Nếu nhiều hơn một kháng thể bắt giữ được dùng, thì phức chất nhiều kháng thể bắt giữ đầu tiên -RGMa được tạo thành. Trong thử nghiệm kẹp, các kháng thể tốt hơn là ít nhất một kháng thể bắt giữ, được dùng với lượng mol dư của lượng

RGMa hoặc mảnh RGMa tối đa nghi ngờ trong mẫu thử. Ví dụ, khoảng từ 5 $\mu\text{g/ml}$ đến 1 mg/ml kháng thể trong ml đệm phủ vi hạt có thể được dùng.

Tùy ý, trước khi cho mẫu thử tiếp xúc với ít nhất một kháng thể bắt giữ đầu tiên, ít nhất một kháng thể bắt giữ đầu tiên có thể được cho liên kết với chất mang rắn mà hỗ trợ việc tách phức chất kháng thể đầu tiên - RGMa khỏi mẫu thử. Chất mang rắn bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được dùng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất mang rắn được làm từ vật liệu polyme ở dạng lỗ, ống, hoặc hạt. Kháng thể (hoặc các kháng thể) có thể liên kết với chất mang rắn bằng cách hấp thụ, bằng cách liên kết đồng hóa trị sử dụng chất kết hợp hóa học hoặc bằng các phương tiện khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, miễn là liên kết này không ảnh hưởng đến khả năng liên kết với RGMa hoặc mảnh RGMa của kháng thể này. Ngoài ra, nếu cần, chất mang rắn có thể được tạo dẫn xuất để cho phép phản ứng với nhiều nhóm chức khác nhau trên kháng thể. Việc tạo dẫn xuất này cần sử dụng các chất kết hợp nhất định như, nhưng không chỉ giới hạn ở, maleic anhydrit, N-hydroxysuxinimit và 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide.

Sau khi mẫu thử bị nghi ngờ chứa RGMa hoặc mảnh RGMa được cho tiếp xúc với ít nhất một kháng thể bắt giữ đầu tiên, mẫu thử này được ủ để cho phép tạo ra phức chất kháng thể đầu tiên bắt giữ (hoặc nhiều kháng thể)-RGMa. Việc ủ có thể được tiến hành ở độ pH nằm trong khoảng từ khoảng từ 4,5 đến 10,0, ở nhiệt độ khoảng từ 2°C đến 45°C, và trong thời gian từ ít nhất khoảng một (1) phút đến mười tám (18) giờ, khoảng từ 2-6 phút, hoặc khoảng từ 3-4 phút.

Sau khi tạo thành phức chất nhiều kháng thể bắt giữ đầu tiên-RGMa, phức chất này sau đó được cho tiếp xúc với ít nhất một kháng thể phát hiện thứ hai (trong các điều kiện cho phép tạo thành phức kháng thể đầu tiên/nhiều-RGMa-kháng thể thứ hai). Nếu phức chất kháng thể đầu tiên-RGMa được cho tiếp xúc với nhiều hơn một kháng thể phát hiện thì phức chất kháng thể bắt giữ đầu tiên/nhiều-RGMa-nhiều kháng thể phát hiện được tạo thành. Do với kháng thể đầu tiên, khi ít nhất kháng thể thứ hai (và sau đó) được cho tiếp xúc với phức chất kháng thể đầu tiên-RGMa, thời gian ủ trong điều kiện tương tự với các điều kiện được mô tả ở trên cần để tạo ra phức chất kháng thể đầu tiên/nhiều-RGMa-

kháng thể thứ hai/nhiều. Tốt hơn, nếu ít nhất một kháng thể thứ hai chứa chất đánh dấu phát hiện được. Chất đánh dấu phát hiện được có thể cho liên kết với ít nhất một kháng thể thứ hai trước khi, đồng thời hoặc sau khi tạo ra phức chất kháng thể đầu tiên/nhiều-RGMA-kháng thể thứ hai/nhiều. Chất đánh dấu phát hiện được đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được dùng.

Ức chế cạnh tranh xuôi

Trong dạng thử nghiệm cạnh tranh xuôi, phân ước của RGMA được đánh dấu, mảnh RGMA hoặc biến thể RGMA của nó có nồng độ đã biết được dùng để cạnh tranh với RGMA hoặc mảnh RGMA trong mẫu thử khi liên kết với kháng thể RGMA (như kháng thể theo sáng chế).

Trong thử nghiệm cạnh tranh xuôi, kháng thể đã cố định (như kháng thể theo sáng chế) có thể lần lượt hoặc đồng thời được cho tiếp xúc với mẫu thử và RGMA được đánh dấu, mảnh RGMA hoặc biến thể RGMA của nó. Peptit RGMA, mảnh RGMA hoặc biến thể RGMA có thể được đánh dấu bằng chất đánh dấu phát hiện được bất kỳ, bao gồm các chất đánh dấu phát hiện được được thảo luận ở trên liên quan đến kháng thể kháng RGMA. Trong thử nghiệm này, kháng thể có thể được cố định vào chất mang rắn. Theo cách khác, kháng thể có thể được kết hợp với kháng thể, như kháng thể kháng loài, được cố định vào chất mang rắn, như vi hạt.

Peptit RGMA được đánh dấu, mảnh RGMA hoặc biến thể RGMA, mẫu thử và kháng thể được ủ trong các điều kiện tương tự với các điều kiện được mô tả ở trên liên quan đến dạng thử nghiệm kẹp. Hai loại khác nhau của phức chất kháng thể-RGMA sau đó có thể được tạo ra. Cụ thể, một phức chất kháng thể-RGMA được tạo ra chứa chất đánh dấu phát hiện được trong khi đó phức chất kháng thể-RGMA còn lại không chứa chất đánh dấu phát hiện được. Phức chất kháng thể-RGMA có thể, nhưng không nhất thiết phải, được tách ra khỏi phần còn lại của mẫu thử trước khi định lượng chất đánh dấu phát hiện được. Bất kể phức chất kháng thể-RGMA có được tách ra khỏi phần còn lại của mẫu thử hay không nhưng lượng chất đánh dấu phát hiện được trong phức chất kháng thể-RGMA sau đó sẽ được định lượng. Nồng độ của RGMA hoặc mảnh RGMA trong mẫu thử sau đó có thể

được xác định bằng cách so sánh lượng chất đánh dấu phát hiện được trong phức chất kháng thể-RGMA với đường cong chuẩn. Đường cong chuẩn có thể được tạo ra sử dụng loạt pha loãng của RGMA hoặc mảnh RGM có nồng độ đã biết, bằng phở khối, đo trọng lực và bằng các kỹ thuật khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Phức chất kháng thể-RGMA có thể được tách ra khỏi mẫu thử bằng cách cho kháng thể liên kết với chất mang rắn, như chất mang rắn được thảo luận ở trên được mô tả ở trên liên quan đến dạng thử nghiệm kẹp, và sau đó loại bỏ phần còn lại của mẫu thử khỏi chất mang rắn mà tiếp xúc với nó.

Thử nghiệm cạnh tranh ngược

Trong thử nghiệm cạnh tranh ngược, peptit RGMA đã cố định, mảnh RGMA hoặc biến thể RGMA của nó có thể lần lượt hoặc đồng thời được cho tiếp xúc với mẫu thử và ít nhất một kháng thể được đánh dấu. Tốt hơn, nếu kháng thể này liên kết đặc hiệu với epitop có trình tự axit amin chứa ít nhất ba (3) axit amin liên tiếp của trình tự nêu trong SEQ ID NO:65 hoặc 66. Peptit RGMA, mảnh RGMA hoặc biến thể RGMA có thể được cho liên kết với chất mang rắn, như chất mang rắn được mô tả ở trên liên quan đến dạng thử nghiệm kẹp. Mảnh peptit RGMA có trình tự axit amin chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:65 hoặc 66.

RGMA đã cố định peptit, mảnh peptit RGMA hoặc biến thể RGMA của nó, mẫu thử và ít nhất một kháng thể được đánh dấu được ủ trong các điều kiện tương tự với các điều kiện được mô tả ở trên liên quan đến dạng thử nghiệm kẹp. Hai dạng khác nhau của phức chất RGMA-kháng thể sau đó được tạo ra. Cụ thể, một trong hai phức chất RGMA-kháng thể được tạo ra được cố định và chứa chất đánh dấu phát hiện được trong khi đó phức chất RGMA-kháng thể còn lại không được cố định và chứa chất đánh dấu phát hiện được. Phức chất RGMA-kháng thể không được cố định và phần còn lại của mẫu thử được loại bỏ phức chất RGMA được cố định-kháng thể nhờ các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như rửa. Ngay sau khi phức chất RGMA-kháng thể không được cố định được loại bỏ, lượng chất đánh dấu phát hiện được trong phức chất RGMA được cố định - kháng thể sau đó được định lượng. Nồng độ của RGMA hoặc mảnh RGMA trong mẫu thử sau đó có thể

được xác định bằng cách so sánh lượng chất đánh dấu phát hiện được trong phức chất của RGMa với đường cong chuẩn. Đường cong chuẩn có thể được tạo ra sử dụng loạt pha loãng của RGMa hoặc mảnh RGM có nồng độ đã biết, bằng phổ khối, đo trọng lực và bằng các kỹ thuật khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thử nghiệm phân cực ánh sáng huỳnh quang

Trong thử nghiệm phân cực ánh sáng huỳnh quang, kháng thể hoặc mảnh có hoạt tính chức năng của nó đầu tiên có thể được cho tiếp xúc với mẫu thử không được đánh dấu nghi ngờ chứa RGMa hoặc mảnh RGMa của nó để tạo ra phức chất RGMa không được đánh dấu-kháng thể. Phức chất RGMa không được đánh dấu-kháng thể sau đó được cho tiếp xúc với RGMa được đánh dấu phát ánh sáng huỳnh quang, mảnh RGMa hoặc biến thể RGMa của nó. RGMa được đánh dấu, mảnh RGMa hoặc biến thể RGMa cạnh tranh với RGMa bất kỳ không được đánh dấu hoặc mảnh RGMa trong mẫu thử trong việc liên kết với kháng thể hoặc mảnh có hoạt tính chức năng của nó. Lượng phức chất RGMa được đánh dấu-kháng thể được tạo ra được xác định và lượng RGMa trong mẫu thử được xác định sử dụng đường cong chuẩn.

Kháng thể được dùng in thử nghiệm phân cực ánh sáng huỳnh quang liên kết đặc hiệu với epitop có trình tự axit amin chứa ít nhất ba (3) axit amin từ trình tự nêu trong SEQ ID NO:65 hoặc SEQ ID NO:66 hoặc SEQ ID NO:74.

Kháng thể, peptit RGMa được đánh dấu, mảnh peptit RGMa hoặc biến thể RGMa của nó và mẫu thử và ít nhất một kháng thể được đánh dấu có thể được ủ trong các điều kiện tương tự với các điều kiện được mô tả ở trên liên quan đến thử nghiệm miễn dịch kẹp.

Theo cách khác, kháng thể hoặc mảnh có hoạt tính chức năng của nó có thể đồng thời được cho tiếp xúc với RGMa được đánh dấu phát ánh sáng huỳnh quang, mảnh RGMa hoặc biến thể RGMa của nó và mẫu thử không được đánh dấu bị nghi ngờ chứa RGMa hoặc mảnh RGMa của nó để tạo ra cả phức chất RGMa được đánh dấu-kháng thể và phức chất RGMa không được đánh dấu-kháng thể. Lượng phức chất RGMa được đánh

dấu - kháng thể được tạo thành được xác định và lượng RGMA trong mẫu thử được xác định sử dụng đường cong chuẩn.

Theo cách khác, kháng thể hoặc mảnh có hoạt tính chức năng của nó đầu tiên được cho tiếp xúc với RGMA được đánh dấu phát ánh sáng huỳnh quang, mảnh RGMA hoặc biến thể RGMA của nó để tạo ra phức chất RGMA được đánh dấu-kháng thể. Phức chất RGMA được đánh dấu-kháng thể sau đó được cho tiếp xúc với mẫu thử không được đánh dấu nghi ngờ chứa RGMA hoặc mảnh RGMA của nó. RGMA bất kỳ không được đánh dấu hoặc mảnh RGMA trong mẫu thử cạnh tranh với RGMA được đánh dấu, mảnh RGMA hoặc RGMA biến thể trong việc liên kết với kháng thể hoặc mảnh có hoạt tính chức năng của nó. Lượng phức chất RGMA được đánh dấu-kháng thể được tạo thành được xác định lượng RGMA trong mẫu thử được xác định thông qua việc sử dụng đường cong chuẩn. Kháng thể được dùng trong thử nghiệm miễn dịch này liên kết đặc hiệu với epitop có trình tự axit amin chứa ít nhất ba (3) axit amin liên tiếp của trình tự nêu trong SEQ ID NO:65, 66 hoặc 74.

Phương pháp khối phổ

Phương pháp khối phổ (Mass spectrometry - MS) có thể được dùng một mình hoặc kết hợp với các phương pháp khác. Các phương pháp khác bao gồm các thử nghiệm miễn dịch và các phương pháp được mô tả ở trên dùng để phát hiện các polynucleotit đặc hiệu. Phương pháp khối phổ có thể được dùng để xác định sự có mặt và/hoặc lượng của một hoặc nhiều chất đánh dấu sinh học. Phân tích MS có thể bao gồm phân tích MS giải hấp/ion hóa laze hỗ trợ bởi chất nền theo thời gian bay (matrix-assisted laser desorption/ionization – MALDI time-of-flight - TOF), như, ví dụ, MALDI-TOF trực tiếp tạo vết hoặc phân tích MS MALDI-TOF sắc ký lỏng. Theo một số phương án, phân tích MS bao gồm MS ion hóa phun điện tử (electrospray ionization - ESI), như ESI-MS sắc ký lỏng (liquid chromatography - LC). Phân tích khối lượng có thể được thực hiện sử dụng các phổ kế mua được trên thị trường. Phương pháp sử dụng phân tích MS, bao gồm MALDI-TOF MS và ESI-MS, để phát hiện sự có mặt hoặc lượng các peptit đánh dấu sinh học trong mẫu sinh học có thể được dùng. Xem, ví dụ patent Mỹ số 6,925,389; 6,989,100; và 6,890,763.

Đối chứng

Có thể cũng mong muốn bao gồm mẫu đối chứng. Mẫu đối chứng có thể được phân tích đồng thời với mẫu thu được từ đối tượng như đã nêu trên. Các kết quả thu được từ mẫu từ đối tượng có thể được so sánh với các kết quả thu được từ mẫu đối chứng. Đường cong chuẩn có thể được cung cấp, mà theo đó các kết quả thử nghiệm cho mẫu sinh học có thể được so sánh với. Các đường cong chuẩn này là mức chất đánh dấu dưới dạng hàm của đơn vị thử nghiệm, nghĩa là, cường độ tín hiệu ánh sáng huỳnh quang, nếu chất đánh dấu huỳnh quang được dùng. Việc sử dụng các mẫu lấy từ nhiều đối tượng cho các đường cong chuẩn có thể được cung cấp cho các mức đối chứng của RGMa ở mô bình thường, cũng như đối với mức RGMa “ở nguy cơ” ở mô lấy từ các đối tượng cho, các đối tượng mà có thể có một hoặc nhiều đặc điểm nêu trên.

Kit

Sáng chế cũng đề xuất kit, có thể được dùng để điều trị hoặc chẩn đoán cho đối tượng. Kit này có thể chứa kháng thể và phương tiện để dùng kháng thể. Kit này có thể còn bao gồm các hướng dẫn sử dụng kit và các hướng dẫn tiến hành phân tích, theo dõi, hoặc điều trị.

Kit cũng có thể chứa một hoặc nhiều vật chứa, như lọ hoặc chai, với mỗi vật chứa chứa các chất thử riêng biệt. Kit này còn có thể bao gồm hướng dẫn sử dụng được trình bày trên giấy, có thể mô tả cách thức thực hiện hoặc hướng dẫn phân tích, theo dõi, điều trị, hoặc phương pháp được mô tả ở đây.

Sáng chế có nhiều khía cạnh, được minh họa bằng các ví dụ không hạn chế phạm vi dưới đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất và phân lập kháng thể đơn dòng kháng-RGMa ở người

Sử dụng công nghệ biểu hiện ARN thông tin dung hợp PRO, thư viện kháng thể lá lách người được thu gom, hạch hạnh nhân, PBMC và hạch lympho được chọn thông qua

8 chu trình dựa trên các kháng nguyên RGMa: 100nM RGMa ở người hoặc chuột nhắt được đánh dấu biotin. Công nghệ dung hợp PRO đã được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số: 20100099103 và 20100105569. Các mảnh sc-Fv được tạo dạng lại trong IgG của người có chiều dài đầy đủ. Sau khi sàng lọc các IgG trong các thử nghiệm ELISA dựa trên RGMa, AE12-1 đến AE12-8 được xác định là chất liên kết dương tính với RGMa ở người và chuột nhắt.

Các kháng thể AE12-13, AE12-15, AE12-20, AE12-21, AE12-23, và AE12-24 là các kháng thể kháng RGMa toàn phần ở người được xác định từ thư viện nấm men scFv người tự nhiên rộng lớn được lựa chọn kháng RGMa ở người sử dụng công nghệ biểu hiện nấm men chuẩn. 2 chu trình phân loại tế bào được hoạt hóa bằng từ tính (Magnetic-activated cell sorting - MACS) và 4 chu trình phân loại tế bào được ánh sáng huỳnh quang hoạt hóa (Fluorescence-activated cell sorting - FACS) được thực hiện trên các thư viện này sử dụng 100 nM RGMa ở người được biotin hóa làm kháng nguyên chọn lọc. Đối với chu trình phân loại cuối cùng, các tế bào cũng được lựa chọn âm tính đối với kháng nguyên RGMc-Fc ở người. Các mảnh sc-Fv đã chọn được tạo dạng lại trong các IgG ở người có chiều dài đầy đủ. Sau khi sàng lọc các IgG trong thử nghiệm ELISA đối với RGMa ở người, AE12-13, -15, -20, -21, -23, và -24 được xác định là chất liên kết dương tính với RGMa ở người. AE12-13, AE12-15 và AE12-23 cũng phản ứng chéo với RGMc ở người như được đánh giá bằng thử nghiệm ELISA.

Ví dụ 2: Phân tích đặc tính của kháng thể

8 kháng thể được tạo ra sử dụng công nghệ dung hợp PRO (AE12-1, AE12-2, AE12-3, AE12-4, AE12-5, AE12-6, AE12-7, và AE12-8), được thử nghiệm bằng thử nghiệm ELISA liên kết trực tiếp để xác định việc liên kết với RGMa ở người (hRGMa) và RGMa ở chuột nhắt và phản ứng chéo với hRGMc. Thử nghiệm liên kết cạnh tranh với hRGMa được sử dụng để thử nghiệm nếu kháng thể bất kỳ nêu trên cạnh tranh với h5F9. 23 trong việc liên kết với hRGMa. h5F9. 23 là kháng thể dẫn kháng RGMa được làm cho giống với của người thu được từ tế bào lai ở chuột nhắt và được biết là liên kết với miền tận cùng N của RGMa. H5F9. 23 có trình tự sau:

VH h5F9. 23	151	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGMNWIRQAPGKGLEWIGMIYYDSSEKHYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKGTTPDYWGQGTMTVTVSS
VL h5F9. 23	152	DVVLTSQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLEY SDGYTFLEWFQQRPGQSPRLLIYEVS NRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CFQATHDPLTFGQGTKLEIKR
VH h5F9. 23 CDR-H1	153	NYGMN
VH h5F9. 23 CDR-H2	154	MIYYDSSEKH YADSVKG
VH h5F9. 23 CDR-H3	155	GTTPDY
VL h5F9. 23 CDR-L1	156	RSSQSLEYSDGYTFLE
VL h5F9. 23 CDR-L2	157	EVS NRFS
VL h5F9. 23 CDR-L3	158	FQATHDPLT

Thử nghiệm ELISA liên kết cạnh tranh neogenin hoặc BMP-2/BMP-4 được sử dụng để xác định nếu các mAb này phong bế liên kết của hRGMa với thụ thể của nó, neogenin hoặc BMP-2/BMP-4.

Dựa trên số liệu từ thử nghiệm ELISA, tất cả 8 mAb dung hợp PRO liên kết với RGMa ở người và chuột nhắt (Bảng 3). Đối với liên kết RGMc trong thử nghiệm ELISA, 3 mAb (AE12-6, -7 và -8) thể hiện liên kết với hRGMc, AE12-4 thể hiện liên kết yếu ở nồng độ cao, và 4 mAb còn lại (AE12-1, -2, -3 và -5) không thể hiện liên kết với hRGMc ở nồng độ lên đến 100 nM. Trong thử nghiệm ELISA liên kết cạnh tranh với hRGMa, AE12-1, AE12-3 và AE12-6 đều có khả năng cạnh tranh với h5F9.23 trong liên kết với hRGMa, điều này gợi ý rằng các epitop liên kết của 3 mAb này gần hoặc chồng lấp lên epitop của h5F9.23. Thử nghiệm thăm điểm các mảnh của hRGMa cho thấy rằng AE12-1 và AE12-6 liên kết với mảnh ở đầu N, AE12-2 và AE12-4 liên kết với mảnh ở đầu C, và 4 Ab còn lại không có tín hiệu có thể phát hiện được thể hiện sự liên kết bất kỳ. Để phong bế liên kết của hRGMa với neogenin trong thử nghiệm ELISA cạnh tranh, chỉ có AE12-5 và AE12-6 thể hiện hoạt tính phong bế tương đương hoặc lớn hơn h5F9. 23, AE12-1 và

AE12-4 thể hiện sự ức chế yếu, và AE12-2, -3, -7, và -8 không thể hiện sự ức chế ở nồng độ lên đến 100 nM. Trong thử nghiệm ELISA liên kết cạnh tranh BMP-2/BMP-4, chỉ có AE12-1, AE12-4 và AE12-6 phong bế liên kết của hRGMA với BMP-2/BMP-4.

Các mAb dung hợp PRO còn được thử nghiệm trong thử nghiệm liên kết với tế bào về khả năng phong bế liên kết của hRGMA với các tế bào thần kinh. Trong thử nghiệm liên kết tế bào dựa trên MSD trong đó các tế bào được ủ với hRGMA-Fc được biotin hóa ở nhiệt độ phòng và liên kết của hRGMA được phát hiện bằng streptavidin-Sulfo-Tag, chỉ có AE12-1 và AE12-6 phong bế liên kết của hRGMA với các tế bào thần kinh SH-SY5Y ở người, tương tự với h5F9. 23 (Bảng 3).

Tuy nhiên, trong thử nghiệm sàng lọc khối lượng lớn (high content screening - HCS), trong đó các tế bào được ủ với hRGMA-Fc ở 37°C và liên kết của hRGMA được phát hiện bằng kháng thể kháng Fc được đánh dấu Cy3 và được tính bằng cách phân tích ảnh huỳnh quang cường độ cao, chỉ có AE12-6 trong số các kháng thể dung hợp PRO thể hiện sự ức chế mạnh liên kết của RGMA với cả thần kinh các tế bào SH-SY5Y và các tế bào thần kinh chủ yếu trong vùng hải mã ở chuột nhắt (Bảng 3, Fig.13). Như được thể hiện trên Fig.13, AE12-15 và AE12-23, các kháng thể này thu được từ thư viện nấm men scFv người tự nhiên, ức chế liên kết của hRGMA với các tế bào.

Yếu tố đáp ứng BMP (BMP responsive element - BRE) được tạo cấu trúc sử dụng các oligo chồng lắp dựa trên trình tự được Korchynskyi và ten Dijke mô tả (J. Biol. Chem. 2002, 277:4883), và được tách dòng vào trong vector thông báo luciferaza bazơ pGL4.27 [luc2P/minP/Hygro] (Promega) để tạo ra cấu trúc thông báo BRE luciferaza. Các thành viên trong họ RGM (RGMA, RGMb và RGMc) là các đồng thụ thể cho việc tạo tín hiệu BMP. Cả thử nghiệm thông báo RGMA lẫn RGMc BMP đều được thiết lập bằng cách đồng chuyển nhiễm các tế bào 293HEK bằng plasmit thông báo BMP và plasmit biểu hiện RGMA hoặc RGMc, và được dùng để sàng lọc các mAb về hoạt tính trung hòa RGMA và RGMc. Trong thử nghiệm thông báo RGMA BMP, AE12-1 và AE12-6 trung hòa hoạt tính của RGMA, phù hợp với số liệu thu được từ thử nghiệm liên kết tế bào dựa trên MSD (Bảng 3). Trong thử nghiệm thông báo RGMc BMP, AE12-6 trung hòa hoạt

tính của RGMc, trong khi đó AE12-1 lại không. Do đó, AE12-1 là mAb có hoạt tính trung hòa và liên kết đặc hiệu với RGMa.

Các mAb dung hợp PRO còn được thử nghiệm về khả năng trung hòa RGMa trong thử nghiệm hóa hướng động của thần kinh các tế bào SH-SY5Y. Trong thử nghiệm này, RGMa tác động như một phân tử tạo ra lực đẩy để ức chế hóa hướng động tế bào. AE12-1 thể hiện hoạt tính trung hòa mạnh đối với hRGMa (Bảng 3). AE12-4 và AE12-6 thể hiện hoạt tính trung hòa ở một mức nhất định.

AE12-1 được thử nghiệm trong thử nghiệm sinh trưởng sợi trục thần kinh với các tế bào thần kinh SH-SY5Y ở người. Trong thử nghiệm này, RGMa, mảnh có chiều dài đầy đủ hoặc mảnh tận cùng N, ức chế thử nghiệm sinh trưởng sợi trục thần kinh. Phù hợp với hoạt tính chức năng trong thử nghiệm thông báo RGMa BMP và thử nghiệm hóa hướng động, AE12-1 thể hiện hoạt tính trung hòa mạnh hướng vào hRGMa có chiều dài đầy đủ hoặc mảnh tận cùng N (Bảng 3).

Phân tích BIAcore đối với AE12-1 trên hRGMc và RGMa ở người, khi đầu chó (cyno) và chuột nhắt cho thấy AE12-1 không liên kết với hRGMc nhưng thể hiện phản ứng chéo tốt với RGMa ở người, khi đầu chó và chuột nhắt với ái lực tương đương. Xem bảng 4.

Dòng→	AE12-1	AE12-2	AE12-3	AE12-4	AE12-5	AE12-6	AE12-7	AE12-8	h5F9, 23
hRGMa liên kết (ELISA)	++	++	++	+	+	++	+	+	++
RGMa chuột nhắt liên kết (ELISA)	++	++	++	+	+	++	+	+	++
hRGMc-His ELISA	-	-	-	+/-	-	++	+	+	++
Cạnh tranh với h5F9.23 để liên kết với hRGMa (ELISA)	+	-	+	-	-	+	-	-	
Lập bản đồ các mảnh của hRGMa	N	C	^a Neg	C	^a Neg	N	^a Neg	^a Neg	N
Cạnh tranh với biot-hRGMa-Fc để liên kết với neo-His (ELISA)	+/-	-	-	+/-	++	+++	-	-	++
^b Phong bế liên kết của hRGMa-Fc với các tế bào SH-SY5Y (MSD)	++	-	-	-	-	++	-	-	++
^c Phong bế liên kết của hRGMa-Fc với các tế bào SH-SY5Y (HCS)	^d (-)	-	-	-	+	+++	-	-	++
Cạnh tranh với FL-RGMa-Fc để liên kết với BMP-2 (ELISA)	++	-	-	++	-	++	-	-	++
Cạnh tranh với FL-RGMa-Fc để liên kết với BMP-4 (ELISA)	++	-	-	++	-	++	^e ?	-	++
Trung hòa hRGMa trong thử nghiệm RGMa BMP thông báo	++	-	-	-	-	++	-	-	++
Trung hòa hRGMc trong thử nghiệm RGMc BMP thông báo	-	-	-	-	-	++	-	-	++
Trung hòa hRGMa trong hóa hướng động bằng các tế bào SH-SY5Y	+++	-	-	^f +	-	+	-	-	++
Trung hòa hRGMa trong thử nghiệm sinh trưởng sợi trục thần kinh	++								++

Liên quan đến Bảng 3, “^aNeg” tương ứng với liên kết âm tính với tất cả các mảnh được thử nghiệm trong thử nghiệm thẩm điểm. “^bMSD” tương ứng với việc sử dụng hRGMA-Fc được biotin hóa và tạo phức với streptavidin-Sulfo-Tag, và ủ với các tế bào ở nhiệt độ phòng (RT). “^cHCS” tương ứng với việc sử dụng hRGMA-Fc được tạo phức với kháng thể kháng Fc được đánh dấu Cy3, và ủ với các tế bào ở 37°C. “^dAE12-1” tương ứng với liên kết của RGMA-Fc với các tế bào tăng mạnh, trái với việc ức chế liên kết của biotin-RGMA-Fc với các tế bào SH-SY5Y bằng MSD. “^e?” tương ứng với số liệu mà không xác định đối với AE12-7. “^fAE12-4” – nồng độ của AE12-4 trong thử nghiệm hóa hướng động tỷ lệ nghịch với hoạt tính trung hòa.

Trong thử nghiệm thông báo đáp ứng-BMP, trong đó RGMA hoặc RGMc làm tăng việc truyền tín hiệu BMP bằng cách tương tác với các BMP, kháng thể chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 và 5 (AE12-1) phong bế hoạt tính của RGMA nhưng không phong bế hoạt tính của RGMc, điều này phù hợp với tính đối kháng chức năng của nó và tính đặc hiệu liên kết đối với RGMA.

Fig.13 và Fig.14 minh họa tác động trung hòa của các kháng thể được làm đặc hiệu để liên kết của RGMA với các tế bào thần kinh sử dụng thử nghiệm liên kết tế bào sống trên các tế bào SH-SY5Y và tế bào thần kinh phổ biến trong vùng hải mã ở chuột nhắt. RGMA được gắn đuôi Fc và các kháng thể kháng Fc được đánh dấu Cy3 được tạo phức ở 4°C trong 60 phút, sau đó ủ phức này với kháng thể phong bế ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Phức RGMA-Cy3 + kháng thể sau đó được bổ sung vào các tế bào cùng với Hoechst 33342 trong 30 phút ở 37°C để tạo liên kết trên các tế bào này. Các tế bào này sau đó được rửa hai lần trong môi trường nuôi cấy và cố định bằng PFH. Việc chụp ảnh tế bào được thực hiện bằng con đường BD và các ảnh được phân tích bằng phần mềm Definiens Architect.

Như đã nêu trên, AE12-6, AE12-15, và AE12-23 phong bế liên kết của RGMA với các tế bào SH-SY5Y và các tế bào thần kinh phổ biến. Xem Fig.13. Trong thử nghiệm HCS, AE12-1 không ức chế liên kết của RGMA trên các tế bào SH-SY5Y. Xem Fig.14. Nồng độ cao nhất của AE12-1 tăng cường liên kết của RGMA-Fc với các tế bào, trong khi

đó ở các nồng độ thấp hơn, mức liên kết bằng với mức liên kết của RGMA trong mẫu đối chứng. Điều này trái ngược với việc ức chế liên kết của biotin-RGMA-Fc với các tế bào SH-SY5Y bằng MSD (MSD tương ứng với việc sử dụng hRGMA-Fc được biotin hóa và được tạo phức với streptavidin-Sulfo-Tag, và ủ với các tế bào ở nhiệt độ phòng). Sự khác nhau giữa thử nghiệm MSD và thử nghiệm HCS có thể do các điều kiện thử nghiệm khác nhau.

Fig.15 thể hiện tác động trung hòa đến lực đẩy RGMA bằng r5F9 (đối chứng), AE12-1, và AE12-6 trong thử nghiệm sinh trưởng sợi trục thần kinh. 6500 tế bào thần kinh phổ biến trong vùng hải mã chuột nhắt trong mỗi lỗ được chuyển vào các đĩa chụp hình 96 lỗ được phủ poly-l-lysine. Các tế bào này được xử lý trong 24 giờ bằng mảnh 47-127 của RGMA có trình tự nêu trong SEQ ID NO:65 (trình tự nêu trong SEQ ID NO:139) kết hợp với các kháng thể kháng RGMA. Các tế bào được cố định và nhuộm bằng BIII-tubulin sử dụng quy trình kit thử nghiệm sinh trưởng sợi trục thần kinh từ Millipore. Các ảnh được thu bằng con đường BD và được phân tích bằng phần mềm Definiens Architect để xác định thử nghiệm sinh trưởng sợi trục thần kinh/tế bào thần kinh.

Ví dụ 3: Biến thể kháng thể và số liệu liên kết

Bảng 4 thể hiện rằng bằng cách thay thế gốc Cys trong AE12-1 VL CDR3 (trình tự nêu trong SEQ ID NO:8), người có kỹ năng có thể tạo ra các biến thể có ái lực tăng cường với hRGMA. Xem trình tự nêu trong SEQ ID NO:67-73. Ví dụ, xem Bảng 4, trong đó dòng kháng thể AE12-1-Y thể hiện ái lực liên kết với hRGMA ít nhất tăng 10 lần với và AE12-1-F thể hiện ái lực liên kết với hRGMA tăng 5 lần. Các kháng thể khác thể hiện ái lực tương đương so với AE12-1 gốc. Tất cả các biến thể phong bế liên kết của hRGMA với các tế bào SH-SY5Y trong thử nghiệm liên kết tế bào dựa trên MSD, trung hòa hoạt tính RGMA nhưng không trung hòa hoạt tính RGMc trong thử nghiệm thông báo BMP, và thể hiện độ ổn nhiệt cao và độ tan tốt trong nghiên cứu trước khi tạo thành.

Bảng 4

Ab	AE12-1	AE12-1-F	AE12-1-H	AE12-1-L	AE12-1-V	AE12-1-I	AE12-1-K	AE12-1-Y
Liên kết hRGMa (ELISA)	++	++	++	++	++	+++	+++	+++
Liên kết RGMa khi đầu chó (ELISA)	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
hRGMa-His	ka (M-1s-1)	$2,7 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$3,8 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	3×10^4	$3,4 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$
	kd (s-1)	$3,9 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-5}$
	Kd (nM)	1,4	3,8	6,6	5,9	4,5	8,8	0,6
RGMa-His khi đầu chó	ka (M-1s-1)	$4,4 \times 10^4$	$4,7 \times 10^4$	$6,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	$9,9 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$	4×10^4
	kd (s-1)	$2,5 \times 10^{-4}$	$6,3 \times 10^{-4}$	$6,7 \times 10^{-4}$	$9,9 \times 10^{-4}$	$8,7 \times 10^{-4}$	$4,7 \times 10^{-4}$	2×10^{-4}
	Kd (nM)	5,4	13,4	10,1	9,2	8,9	9,3	4,9
RGMa-His chuột đồng	ka (M-1s-1)	$2,6 \times 10^4$	$2,9 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$	$2,8 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
	kd (s-1)	$4,8 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^{-4}$	$6,9 \times 10^{-5}$
	Kd (nM)	5,2	8,6	12	15	12	17	5
hRGMc-His	Liên kết BIAcore	-	-	-	-	-	-	-
Phong bế liên kết của hRGMa-Fc với các tế bào SH-SY5Y (MSD)	++	++	++	++	++	++	++	++
Trung hòa RGMa trong thử nghiệm BRE luc	++	++	++	++	++	++	++	++
Trung hòa RGMa trong thử nghiệm BRE luc	-	-	-	-	-	-	-	-
Độ tan/độ ổn định hiệu giá 1	++	++	++	++	++	++	++	++

Ví dụ 4: Thử nghiệm sinh trưởng sợi trục thần kinh

Như được thể hiện trên Fig.1, 2 và 15, AE12-1 trung hòa hoàn toàn hRGMa có chiều dài đầy đủ và mảnh hRGMa, như được thể hiện trên các tế bào SH-SY5Y và các tế bào thần kinh chủ yếu trên vùng đồi hải mã ở chuột nhắt. Mảnh này của hRGMa tương ứng với axit amin 47-127 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:65 như được thể hiện ở đây: PCKI LKCNSEFWSA TSGSHAPASD DTPEFCAALR SYALCTRRTA RTCRGDLAYH SAVHGIEDLM SQHNCSKDGP TSQPRLR (SEQ ID NO:139).

Các thử nghiệm sinh trưởng sợi trục thần kinh khác được thực hiện để đánh giá tác động của AE12-1 cũng như các biến thể AE12-1, trong đó kháng thể này chứa các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 và 5, hoặc 2-4 và 6-8, trong đó gốc Cys của trình tự nêu trong SEQ ID NO:8 được thay thế cho axit amin khác, hoặc trong đó gốc Cys ở vị trí 91 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:5 được thay thế bằng axit amin (nghĩa là, AE12-1-F, AE12-1-H, AE12-1-L, AE12-1-V, AE12-1-I, AE12-1-K, và AE12-1-Y). Xem Fig.9-12, trong đó mức độ ức chế bằng kháng thể đã mô tả (ủ trong 24 giờ) trên thử nghiệm sinh trưởng sợi trục thần kinh của các tế bào SH-SY5Y được xử lý bằng FL hRGMa được thể hiện.

Ví dụ 5: Các thử nghiệm *in vivo*

Như được thể hiện trên Fig.3 và 4, AE12-1 tăng cường sự phát triển tái tạo các exon hạch võng mạc quanh thương tổn (0-500 μ m) ($n = 3-5$ chuột/nhóm). Xem Fig.3. Kháng thể AE12-1 cũng tăng cường sự phát triển tái tạo các exon hạch võng mạc tại các khu vực cách xa thương tổn (500-1000 μ m) ($n = 3-5$ chuột/nhóm).

Ví dụ 6: Thử nghiệm chèn ép thần kinh mắt ở chuột

AE12-1 có hoạt tính trong thử nghiệm chèn ép thần kinh mắt ở chuột. Xem Fig.8. Tổn thương chèn ép thần kinh mắt một bên được tiến hành ở chuột Wistar đực, 2-4 mm cạnh mắt. Chuột được theo dõi trong 6 tuần (8 nhóm, $n = 6$) và các kháng thể được dùng một lần một tuần trong tĩnh mạch ở liều 10 mg/kg, 1 mg/kg, hoặc 0,1 mg/kg. Đối chứng hlgG1 được dùng trong tĩnh mạch, một tuần/một lần 10 mg/kg ($n = 6$ chuột). Trong chuột

được xử lý bằng AE12-1, các sợi tái tạo thần kinh có khả năng phát triển bên trên tổn thương chèn ép thần kinh mắt, trong khi đó ở chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng hIgG1, các sợi tái tạo thần kinh tích lũy ở tổn thương do chúng không có khả năng vượt qua các thương tổn. Xem Fig.8.

Ví dụ 7: Lập bản đồ epitop của RGMA ở người (hRGMA) bằng kháng thể đơn dòng AE12-1

Nghiên cứu lập bản đồ epitop được tiến hành đối với kháng thể đơn dòng AE12-1. Số liệu gợi ý rằng epitop cho AE12-1 nằm tại vùng tận cùng N của RGMA. Một vài cấu trúc của hRGMA được dùng để cố gắng xác định epitop cho AE12-1. Các cấu trúc này bao gồm:

pelB-M-[RGMA(47-168)]-6His ("6His" được mô tả dưới dạng trình tự nêu trong SEQ ID NO: 148) (*E. coli*) được tạo ra theo cách tái tổ hợp. Kháng nguyên bằng 0,41 mg/ml trong ChemTag#16211, đệm S100, độ pH=8, Tris 25mM, NaCl 100mM, DTT 1mM, glyxerol 10% (thể tích/thể tích). Trình tự của cấu trúc kháng nguyên đầu tiên là: MKYLL PTAAA GLLLL AAQPA MAMPC KILKC NSEFW SATSG SHAPA SDDTP EFCAA LRSYA LCTRR TARTC RGDLA YHSAV HGIED LMSQH NCSKD GPTSQ PRLRT LPPAG DSQER SDSPE ICHYE KSFHK HSATP NYTHC GLFGD HHHHHH (trình tự nêu trong SEQ ID NO:75).

[IgK-trình tự dẫn]-AttB1-[hRGMA(47-422)]-AttB2-MYC-6His ("6His" được mô tả dưới dạng trình tự nêu trong SEQ ID NO: 148) được tạo ra theo cách tái tổ hợp, 0,85 mg/ml trong PBS. Trình tự của cấu trúc kháng nguyên thứ hai là: METDT LLLWV LLLWV PGSTG DAAQP ARRAR RTKLG TELGS TSPVW WNSAD ITS LY KKAGS PCKIL KCNSE FWSAT SGSHA PASDD TPEFC AALRS YALCT RRTAR TCRGD LAYHS AVHGI EDLMS QHNCS KDGPT SQPRL RTLPP AGDSQ ERS DS PEICH YEKSF HKHSA TPNYT HCGLF GDPHL RTFTD RFQTC KVQGA WPLID NNYLN VQVTN TPVLP GSAAT ATSKL TIIFK FNQEC VDQKV YQAEM DELPA AFVDG SKNGG DKHGA NSLKI TEKVS GQHVE IQAKY IGTTI VVRQV GRYLT FAVRM PEEVV NAVED WDSQG LYLCL RGCPL NQQID FQAFH TNAEG TGARR LAAAS

PAPTA PETFP YETAV AKCKE KLPVE DLYYQ ACVFD LLTTG DVNFT LAAYY
 ALEDV KMLHS NKDKL HLYER TRDLP GNPAF LYKVV ISSTV AAARG GPEQK
 LIXEM DLNSA VDHHS HHH (trình tự nêu trong SEQ ID NO:76).

[IgK-trình tự dẫn]-AttB1-[hRGMA(47-168)]-Xa-[hlgG L Fc (257-481)] (cấu trúc ở
 động vật có vú), được tạo ra bằng cách tái tổ hợp, 1,18 mg/mL, trong PBS. Trình tự của
 cấu trúc kháng nguyên thứ ba là: METDT LLLWV LLLWV PGSTG DAAQP ARRAR
 RTKLP CKILK CNSEF WSATS GSHAP ASDDT PEFCA ALRSY ALCTR RTART
 CRGDL AYHSA VHIE DLMSQ HNCSE DGPTS QPRLR TLPPA GDSQE RSDSP
 EICHY EKSFH KHSAT PNYTH CGLFG DLNSA DIEGR MDPPC PAPEL LGGPS
 VFLFP PKPKD TLMIS RTPEV TCVVV DVSHE DPEVK FNWYV DGVEV HNAKT
 KPREQ QYNST YRVVS VLTVL HQDWL NGKEY KCKVS NKALP APIEK TISKA
 KGQPR EPQVY TLPPS REEMT KNQVS LTCLV KGFYP SDIAV EWESN GPEN
 NYKTT PPVLD SDGSF FLYSK LTVDK SRWQQ GNVFS CSVMH EALHN HYTQK
 SLSLS PGK (trình tự nêu trong SEQ ID NO:77).

Tất cả các kháng nguyên được dùng đều chứa trình tự axit amin RGMA (47-168),
 trong đó việc đánh số được dùng để xác định các vị trí của trình tự tương ứng với việc
 đánh số của protein gốc. Trình tự của hRGMA (47-168) là: PCKI LKCNSEFWSA
 TSGSH APASD DTPEF CAALR SYALC TRRTA RTCRG DLAYH SAVHG IEDLM
 SQHNC SKDGP TSQPR LRTL P AGDS QERSD SPEIC HYEKS FHKHS ATPNY
 THCGL FGD (trình tự nêu trong SEQ ID NO:78).

Các đệm được dùng để cắt các epitop như sau:

Đệm A: NaHCO₃ 100 mM, NaCl 500 mM, độ pH= 8;

Đệm B: NaHCO₃ 100 mM, NaCl 100 mM, độ pH= 8;

Đệm C: NaOAc 100 mM, NaCl 500 mM, độ pH= 4; và

Đệm D: Tris-HCl 100 mM, NaCl 500 mM, độ pH= 8.

Kháng thể đơn dòng được làm cố định như sau. 20mg các hạt Sepharoza được CNBr hoạt hóa (GE Healthcare, Uppsala Sweden) được cân và chuyển vào cột phản ứng nén (USB Corp., Cleveland, OH) bằng 35 μ m thủy tinh và rửa 3 lần bằng 200 μ l HCl 1mM, sau đó rửa 3 lần bằng 200 μ l đệm A.

Khoảng 5-6 nmol dung dịch kháng thể AE12-1 được thẩm tách dựa trên PBS sử dụng bộ thẩm tách nhỏ 10,000 MWCO Slide-A-Lyzer (Pierce, Rockford, IL) trong khoảng 40 phút để loại bỏ đệm histidin mà sẽ tương tác với kháng thể liên kết với Sepharoza. Dung dịch mAb đã thẩm tách được bổ sung vào nhựa đã hoạt hóa và cho phép trộn trên máy trộn quay (Mix-All Laboratory Tube Mixer, Torrey Pines Scientific, San Marcos, CA) trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau khi liên kết, dòng chảy qua nhựa được thu gom, và nhựa được rửa ba lần bằng 200 μ l đệm A. Nhựa này được tạo huyền phù trong 200 μ l đệm D, và quay ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ để phong bế các vị trí liên kết quá mức trong nhựa. Dung dịch đệm D rửa bỏ và nhựa được rửa theo cách khác bằng 200 μ l đệm C và đệm D (độ pH rửa cao/thấp), tổng cộng rửa ba lần. Nhựa này được rửa ba lần bằng 200 μ l đệm B, để nó sẵn sàng kết hợp với kháng nguyên.

Kháng thể đơn dòng AE12-1 đã cố định được kết hợp với hRGMA. Các cột phản ứng nén (Compact reaction column - CRC) được chuẩn bị để kết hợp kháng nguyên bằng cách rửa 35 μ m thủy tinh của CRC ba lần bằng 200 μ l đệm B. Nhựa cùng với kháng thể liên kết được trộn từ từ để tái tạo huyền phù nhựa đồng nhất, và 50 μ l nhựa được đặt vào mỗi CRC đã chuẩn bị. Nhựa này được rửa ba lần bằng 200 μ l đệm B. Khoảng 1,5 nmol kháng nguyên hRGMA được bổ sung vào nhựa cùng với đủ lượng đệm B để tạo ra tổng thể tích ít nhất bằng 200 μ l. Trước khi kết hợp kháng nguyên, kháng nguyên do *E. coli* tạo ra được thẩm tách dựa trên đệm PBS trong khoảng 30 phút bằng cách sử dụng bộ thẩm tách nhỏ 3500 MWCO Slide-A-Lyzer để loại bỏ DTT khỏi đệm kháng nguyên. Hỗn hợp kháng nguyên/nhựa được phép trộn trên máy quay trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng. FT được thu gom, và nhựa được rửa ba lần bằng 200 μ l đệm B.

Các epitop được phân cắt bằng cách sử dụng trypsin và enzym endoproteinaza Asp-N. Nhựa chứa phức kháng thể/kháng nguyên đã cố định được tạo huyền phù trong

200 μ l đệm B. Lọ nhỏ chứa 20 μ g trypsin (Promega, Madison, WI) được hòa tan trong 100 μ l đệm tái tạo huyền phù (HOAc 50 mM), cho nồng độ 0,2 μ g/ μ l, và lọ chứa 2 μ g enzym endoproteinaza Asp-N (Roche) được hòa tan trong 50 μ l nước (0,04 μ g/ μ l). Việc phân cắt kháng nguyên được thực hiện với tỷ lệ 1:100 (w/w) enzym:kháng nguyên. Phản ứng diễn ra trong 4-6 giờ kèm theo quay ở nhiệt độ phòng.

Sau khi tiêu hóa, FT được thu gom và nhựa được rửa hai lần bằng 200 μ l đệm B, với mỗi lần thu gom nước rửa được thực hiện riêng (nước rửa lần 1 và nước rửa 2), 200 μ l đệm A (nước rửa 3), và sau đó, 200 μ l đệm B (nước rửa 4). Pettit kháng nguyên liên kết với kháng thể được rửa giải từ nhựa bằng ba phân ước 200 μ l của axit formic 2%, và mỗi nước rửa giải được thu gom riêng rẽ (nước rửa giải 1, 2 và 3). Phần nước rửa giải 1 được phân tích bằng phổ khối (LC-MS/MS) để xác định vùng epitop.

Các phần nước rửa giải 1 được thu gom sau khi tiêu hóa được phân tích bằng LC-ESI-MS/MS (ion dương) sử dụng bơm nạp HPLC 1100 mao dẫn Agilent (Santa Clara, CA) và bơm gradient nano-HPLC 1200, có Chip Cube (cột làm giàu 40 nL, cột phân tích 75 μ m x 43 mm, chip C8 ZORBAX) ghép nối với Agilent 6510 QTOF MS. Thê tích tiêm lên đến 7 μ l được dùng, và MS/MS được thực hiện trên 3 đầu đáp ứng tiêu chuẩn tín hiệu MS chuyên dụng.

Phân tích MS ban đầu đối với các phần phân cắt epitop (nước rửa giải 1) cho thấy sự có mặt của loại peptit lớn có thể không tương thích với peptit phân cắt protein như mong đợi do sự có mặt của peptit có liên kết disulfua. Để khử liên kết disulfua, các phân ước 10 μ l được điều chỉnh độ pH đến ~8 sử dụng NaOH đã pha loãng, và khử trong dithiothreitol 5 mM (DTT) ở 37°C trong 30 phút trước khi phân tích lại bằng MS. Một số phần cần biến tính để khử, trong trường hợp này các phân ước được pha loãng trong thể tích tương đương guanidin hydroclorua 8M, Tris 100 mM (pH=8) trước khi bổ sung DTT.

Phân tích LC-ESI-MS/MS đối với tất cả các phần rửa giải 1 sau khi tiêu hóa kháng thể AE12-1 được kết hợp với các cấu trúc hRGMA khác nhau bằng enzym cho thấy sự có mặt của một vài loại peptit lớn có phân tử lượng nằm trong khoảng từ 8,5 đến 12 kDa. Khối lượng và sự phân mảnh các loại peptit lớn này không đủ để xác định chúng. Để xác

định peptit eptitop, việc khử các liên kết disulfua là cần thiết. Trong tất cả các trường hợp, cường độ tín hiệu MS của các peptit này giảm đáng kể sau khi khử, trong một số trường hợp không phát hiện thấy trừ khi được khử khi có mặt chất làm biến tính.

Sau khi khử phần nước rửa giải 1 bằng DTT, các phần này được phân tích lại bằng LC-MS/MS. Trong thử nghiệm phân cắt sử dụng hRGMa do *E. coli* tạo ra, phần lớn các đỉnh quan sát được trong biểu đồ sắc ký ion là các loại mang một loại điện, nhiều trường hợp liên quan đến polyme và các phụ gia khác. Hai peptit được xác định là liên quan đến cấu trúc hRGMa được sử dụng. Xem Fig.5. Peptit đầu tiên là peptit có phân tử lượng đơn đồng vị bằng 2420,2 Da. Phân tử lượng của peptit này và khối lượng của vài mảnh quan sát được trong phổ MS/MS (không được thể hiện) phù hợp với trình tự PCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (hRGMa 47-69) (trình tự nêu trong SEQ ID NO:79) mặc dù việc gán này không phù hợp với tính đặc hiệu enzym. Peptit epitop tiềm năng thứ hai có phân tử lượng đơn đồng vị bằng 2551,2 Da chỉ xác định được 2-3 các mảnh có thể xác định được bằng MS/MS mà phù hợp với trình tự MPCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (trình tự nêu trong SEQ ID NO:80). Tính đặc hiệu của enzym không tương thích; tuy nhiên phân tử lượng của kháng nguyên bắt đầu không tương ứng với khối lượng tính toán được của trình tự đầy đủ, có thể do kháng nguyên có tính dị sinh ở đầu N ảnh hưởng đến tính đặc hiệu enzym biểu kiến không tương thích này.

Việc sử dụng cấu trúc kháng nguyên thứ hai không phải peptit có thể quan sát được ở phổ MS sau khi khử bằng DTT. Phân tích MS sau khi khử trong các điều kiện biến tính không cho thấy có peptit trong số các ion nền, mang điện đơn. Bốn peptit kháng nguyên được xác định trong phần E1 bị biến tính và khử. Peptit liên quan đến kháng nguyên thứ nhất có phân tử lượng đơn đồng vị bằng 2763,3 Da, kèm theo sự phân mảnh khi phân tích bằng MS/MS, phù hợp với trình tự KAGSPCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (trình tự nêu trong SEQ ID NO:81) (hRGMa 47-69 có 4 gốc bổ sung ở đầu N). Phổ của peptit được thể hiện trên Fig.6. Tín hiệu peptit cường độ rất thấp trong cùng phổ (MW 2878,4 Da; +4 ở m/z 720,84, được đánh dấu sao trên Fig.6) phù hợp với trình tự KAGSPCKILKCNSEFWSATSGSHAPPASD (trình tự nêu trong SEQ ID NO:82). Peptit có MW=2635,2, được thể hiện trên Fig.7, phù hợp với

trình tự AGSPCKILKCNSEFWSATSGSHAPPAS (trình tự nêu trong SEQ ID NO:90). Peptit khác ở $m/z = 688,82$ (đồng vị phổ biến nhất, ở trạng thái mang điện +4), được đánh dấu sao trên Fig.7, cùng rửa giải bằng peptit có MW=2635,2. Số liệu MS/MS giới hạn thu được ở thành phần có cường độ thấp này phù hợp với trình tự AGSPCKILKCNSEFWSATSGSHAPPASD (trình tự nêu trong SEQ ID NO:83) (MW=2750,3 Da).

Cấu trúc thứ ba của hRGMa được dùng để xác nhận epitop bằng AE12-1. Trong phần nước rửa giải 1 được khử bằng DTT, mức độ khử rất nhỏ được quan sát thấy, nhưng chỉ một peptit có thể xác định được là peptit liên quan đến hRGMa kháng nguyên và phù hợp với các kết quả thu được từ các cấu trúc kháng nguyên khác. Peptit này được quan sát ở $m/z=691,60$ (ở trạng thái mang điện + 4), phân tử lượng đơn đồng vị của nó bằng 2762,4 Da. Số liệu MS/MS giới hạn thu được cho peptit này (không được thể hiện) gợi ý rằng trình tự của chúng là TKLPCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (trình tự nêu trong SEQ ID NO:84). Các peptit khác được quan sát trong phổ MS có thể được cho là peptit liên quan đến vùng hRGMa (47-168) bao gồm DSPEICHYEK (trình tự nêu trong SEQ ID NO:85); GDLAYHSAVHGIE (trình tự nêu trong SEQ ID NO:86); DLAYHSAVHGIE (trình tự nêu trong SEQ ID NO:87); và DDTPEFCAALR (trình tự nêu trong SEQ ID NO:88).

Trong các phần nước rửa giải 1 (tiêu hóa bằng trypsin/Asp-N) từ thử nghiệm phân cắt epitop của hRGMa liên kết với AE12-1, peptit hRGMa (47-69) được xác định từ ba cấu trúc kháng nguyên. Peptit này được xác định là epitop cho hRGMa liên kết với AE12-1 là: PCKILKCNSEFWSATSGSHAPAS (hRGMa 47-69) (trình tự nêu trong SEQ ID NO:79).

Ví dụ 8: Nghiên cứu về độc tính

Do sự tích lũy sắt trong các tế bào gan và lượng sắt giảm trong tế bào lá lách có thể dẫn đến sự trung hòa RGMc nên độc học lực và khả năng dung nhận các kháng thể đơn dòng chọc lọc RGMa được mô tả ở trên được nghiên cứu. Các nghiên cứu này được mong đợi là thể hiện sự tích lũy sắt trong các tế bào gan và sự loại bỏ sắt trong tế bào lá lách sẽ

không xuất hiện khi cho chuột Sprague-Dawley dùng kháng thể đơn dòng chọn lọc RGMa.

Ví dụ 9: Các kháng thể đơn dòng chọn lọc RGMa, AE12-1 và AE12-1Y, giống kháng thể đơn dòng 5F9 được nhân hóa, tạo ra sự tái tạo axon thần kinh mắt bị tổn thương, chèn ép ở mô hình chuột nhắt bị tổn thương thần kinh mắt

Mô hình chèn ép thần kinh mắt (hay còn gọi là “tổn thương thần kinh mắt”) cung cấp mô hình động vật để thử nghiệm các hợp chất khác nhau có tác dụng kích thích sự tái tạo các sợi thần kinh mắt và làm giảm quá trình chết hàng loạt của các tế bào hạch thần kinh võng mạc.

Các thử nghiệm được tiến hành trên chuột đực Wistar thành thực do phòng thí nghiệm Charles River (D) (Đức) cung cấp. Các động vật này được giữ trong từng lồng riêng trong chu kỳ sáng/tối 12:12 giờ kèm theo cung cấp thức ăn và nước uống theo nhu cầu. Việc chèn ép thần kinh mắt luôn được thực hiện chỉ ở mắt bên trái bằng cách tiểu phẫu trước như được mô tả trong tài liệu: P. Monnier et al., *J. Neurosci.*, 31:10494-10505 (2011), và theo phương pháp phẫu thuật mắt trước ở người. Trước và trong khi phẫu thuật, các động vật thử nghiệm được gây mê bằng cách hít thuốc mê sử dụng Sevoflurane (Abbott GmbH Co. & KG, Delkenheim, Germany) và được cố định trên bàn bằng kẹp miệng và bằng băng dính dính các chân lại. Tránh việc giảm đột ngột thân nhiệt của chúng bằng cách gắn chúng vào tấm gia nhiệt. Khi khởi mổ chèn ép thần kinh mắt phía trước, mắt trái được cẩn thận lấy ra khỏi dây chằng và mô liên kết. Bước thứ nhất, thực hiện tiểu phẫu cắt lấy 2-3mm mô liên kết ở góc ngoài cùng của mắt. Bước tiếp, mở thần kinh mắt bằng cách sử dụng một kẹp để di chuyển cơ mắt và tuyến lệ sang một bên, do đó loại bỏ được nó. Bước tiếp, mở dọc màng não sử dụng cây kéo nhỏ để mở thần kinh mắt. Việc này làm cho mắt có độ linh động cao hơn và khiến cho mắt có thể quay sang một bên và tiếp cận được thần kinh mắt bên trái. Thần kinh mắt bị tổn thương khoảng 1-3 mm bên cạnh mắt, sử dụng kẹp được cài đặt để tạo ra áp suất lớn nhất và cố định trong 10-20 giây. Cố gắng cẩn thận để tránh gây tổn thương đến mạch cung cấp máu cho mắt.

Sau khi tiểu phẫu không xâm lấn, động vật được đặt lên khăn giấy trong lồng sạch trên máy làm ấm để kiểm soát thân nhiệt cho đến khi chúng bắt đầu động đậy. Thuốc mỡ chứa kháng sinh (Gentamytrex, Dr. Mann Pharma) được bôi lên mắt để tránh nhiễm trùng và làm khô màng cứng.

Carprofen (Rimadyl, 5 mg/kg) được dùng trong màng bụng để điều trị chứng đau sau mổ ngay sau khi mổ và sau đó, dùng hai ngày một lần, trong 3 ngày. Động vật được quan sát và kiểm soát đều đặn trong vài giờ ngay sau khi mổ và trong 2-4 ngày sau đó để đảm bảo tất cả số động vật này sống sót và phục hồi sau khi gây mê và mổ.

Phương pháp cải tiến chèn ép thần kinh mắt từ phía trước nêu trên có ưu điểm đáng kể so với phương pháp chèn ép thần kinh mắt chuẩn mà thực hiện trên từ phần sau của mắt. Cụ thể, trong quy trình nêu trên, không có vết thương hở lớn cần khâu được tạo ra và nguy cơ nhiễm trùng của các vết thương nhỏ được giảm đáng kể. Ngoài ra, do thời gian cần để tạo ra khối chèn ép ngắn hơn (phương pháp chèn ép từ phía trước nêu trên nhanh hơn ba lần so với phương pháp chèn ép từ phía sau) nên động vật ít đau hơn, và do đó, chúng bị căng thẳng ít hơn. Hơn thế nữa, cường độ đau mà động vật phải chịu giảm đáng kể và động vật phục hồi với tỷ lệ nhiều hơn và tốc độ nhanh hơn nhiều.

Dùng toàn thân kháng thể

Để phân phối kháng thể toàn thân, chuột đực Wistar được dùng toàn thân thông qua tĩnh mạch (iv) bằng RGMa được nhân hóa và kháng thể phong bế RGMc, 5F9 (h5F9) (n = 8 động vật) (kháng thể 5F9 được nhân hóa được mô tả trong US 2010/0028340), bằng kháng thể của người chọn lọc RGMa, AE12-1, được mô tả ở đây, và bằng kháng thể RGMa tương tự (có mối liên quan mật thiết), AE12-1Y, cũng được mô tả ở đây và bằng kháng thể đối chứng đồng vị ở người (hIgG) (n = 8 động vật). Chuột được tiêm một lần một tuần trong tĩnh mạch bằng 10 mg kháng thể/kg và bắt đầu tiêm ngay sau khi gây chèn ép thần kinh mắt. Tất cả chuột được tiêm 5 lần và chúng bị giết 6 tuần sau khi gây tổn thương chèn ép. Các thử nghiệm là thử nghiệm mù và việc tách mô, xử lý, chuẩn bị các mảnh cắt và phân tích định lượng được tiến hành như được mô tả trong tài liệu: P. Monnier et al., *J. Neurosci.*, 31:10494-10505 (2011) và Koeberle et al., *Neuroscience*,

169:495-504 (2010). Các ảnh ghép của thần kinh mắt ở chuột được chuẩn bị, vị trí chèn ép được xác định và các sợi dương tính với GAP-43 đi qua vị trí chèn ép 500 μ m được đếm. Như được thể hiện trên Fig.16, cả ba kháng thể kháng RGMa, h5F9, AE12-1 và AE12-1Y đều có mức sinh trưởng tái tạo đáng kể ở phía trên vị trí chèn ép, điều này trái ngược với động vật đối chứng được xử lý bằng hIgG.

Ví dụ 10: Các kháng thể đơn dòng chọn lọc RGMa, AE12-1 và AE12-1Y giống kháng thể được nhân hóa 5F9, bảo vệ lớp sợi thần kinh võng mạc (retinal nerve fiber layer - RNLF) khỏi sự thoái hóa

Để quan sát tác dụng bảo vệ RNLF khỏi sự thoái hóa, một phương pháp thử nghiệm mới trong phòng thử nghiệm được dùng. Phương pháp này dựa trên việc giải thích và phân tích võng mạc của chuột thành thực có chèn ép thần kinh và được xử lý toàn thân bằng kháng thể 5F9, AE12-1, AE2-1Y và kháng thể đối chứng, IgG của người. Phương pháp này là phương pháp cải tiến của phương pháp được mô tả trong tài liệu: P. Monnier et al., *J. Neurosci.*, 31:10494-10505 (2011) và Koeberle et al., *Neuroscience*, 169:495-504 (2010). P. Monnier et al., *J. Neurosci.*, 31:10494-10505 (2011) và Koeberle et al., *Neuroscience*, 169:495-504 (2010). Chuột Wistar thành thực do phòng thí nghiệm Charles River cung cấp được tiêm một lần một tuần trong tĩnh mạch bằng 10 mg kháng thể/kg và bắt đầu tiêm ngay sau khi gây chèn ép thần kinh mắt. Tất cả chuột được tiêm 5 lần và chúng bị giết 6 tuần sau khi gây tổn thương chèn ép.

Chuẩn bị võng mạc và nhuộm màu bằng chất phát huỳnh quang miễn dịch:

Động vật được gây mê sau bằng Sevoflurane (8%; Abbott GmbH Co. & KG, Delkenheim, Germany), sau đó bị giết bằng cách mở lồng ngực và được truyền dịch bằng dung dịch paraformaldehyt 4% (PFA) qua tâm thất trái. Mắt được cắt nhỏ cùng với mô liên kết được điều chỉnh và đặt trong PFA 4% cho đến khi việc chuẩn bị võng mạc diễn ra.

Việc chuẩn bị võng mạc được thực hiện trong dung dịch muối cân bằng Hank (HBSS, không chứa magie và canxi; Invitrogen, #14170070). Mắt được cố định ở mô liên kết bằng kẹp và một vết cắt tròn được tạo ra trên màng cứng xung quanh giác mạc.

Một nửa võng mạc hình cầu được cắt ở bốn điểm, được mở ra và trải rộng trên màng nitrocellulose màu xám (Sartorius, #13006-50-N). Nếu cần, màng cùng với võng mạc được phép làm khô trong không khí trong 5-10 giây.

Sau đó, võng mạc trên màng được đặt vào dung dịch formaldehyt được đệm phosphat trung tính 10% (độ pH=7,3; Fisher Scientific, #F/1520/21) ở +4°C cho đến khi việc nhuộm màu bằng chất phát huỳnh quang miễn dịch được thực hiện. Việc nhuộm màu này được thực hiện theo quy trình dưới đây.

Chế phẩm võng mạc được rửa bằng TBS, sau đó phong bế và làm cho thấm bằng BSA 5%, Triton X-100 1% trong TBS trong 30 phút và sau đó, rửa lại bằng TBS. Kháng thể đầu tiên, có tên là, kháng thể đơn dòng TUJ-1, một kháng thể kháng β III Tubulin ở chuột, AbCam, số kháng thể 14545; pha loãng theo tỷ lệ 1:500, trong TBS, BSA 5%, được bổ sung vào trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng trong bóng tối, sau đó rửa bằng TBS, Tween 20 0,1%. Tiếp theo, kháng thể thứ hai, có tên là, Cy3 khi kháng chuột; Jackson ImmunoResearch (Dianova) 715-165-151, tỷ lệ pha loãng 1:1000, và Bisbenzimid (50 μ g/ml, tỷ lệ pha loãng 1:100 trong TBS, BSA 5%) được bổ sung trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng trong bóng tối, sau đó rửa bằng TBS, Tween 20 0,1%, và sau đó, rửa bằng H₂O đã loại muối. Chế phẩm này sau đó được định vị bằng Fluoromount G và bảo quản ở +4°C trong bóng tối.

Phân tích định lượng tác dụng bảo vệ của kháng thể RGMA trên lớp sợi thần kinh (RNFL) trong mắt

Phần mềm Axiovision được sử dụng để chọn ngẫu nhiên các ảnh ($n = 12$) của mỗi võng mạc và xác định số sợi thần kinh trong mỗi ảnh. Đối với các thử nghiệm này, 5 – 8 võng mạc có thần kinh mắt bị chèn ép được dùng cho mỗi nhóm: nhóm kháng thể h5F9,

nhóm kháng thể đối chứng hIgG và nhóm kháng thể AE12. 1 và AE12-1Y. Việc phân tích số liệu và phân tích thống kê được thực hiện sử dụng chương trình GraphPad.

Các kết quả được minh họa trên Fig.17. Cụ thể, số lượng bó sợi thần kinh quan sát thấy ở võng mạc của những động vật được xử lý toàn thân bằng các kháng thể RGMA theo sáng chế cao hơn so với động vật được xử lý bằng kháng thể hIgG đối chứng.

Ví dụ 11 : Các kháng thể RGMA tăng cường việc phục hồi chức năng trong mô hình viêm màng não tự miễn thử nghiệm cột sống tập trung

Kerschensteiner et al. (*Am. J. Pathol.* 164: 1455 – 69, 2004) đã phát triển mô hình EAE hội tụ, khu biệt trong đó các thương tổn gây viêm diện rộng không mở rộng tự nhiên trong cột sống, não và thần kinh thị giác nhưng có thể được tạo ra một cách chọn lọc trong cột sống hoặc trong các vùng khác của não. Việc sử dụng mô hình hội tụ hoặc tạo đích này, các thương tổn gây viêm diện rộng, khá tương tự với các thương tổn của cột sống MS, được tạo ra trong cột sống lưng của dây cột sống, ảnh hưởng đến đường vỏ não-tủy sống. Trong mô hình này, chuột đầu tiên được gây miễn dịch bằng myelin protein MOG. Hai đến ba tuần sau khi gây miễn dịch, hiệu giá kháng thể MOG được xác định và động vật có đáp ứng miễn dịch dương tính được tiêm hỗn hợp xytokin (TNF α 250 ng, IFN γ 150 U) tại chỗ ở cấp độ T8. Trong vòng 1 tuần sau khi tiêm xytokin, chuột có biểu hiện các thiếu hụt vận động bằng châu sau, liệt đuôi và đáng đi không ổn định và đạt đến điểm EAE bằng 2,5. Bốn tuần sau khi tiêm xytokin, số điểm này cải thiện điểm EAE xuống đến 1 (Kerschensteiner et al., *Am. J. Pathol.* 164: 1455 – 69, 2004).

Chuột Female Lewis được tiêm dưới da 75 μ l MOG (75 μ g, 1-125 aa, BlueSky Biotech, Worcester, MA) đã hòa tan trong nước muối sinh lý và sau đó, được nhũ hóa bằng 75 μ l chất điều chỉnh Freund không hoàn toàn (IFA, Sigma, #F5506). Ngay trước khi tiêm và sau đó cứ 7-8th ngày, lấy mẫu máu từ các động vật này để phân tích các mẫu đối với các kháng thể MOG.

Hai hoặc ba tuần sau khi gây miễn dịch bằng MOG, máu được thu gom từ chuột đã gây miễn dịch và ELISA được thực hiện để phát hiện các kháng thể đặc hiệu MOG. Việc

gây miễn dịch tạo ra các kháng thể MOG nhiều hơn 90% chuột đã gây miễn dịch. Tuy nhiên, trong chủng này, việc tạo ra kháng thể MOG không làm xuất hiện triệu chứng bệnh bất kỳ. Chuột Lewis chỉ có biểu hiện không vận động sau khi tiêm tại chỗ 2 xytokin gây viêm (TNF α , IFN γ) vào cột sống vùng ngực ở cấp độ T8.

Đối với việc tiêm xytokin, chuột được gây mê bằng cách hít Sevoflurane (8%; Abbott GmbH Co. & KG, Delkenheim, Germany) và thủ thuật cắt bỏ cung sau cột sống cổ được thực hiện bằng quy trình chuẩn. Cụ thể, da trên lưng chuột nhất được cạo và sát trùng bằng etanol 70%, sau đó diện tích đã cạo được làm sạch bằng proclin và được cắt một đoạn 2-3 cm bằng dao mổ bắt đầu từ khoảng T3-4 đến T11-12. Chất béo bề mặt được tách khỏi cơ bằng kéo sắc và các cơ được cắt bằng đường giữa dọc theo cột sống từ một phía. Khoảng trống giữa T8 và T9 được định vị và T8 được lấy ra khỏi mô liền kề. Mũi khoan nhỏ được dùng để tạo ra một hố tròn có đường kính khoảng 1-2 mm ở T8 và kẹp nhọn được dùng để loại bỏ màng xương và mảnh xương bất kỳ. Tiếp theo, màng cứng được loại bỏ bằng kéo nhỏ và tiêm trực tiếp được tiến hành bằng ống mao dẫn bằng thủy tinh rất mỏng ghép nối với xylanh Hamilton 10 μ l có Luer Tip (LT) và được nạp đầy dầu khoáng (Sigma Aldrich).

Việc sử dụng máy tiêm tự động, ống mao dẫn được nạp đầy 3 μ l hỗn hợp xytokin trong PBS hoặc chỉ mình PBS với một lượng vết xanh Evans. Liều TNF α cao hơn 4 lần (4x) (1000 ng) và cùng liều IFN γ (150 U) được dùng như được thông báo trong tài liệu: Kerschensteiner et al.(2004). Liều cao hơn 4 lần làm kéo dài đáng kể quy trình phục hồi ở chuột được xử lý bằng chất dẫn hoặc đối chứng.

Ở bước tiếp, ống mao dẫn bằng thủy tinh được cắm vào ở độ sâu 0,7 mm và 2 μ l hỗn hợp xytokin được tiêm vào giữa cột sống tại cấp độ T8 trong thời gian 5 phút sử dụng máy tự tiêm. Sau khi dùng lidocain và làm kín vết thương, chuột được xử lý bằng thuốc giảm đau Rimadyl (ngay sau khi mổ và hàng ngày trong 3-4 ngày nữa). Chuột sau đó được đặt vào khăn giấy sạch và được giữ ấm cho đến khi chúng tỉnh.

Chuột biểu hiện các triệu chứng đầu tiên trong vòng 1 tuần sau khi tiêm xytokin. Việc xử lý bằng kháng thể được bắt đầu vào ngày 7 hoặc 8 sau khi dùng xytokin. Kháng

thể đối chứng hIgG và một vài kháng thể RGMA khác (có tên là, AE12-1, AE12-1Y và 5F9.23 được nhân hóa (h5F9.23 được mô tả trong US 2010/0028340)) được dùng và chuột được xử lý một tuần một lần thông qua đường tĩnh mạch. Việc tính điểm EAE được tiến hành hàng ngày và điểm được ghi chép vào tài liệu. Các đối tượng tiến hành thử nghiệm trong điều kiện không biết về các nhóm xử lý khác nhau (thử nghiệm mù). Sau thời gian 27-29 ngày sau khi dùng xytokin, các động vật này bị giết, cột sống được tách riêng và phân tích mức biểu hiện các protein sau: GAP-43 (chất đánh dấu tái tạo), CD68 (chất đánh dấu viêm cho các tế bào tiểu thần kinh đệm đã hoạt hóa và các đại thực bào) và MPB (protein cơ sở myelin, chất đánh dấu tái myelin hóa hoặc các đường myelin được dự trữ). Diện tích chứa chất đánh dấu này được đo, phân tích và đánh giá thống kê sử dụng thử nghiệm ANOVA một chiều và thử nghiệm đánh giá ý nghĩa thống kê Bonferroni. Như được thể hiện trên Fig.18, cả ba kháng thể RGMA đều làm tăng khả năng phục hồi chức năng ở mô hình tEAE tùy sống.

Trong mô hình tEAE tùy sống, tất cả kháng thể RGMA đều thể hiện hoạt tính kích thích sự tái tạo thần kinh và hoạt tính kích thích bảo vệ thần kinh gần như nhau. Các kháng thể chọn lọc RGMA, AE12-1 và AE12-1Y thể hiện hoạt tính tương đương với h5F9.23, một kháng thể trung hòa cả RGMA lẫn RGMc. Việc trung hòa RGMc không được xem là cần thiết cho hoạt lực. Do đó, để hiểu sâu hơn về cơ chế tác động của cả ba kháng thể RGMA trong mô hình EAE tùy sống tập trung, một vài chất đánh dấu được đánh giá ở nhiều lát cắt cột sống của chuột được xử lý bằng kháng thể AE12-1Y, AE12-1 và h5F9.23 làm tăng diện tích tái tạo (GAP-43), diện tích tái myelin hóa (MBP) và làm giảm diện tích CD68 gây viêm (dương tính với CD68) xung quanh vị trí thương tổn cột sống (xem, Fig.19).

Kháng thể chọn lọc RGMA, AE12-1Y-QL, được thử nghiệm để xác định liệu có hiệu quả trong mô hình tEAE cột sống này. Cụ thể, 4 liều kháng thể khác nhau (đó là (0,01, 0,1, 1, 10 mg/kg được dùng toàn thân qua đường IV một tuần một lần cho chuột). AE12-1Y-QL thể hiện hoạt tính đáng kể ở 0,1, 1 và 10 mg/kg (Fig.20). Tuy nhiên, liều 0,01 mg/kg không có hoạt lực.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng phân tử dẫn hướng đẩy a (Repulsive Guidance Molecule a - “RGMa”) đơn dòng phân lập được chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa vùng xác định bổ trợ (complementary determining region - CDR)1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:2, CDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:3, và CDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa CDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:6, CDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:7 và CDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:73.
2. Kháng thể kháng RGMa đơn dòng phân lập được theo điểm 1, trong đó CDR3 của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:73.
3. Kháng thể kháng RGMa đơn dòng phân lập được theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này là kháng thể của người.
4. Kháng thể kháng RGMa đơn dòng phân lập được theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này chứa miền cố định globulin miễn dịch của chuỗi nặng của isotyp IgG.
5. Kháng thể kháng RGMa đơn dòng phân lập được theo điểm 4, trong đó isotyp IgG là isotyp IgG1 ở người.
6. Kháng thể kháng RGMa đơn dòng phân lập được theo điểm 5, trong đó miền cố định IgG1 ở người chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:140, 141, 142 hoặc 143.
7. Kháng thể kháng RGMa đơn dòng phân lập được theo điểm 5, trong đó miền cố định IgG1 ở người chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 143.
8. Kháng thể kháng RGMa đơn dòng phân lập được theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này chứa vùng cố định của chuỗi nhẹ lambda.
9. Kháng thể kháng RGMa đơn dòng phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó kháng thể này chứa trình tự chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO:146 và trình tự chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 147.
10. Kháng thể kháng RGMa đơn dòng phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó kháng thể này còn chứa tác nhân được chọn từ nhóm bao gồm: phân

tử kết dính miễn dịch, tác nhân để chụp hình, và tác nhân điều trị, trong đó tác nhân để chụp hình được chọn từ nhóm bao gồm chất đánh dấu phóng xạ, enzym, chất đánh dấu huỳnh quang, chất đánh dấu phát quang hóa học, chất đánh dấu phát quang sinh học, chất đánh dấu từ và biotin, và trong đó chất đánh dấu phóng xạ được chọn từ nhóm bao gồm ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho và ^{153}Sm .

11. Dược phẩm chứa kháng thể kháng RGMa đơn dòng phân lập được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9.

FIG.1

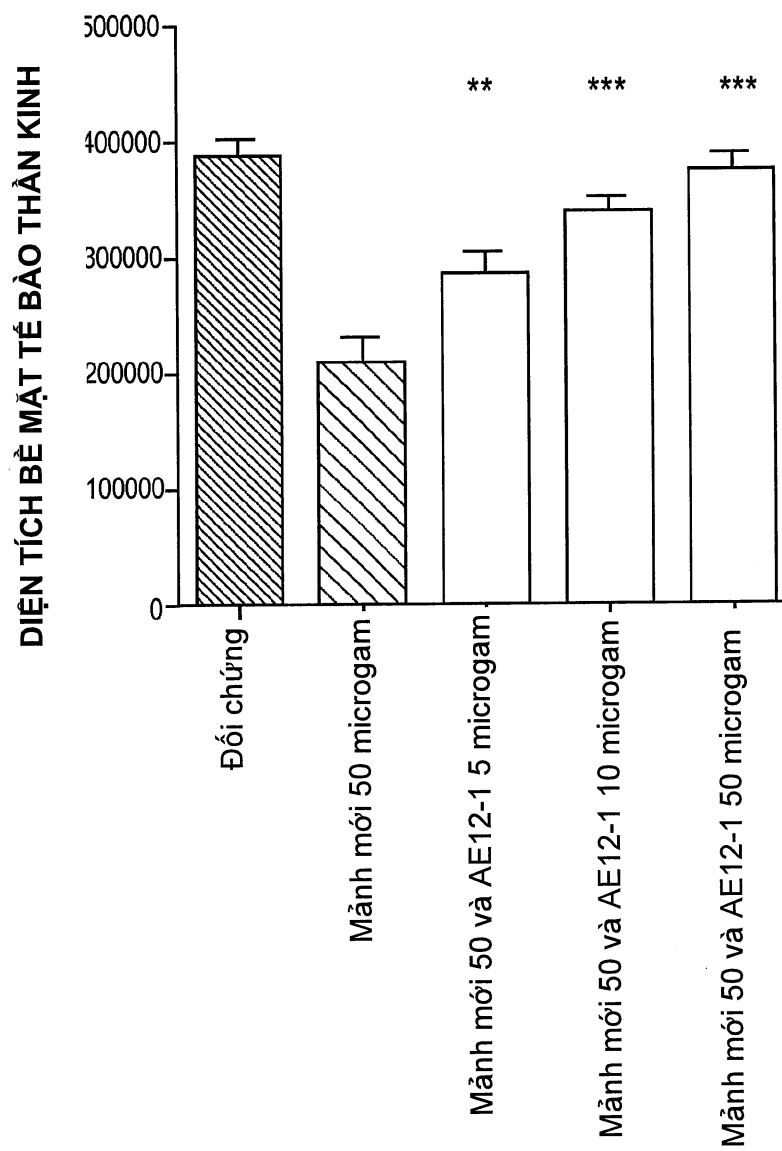


FIG.2

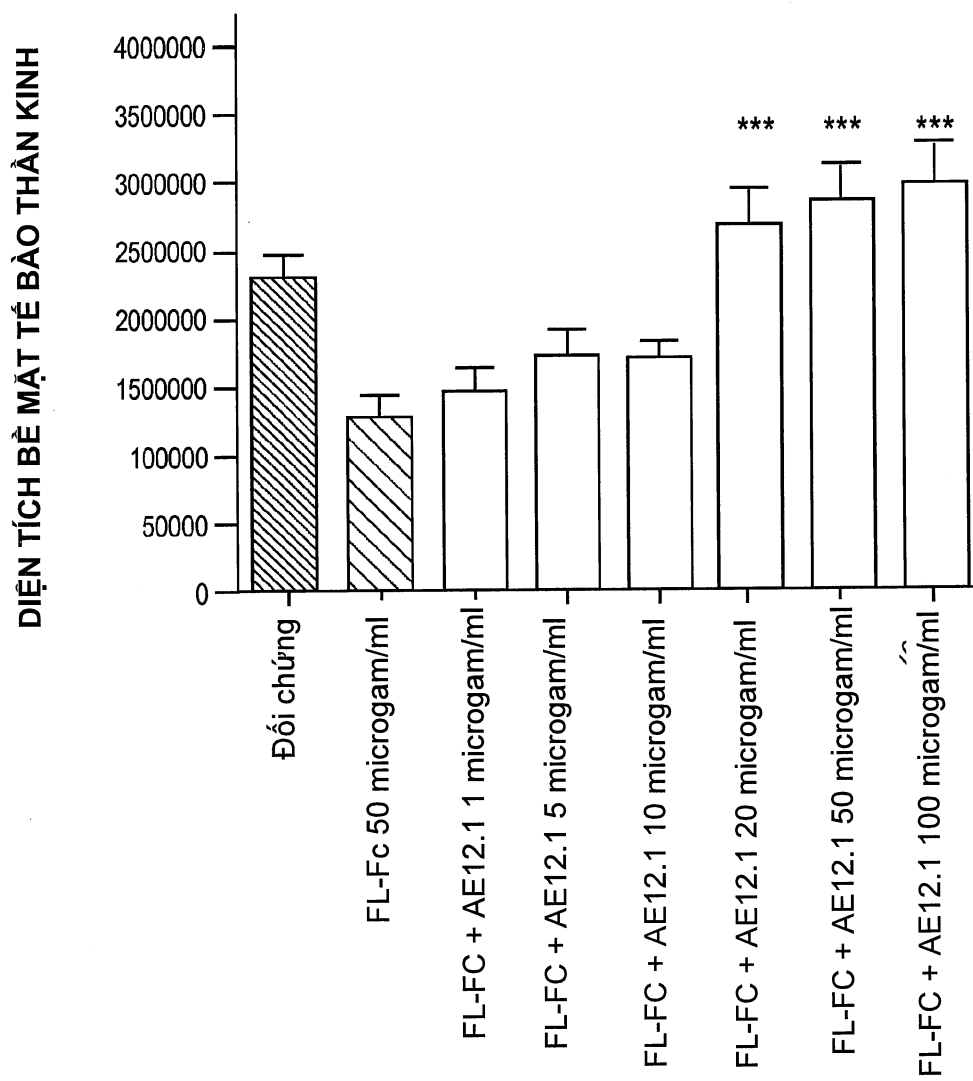


FIG.3

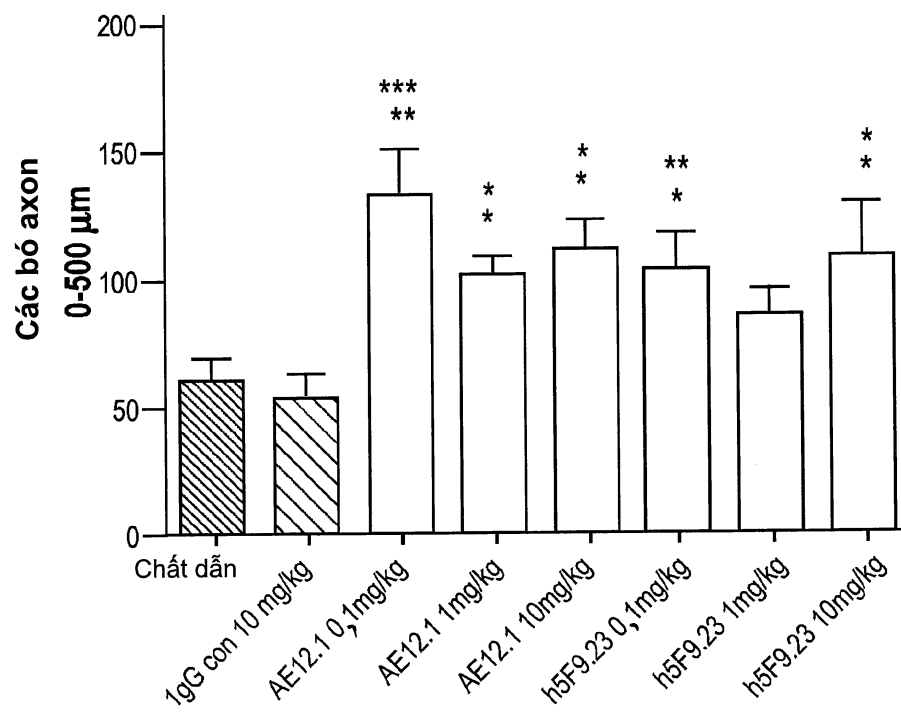


FIG.4

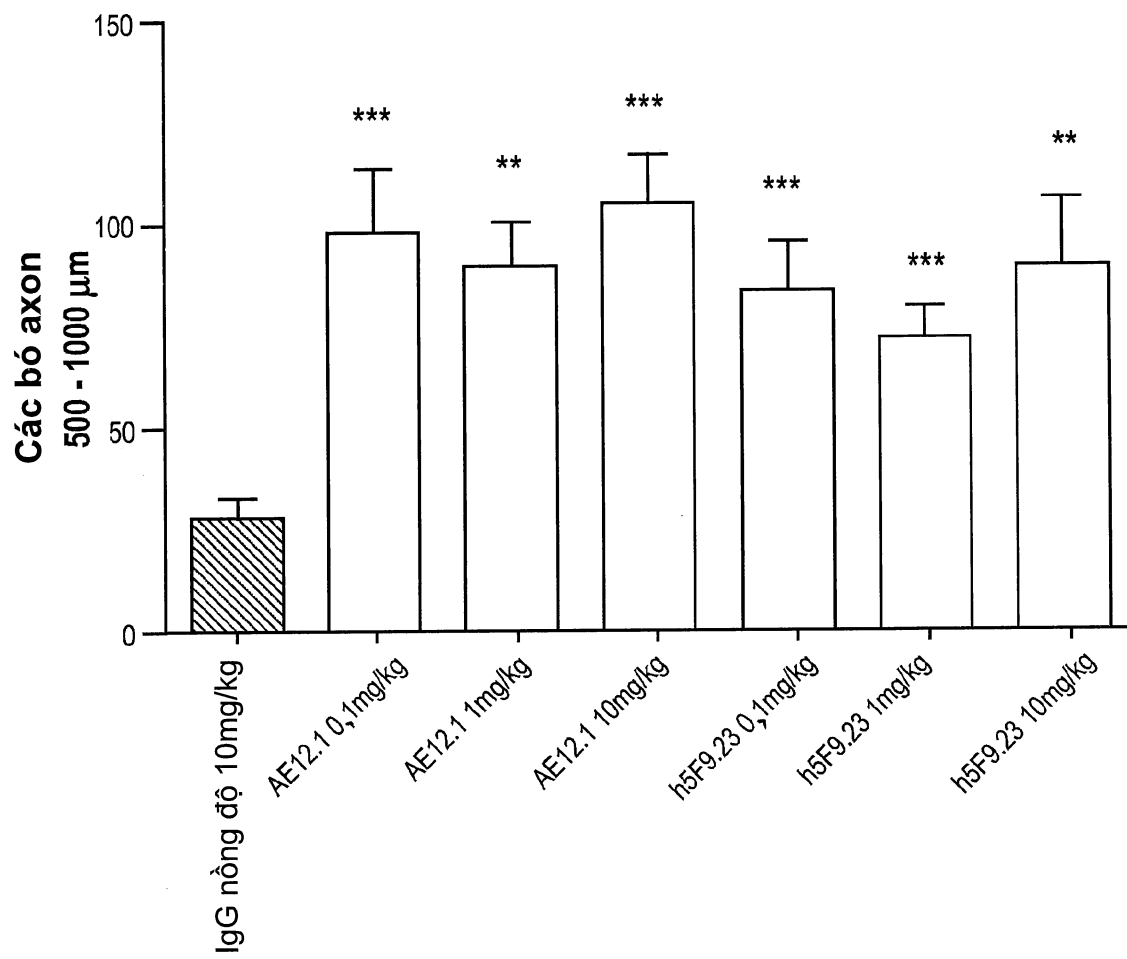


FIG.5

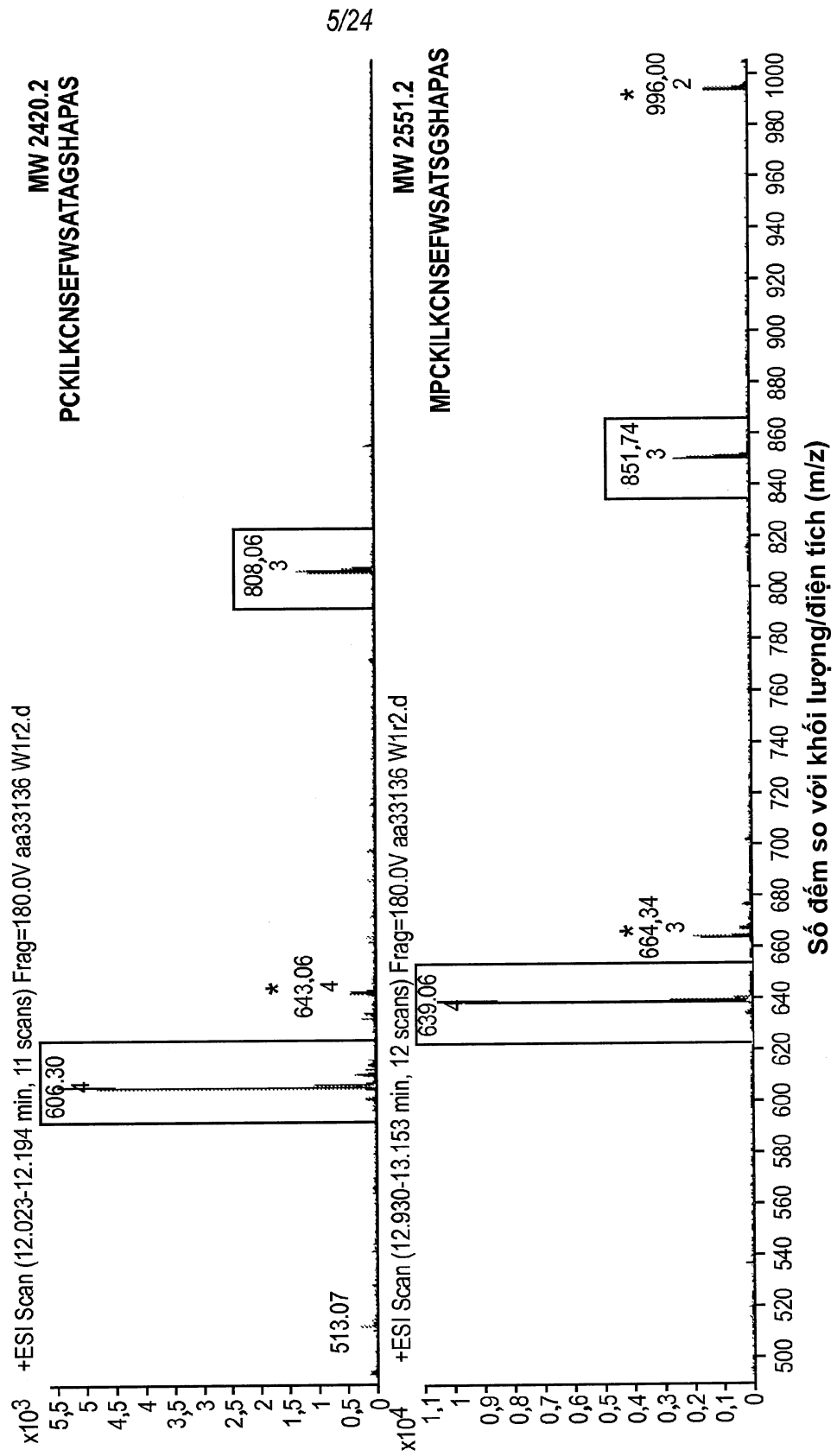


FIG.5

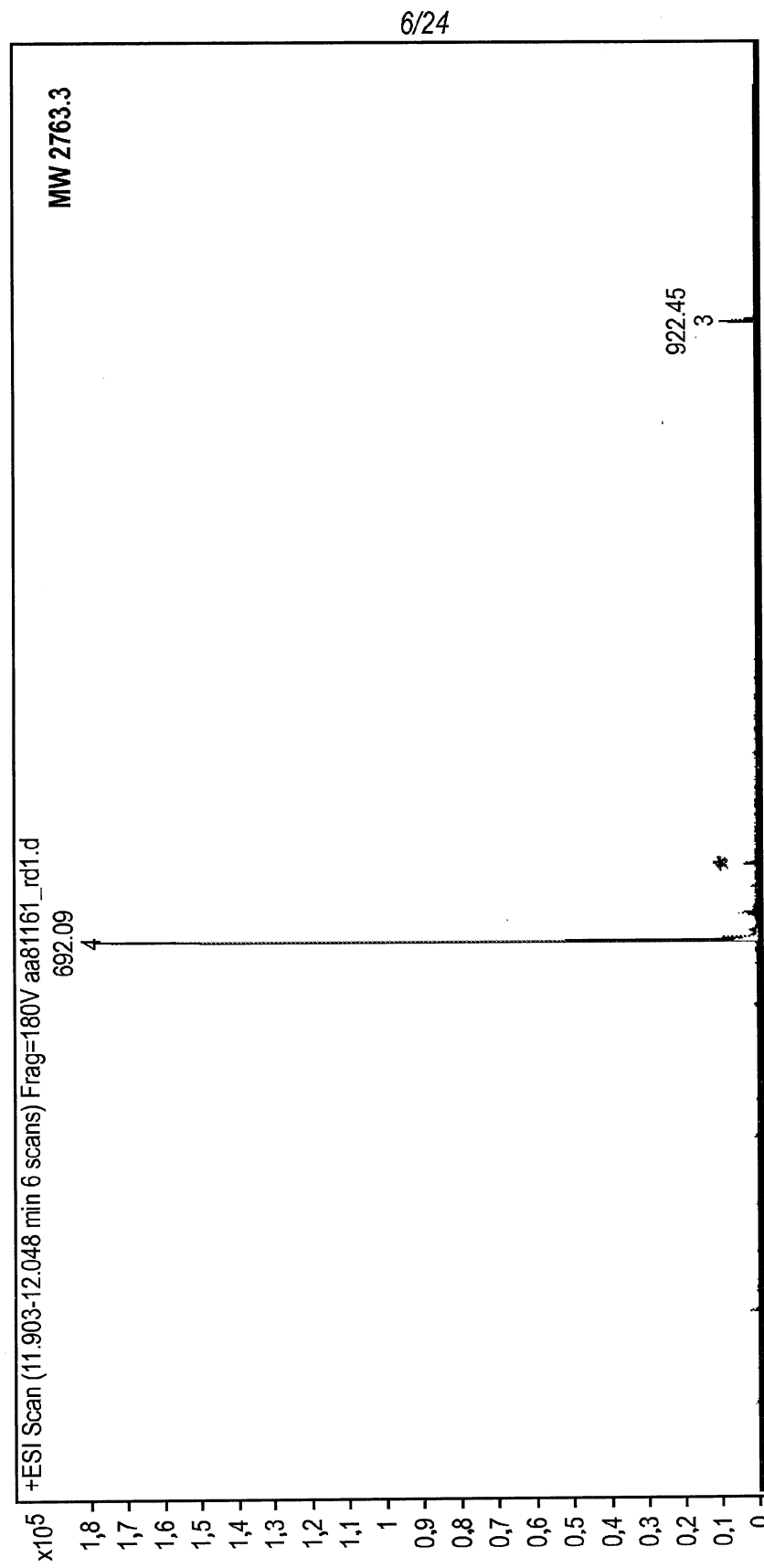


FIG.6 (tiếp)

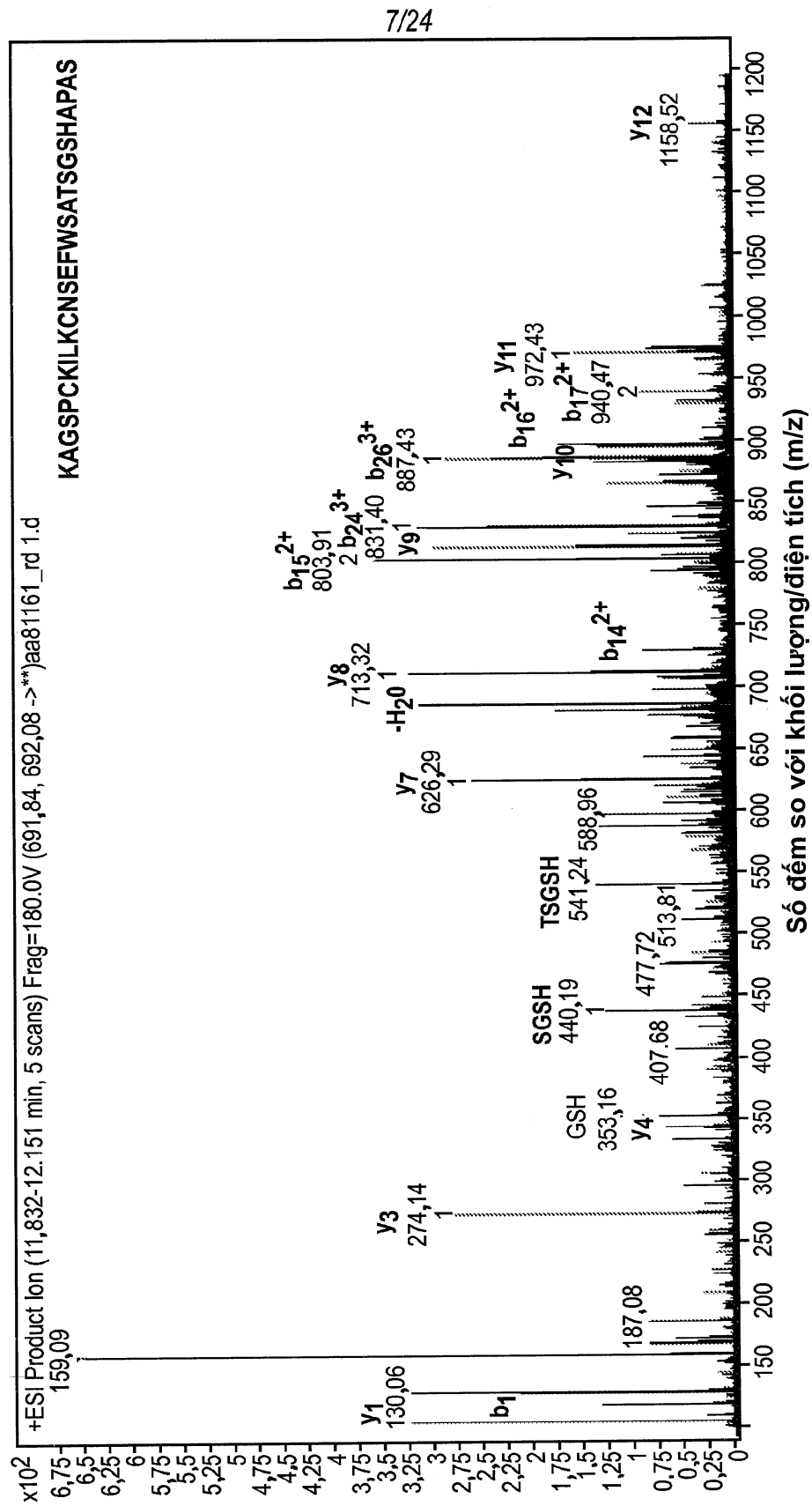


FIG.7

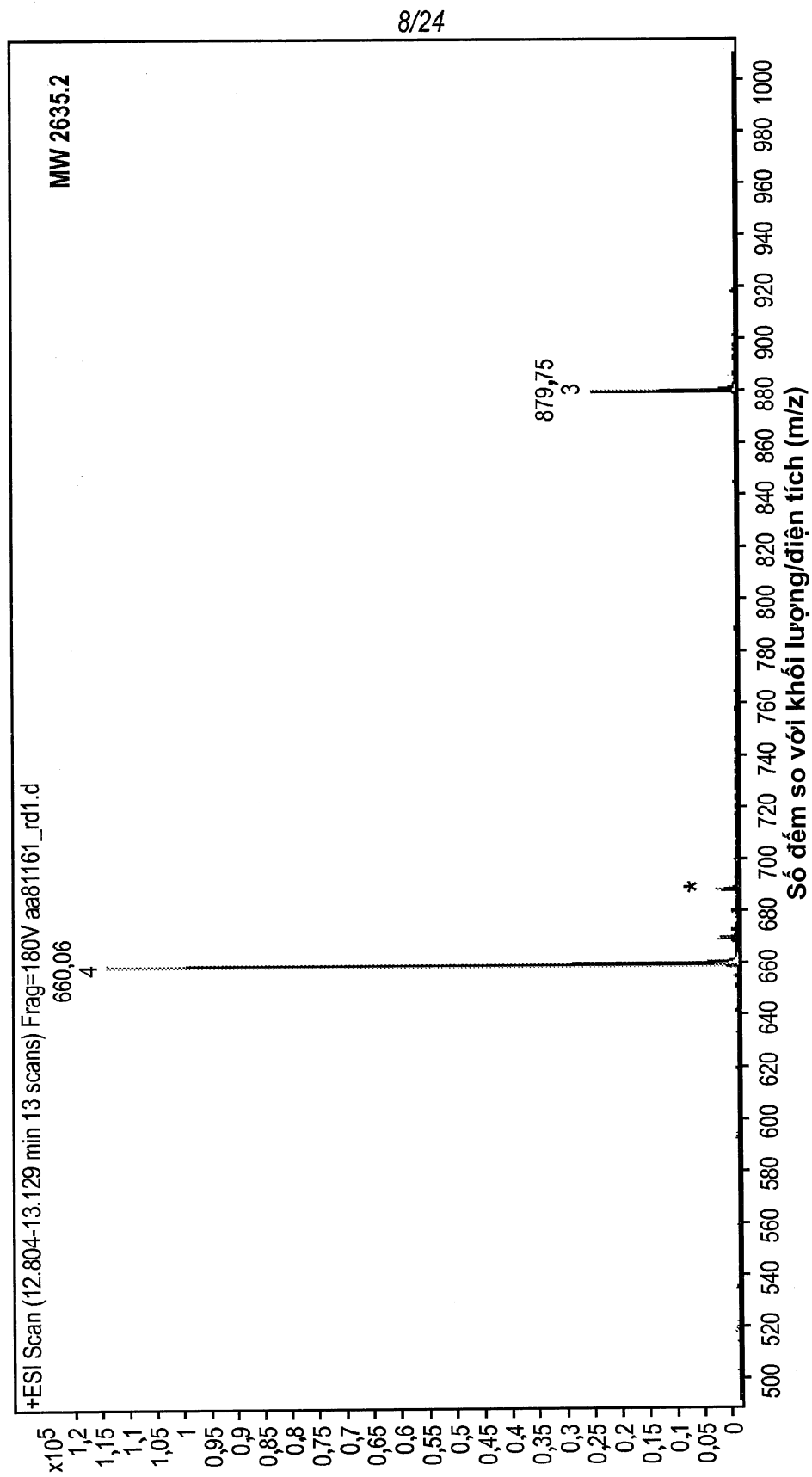
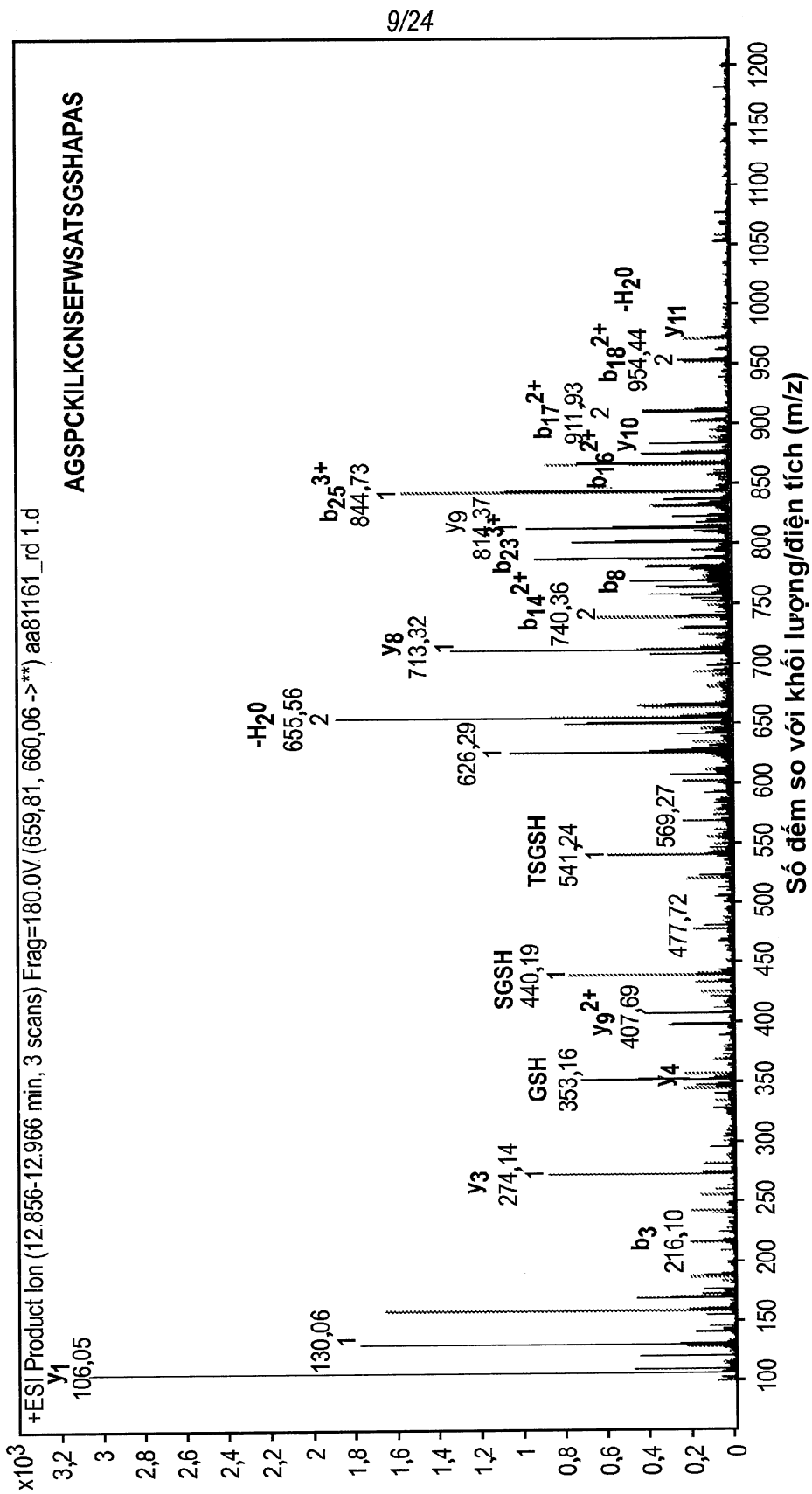


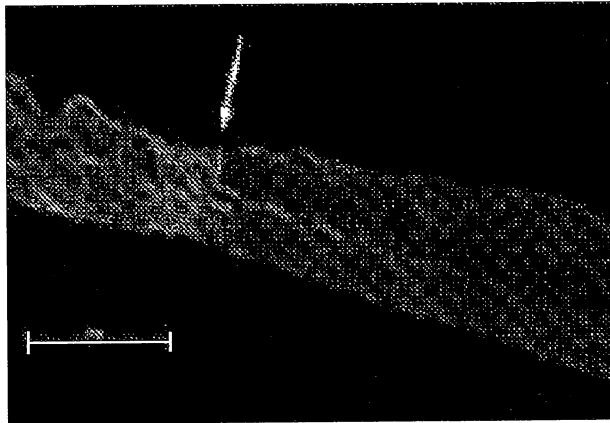
FIG.7 (tiếp)



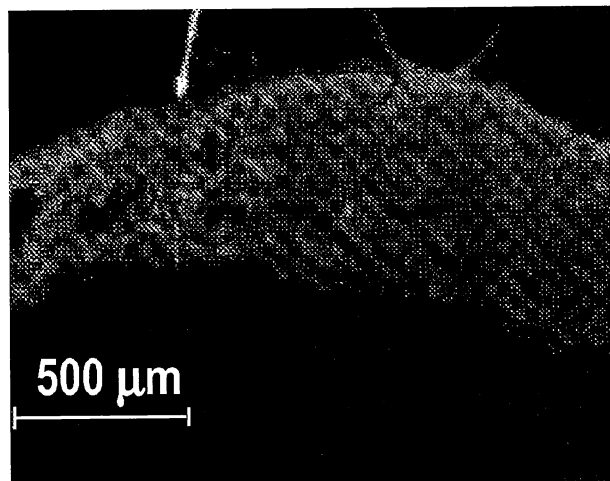
10/24

FIG.8

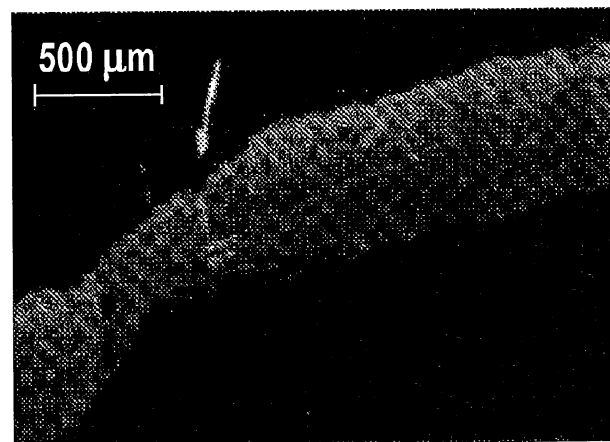
hIgG 10 mg/kg



AE12-11 mg/kg



h5F9.23 1 mg/kg



Não →

11/24

FIG.9

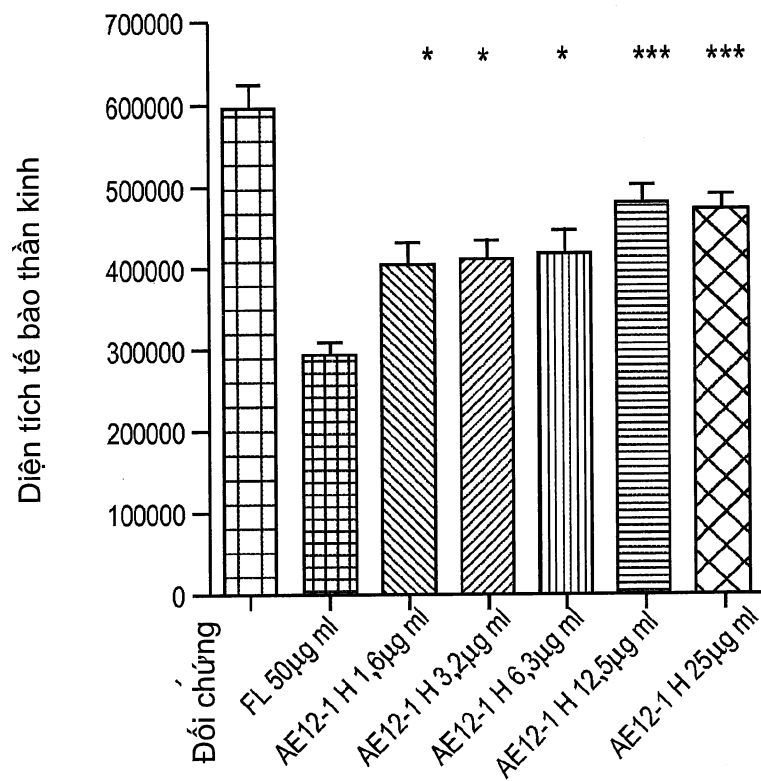
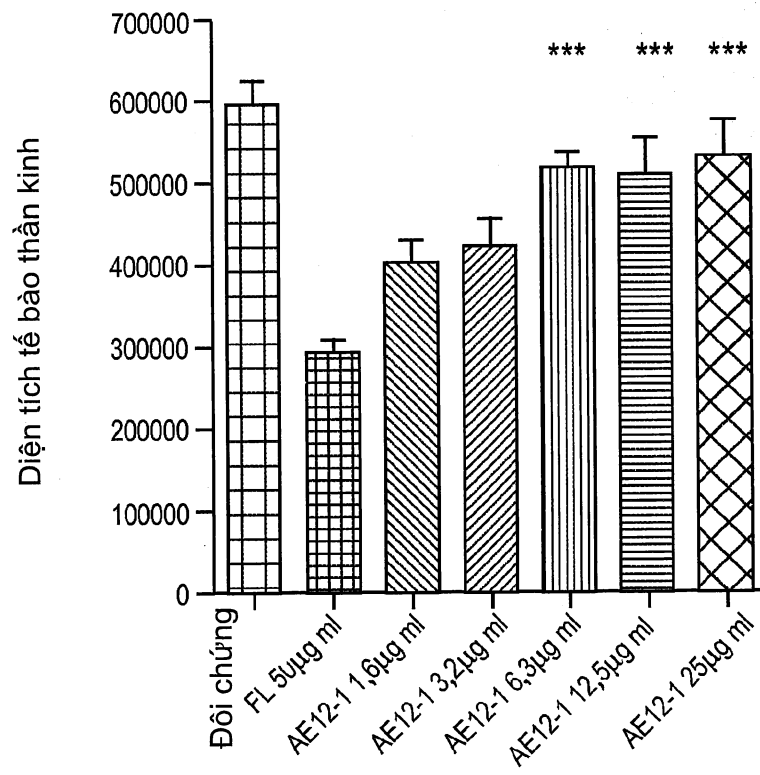


FIG.10

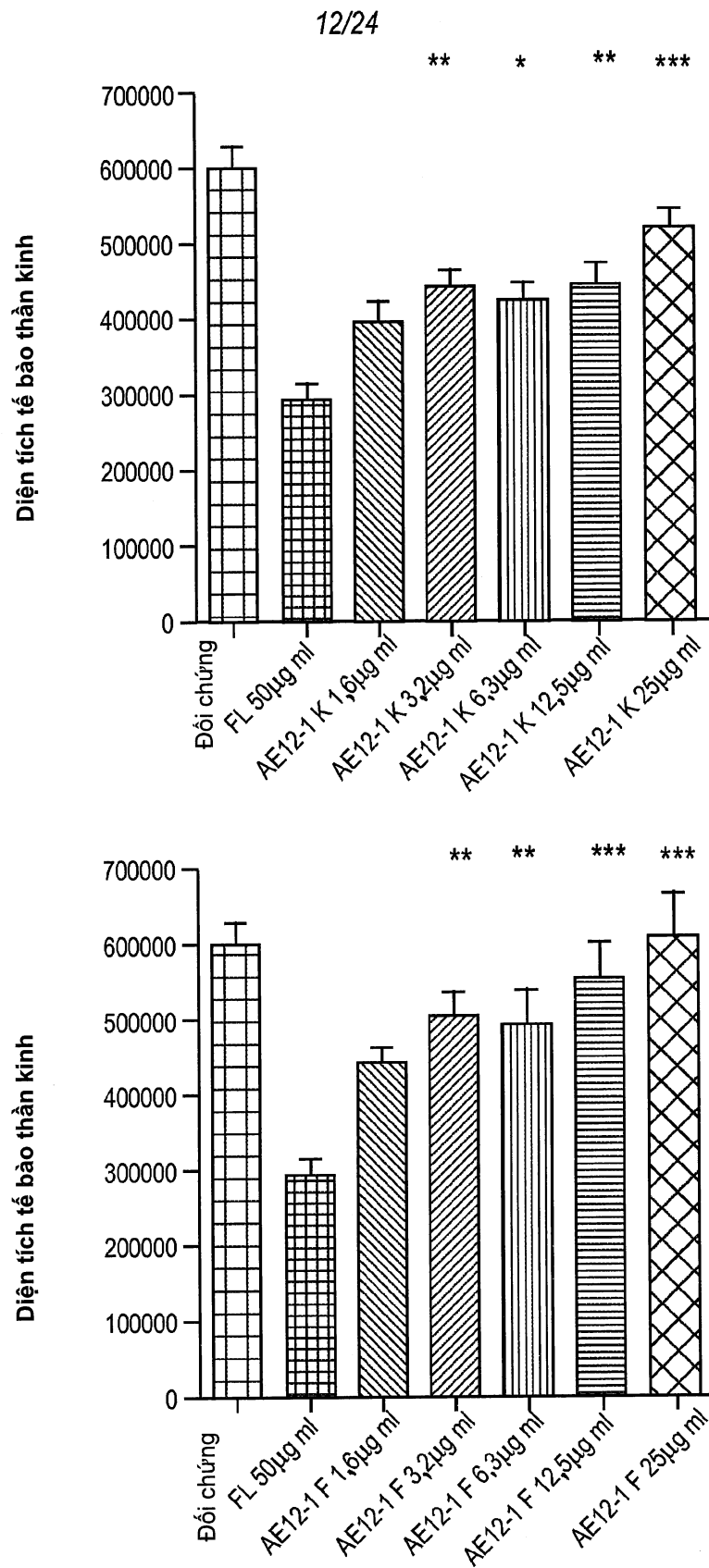


FIG.11

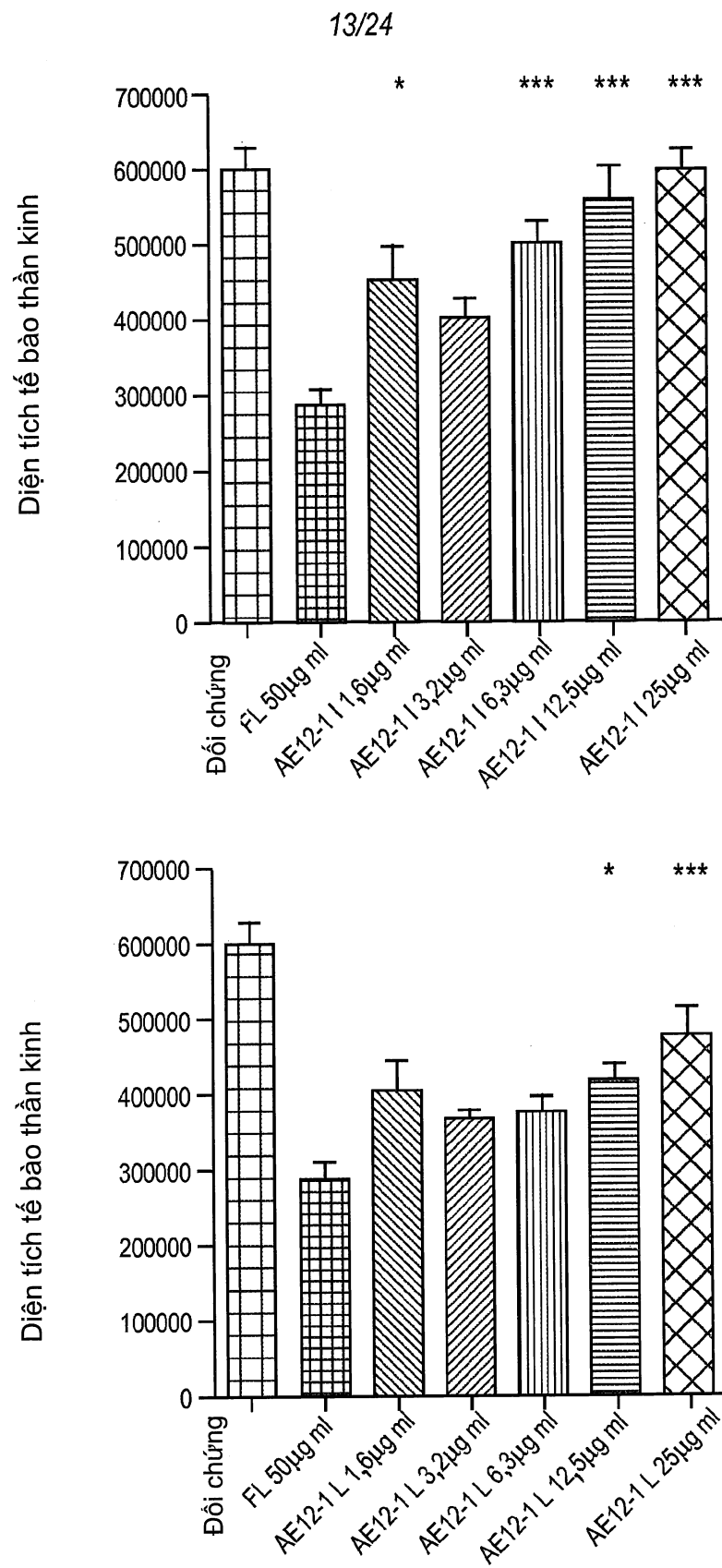


FIG.12

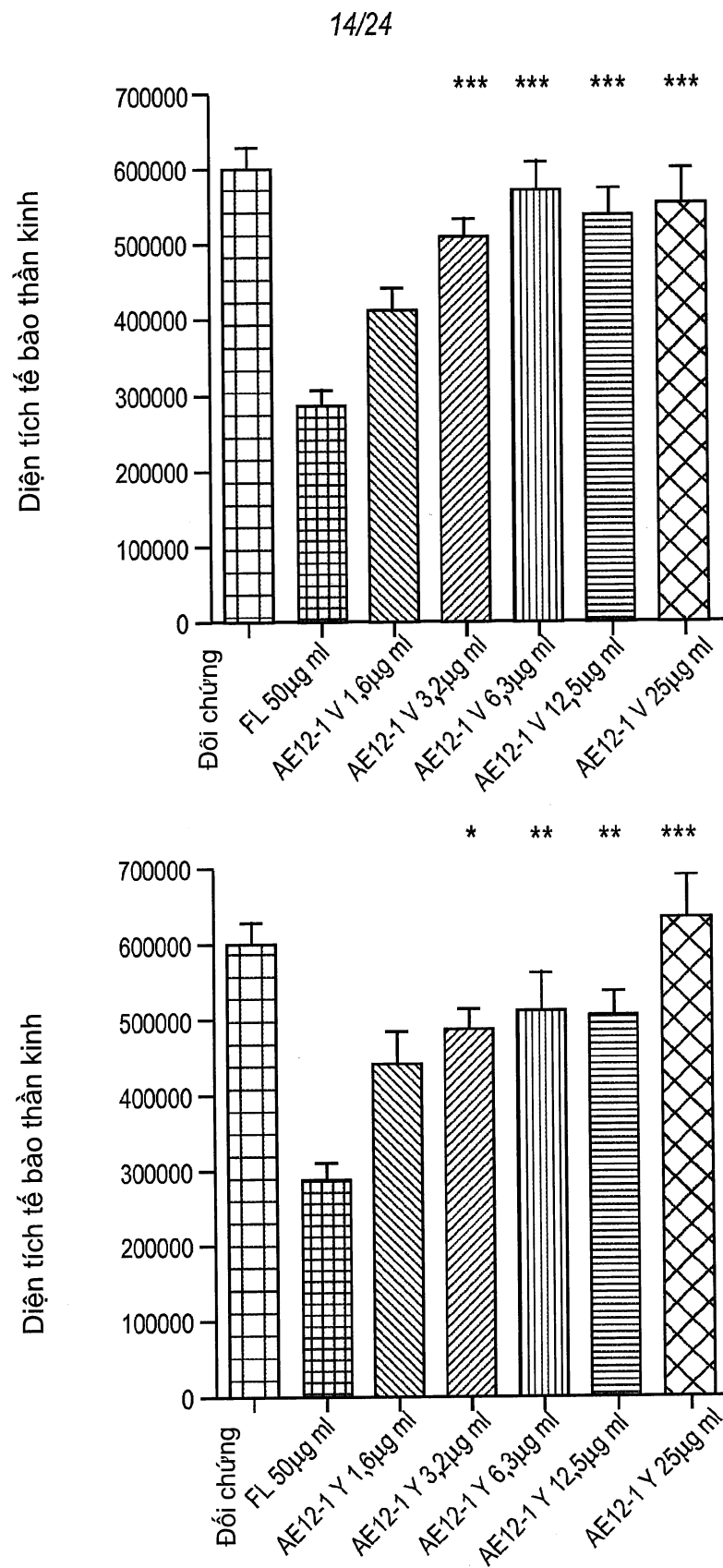
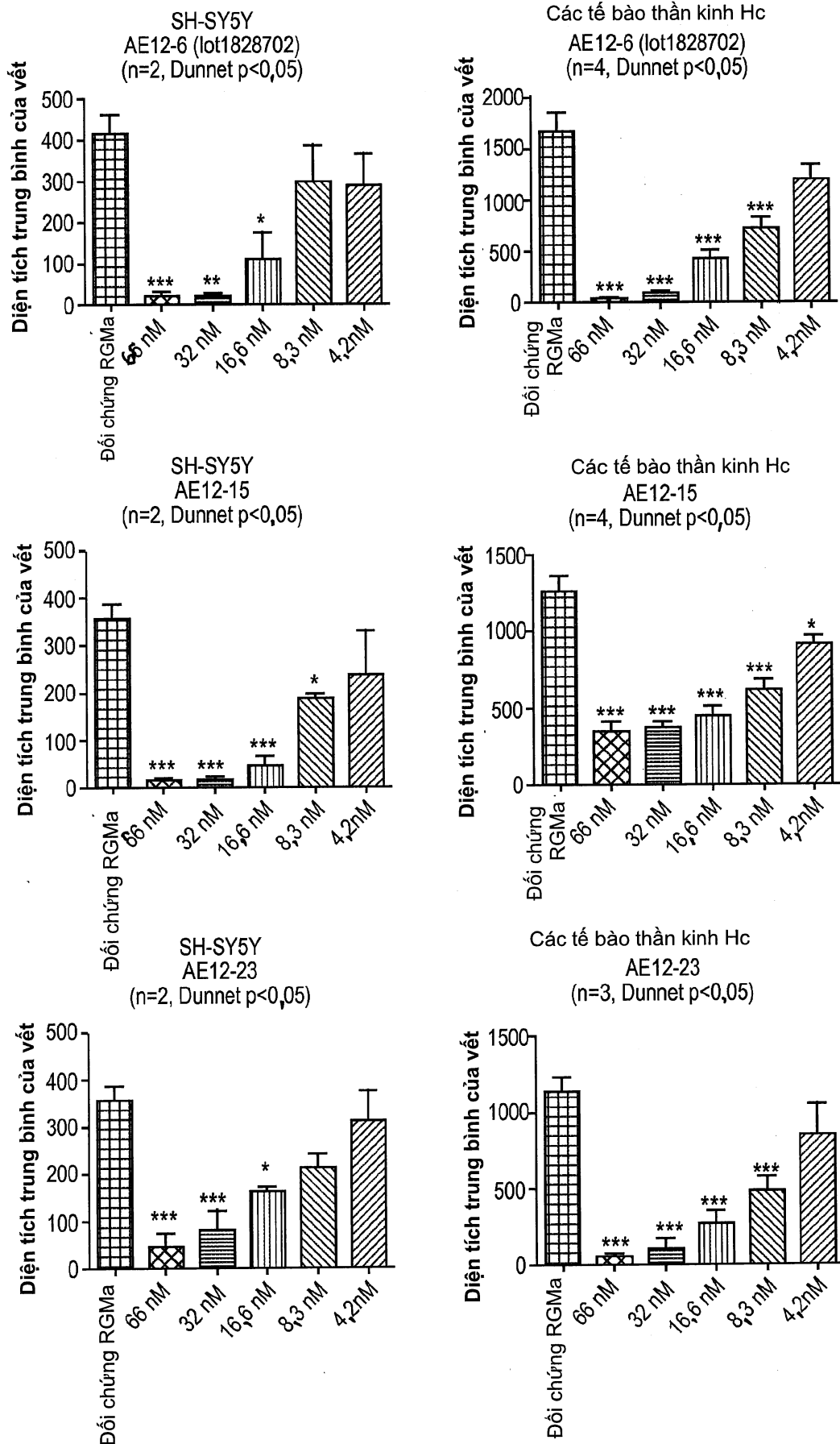


FIG.13

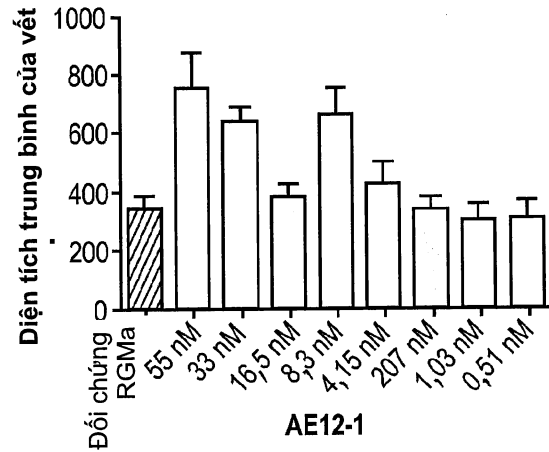
15/24



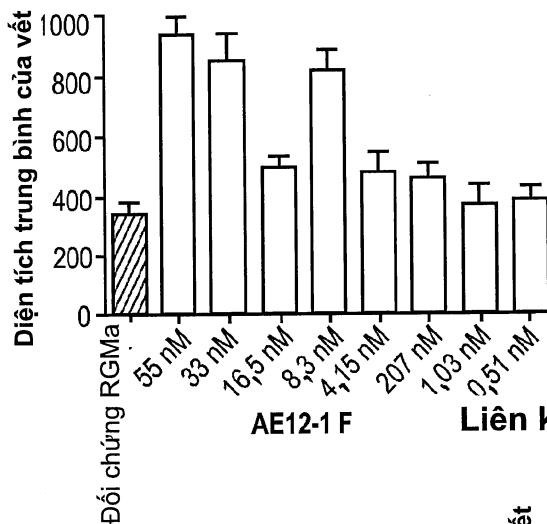
16/24

FIG.14

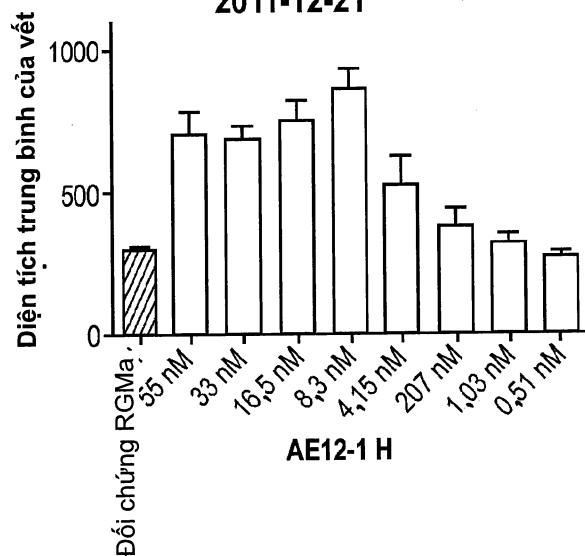
Liên kết RGMa-Fc trên các tế bào SH-SY5Y

AE 12-1
2011-12-21

Liên kết RGMa-Fc trên các tế bào SH-SY5Y

AE 12-1 F
2011-12-21

Liên kết RGMa-Fc trên các tế bào SH-SY5Y

AE 12-1 H
2011-12-21

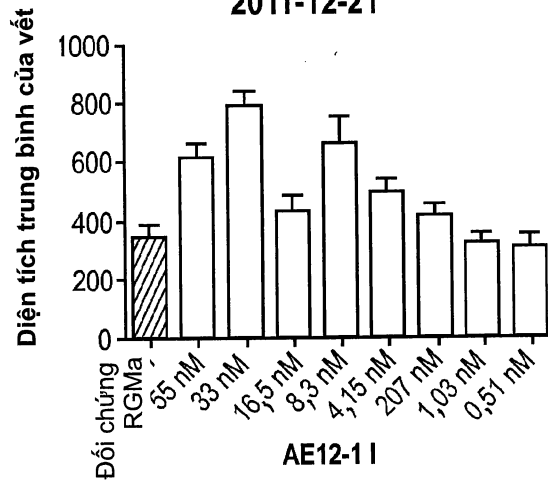
17/24

FIG.14 (tiếp)

Liên kết RGMa-Fc trên các tế bào SH-SY5Y

AE 12-1 I

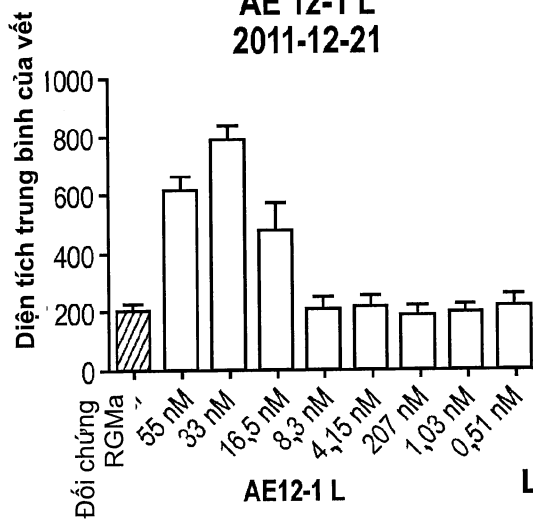
2011-12-21



Liên kết RGMa-Fc trên các tế bào SH-SY5Y

AE 12-1 L

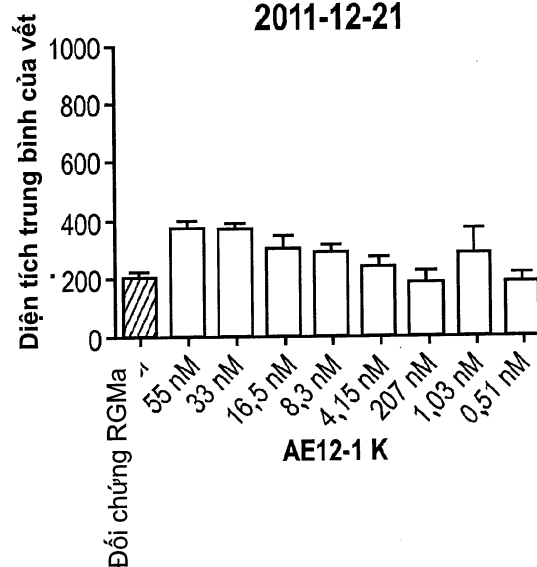
2011-12-21



Liên kết RGMa-Fc trên các tế bào SH-SY5Y

AE 12-1 K

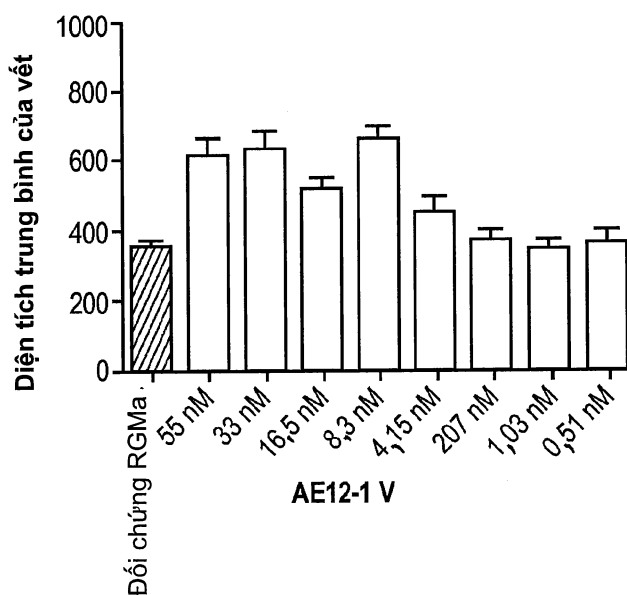
2011-12-21



18/24

FIG.14 (tiếp)

Liên kết RGMa-Fc trên các tế bào SH-SY5Y
 AE 12-1 V
 2011-12-21



Liên kết RGMa-Fc trên các tế bào SH-SY5Y
 AE 12-1 Y
 2011-12-06

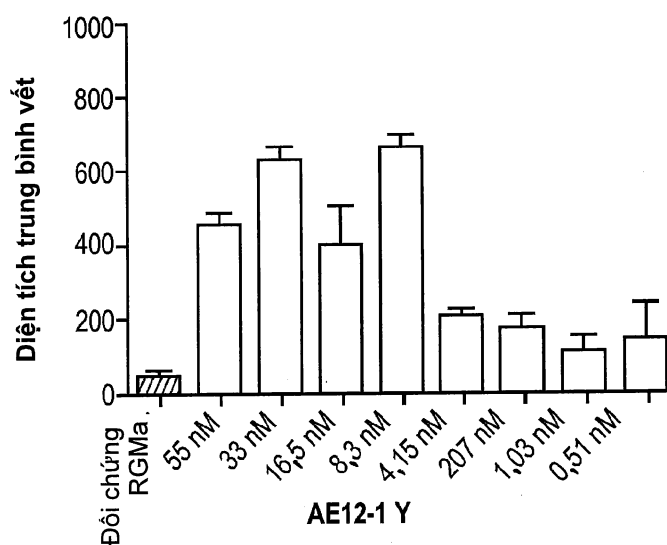


FIG.15

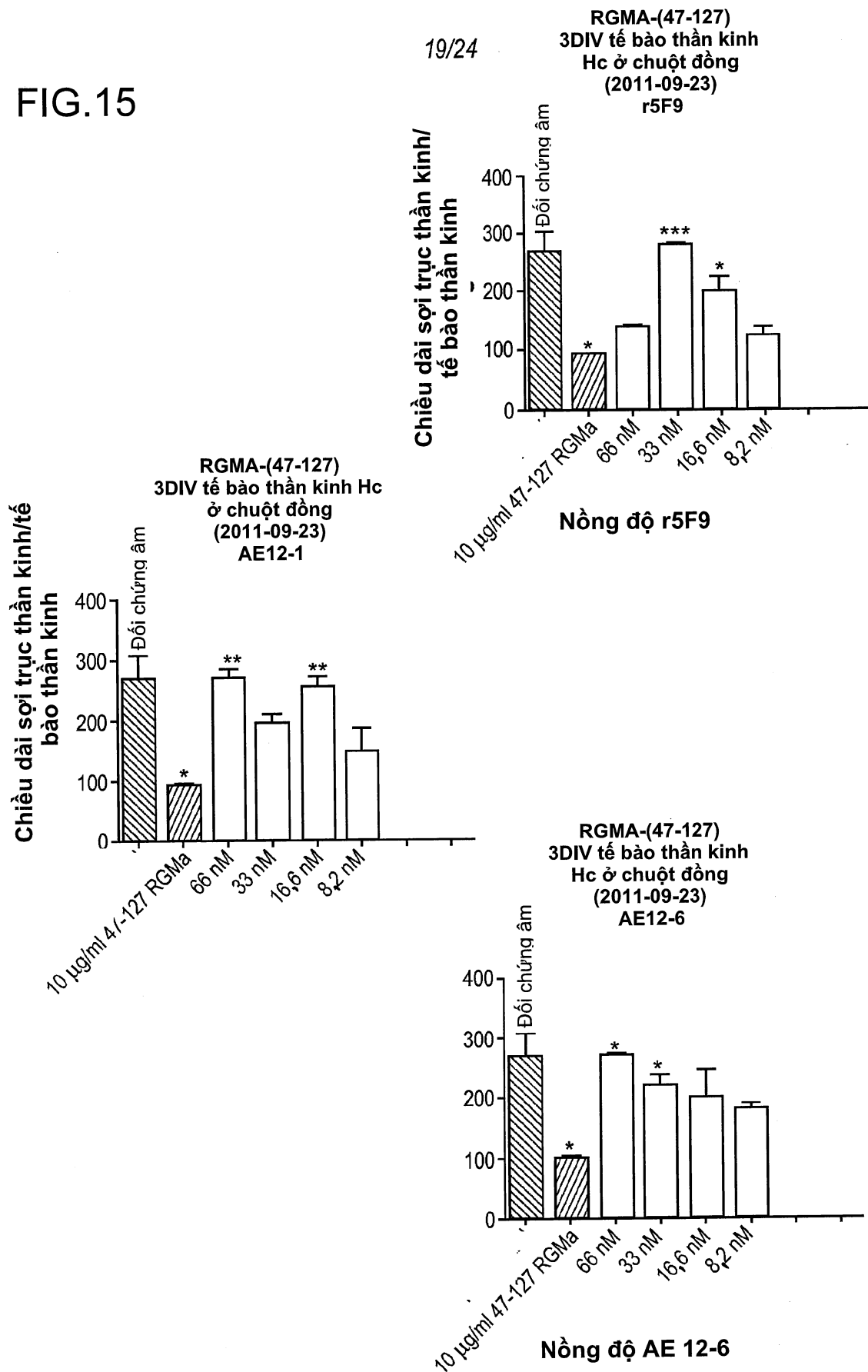


FIG.16

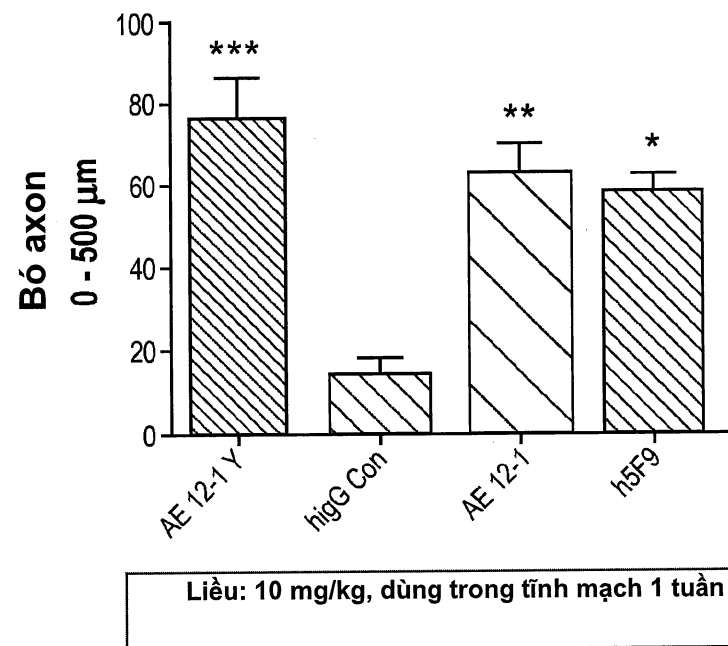


FIG.17

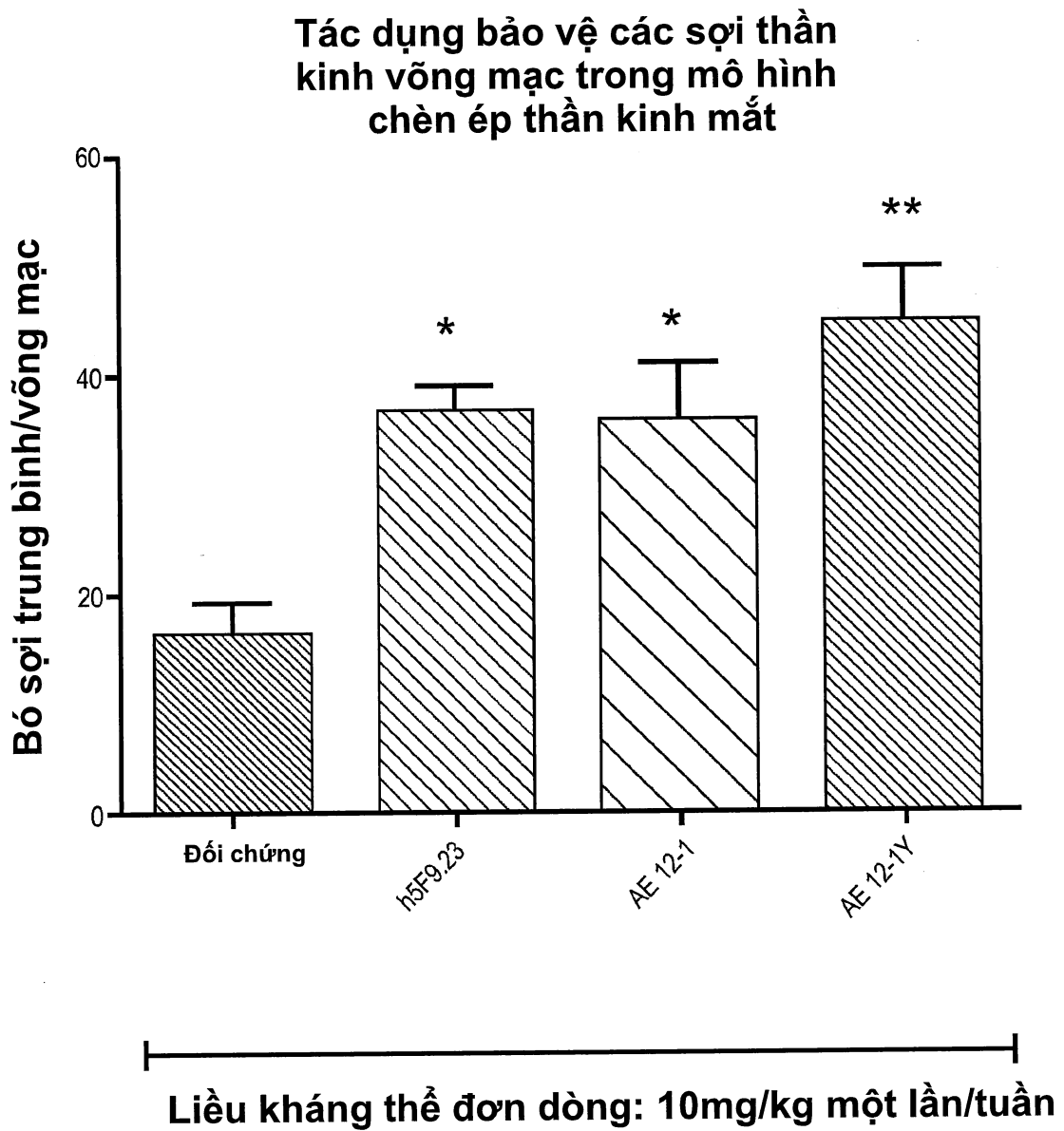
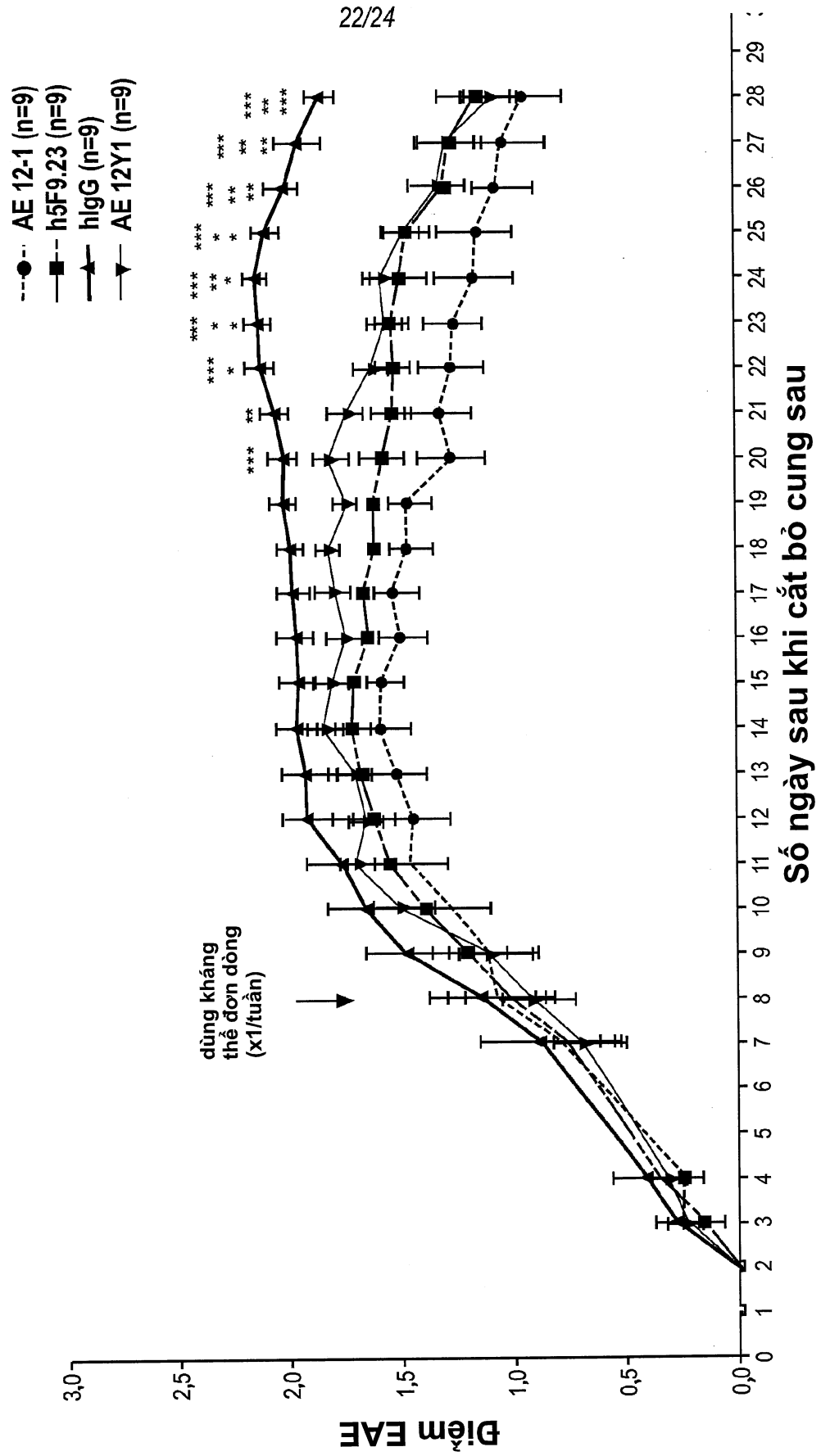


FIG.18



23/24

FIG.19

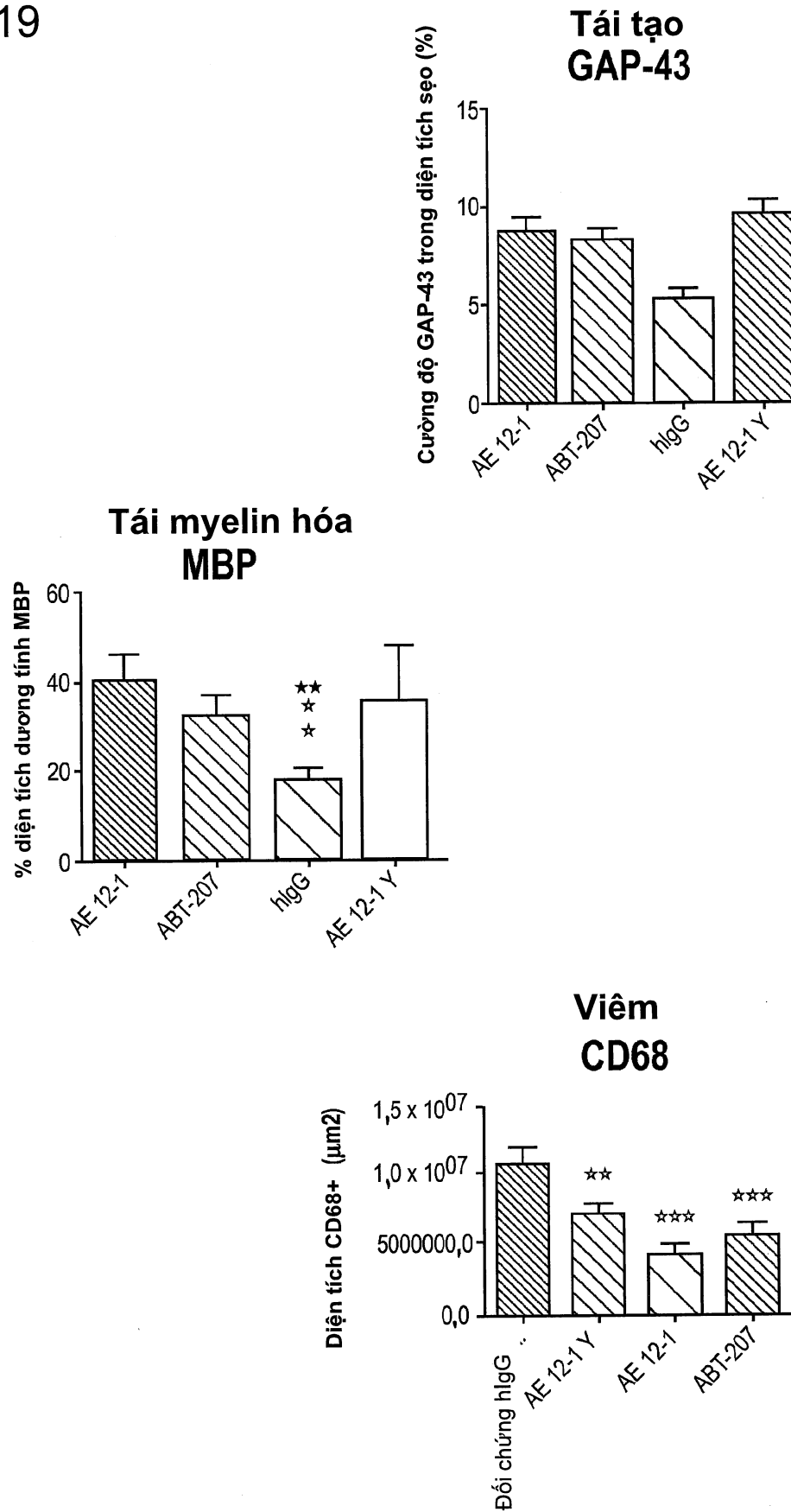
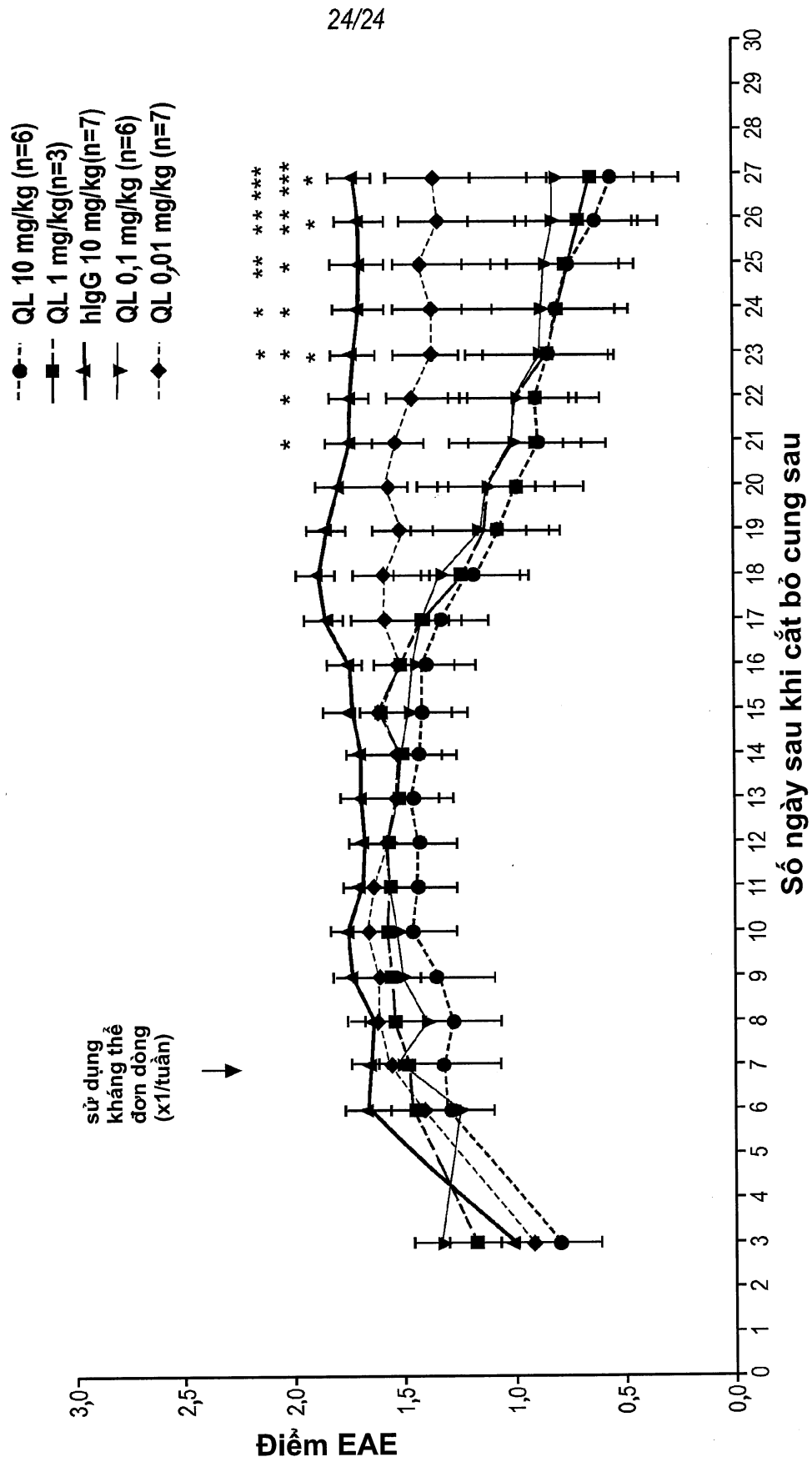


FIG.20

5 M1 215

EAE cột sống được tạo đích ở chuột Lewis



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MUELLER, BERNHARD

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG PHÂN TỬ DẪN HƯỚNG ĐẪY α (RGMa) VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 11423US01

<140>

<141>

<150> 61/591,324

<151> 2012-01-27

<160> 158

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 1

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Met
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala 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 Val Gly Ser Gly Pro Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 2

Ser His Gly Ile Ser

1 5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 3

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

1 5 10 15

Gly

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 4

Val Gly Ser Gly Pro Tyr Tyr Tyr Met Asp Val

1 5 10

<210> 5

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 5

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

1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Ser Val Gly Asp Ser

20 25 30

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

Met Leu Tyr Asp Val Thr Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

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

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

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 6

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

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 7

Asp Val Thr Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 8

26217

Cys Ser Tyr Ala Gly Thr Asp Thr Leu

1 5

<210> 9

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 9

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala 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 Ser Thr Ser Leu Ser Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 10

Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 11

Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 12

Ser Thr Ser Leu Ser Val
 1 5

<210> 13

<211> 106

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 13

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 Lys Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asp 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 Gly Val
 85 90 95

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

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 14

Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Cys
1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 15

Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 16

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Gly Val
1 5

<210> 17

<211> 126

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 17

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Arg Val Tyr Ser Ser Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110

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

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 18

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 19

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

1 5 10 15

Gly

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 20

Glu Arg Val Tyr Ser Ser Gly Lys Glu Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15

Val

<210> 21
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

<210> 22
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 22

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

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 23

Gly Asp Tyr Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 24

Gln Ser Tyr Asp Asn Ser Leu Arg Gly Val Leu
 1 5 10

<210> 25

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 25

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro 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 Ala Ile Ser Gly Asp Gly Ile Leu Lys Tyr Tyr Thr 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 Asn Leu Ser Gly Glu Asp Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asn Tyr Asp Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 26

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 27

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

Gly

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 28

Asn Tyr Asp Asn Ser Leu Asp Tyr

1

5

<210> 29

<211> 111

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 29

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

Ser Val Lys Val Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gly His Ser Ala Tyr Ala
 20 25 30

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

Lys Val Asn Ser Asp Gly Ser His Asn Lys Gly Asp Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Ile Ile Ser
 65 70 75 80

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

Pro Gly Ile Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 30

Thr Leu Ser Ser Gly His Ser Ala Tyr Ala Ile Ala
 1 5 10

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 31

Val Asn Ser Asp Gly Ser His Asn Lys Gly Asp
1 5 10

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 32

Gln Thr Trp Gly Pro Gly Ile Arg Val
1 5

<210> 33

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 33

Glu 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 His Ser Leu Ser Glu Leu
20 25 30

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

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Arg Gly Thr Tyr Ala Pro Asn Phe
50 55 60

Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 34
 Glu Leu Thr Ile His
 1 5

<210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 35
 Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Arg Gly Thr Tyr Ala Pro Asn Phe Arg
 1 5 10 15

Gly

<210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 36
 Leu Leu Gly Glu Tyr Asp Ser Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10

<210> 37
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 37
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Glu
 1 5 10 15

26217

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile 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 Glu Ala
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 38

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Cys Leu His
1 5 10

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 39

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 40

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Tyr Thr

1

5

<210> 41

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 41

Glu 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 Ile Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Met Asn Pro Asp Ser Gly Asn Thr Gly Phe Val Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 42

Asn Tyr Asp Ile Ala
 1 5

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 43

Trp Met Asn Pro Asp Ser Gly Asn Thr Gly Phe Val Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 44

Asp Arg Phe Gly Ser Gly Tyr Asp Leu Asp His
1 5 10

<210> 45

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 45

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

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

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

Asp Asp Ser Asp 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 Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Gly Ser Ser Ser Asp His
85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 46

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
1 5 10

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 47

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 48

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

<210> 49

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 49

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 Ser Ser Ser Tyr
20 25 30

26217

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

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

Ala Arg Gln Gly Tyr Gly Ala His Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 50

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 50

Ser Tyr Ala Met Thr

1 5

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 51

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

1 5 10 15

Gly

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 52

Gln Gly Tyr Gly Ala His Asp Tyr

1

5

<210> 53

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 53

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50

55

60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65

70

75

80

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

85

90

95

Asn Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100

105

110

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 54

Ser Gly Ala Ser Ser Asn Val Gly Ser Asn Arg Val Asn

1

5

10

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 55

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 56

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Tyr Val

1 5 10

<210> 57

<211> 126

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 57

Glu Val Gln Leu Leu 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 Asp Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Leu Ile Ser Trp Asp 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 Ser Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Asp Ile Pro Lys Val Gly Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Gly Ala

100 105 110

Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 58

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 59

Leu Ile Ser Trp Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 60

Asp Ile Pro Lys Val Gly Gly Tyr Ser Tyr Gly Tyr Gly Ala Leu Gly

1 5 10 15

Tyr

<210> 61

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 61

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Met Leu Val Val His
 35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Ser Ser Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr His Cys Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Gly His
 85 90 95

His Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105

<210> 62

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 62

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Asp Ile Ser Val His
 1 5 10

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 63

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 1 5

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 64

Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Gly His His Val
 1 5 10

<210> 65

<211> 450

<212> PRT

<213> Người

<400> 65

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

Met Gly Met Gly Arg Gly Ala Gly Arg Ser Ala Leu Gly Phe Trp Pro
 20 25 30

Thr Leu Ala Phe Leu Leu Cys Ser Phe Pro Ala Ala Thr Ser Pro Cys
 35 40 45

Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Gly Ser
 50 55 60

His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu Arg
 65 70 75 80

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

Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser Gln
 100 105 110

His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Leu Arg Thr
 115 120 125

Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile
 130 135 140

Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Thr Pro Asn Tyr
 145 150 155 160

Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp
 165 170 175

Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn

26217

180	185	190
Asn Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser		
195	200	205
Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln		
210	215	220
Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro		
225	230	240
Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala		
245	250	255
Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile		
260	265	270
Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg		
275	280	285
Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val		
290	295	300
Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro		
305	310	320
Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr Asn Ala Glu Gly		
325	330	335
Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala Pro Thr Ala Pro		
340	345	350
Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu		
355	360	365
Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr		
370	375	380
Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp		
385	390	400
Val Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Tyr Glu Arg		
405	410	415
Thr Arg Asp Leu Pro Gly Arg Ala Ala Ala Gly Leu Pro Leu Ala Pro		
420	425	430

Arg Pro Leu Leu Gly Ala Leu Val Pro Leu Leu Ala Leu Leu Pro Val
 435 440 445

Phe Cys
 450

<210> 66
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 66
 Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser
 1 5 10 15

Gly Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys Ala Ala
 20 25 30

Leu Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg
 35 40 45

Gly Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met
 50 55 60

Ser Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Leu
 65 70 75 80

Arg Thr Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro
 85 90 95

Glu Ile Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Thr Pro
 100 105 110

Asn Tyr Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp
 115 120

<210> 67
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 67
 Phe Ser Tyr Ala Gly Thr Asp Thr Leu
 1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 68

His Ser Tyr Ala Gly Thr Asp Thr Leu

1

5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 69

Leu Ser Tyr Ala Gly Thr Asp Thr Leu

1

5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 70

Val Ser Tyr Ala Gly Thr Asp Thr Leu

1

5

<210> 71

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 71

Ile Ser Tyr Ala Gly Thr Asp Thr Leu

1

5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 72

Lys Ser Tyr Ala Gly Thr Asp Thr Leu
1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 73

Tyr Ser Tyr Ala Gly Thr Asp Thr Leu
1 5

<210> 74

<211> 23

<212> PRT

<213> Người

<400> 74

Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser
1 5 10 15

Gly Ser His Ala Pro Ala Ser
20

<210> 75

<211> 151

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 75

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser
20 25 30

Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp
35 40 45

Thr Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg
50 55 60

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

26217

[illegible]

Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser Gln His Asn
 115 120 125
 Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Leu Arg Thr Leu Pro
 130 135 140
 Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile Cys His
 145 150 155 160
 Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Thr Pro Asn Tyr Thr His
 165 170 175
 Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp Arg Phe
 180 185 190
 Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn Asn Tyr
 195 200 205
 Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser Ala Ala
 210 215 220
 Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Phe Asn Gln Glu Cys
 225 230 235 240
 Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro Ala Ala
 245 250 255
 Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala Asn Ser
 260 265 270
 Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile Gln Ala
 275 280 285
 Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg Tyr Leu
 290 295 300
 Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val Glu Asp
 305 310 315 320
 Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro Leu Asn
 325 330 335
 Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr Asn Ala Glu Gly Thr Gly
 340 345 350
 Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala Pro Thr Ala Pro Glu Thr

355

360

365

Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu Pro Val
 370 375 380

Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr Thr Gly
 385 390 395 400

Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp Val Lys
 405 410 415

Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Tyr Glu Arg Thr Arg
 420 425 430

Asp Leu Pro Gly Asn Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Ile Ser Ser
 435 440 445

Thr Val Ala Ala Ala Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 450 455 460

Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
 465 470 475

<210> 77

<211> 388

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 77

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
 20 25 30

Lys Leu Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala
 35 40 45

Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys
 50 55 60

Ala Ala Leu Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr
 65 70 75 80

26217

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

Leu Met Ser Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro
100 105 110

Arg Leu Arg Thr Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp
115 120 125

Ser Pro Glu Ile Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala
130 135 140

Thr Pro Asn Tyr Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Leu Asn Ser Ala
145 150 155 160

Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
165 170 175

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
180 185 190

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
195 200 205

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
210 215 220

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
225 230 235 240

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
245 250 255

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
260 265 270

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
275 280 285

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
290 295 300

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
305 310 315 320

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

325

330

335

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 340 345 350

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 355 360 365

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 370 375 380

Ser Pro Gly Lys
 385

<210> 78
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 78
 Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser
 1 5 10 15

Gly Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys Ala Ala
 20 25 30

Leu Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg
 35 40 45

Gly Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met
 50 55 60

Ser Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Leu
 65 70 75 80

Arg Thr Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro
 85 90 95

Glu Ile Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Thr Pro
 100 105 110

Asn Tyr Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp
 115 120

<210> 79
 <211> 23
 <212> PRT

<213> Người

<400> 79

Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser
 1 5 10 15

Gly Ser His Ala Pro Ala Ser
 20

<210> 80

<211> 24

<212> PRT

<213> Người

<400> 80

Met Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr
 1 5 10 15

Ser Gly Ser His Ala Pro Ala Ser
 20

<210> 81

<211> 27

<212> PRT

<213> Người

<400> 81

Lys Ala Gly Ser Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp
 1 5 10 15

Ser Ala Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Ala Ser
 20 25

<210> 82

<211> 29

<212> PRT

<213> Người

<400> 82

Lys Ala Gly Ser Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp
 1 5 10 15

Ser Ala Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Pro Ala Ser Asp
 20 25

<210> 83

<211> 28

<212> PRT

<213> Người

<400> 83

Ala Gly Ser Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser

1 5 10 15

Ala Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Pro Ala Ser Asp
20 25

<210> 84
<211> 26
<212> PRT
<213> Người

<400> 84
Thr Lys Leu Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser
1 5 10 15

Ala Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Ala Ser
20 25

<210> 85
<211> 10
<212> PRT
<213> Người

<400> 85
Asp Ser Pro Glu Ile Cys His Tyr Glu Lys
1 5 10

<210> 86
<211> 13
<212> PRT
<213> Người

<400> 86
Gly Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu
1 5 10

<210> 87
<211> 12
<212> PRT
<213> Người

<400> 87
Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu
1 5 10

<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> Người

<400> 88
Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu Arg
1 5 10

<210> 89
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 89
 Ala Gly Ser Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser
 1 5 10 15

Ala Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Ala Ser
 20 25

<210> 90
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Người

<400> 90
 Ala Gly Ser Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser
 1 5 10 15

Ala Thr Ser Gly Ser His Ala Pro Pro Ala Ser
 20 25

<210> 91
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 91
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Arg Asp Asp Gly Ala Gly Val Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 92
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 92
Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 93
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 93
Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 94
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 94
Asp Asp Gly Ala Gly Val Phe Asp Leu
1 5

<210> 95
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 95

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

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

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

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

<210> 96

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 96

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 97

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 97

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 98

Gln Gln Ser Gly Asn Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 99

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 99

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Lys Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Leu Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Arg Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Phe Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Glu Asp Met Asn Thr Val Leu Ala Thr Ser Trp Phe Asp Pro
100 105 110

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

<210> 100

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 100

Asp Tyr Tyr Ile Gln

1

5

<210> 101

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 101

Trp	Ile	Asn	Pro	Lys	Thr	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Leu	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 102

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 102

Glu	Asp	Met	Asn	Thr	Val	Leu	Ala	Thr	Ser	Trp	Phe	Asp	Pro
1			5						10				

<210> 103

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 103

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

Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asn	Gln	Leu	Gly	His	Lys	Phe	Ala
			20					25					30		

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

Glu	Asp	Lys	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 Val Trp Asp Val Ile Thr Asp His
 85 90 95

Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 104

Ser Gly Asn Gln Leu Gly His Lys Phe Ala Ser
 1 5 10

<210> 105

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 105

Glu Asp Lys Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 106

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 106

Gln Val Trp Asp Val Ile Thr Asp His Tyr Val
 1 5 10

<210> 107

<211> 121

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 107

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

26217

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala 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 Trp Ala Tyr Cys Gly Gly Asp Cys Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 108

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 108

Asn Ser Ala Ile His

1 5

<210> 109

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 109

Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 110
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 110
 Ala Tyr Cys Gly Gly Asp Cys Tyr Ser Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 111
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 111
 Asp Ile Gln Val Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala 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 Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Leu Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 112
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 112

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 113

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 113

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 114

Gln Gln Tyr Asp Ser Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 115

<211> 126

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 115

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

Ser Leu Arg Leu Thr Cys Glu Gly Ser Gly Phe Asn Phe Phe Thr Gln
20 25 30

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

Ala Ser Ile Ser Ser Asp Ser Asn Tyr Ile Tyr His Ala Asp Ser Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asp Ser Val Phe
65 70 75 80

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

85

90

95

Ala Arg Asp Ile Leu Leu Glu Pro Leu Ala Pro His Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110

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

<210> 116

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 116

Thr Gln Thr Ile His
 1 5

<210> 117

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 117

Ser Ile Ser Ser Asp Ser Asn Tyr Ile Tyr His Ala Asp Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 118

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 118

Asp Ile Leu Leu Glu Pro Leu Ala Pro His Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp
 1 5 10 15

Val

<210> 119

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 119

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Glu Ile Gly Val Pro Ser Arg Ile 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 Asn Phe Pro Leu
85 90 95

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

<210> 120

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 120

Arg Ala Ser Gln Pro Ile Ser Thr Tyr Val Asn
1 5 10

<210> 121

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 121

Asp Ala Ser Thr Leu Glu Ile
1 5

<210> 122
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 122
 Gln Gln Tyr Asp Asn Phe Pro Leu Thr
 1 5

<210> 123
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 123
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Phe His Thr Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg
 50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 124
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 124

Gly Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 125

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 125

Glu Ile Phe His Thr Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 126

Asp Ser Ala Phe Gly Ser Phe Asp Tyr

1 5

<210> 127

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 127

Asp Ile Arg Val 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 Asn Glu Asp Ile Ser Ile Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg 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 Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

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

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

<210> 128

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 128

Gln Ala Asn Glu Asp Ile Ser Ile Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 129

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 129

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 130

Gln Gln Tyr His Thr Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 131

<211> 120

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 131

26217

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 132

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 132

Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 133

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 133

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

<210> 134

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 134

Ala Leu Asp Phe Trp Ser Gly Gln Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 135

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 135

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr 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 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 Ala Ser Thr 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 Gly Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

<210> 136

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 136

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asp Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 137

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 137

Asp Ala Ser Thr Leu Glu Ser

1 5

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 138

Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Pro Thr

1 5

<210> 139

<211> 81

<212> PRT

<213> Người

<400> 139

Pro Cys Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser

1 5 10 15

Gly Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys Ala Ala

20 25 30

Leu Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg

35 40 45

Gly Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met

50 55 60

Ser Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Leu

65 70 75 80

Arg

<210> 140

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 140

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 141

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 141

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85

90

95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 142

<211> 330

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 142

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

26217

195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 143
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp
 <400> 143
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305

310

315

320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 144

<211> 215

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 144

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

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

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

Met Leu Tyr Asp Val Thr Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

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

Asp Thr Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro
 100 105 110

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
 115 120 125

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
 130 135 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
 145 150 155 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
 165 170 175

26217

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
180 185 190

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
195 200 205

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 145

<211> 450

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 145

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Met
35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala 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 Val Gly Ser Gly Pro Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

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

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

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

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

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

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

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

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His
 420 425 430

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

Gly Lys
 450

<210> 146

<211> 215

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 146

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

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

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

Met Leu Tyr Asp Val Thr Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

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

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

Asp Thr Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro
 100 105 110

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
 115 120 125

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
 130 135 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
 145 150 155 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
 165 170 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
 180 185 190

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 195 200 205

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 147

<211> 450

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 147

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Met
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala 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 Val Gly Ser Gly Pro Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

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

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

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His
 420 425 430

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

Gly Lys
 450

<210> 148

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Đuôi 6xHis tổng hợp

<400> 148

His His His His His His

1

5

<210> 149

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 149

Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

<210> 150

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 150

Ala Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

<210> 151

<211> 115

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 151

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 Asn Tyr

20

25

30

Gly Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His 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 Gly Thr Thr Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr

100

105

110

Val Ser Ser

115

<210> 152

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp

<400> 152

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

1

5

10

15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser

20

25

30

65

Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
 85 90 95

Thr His Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 153

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 153

Asn Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 154

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 154

Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 155

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 155

Gly Thr Thr Pro Asp Tyr

1

5

<210> 156

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 156

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Tyr Ser Asp Gly Tyr Thr Phe Leu Glu

1

5

10

15

<210> 157

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 157

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser

1

5

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 158

Phe Gln Ala Thr His Asp Pro Leu Thr

1

5