



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

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

(11)



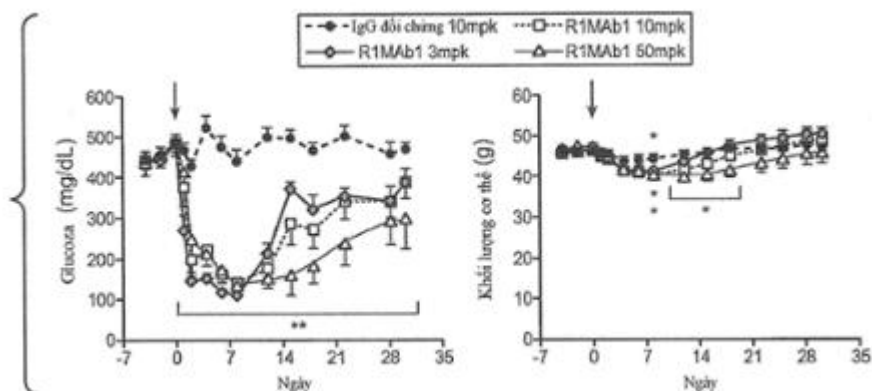
1-0027381

(51)⁷ C07K 16/28; A61K 39/395; A61P 3/10 (13) B

- (21) 1-2013-03546 (22) 15/05/2012
(86) PCT/US2012/037964 15/05/2012 (87) WO 2012/158704 22/11/2012
(30) 61/486,731 16/05/2011 US; 61/536,936 20/09/2011 US
(45) 25/02/2021 395 (43) 26/05/2014 314A
(73) GENENTECH, INC. (US)
1 DNA Way, South San Francisco, California 94080, United States of America
(72) SONODA, Junichiro (JP); WU, Yan (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ CHẤT CHỦ VẬN KHÁNG THỤ THỂ YẾU TỔ TĂNG TRƯỞNG NGUYÊN BÀO SỢI-1 (FGFR1), PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể chất chủ vận kháng thụ thể yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi-1 (FGFR1). Ngoài ra sáng chế còn đề cập đến axit nucleic, tế bào chủ chứa axit nucleic này và phương pháp sản xuất kháng thể và dược phẩm chứa kháng thể này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất chủ vận FGFR1 và các phương pháp sử dụng chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc không kiểm soát được hàm lượng glucoza trong máu là cơ sở của nhiều tình trạng bệnh chuyển hóa. Tiểu đường là hội chứng tăng đường huyết gặp phải do khiếm khuyết trong việc tiết insulin trong đáp ứng với glucoza (tiểu đường typ 1 và typ 2) và hiệu quả của insulin bị giảm trong việc kích thích hấp thu glucoza cơ xương và trong việc cản trở sản xuất glucoza ở gan (tiểu đường typ 2). Tiểu đường là bệnh rất phổ biến và, mặc dù các lựa chọn trị liệu đều đã có đối với một số bệnh tiểu đường, nhưng vẫn có nhu cầu cấp thiết về các liệu pháp bổ sung.

Yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 21 (fibroblast growth factor 21 - FGF21) là một thành viên của họ phụ FGF nội tiết, bao gồm FGF19 và FGF23, và nó được xác định là chất thay đổi bệnh tiềm năng để đảo ngược chứng béo phì và bệnh gan nhiễm mỡ gây ra chứng béo phì và chứng tăng đường huyết (xem, ví dụ, Kharitonnikov and Larsen, *Trends Endocrinol. Metab.* 22(3):81-6 (2011); Kharitonnikov et al., *J. Clin. Invest.* 115: 1627-35 (2005); WO 2010/042747). Protein FGF21 nội tiết liên kết với ba thụ thể FGF (FGFR 1-3), và cải thiện tính kháng insulin và các bệnh tiểu đường typ 2 bởi các thụ thể này cùng với đồng thụ thể liên kết màng beta-Klotho của chúng. Tuy nhiên, sự phát triển của nó bị cản trở bởi đặc tính dược động học kém và cơ chế tác dụng sinh học chưa được hiểu rõ. Các kháng thể đối kháng kháng FGFR1 cũng được đề xuất để điều trị bệnh tiểu đường (WO 2005/037235). Tuy nhiên, sự giống nhau của cả ba FGFR điều tiết hoạt tính chuyển hóa có lợi của FGF21 chưa được phát hiện.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế một phần dựa trên sự phát hiện ra rằng sự hoạt hóa FGFR1 giúp làm cải thiện bệnh tiểu đường. Sáng chế đề xuất chất chủ vận FGFR1, bao gồm các kháng thể chủ vận kháng FGFR1 và phương pháp sử dụng chất này.

Theo một khía cạnh, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh chuyển hóa ở một cá thể, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho cá thể sử dụng lượng hữu hiệu chất chủ vận kháng thụ thể yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi-1 (FGFR1), trong đó bệnh chuyển hóa được chọn từ nhóm gồm: hội chứng đa nang buồng trứng (PCOS), hội chứng chuyển hóa (MetS), chứng béo phì, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH), bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD), tăng lipit huyết, cao huyết áp, tiểu đường typ 2, tiểu đường không thuộc typ 2, tiểu đường typ 1, tiểu đường tự miễn tiềm ẩn (LAD), và bệnh tiểu đường khởi phát sớm của người trẻ (MODY). Theo một số phương án, chất chủ vận FGFR1 không hoạt hóa FGFR2 hoặc FGFR3. Theo một số phương án, chất chủ vận FGFR1 là kháng thể kháng FGFR1. Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR1 có hai vị trí liên kết FGFR1, ví dụ kháng thể nguyên chiều dài hoặc đoạn F(ab')₂. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết với peptit #26 KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 28) hoặc peptit #28 FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 29). Theo một số phương án, kháng thể này liên kết với cả peptit #26 và peptit #28. Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR1 liên kết với cả FGFR1b và FGFR1c. Theo một số phương án, kháng thể này là kháng thể đặc hiệu kép. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép còn liên kết với beta-Klotho.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà liên kết với FGFR1, trong đó kháng thể này là chất chủ vận có hoạt tính FGFR1. Theo một số phương án, kháng thể này không phải là chất chủ vận của FGFR2 hoặc FGFR3. Theo một số phương án, kháng thể này là kháng thể đơn dòng. Theo một số phương án, kháng thể này là kháng thể của người, kháng thể được làm tương thích với người, hoặc kháng thể thể khảm. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SSGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 16), SGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 17), EHFDWVHYVMDY (SEQ ID NO: 18), GTDVMMDY (SEQ ID NO: 19), và GTDVMMDY (SEQ ID NO: 20), (b) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin QQSYTTPPT (SEQ ID NO: 23), và (c) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm X₁X₂IX₃PX₄DGX₅TX₆YADSVKG, trong đó X₁ là A hoặc G, X₂ là D hoặc E, X₃ là D hoặc Y, X₄ là N hoặc Y, X₅ là A hoặc D, và X₆ là D hoặc Y (SEQ ID NO: 24) và X₁IX₂PX₃DGX₄TX₅YADSVKG, trong đó X₁ là D hoặc E, X₂ là D hoặc Y, X₃ là N hoặc Y, X₄ là A hoặc D, và X₅ là D hoặc Y (SEQ

ID NO: 25). Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin GFTFX₁X₂X₃X₄IX₅, trong đó X₁ là S hoặc T, X₂ là N hoặc S, X₃ là N hoặc T, X₄ là W hoặc Y, X₅ là H hoặc S (SEQ ID NO: 26), (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm X₁X₂IX₃PX₄DGX₅TX₆YADSVKG, trong đó X₁ là A hoặc G, X₂ là D hoặc E, X₃ là D hoặc Y, X₄ là N hoặc Y, X₅ là A hoặc D, và X₆ là D hoặc Y (SEQ ID NO: 24) và X₁IX₂PX₃DGX₄TX₅YADSVKG, trong đó X₁ là D hoặc E, X₂ là D hoặc Y, X₃ là N hoặc Y, X₄ là A hoặc D, và X₅ là D hoặc Y (SEQ ID NO: 25), và (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SSGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 16), SGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 17), EHFDAWVHYYVMDY (SEQ ID NO: 18), TGTDVMDY (SEQ ID NO: 19), và GTDVMDY (SEQ ID NO: 20). Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin GFTFTSTWIS (SEQ ID NO: 7), (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm GEIDPYDGDITYYADSVKG (SEQ ID NO: 10) và EIDPYDGDITYYADSVKG (SEQ ID NO: 11), và (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SSGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 16) và SGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 17). Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin GFTFSNNYIH (SEQ ID NO: 8), (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm ADIYPNDGDDTYADSVKG (SEQ ID NO: 12) và DIYPNDGDDTYADSVKG (SEQ ID NO: 13), và (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin EHFDAWVHYYVMDY (SEQ ID NO: 18). Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin GFTFTSNWIS (SEQ ID NO: 9), (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm AEIDPYDGATDYADSVKG (SEQ ID NO: 14) và EIDPYDGATDYADSVKG (SEQ ID NO: 15), và (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm TGTDVMDY (SEQ ID NO: 19) và GTDVMDY (SEQ ID NO: 20). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm (a) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 21); (b) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin SASFLYS (SEQ ID NO: 22); và (c) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin QQSYTTPPT (SEQ ID NO: 23). Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm trình tự VH được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 2, 3 và 4. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm trình tự VL của SEQ ID NO: 6.

Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR1 có hai vị trí liên kết FGFR1, ví dụ kháng thể nguyên chiều dài hoặc đoạn F(ab')₂. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể đa đặc hiệu. Theo một số phương án, kháng thể này còn liên kết với beta-Klotho. Theo một số phương án, kháng thể này là kháng thể IgG1. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể theo sáng chế. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic theo điểm 21. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 22 sao cho kháng thể này được tạo ra. Theo một số phương án, phương pháp này còn gồm bước thu hồi kháng thể này từ tế bào chủ này.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể theo sáng chế và chất mang được dùng.

Theo một số phương án, sáng chế mô tả kháng thể theo sáng chế để dùng làm thuốc chữa bệnh. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế để sử dụng trong điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh chuyển hóa được chọn từ nhóm bao gồm: hội chứng đa nang buồng trứng (PCOS), hội chứng chuyển hóa (MetS), chứng béo phì, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH), bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD), tăng lipit huyết, cao huyết áp, tiểu đường typ 2, tiểu đường không thuộc typ 2, tiểu đường typ 1, tiểu đường tự miễn tiềm ẩn (LAD), và bệnh tiểu đường khởi phát sớm của người trẻ (MODY). Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế này để sử dụng trong việc làm cho cá thể nhạy với insulin.

Theo một số phương án, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể theo sáng chế trong việc sản xuất thuốc. Theo một số phương án, thuốc chữa bệnh này là để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh chuyển hóa được chọn từ nhóm gồm: hội chứng đa nang buồng trứng (PCOS), hội chứng chuyển hóa (MetS), chứng béo phì, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH), bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD), tăng lipit huyết, cao huyết áp, tiểu đường typ 2, không thuộc tiểu đường typ 2, tiểu đường typ 1, tiểu đường tự miễn tiềm ẩn (LAD), và bệnh tiểu đường khởi phát sớm của người trẻ (MODY). Theo một số phương án, thuốc chữa bệnh này là để làm cho cá thể nhạy với insulin.

Theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị tiểu đường ở một cá thể, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho cá thể sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể theo sáng chế. Theo một số phương án, phương pháp này còn gồm việc cho cá thể sử dụng chất khác để điều trị tiểu đường với điều kiện là chất khác này không phải insulin. Theo một số phương án, phương pháp này còn gồm việc cho cá thể sử dụng một chất để điều trị bệnh tim mạch.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1A thể hiện phân tích ELISA đo sự liên kết của các kháng thể kháng FGFR1 với đoạn FGFR ECD tinh khiết.

Fig. 1B thể hiện các hằng số liên kết cộng hưởng từ bề mặt đối với R1MAb1 và R1MAb2.

Fig. 1C thể hiện thử nghiệm GAL-Elk1 luxiferaza trong các tế bào L6 ở chuột. Các tế bào được đồng biến nạp với vector biểu hiện đối với isoform FGFR được chỉ định cùng với GAL-Elk1, SV40-renilla Luxiferaza, và gen chỉ thị luxiferaza ở đom đóm đáp ứng Gal. Tế bào đã được biến nạp được nuôi trong môi trường chứa các nồng độ tăng dần của R1Mab hoặc axit FGF (aFGF: đối chứng dương) trong 6 giờ trước thử nghiệm luxiferaza. Sự hoạt hóa quá trình phiên mã được đánh giá bằng hoạt tính luxiferaza ở đom đóm tương đối được chuẩn hóa bằng hoạt tính luxiferaza renilla và được biểu diễn theo đơn vị luxiferaza tương đối (RLU).

Fig. 1D thể hiện thử nghiệm giống với 1C trừ việc tế bào L6 biểu hiện cả FGFR1c và KLB.

Fig. 1E thể hiện thử nghiệm giống với 1C trừ việc tế bào HEK293 được sử dụng.

Fig. 1F thể hiện phân tích thẩm tách Western của các tế bào tạo mỡ 3T3-L1 được xử lý bằng protein chỉ định ở nồng độ 0,5µg/ml cho mỗi lần quy định.

Fig. 1G thể hiện WAT được thu hoạch từ các con chuột gây C57BL/6 ở thời điểm chỉ định sau khi tiêm màng bụng ở 1mpk R1Mab (+) hoặc đối chứng IgG (-), và được đưa đi phân tích thẩm tách Western.

Fig. 2A thể hiện glucoza trong máu (bên trái) và khối lượng cơ thể (bên phải) của chuột db/db sau khi tiêm màng bụng một lần (mũi tên) R1Mab1 hoặc đối chứng IgG ở liều lượng quy định. Mức ý nghĩa được quan sát với glucoza (với đối chứng IgG) trong

khoảng từ ngày 1 đến ngày 30 cho tất cả các nhóm và với khối lượng (với đối chứng IgG) vào ngày 8 cho tất cả các nhóm, và trong khoảng từ ngày 12 đến ngày 18 với nhóm 50mpk. $N=6\sim14$, $*p<0,05$, $**p<0,01$.

Fig. 2B thể hiện glucoza trong máu chuột được cho ăn ngẫu nhiên và chuột để nhịn đói qua đêm (phía trên) và hàm lượng insulin huyết thanh sau khi để nhịn đói qua đêm, và 30 phút sau khi tiêm 1g/kg glucoza vào màng bụng (phía dưới). $N=6\sim14$, $*p<0,05$, $**p<0,01$.

Fig. 2C thể hiện glucoza máu (bên trái) và khối lượng cơ thể (bên phải) của chuột Ins2Akita sau khi tiêm màng bụng một lần R1Mab1 hoặc đối chứng IgG ở liều 3mpk. $N=10$. $*p<0,01$.

Fig. 2D thể hiện sự hấp thu thức ăn (bên trái), glucoza máu (ở giữa), và khối lượng cơ thể (bên phải) của chuột db/db sau khi tiêm màng bụng một lần R1Mab1 hoặc đối chứng IgG ở liều lượng 1mpk. PF: cho ăn theo cặp với nhóm được xử lý R1MAb. $N=7$. $\#p<0,001$ (với IgG), $*p<0,001$ (với PF-IgG).

Fig. 2E thể hiện sự định lượng vùng dương tính insulin trong các vùng tụy được cố định. Mô được gom lại vào ngày thứ 7 sau khi tiêm màng bụng một lần 3mpk (bên trái) hoặc 1mpk (bên phải) R1Mab1 và được nhuộm cho insulin và glucagon. $N=4\sim7$. $**p<0,002$. $***p<0,001$.

Fig. 3A thể hiện sự hoạt hóa quá trình dẫn truyền tín hiệu MAPK trong mô của chuột. Mô được chỉ định được thu hoạch ở 15 phút (25 μ g/chuột FGF21: phía trên) hoặc 1 giờ (1mpk R1Mab1: phía dưới) sau khi tiêm màng bụng cho các con chuột gây C57BL/6 và được đưa đi phân tích thẩm tách Western. PBS (phía trên) và đối chứng IgG (phía dưới) được sử dụng làm đối chứng âm.

Fig. 3B-D thể hiện phương pháp nhuộm H&E ở gan (B), lipid trong gan (C), và lipid trong huyết thanh (D). Mẫu này được gom lại vào ngày thứ 7 sau khi tiêm màng bụng một lần 1mpk R1Mab1. Các con chuột đối chứng được cho ăn theo cặp để chuẩn hóa khối lượng cơ thể. $N=7$, $*p<0,05$, $**p<0,001$.

Fig. 3E thể hiện thông số chuyển hóa của các con chuột ob/ob hoặc chuột ap2-SREBP1c (srebp) chuyển gen được tiêm 1mpk Ab. Nhóm đối chứng được cho ăn theo cặp để chuẩn hóa khối lượng cơ thể (Fig. S7). Glucoza và Insulin để tính toán HOMA-

IR được đo vào ngày thứ 3 sau 3 giờ để nhịn đói. GTT được thực hiện bằng việc tiêm 1g/kg glucoza vào màng bụng vào ngày thứ 4 sau khi để nhịn đói qua đêm. Khối lượng mô được đo vào ngày thứ 5. $N=7$, $*p<0,05$, $***p<0,01$.

Fig. 3F thể hiện thông số chuyển hóa của các con chuột ap2-SREBP được cấy dưới da cùng với bơm thẩm thấu để ngấm FGF21 (12ng/ngày). ITT với tiêm màng bụng 1U/kg insulin được thực hiện vào ngày 4. Huyết thanh được gom lại vào ngày 6. $N=6\sim 8$.

Fig. 4A thể hiện sự biểu hiện mARN (đỏ: mức biểu hiện cao và xanh da trời: mức biểu hiện thấp) trong BAT đối với các gen thuộc con đường KEGG được chỉ định. Mẫu này được gom lại vào ngày thứ 4 sau khi tiêm màng bụng một lần 1mpk R1MAb1 hoặc các con chuột được cho ăn theo cặp được tiêm đối chứng IgG.

Fig. 4B thể hiện sự biểu hiện mARN trong BAT bằng qPCR. $N=6$, $*p<0,05$, $**p<0,001$.

Fig. 4C thể hiện thử nghiệm luxiferaza trong tế bào HEK293. Đồ thị thể hiện rằng cả FGF21 và R1MAb1 đều kích thích sự phiên mã gen chỉ thị luxiferaza được điều khiển bởi UAS trong tế bào HEK293 qua CREB được dung hợp với miền liên kết ADN GAL4 (GAL-CREB) (hai bảng bên trái), hoặc gen chỉ thị luxiferaza được điều khiển bởi CRE (hai bảng bên phải), theo cách phụ thuộc liều lượng. Một số tế bào còn được đồng biến nạp để biểu hiện FGFR1c và KLB (màu đỏ; đường cong phía trên đỉnh trên các đồ thị). Kết quả là giá trị trung bình của cả ba lần thử nghiệm lặp lại cho hoạt tính luxiferaza được chuẩn hóa bởi hoạt tính renilla.

Fig. 4D thể hiện WAT được thu hoạch 15 phút sau khi tiêm trong tĩnh mạch với 25 μ g FGF21 (+) hoặc PBS (-), và được đưa đi phân tích thẩm tách Western.

Fig. 4E thể hiện phân tích thẩm tách Western tế bào tạo mỡ nguyên sinh được biệt hóa của người được xử lý bằng FGF21 ở 1 μ g/ml trong 30 phút.

Fig. 4F thể hiện kiểu con đường dẫn truyền tín hiệu qua đó FGF21 và R1MAb hoạt hóa chương trình PGC-1alpha trong mô mỡ.

Fig. 5 thể hiện hoạt tính chủ vận không phụ thuộc heparin và phụ thuộc FGFR1 của R1MAb1. Thử nghiệm luxiferaza GAL-Elk1 trong tế bào HEK293. Tế bào được đồng biến nạp với hoặc không với vector biểu hiện FGFR1c như được chỉ định, cùng

với GAL-Elk1, SV40-renilla Luxiferaza, và gen chỉ thị luciferaza ở đom đóm đáp ứng Gal. Tế bào được biến nạp được nuôi trong môi trường chứa các nồng độ tăng dần của R1Mab1 có bổ sung hoặc không bổ sung 25 mg/L heparin ở lợn nhu được chỉ định trong 6 giờ trước khi thử nghiệm luxiferaza. Sự hoạt hóa phiên mã được đánh giá bằng hoạt tính luciferaza ở đom đóm tương đối được chuẩn hóa bởi hoạt tính luxiferaza renilla và được biểu diễn theo đơn vị luxiferaza tương đối (RLU).

Fig. 6A thể hiện sự hấp thụ thức ăn (bên trái), khối lượng cơ thể (ở giữa), và glucoza máu (bên phải) của các con chuột db/db sau khi tiêm màng bụng một lần R1Mab2 hoặc đối chứng IgG ở liều lượng 3mpk vào ngày 0. Các con chuột đối chứng được cho ăn theo cặp (PF) để điều chỉnh sự hấp thụ thức ăn cho đến ngày 11. Vào ngày thứ 11, sự hấp thụ thức ăn của các con chuột được xử lý R1Mab2 quay trở lại bình thường, và do đó tất cả các con chuột được cho ăn thoải mái sau ngày 11 (AL). N=7~12. $p<0,001$.

Fig. 6B thể hiện hàm lượng glucoza trong máu của các con chuột được cho ăn ngẫu nhiên sử dụng trong Fig.2A vào ngày 26.

Fig. 6C thể hiện GTT được thực hiện sử dụng cùng các con chuột vào ngày 28.

Fig. 6D thể hiện ITT được thực hiện sử dụng cùng các con chuột vào ngày 37.

Fig. 7A thể hiện glucoza máu (bên trái) và khối lượng cơ thể (bên phải) của các con chuột ob/ob sau khi tiêm màng bụng một lần R1Mab1 hoặc đối chứng IgG ở liều lượng 1mpk vào ngày 0. Các con chuột đối chứng được cho ăn theo cặp (PF) đối với nhóm được xử lý R1Mab. N=7. $*p<0,05$ (với PF-IgG).

Fig. 7B thể hiện glucoza máu (bên trái) và khối lượng cơ thể (bên phải) của các con chuột C57BL/6 được cho ăn HFD sau khi tiêm màng bụng một lần R1Mab1 hoặc đối chứng IgG ở liều lượng 1mpk vào ngày 0. N=7~9. $*p<0,05$.

Fig. 7C thể hiện GTT được thực hiện ở các con chuột cho ăn theo chế độ HFD được sử dụng trong S3B vào ngày 8 sau khi tiêm Ab. Các con chuột được tiêm vào màng bụng 1g/kg glucoza sau khi để nhịn đói qua đêm. Khối lượng cơ thể trung bình là $28,6 \pm 0,6$ (R1Mab1) và $32,1 \pm 0,8$ (đối chứng IgG) ($p<0,01$). N=7.

Fig. 7D thể hiện glucoza trong máu (bên trái) và khối lượng cơ thể (bên phải) của các con chuột Ins2Akita vào ngày 5 sau khi tiêm màng bụng một lần R1Mab1 hoặc đối

chứng IgG ở nồng độ 1mpk. Các con chuột đối chứng được cho ăn theo cặp (PF-IgG) để chuẩn hóa khối lượng cơ thể. * $p < 0,05$.

Fig. 8A thể hiện sự nhuộm màu tiêu biểu của đảo tụy ở các con chuột db/db được phân tích trên Fig. 4E. Đỏ: Insulin, Màu xanh lá cây: Glucagon, Xanh da trời: Nuclei. Lưu ý rằng R1MAb không ảnh hưởng đến toàn bộ hình thái học của đảo.

Fig. 8B thể hiện sự phân bố vùng dương tính với insulin (%) ở mỗi đảo trong mỗi con vật.

Fig. 9A thể hiện mô tả dạng giản đồ của IgG và IgG một nhánh (OA). Xanh da trời: Chuỗi nặng, Màu xanh lá cây: Chuỗi nhẹ. Dấu hoa thị màu đỏ chỉ vị trí áng chừng của các gốc được gây đột biến trong thể đột biến DANA.

Fig. 9B thể hiện thử nghiệm luxiferaza dựa trên GAL-Elk trong tế bào HEK293 biểu hiện FGFR1c để so sánh R1MAb2 và thể đột biến ADN của R1MAb2 (R1MAb2 DANA).

Fig. 9C thể hiện glucoza trong máu của các con chuột db/db trước và vào ngày 7 sau khi tiêm màng bụng Ab xác định ở liều 1mpk. Các con chuột đối chứng được cho ăn theo cặp để chuẩn hóa khối lượng cơ thể.

Fig. 9D thể hiện ELISA xác định liên kết kháng thể với đoạn FGFR ECD tinh sạch. OA-R1MAb1: bản OA của R1MAb1.

Fig. 9E thể hiện thử nghiệm luxiferaza dựa trên GAL-Elk giống với S5B.

Fig. 9F thể hiện phân tích thẩm tách Western của tế bào tạo mỡ 3T3-L1 được xử lý bằng protein chỉ định ở 0,5 μ g/ml trong thời gian xác định.

Fig. 9G thể hiện glucoza trong máu (bên trái) và khối lượng cơ thể (bên phải) của các con chuột db/db sau khi tiêm màng bụng một lần Ab xác định vào ngày 0 (mũi tên). N=7. * $p < 0,05$ (đối chứng IgG với 3mpk R1MAb1), ** $p < 0,0005$ (đối chứng IgG với 3mpk R1MAb1 và đối chứng IgG với 1mpk R1MAb1).

Fig. 9H thể hiện lipit gan và lipit trong huyết thanh từ mẫu được gom lại vào ngày 7 sau khi tiêm Ab. N=7. * $p < 0,05$, ** $p < 0,0005$ (với đối chứng IgG).

Fig. 10 thể hiện sự biểu hiện mRNA của isoform KLB và FGFR trong gan và WAT. Các con chuột C57BL/6 được cho ăn thức ăn và ăn theo chế độ HFD là chuột

25 tuần tuổi. Các con chuột ăn theo chế độ HFD được ăn HFD trong 21 tuần. * $p < 0,05$ hoặc ** $p < 0,001$. N=6.

Fig. 11 thể hiện yêu cầu đối với chức năng mỡ bình thường cho hoạt tính của FGF21 và R1MAb. Sự hấp thụ thức ăn (bên trái), glucoza máu (ở giữa), và khối lượng cơ thể (bên phải) của các con chuột chuyển gen ob/ob hoặc ap2-srebp1c sau khi tiêm màng bụng một lần R1Mab1 hoặc đối chứng IgG ở liều lượng 1mpk vào ngày 0. Các con chuột giống nhau được mô tả trên Fig. 3E. N=7. # $p < 0,001$ (với IgG), * $p < 0,001$ (với PF-IgG). Việc đo sau khi điều trị thực hiện vào thời điểm 1 ngày sau khi tiêm.

Fig. 12A thể hiện thử nghiệm luxiferaza dựa trên tế bào ở HEK293. Các tế bào được đồng biến nạp với vector biểu hiện đối với protein dung hợp GAL xác định, SV40-renilla Luxiferaza, và gen chỉ thị luxiferaza đáp ứng GAL. Một số tế bào cũng được đồng biến nạp với vector biểu hiện đối với KLB như được chỉ định. Tế bào đã được biến nạp được nuôi với môi trường chứa môi trường có điều kiện từ tế bào HEK293 được biến nạp với vector biểu hiện đối với FGF21 hoặc vector trống đối chứng như được chỉ định. Sau 6 giờ nuôi, tế bào được đưa qua thử nghiệm luxiferaza. Sự hoạt hóa phiên mã được đánh giá bởi hoạt tính luxiferaza ở đom đóm tương đối được chuẩn hóa bằng hoạt tính luxiferaza renilla và được biểu diễn dưới dạng cường độ cảm ứng (lần).

Fig. 12B thể hiện thử nghiệm luxiferaza tương tự trong đó một số tế bào được đồng xử lý bằng phối tử thụ thể hạt nhân sau đây: 1MM Wy14643 (PPAR α), 5nM GW101516 (PPAR α), 50nM rosiglitazone (PPAR γ), 50nM T0901317 (LXR α), 5nM T3 (TR β), 30MM CDCA (FXR). Lưu ý rằng FGF21 không ảnh hưởng đến hoạt tính của thụ thể hạt nhân được thử nghiệm có hoặc không có xử lý phối tử cùng nguồn gốc.

Fig. 12C thể hiện phân tích thẩm tách Western tế bào HEK293 được xử lý bằng FGF21 ở 0,5 μ g/ml trong 10 phút. Một số tế bào được xử lý sơ bộ bằng chất ức chế đối với FGFR (100nM PD173074), mTOR (100nM rapamycin) MEK1/2 (10 μ M U0126), PI3K (1 μ M wortmannin) như được chỉ định.

Fig. 12D thể hiện gen cùng hướng liên quan đến cơ chế chuyển hóa oxy hóa trong mô mỡ.

Fig. 13 thể hiện glucoza trong máu (phía trên) và khối lượng cơ thể (phía dưới) của các con chuột db/db sau khi tiêm màng bụng một lần R1MAb2 (được đánh dấu là

182.2), R1MAb3 (được đánh dấu là 182.5) hoặc đối chứng IgG (kháng-Her2) ở liều lượng quy định. N=6, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$. R1MAb3 chứa VH có chứa SEQ ID NO: 6 và VH có chứa SEQ ID NO: 4.

Fig. 14A thể hiện sự hấp thụ tích lũy thức ăn, glucoza trong máu, và thay đổi khối lượng cơ thể của các con chuột gầy C57BL/6 sau khi tiêm màng bụng một lần R1MAb1 hoặc đối chứng IgG ở liều 0,5 mpk. Các con chuột còn được cấy dưới da với bơm thẩm thấu mini vào ngày 0 để truyền liên tục (c.i.) FGF21 tái tổ hợp ở liều 1,2 mpk/ngày hoặc tá dược đối chứng (PBS). Vào ngày 3, các con chuột được cho nhịn đói qua đêm để thực hiện thử nghiệm dung nạp glucoza (glucose tolerance test - GTT) vào ngày 4 (mũi tên).

Fig. 14B thể hiện thử nghiệm dung nạp glucoza được thực hiện với 2 g/kg glucoza được tiêm vào màng bụng vào ngày 4 sau khi nhịn đói qua đêm.

Fig. 14C là phân tích huyết thanh của các con chuột được thể hiện trên Fig. 2C, S10A và S10B. Các mẫu huyết thanh được gom lại vào ngày thứ 5 sau khi nhịn đói 4 giờ. Các số liệu là giá trị trung bình $\pm$ SEM với n=6 con chuột một nhóm; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ với PBS (c.i.) + đối chứng IgG, bởi thử nghiệm t-student không bắt cặp hai phía (n.s. = không đáng kể).

Fig. 15 thể hiện phân tích biểu hiện gen sử dụng mARN được phân lập từ mô gan của các con chuột được sử dụng trên Fig. 2C và S10. Các mẫu mô được phân lập vào ngày thứ 5 sau khi nhịn đói 4 giờ. Các số liệu là giá trị trung bình $\pm$ SEM với n=6 con chuột một nhóm; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ với PBS (c.i.) + đối chứng IgG, bởi thử nghiệm t-student không bắt cặp hai phía (n.s. = không đáng kể).

Fig. 16 thể hiện phân tích biểu hiện gen sử dụng mARN được phân lập từ mô mỡ nâu của các con chuột được sử dụng trên Fig. 2C, S10 và S11. Các mẫu mô được phân lập vào ngày thứ 5 sau khi nhịn đói 4 giờ. Các số liệu là giá trị trung bình $\pm$ SEM với n=6 con chuột một nhóm; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ so với PBS (c.i.) + đối chứng IgG, bởi thử nghiệm t-student không bắt cặp hai phía (n.s. = không đáng kể).

Fig. 17A thể hiện kết quả ELISA xác định kháng thể liên kết với đoạn peptit được biotinyl hóa.

Fig. 17B thể hiện trình tự axit amin của FGFR1 (axit amin 161-212; SEQ ID NO: 27), trình tự axit amin của peptit #26 (SEQ ID NO: 28) và peptit #28 (SEQ ID NO: 29) cùng với axit amin tương ứng với peptit #26 từ FGFR2 (SEQ ID NO: 30), FGFR3 (SEQ ID NO: 31) và FGFR4 (SEQ ID NO: 32) và axit amin tương ứng với peptit #28 từ FGFR2 (SEQ ID NO: 33), FGFR3 (SEQ ID NO: 34) và FGFR4 (SEQ ID NO: 35). Sự khác biệt giữa trình tự peptit #26 và peptit #28 trong FGFR1 và vùng tương ứng của FGFR2-4 được đóng khung.

Fig. 17C thể hiện kết quả ELISA xác định FGFR1 được gắn His liên kết với protein FGF2 khi có mặt các nồng độ khác nhau của R1MAb1 hoặc đối chứng IgG. Các số liệu được biểu diễn dưới dạng % FGFR1-His liên kết và là giá trị trung bình $\pm$ SEM (n=3).

Fig. 17D thể hiện liên kết của FGF21 iôt hóa với tế bào HEK293 biểu hiện ổn định cả KLB và FGFR1c khi có mặt các nồng độ khác nhau của R1MAb1 không được đánh dấu hoặc FGF21 (phản ứng còn chứa BSA (10 mg/ml) và đối chứng IgG (350 mM) để chặn liên kết không đặc hiệu. Các số liệu được biểu diễn dưới dạng % FGF21 liên kết của tổng FGF21 được đánh dấu phóng xạ trong phản ứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

“Khung thể nhận của người” cho mục đích của sáng chế là khung chứa trình tự axit amin của khung miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) hoặc khung miền biến đổi chuỗi nặng (VH) thu được từ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người, như được xác định dưới đây. Khung thể nhận của người “thu được từ” khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người có thể chứa trình tự axit amin tương tự của nó, hoặc nó có thể chứa các thay đổi trình tự axit amin. Theo một số phương án, số các thay đổi axit amin là 10 hoặc ít hơn, 9 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 7 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 5 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, 3 hoặc ít hơn, hoặc 2 hoặc ít hơn. Theo một số phương án, khung thể nhận VL của người là giống về trình tự với trình tự khung globulin miễn dịch VL của người hoặc trình tự khung liên ứng của người.

“Ái lực” chỉ độ lớn của tổng các tương tác không cộng hóa trị giữa vị trí liên kết đơn của phân tử (ví dụ, kháng thể) và đối tác liên kết của nó (ví dụ, kháng nguyên).

Trừ khi được quy định khác, theo sáng chế, “ái lực liên kết” chỉ ái lực liên kết nội sinh phản ánh sự tương tác 1:1 giữa các thành phần của cặp liên kết (ví dụ, kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của phân tử X với đối tác Y của nó thường được biểu diễn bằng hằng số phân ly (K_d). Ái lực này có thể được đo bằng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực, gồm các phương pháp được mô tả trong sáng chế. Các phương án minh họa cụ thể để xác định ái lực liên kết và phương án minh họa được mô tả dưới đây.

Thuật ngữ “kháng thể chủ vận kháng FGFR1” chỉ kháng thể có khả năng liên kết FGFR1 với ái lực đủ để kháng thể này là hữu ích khi dùng làm chất trị liệu trong việc hoạt hóa FGFR1. Theo một phương án, mức độ liên kết của kháng thể kháng FGFR1 với protein không phải là FGFR1, không cùng họ là thấp nhỏ hơn khoảng 10% của liên kết của kháng thể này với FGFR1 như được xác định, ví dụ, bằng thử nghiệm miễn dịch dùng đánh dấu phóng xạ (radioimmunoassay - RIA). Theo phương án nhất định, kháng thể liên kết với FGFR1 có hằng số phân ly (K_d) $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$, hoặc $\leq 0,001\text{ nM}$ (ví dụ 10^{-8} M hoặc thấp hơn, ví dụ từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M , ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M).

Thuật ngữ “kháng thể” theo sáng chế được sử dụng theo nghĩa rộng nhất và gồm các cấu trúc kháng thể khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép), và mảnh kháng thể đủ dài để chúng biểu hiện hoạt tính liên kết kháng nguyên mong muốn.

“Mảnh kháng thể” chỉ phân tử không phải là kháng thể nguyên vẹn mà chứa một phần của kháng thể nguyên vẹn mà liên kết kháng nguyên với kháng thể nguyên vẹn liên kết với. Ví dụ về mảnh kháng thể gồm, nhưng không giới hạn ở, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; kháng thể thể đôi; các kháng thể mạch thẳng; phân tử kháng thể chuỗi đơn (ví dụ scFv); và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ mảnh kháng thể.

Thuật ngữ kháng thể “thể khảm” chỉ kháng thể trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ thu được từ nguồn hoặc loài cụ thể, trong khi phần còn lại của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ thu được từ nguồn hoặc loài khác nhau.

“Lớp” của kháng thể chỉ kiểu của miền không đổi hoặc vùng không đổi được quy định bởi chuỗi nặng của nó. Có năm lớp chính của các kháng thể: IgA, IgD, IgE, IgG,

và IgM, và một số lớp này có thể được chia tiếp thành các phân lớp (isotyp), ví dụ, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, và IgA₂. Miền không đổi chuỗi nặng mà tương ứng với các lớp globulin miễn dịch khác nhau được gọi là α , δ , ϵ , γ , và μ , theo thứ tự.

“Chức năng tác động” chỉ các hoạt tính sinh học có thể quy cho vùng Fc của kháng thể, mà làm thay đổi isotyp kháng thể này. Ví dụ về chức năng tác động của kháng thể gồm: liên kết C1q và gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC); liên kết thụ thể Fc; độ độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC); cơ chế thực bào; điều tiết giảm của thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ thụ thể tế bào B); và sự hoạt hóa tế bào B.

“Lượng hữu hiệu” của chất, ví dụ, dược phẩm, chỉ lượng hữu hiệu, ở liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết, để thu được kết quả trị liệu hoặc ngăn ngừa mong muốn.

Thuật ngữ “vùng Fc” theo sáng chế chỉ vùng đầu tận C của chuỗi nặng globulin miễn dịch mà chứa ít nhất là một phần của vùng không đổi. Thuật ngữ này gồm vùng Fc trình tự tự nhiên và vùng Fc thay đổi. Theo một phương án, vùng Fc chuỗi nặng IgG của người kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, đầu tận C của lysin (Lys447) của vùng Fc có thể hoặc có thể không có mặt. Trừ khi có quy định khác, việc đánh số gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng không đổi theo hệ đánh số EU, còn được gọi là chỉ số EU, như được mô tả trong Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

“Khung” hoặc “FR” chỉ các gốc miền biến đổi khác ngoài gốc vùng siêu biến (HVR). FR của miền biến đổi thường gồm bốn miền FR: FR1, FR2, FR3, và FR4. Do đó, trình tự HVR và FR thường xuất hiện trong trình tự trong VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Thuật ngữ “kháng thể nguyên chiều dài”, “kháng thể nguyên vẹn” và “toàn bộ kháng thể” được sử dụng thay thế lẫn nhau trong sáng chế để chỉ kháng thể có cấu trúc về cơ bản giống với cấu trúc kháng thể tự nhiên hoặc có chuỗi nặng chứa vùng Fc như được xác định theo sáng chế.

Thuật ngữ “tế bào chủ”, “dòng tế bào chủ” và “môi trường nuôi cấy tế bào chủ” được sử dụng thay thế lẫn nhau và chỉ các tế bào mà axit nucleic ngoại sinh được đưa

vào tế bào đó, bao gồm đời con của tế bào này. Tế bào chủ gồm “thể biến nạp” và “tế bào được biến nạp” bao gồm tế bào được biến nạp sơ cấp và đời con cháu thu được từ tế bào này mà không liên quan đến số lượng đi qua. Đời con có thể không giống hoàn toàn về lượng axit nucleic với tế bào bố mẹ, mà có thể chứa thể đột biến. Thể đột biến đời con cháu có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc được chọn cho tế bào được biến nạp ban đầu được bao gồm theo sáng chế.

“Kháng thể của người” là kháng thể có trình tự axit amin mà tương ứng với trình tự axit amin của kháng thể được tạo ra bởi người hoặc tế bào của người hoặc thu được từ nguồn không phải người mà sử dụng bề kháng thể người hoặc các trình tự mã hóa kháng thể người khác. Định nghĩa này về kháng thể người loại trừ riêng đối với kháng thể được làm tương thích với người chứa gốc liên kết kháng nguyên không phải của người.

“Khung liên ứng của người” là khung biểu thị gốc axit amin xuất hiện nhiều nhất trong sự chọn lọc của trình tự khung VL hoặc VH globulin miễn dịch của người. Thông thường, việc chọn lọc của trình tự VL hoặc VH globulin miễn dịch của người là từ phân nhóm của trình tự miền biến đổi. Thông thường, phân nhóm của các trình tự này là phân nhóm như trong tài liệu Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. Theo một phương án, đối với VL, phân nhóm này là phân nhóm kappa I như trong Kabat et al., nêu trên. Theo một phương án, đối với VH, phân nhóm này là phân nhóm III như trong Kabat et al., nêu trên.

Kháng thể “được làm tương thích với người” chỉ kháng thể thể khảm chứa gốc axit amin từ các HVR không phải của người và gốc axit amin từ các FR của người. Theo phương án nhất định, kháng thể được làm tương thích với người về cơ bản sẽ gồm tất cả của ít nhất là một, và cụ thể là hai miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc về cơ bản là tất cả của các HVR (ví dụ, các CDR) tương ứng với các HVR của kháng thể không phải của người, và tất cả hoặc về cơ bản là tất cả các FR tương ứng với các FR của kháng thể người. Kháng thể được làm tương thích với người tùy ý có thể gồm ít nhất là một phần vùng không đổi kháng thể thu được từ kháng thể người. “Dạng được làm tương thích với người” của kháng thể, ví dụ, kháng thể không phải của người, chỉ kháng thể đi qua quá trình làm cho giống của người.

Thuật ngữ “gốc vùng siêu biến” hoặc “HVR,” theo sáng chế, chỉ mỗi trong số các vùng của miền biến đổi kháng thể có khả năng siêu biến về trình tự và/hoặc tạo thành các vòng đã được xác định cấu trúc (“vòng siêu biến”). Thông thường, các kháng thể bốn chuỗi tự nhiên chứa sáu HVR; ba nằm trong VH (H1, H2, H3), và ba nằm trong VL (L1, L2, L3). Các HVR thường chứa gốc axit amin từ các vòng siêu biến và/hoặc từ “vùng quyết định bổ thể” (CDR), các HVR chứa gốc axit amin từ vùng quyết định bổ thể có tính thay đổi trình tự cao nhất và/hoặc được bao gồm trong sự nhận diện kháng nguyên. Các vòng siêu biến được lấy làm ví dụ xuất hiện ở gốc axit amin 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), và 96-101 (H3). (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987).) CDR lấy làm ví dụ (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3) xuất hiện ở gốc axit amin 24-34 của L1, 50-56 của L2, 89-97 của L3, 31-35B của H1, 50-65 của H2, và 95-102 của H3. (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).) Ngoài trừ CDR1 trong VH, CDR thường chứa gốc axit amin mà tạo thành các vòng siêu biến. Các CDR còn chứa “gốc quyết định tính đặc hiệu,” hoặc “SDR,” là các gốc tiếp xúc với kháng nguyên. SDR được chứa trong vùng của CDR được gọi là các CDR được làm ngắn, hoặc a-CDR. a-CDR được lấy làm ví dụ (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, và a-CDR-H3) xuất hiện ở các gốc axit amin 31-34 của L1, 50-55 của L2, 89-96 của L3, 31-35B của H1, 50-58 của H2, và 95-102 của H3. (Xem Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008).) Trừ khi được quy định khác, các gốc HVR và các gốc khác trong miền biến đổi (ví dụ, các gốc FR) được đánh số trong sáng chế theo Kabat et al., nêu trên.

“Thể tiếp hợp miễn dịch” là kháng thể được tiếp hợp với một hoặc nhiều phân tử khác loại.

“Cá thể” hoặc “đối tượng” là động vật có vú. Động vật có vú gồm, nhưng không giới hạn ở, vật nuôi trong gia đình (ví dụ, bò, cừu, mèo, chó, và ngựa), động vật linh trưởng (ví dụ, con người và động vật linh trưởng không phải người như khỉ), thỏ, và loài gặm nhấm (ví dụ, các con chuột và chuột cống). Theo phương án nhất định, cá thể hoặc đối tượng này là người.

Kháng thể “được phân lập” là kháng thể được phân tách ra từ thành phần của môi trường tự nhiên của nó. Theo một số phương án, kháng thể được tinh sạch đến độ tinh

khuyết cao hơn 95% hoặc 99% như được xác định bởi, ví dụ, phương pháp điện di (ví dụ, SDS-PAGE, hội tụ đẳng điện (isoelectric focusing - IEF), điện di mao dẫn) hoặc sắc ký (ví dụ, HPLC trao đổi ion hoặc pha đảo). Tổng quan về các phương pháp đánh giá độ tinh khiết của kháng thể, xem, ví dụ, Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Axit nucleic “được phân lập” chỉ phân tử axit nucleic được tách ra từ thành phần của môi trường tự nhiên của nó. Axit nucleic được phân lập gồm phân tử axit nucleic được chứa trong tế bào mà thường chứa phân tử axit nucleic, nhưng phân tử axit nucleic này nằm ngoài nhiễm sắc thể hoặc ở vị trí nhiễm sắc thể khác với vị trí nhiễm sắc thể tự nhiên của nó.

“Axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể kháng FGFR1” chỉ một hoặc nhiều phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (hoặc mảnh của nó), gồm các phân tử axit nucleic trong một vector hoặc trong các vector riêng biệt, và các phân tử axit nucleic nằm ở một hoặc nhiều vị trí trong tế bào chủ.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” theo sáng chế chỉ kháng thể thu được từ quần thể các kháng thể về cơ bản là đồng nhất, tức là, các kháng thể cá thể có chứa quần thể này là giống và/hoặc liên kết với cùng epitop, trừ các kháng thể biến thể có khả năng, ví dụ, chứa thể đột biến có trong tự nhiên hoặc xuất hiện trong quá trình sản xuất chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể này thường có mặt với lượng rất nhỏ. Ngược với các chế phẩm kháng thể đa dòng, mà thường gồm các kháng thể khác nhau được dựa trực tiếp trên các yếu tố quyết định (epitop) khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng dựa trực tiếp trên một yếu tố quyết định trên kháng nguyên. Do đó, từ bỏ nghĩa “đơn dòng” này chỉ ra đặc điểm của kháng thể này như thu được từ quần thể các kháng thể về cơ bản là đồng nhất, và không được hiểu là cần đến quá trình sản xuất kháng thể này bởi phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng được sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra bởi nhiều kỹ thuật, gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp tế bào lai, phương pháp ADN tái tổ hợp, phương pháp biểu hiện trên thực khuẩn thể, và các phương pháp sử dụng động vật chuyển gen chứa tất cả hoặc một phần tập hợp globulin miễn dịch của người, các phương pháp này và các phương pháp được lấy làm ví dụ khác để tạo ra các kháng thể đơn dòng được mô tả trong sáng chế.

“Các kháng thể tự nhiên” chỉ phân tử globulin miễn dịch có trong tự nhiên có cấu trúc thay đổi. Ví dụ, các kháng thể IgG tự nhiên là các glycoprotein tetrame khác loại gồm khoảng 150.000 dalton, chứa hai chuỗi nhẹ giống nhau và hai chuỗi nặng giống nhau được liên kết disulfua. Từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nặng có vùng thay đổi (VH), còn được gọi là miền chuỗi nặng thay đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nặng, theo sau là ba miền không đổi (CH1, CH2, và CH3). Tương tự, từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nhẹ có vùng thay đổi (VL), còn được gọi là miền chuỗi nhẹ thay đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ, theo sau là miền chuỗi nhẹ không đổi (CL). Chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được quy về một trong hai loại, được gọi là kappa (κ) và lambda (λ), dựa trên trình tự axit amin của miền không đổi của nó.

Thuật ngữ “tờ hướng dẫn sử dụng” để chỉ các hướng dẫn thường có trong các vật phẩm trên thị trường của sản phẩm trị liệu, chứa thông tin về các chỉ định, cách dùng, liều lượng, đường dùng, liệu pháp hỗn hợp, các chống chỉ định và/hoặc cảnh báo về việc sử dụng các sản phẩm trị liệu này.

“Phần trăm (%) độ tương đồng trình tự axit amin” với trình tự polypeptit tham khảo được định nghĩa là phần trăm gốc axit amin trong trình tự ứng cử mà giống với gốc axit amin trong trình tự polypeptit tham khảo, sau khi so sánh trình tự và chèn khoảng trống vào, nếu cần, để thu được phần trăm độ tương đồng trình tự tối đa, và không xem bất kỳ đoạn thế bảo toàn nào là một phần của mức tương đồng trình tự. Việc so sánh để xác định phần trăm độ tương đồng trình tự axit amin của thể thu được theo nhiều cách khác nhau thuộc kiến thức của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, sử dụng phần mềm máy tính có trên thị trường như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể xác định các thông số thích hợp để so sánh trình tự, bao gồm các thuật toán bất kỳ được yêu cầu để thu được sự sắp thẳng tối đa trên toàn bộ chiều dài của trình tự được so sánh. Tuy nhiên, cho mục đích sáng chế, % giá trị độ tương đồng trình tự axit amin được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 được tạo ra bởi Genentech, Inc., và mã nguồn được nộp vào tư liệu sử dụng ở Cơ quan Bản quyền Hoa Kỳ (U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559), mà nó được đăng ký với số đăng ký bản quyền là TXU510087. Chương trình ALIGN-2 là có sẵn trên thị trường từ Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể được biên soạn từ mã

nguồn. Chương trình ALIGN-2 cần được biên soạn để sử dụng trên môi trường hệ điều hành UNIX, gồm UNIX V4.0D kỹ thuật số. Tất cả các thông số so sánh trình tự được đặt bằng chương trình ALIGN-2 và không thay đổi.

Trong các trường hợp mà ALIGN-2 được sử dụng để so sánh trình tự axit amin, % độ tương đồng trình tự axit amin của trình tự axit amin cụ thể A so với, với, hoặc dựa trên trình tự axit amin cụ thể B (mà có thể xen kẽ được diễn giải dưới dạng trình tự axit amin A cụ thể có hoặc có chứa % độ tương đồng trình tự axit amin cụ thể so với, với, hoặc dựa trên trình tự axit amin cụ thể B) được tính như sau:

$$100 * X/Y$$

trong đó X là số gốc axit amin được tính là các bắt cặp giống nhau bởi chương trình so sánh trình tự ALIGN-2 trong chương trình này có sự so sánh giữa A và B, và trong đó Y là tổng số gốc axit amin của trong B. Sẽ được hiểu rằng khi chiều dài trình tự axit amin A không bằng chiều dài trình tự axit amin B, thì % mức tương đồng trình tự axit amin của A so với B sẽ không bằng % độ tương đồng trình tự axit amin của B với A. Trừ khi được quy định cụ thể khác, tất cả các giá trị % độ tương đồng trình tự axit amin theo sáng chế thu được như được mô tả trong đoạn ngay trên đây sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2.

Thuật ngữ "dược phẩm" chỉ chế phẩm mà ở dạng đó cho phép hoạt tính sinh học của thành phần hoạt tính chứa trong đó có hiệu quả, và nó không chứa thành phần bổ sung nào gây độc không chấp nhận được cho đối tượng sử dụng chế phẩm đó.

“Chất mang dược dụng” chỉ thành phần trong dược phẩm, khác thành phần hoạt tính, không gây độc cho đối tượng. Chất mang dược dụng gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đệm, tá dược, chất làm ổn định, hoặc chất bảo quản.

Thuật ngữ “thụ thể yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 1 hoặc FGFR1,” theo sáng chế, chỉ FGFR1 tự nhiên bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ bao gồm động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ người) và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi được quy định khác. Thuật ngữ này bao gồm các FGFR1 “nguyên chiều dài,” chưa được xử lý cũng như dạng bất kỳ của FGFR1 nhận được từ quá trình xử lý trong tế bào. Thuật ngữ còn gồm các biến thể có trong tự nhiên của FGFR1, ví dụ, biến thể ghép hoặc biến thể alen. Trình tự axit amin của FGFR1b và FGFR2b của người ví dụ, theo thứ tự, được thể hiện dưới đây:

NTKPNPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKE
FKPDHRIGGYKVRATWSIIMDSVVP SDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVVE
RSPHRPILQAGLPANKTVALG SNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIGP
DNLPYVQILKHSGINSSDAEVLTLFNVTEAQSGEYVCKVS NYIGEANQSAWLT
VTRPVAKALEERPAVMTS (SEQ ID NO: 1); và

NTKPNPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKE
FKPDHRIGGYKVRATWSIIMDSVVP SDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVVE
RSPHRPILQAGLPANKTVALG SNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIGP
DNLPYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLSHSA
WLTVLEALEERPAVMTS (SEQ ID NO: 5).

Theo sáng chế, “sự điều trị” (và các dạng ngữ pháp tương đương của nó như “điều trị” hoặc “để điều trị”) chỉ sự can thiệp lâm sàng trong nỗ lực thay đổi tiến trình tự nhiên của cá thể được điều trị, và có thể được thực hiện để phòng ngừa hoặc trong tiến trình bệnh học lâm sàng. Tác dụng mong muốn của việc điều trị gồm, nhưng không giới hạn ở, ngăn sự xuất hiện hoặc tái phát của bệnh, làm giảm triệu chứng, giảm bớt hậu quả bệnh học trực tiếp hoặc gián tiếp bất kỳ của bệnh, làm giảm tốc độ tiến triển bệnh, làm thuyên giảm hoặc làm dịu tình trạng bệnh, và việc dự đoán bệnh được cải thiện. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng để trì hoãn sự phát triển của bệnh hoặc làm chậm tiến trình của bệnh.

Thuật ngữ “vùng thay đổi” hoặc “miền biến đổi” chỉ miền của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể liên quan đến việc liên kết kháng thể với kháng nguyên. Miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (VH và VL, theo thứ tự) của kháng thể tự nhiên thường có cấu trúc tương tự, với mỗi miền có chứa bốn vùng khung được bảo toàn (FR) và ba gốc vùng siêu biến (HVR). (Xem, ví dụ, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., trang 91 (2007).) Miền VH hoặc VL đơn có thể thích hợp để mang lại tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên. Ngoài ra, các kháng thể mà liên kết kháng nguyên cụ thể có thể được phân lập sử dụng miền VH hoặc VL từ kháng thể liên kết kháng nguyên này để sàng lọc thư viện miền VL hoặc VH bỏ thể, theo thứ tự. Xem, ví dụ, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

Thuật ngữ "vector," theo sáng chế, chỉ phân tử axit nucleic có khả năng sinh ra axit nucleic khác mà nó được liên kết với. Thuật ngữ này bao gồm vector ở dạng cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vector được kết hợp vào bộ gen của tế bào chủ mà nó được đưa vào. Các vector nhất định có khả năng hướng sự biểu hiện của axit nucleic mà chúng được liên kết có điều khiển với. Theo sáng chế, các vector này được gọi là "vector biểu hiện".

Hợp phân và phương pháp

Theo một khía cạnh, sáng chế dựa, một phần, vào sự phát hiện các kháng thể chủ vận kháng FGFR1 và hoạt tính trị liệu của các kháng thể này. Các kháng thể theo sáng chế là hữu ích, ví dụ, để điều trị các bệnh chuyển hóa, gồm tiểu đường.

Các kháng thể kháng FGFR1 được lấy làm ví dụ

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các kháng thể được phân lập liên kết với FGFR1. Theo phương án nhất định, kháng thể kháng FGFR1 liên kết với FGFR1b và/hoặc FGFR1c và kích hoạt hoạt tính FGFR1.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR1 có chứa ít nhất là một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 26; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 25; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 hoặc SEQ ID NO: 20; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 23.

Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR1 có thể là hoàn toàn của người, được làm tương thích với người hoặc không phải của người. Theo một phương án, kháng thể kháng FGFR1 có chứa HVR như trong phương án bất kỳ trong số các phương án ở trên, và còn gồm khung thể nhận của người, ví dụ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng FGFR1 có chứa trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có mức tương đồng trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 2, 3 hoặc 4 như sau:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTWISWVPGKGLEWVGEIDPYDG
DTYYADSVKGRFTISADTSKNLQMNSLRAEDTAVYYCASSGYGGSDYAMDY
WGQ (SEQ ID NO: 2),

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNNYIHWVPGKGLEWVADIYPND
GDTDYADSVKGRFTISADTSKNLQMNSLRAEDTAVYYCAREHFDAAVHYYV
MDYWGQ (SEQ ID NO: 3), và

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSNWISWVPGKGLEWVAEID
PYDGATDYADSVKGRFTISADTSKNLQMNSLRAEDTAVYYCATGTDVMDYW
GQ (SEQ ID NO: 4). Theo phương án nhất định, trình tự VH có độ tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% này chứa đoạn thể (ví dụ, đoạn thể bảo toàn), đoạn cài xen, hoặc đoạn loại bỏ so với trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng FGFR1 có chứa trình tự đó vẫn giữ khả năng liên kết với FGFR1 và kích hoạt hoạt tính của nó. Theo phương án nhất định, tổng từ 1 đến 10 axit amin được thay thế, được cài xen và/hoặc được loại bỏ trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2, 3 hoặc 4. Theo phương án nhất định, đoạn thể, đoạn cài xen, hoặc đoạn loại bỏ xuất hiện trong các vùng bên ngoài HVR (tức là, trong FR). Tùy ý, kháng thể kháng FGFR1 có chứa trình tự VH trong SEQ ID NO: 2, 3 hoặc 4, gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR1, trong đó kháng thể này có chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% so với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6 như sau:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF
LYSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR
(SEQ ID NO: 6). Theo phương án nhất định, trình tự VL có độ tương đồng ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% này chứa đoạn thể (ví dụ, đoạn thể bảo toàn), đoạn cài xen hoặc đoạn loại bỏ so với trình tự tham khảo, nhưng kháng thể kháng FGFR1 có chứa trình tự đó vẫn giữ khả năng liên kết với FGFR1. Theo phương án nhất định, tổng từ 1 đến 10 axit amin được thay thế, được cài xen và/hoặc được loại bỏ trong SEQ ID NO: 6. Theo phương án nhất định, đoạn thể, đoạn cài xen, hoặc đoạn loại bỏ xuất hiện trong các vùng bên ngoài HVR (tức là, trong

các FR). Tùy ý, kháng thể kháng FGFR1 có chứa trình tự VL trong SEQ ID NO: 6, gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR1, trong đó kháng thể này có chứa VH như trong phương án bất kỳ trong số các phương án ở trên, và VL như trong phương án bất kỳ trong số các phương án ở trên. Theo một phương án, kháng thể này có chứa trình tự VH và VL trong SEQ ID NO: 2, 3 hoặc 4 và SEQ ID NO: 6, theo thứ tự, gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó.

Theo khía cạnh khác theo sáng chế, kháng thể kháng FGFR1 theo phương án bất kỳ trong số các phương án ở trên là kháng thể đơn dòng, gồm kháng thể thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người hoặc kháng thể người. Theo một phương án, kháng thể kháng FGFR1 là mảnh kháng thể, ví dụ, Fv, Fab, Fab', scFv, kháng thể thể đôi, hoặc đoạn F(ab')₂. Theo phương án khác, kháng thể này là kháng thể nguyên chiều dài, ví dụ, kháng thể IgG1 nguyên vẹn hoặc lớp hoặc isotyp kháng thể khác như được xác định theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng FGFR1 theo phương án bất kỳ trong số các phương án ở trên có thể kết hợp các đặc điểm bất kỳ, một mình hoặc trong hỗn hợp, như được mô tả trong các phần từ 1 đến 7 dưới đây:

Ái lực của kháng thể

Theo phương án nhất định, kháng thể được đề xuất theo sáng chế có hằng số phân ly (K_d) $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$, $\leq 0,1\text{ nM}$, $\leq 0,01\text{ nM}$, hoặc $\leq 0,001\text{ nM}$ (ví dụ 10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, ví dụ từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M , ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M).

Theo một phương án, K_d được đo bằng thử nghiệm liên kết kháng nguyên đánh dấu phóng xạ (RIA) được thực hiện với bản Fab của kháng thể quan tâm và kháng nguyên của nó như được mô tả bởi thử nghiệm dưới đây. Ái lực liên kết dung dịch của Fab đối với kháng nguyên được đo bằng cách làm cân bằng Fab với nồng độ tối thiểu của kháng nguyên được đánh dấu (^{125}I) khi có mặt của chuỗi chuẩn độ của kháng nguyên không được đánh dấu, sau đó giữ kháng nguyên đã liên kết với đĩa được phủ kháng thể kháng Fab (xem, ví dụ, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)). Để thiết lập các điều kiện cho thử nghiệm, các đĩa nhiều giếng MICROTITER® (Thermo Scientific) được phủ qua đêm với 5 $\mu\text{g/ml}$ của kháng thể bắt giữ kháng Fab (Cappel

Labs) trong 50 mM natri cacbonat (pH 9,6), và sau đó được phong bế bằng 2% (khối lượng/thể tích) albumin huyết thanh bò trong PBS trong từ hai đến năm giờ ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 23°C). Trong đĩa không hấp thụ (Nunc #269620), 100 pM hoặc 26 pM kháng nguyên được đánh dấu [^{125}I] được trộn với các dung dịch pha loãng liên tiếp của Fab quan tâm (ví dụ, phù hợp với đánh giá của kháng thể kháng VEGF, Fab-12, trong Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). Sau đó, Fab quan tâm được ủ qua đêm; tuy nhiên, việc ủ này có thể tiếp diễn trong khoảng thời gian dài hơn (ví dụ, khoảng 65 giờ) để đảm bảo rằng trạng thái cân bằng được thiết lập. Sau đó, hỗn hợp được chuyển đến đĩa bắt giữ để ủ ở nhiệt độ trong phòng (ví dụ, trong một giờ). Sau đó, dung dịch được loại bỏ và đĩa được rửa tám lần với polysorbat 20 0,1% (TWEEN-20®) trong PBS. Khi các đĩa được sấy khô, bổ sung 150 μl /giếng chất nhấp nháy (MICROSCINT-20™; Packard), và các đĩa này được đếm trên máy đếm gama TOPCOUNT™ (Packard) trong mười phút. Nồng độ mỗi Fab mà tạo ra ít hơn hoặc bằng 20% liên kết tối đa được chọn để sử dụng trong các thử nghiệm liên kết cạnh tranh.

Theo phương án khác, Kd được đo sử dụng thử nghiệm cộng hưởng từ bề mặt sử dụng BIACORE®-2000 hoặc BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) ở 25°C với chip CM5 kháng nguyên được cố định ở ~10 đơn vị đáp ứng (RU). Nói ngắn gọn, chip cảm biến sinh học dextran carboxymetyl hóa (CM5, BIACORE, Inc.) được hoạt hóa bằng *N*-etyl-*N'*-(3-dimetylaminopropyl)-carbodiimide hydroclorua (EDC) và *N*-hydroxysuccinimide (NHS) theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Kháng nguyên được pha loãng bằng natri axetat 10 mM, pH = 4,8, đến nồng độ 5 $\mu\text{g/ml}$ (~0,2 μM) trước khi tiêm ở lưu lượng là 5 μl /phút để thu được khoảng 10 đơn vị đáp ứng (RU) protein ghép cặp. Sau khi tiêm kháng nguyên, 1 M etanolamin được tiêm để phong tỏa nhóm không phản ứng. Để xác định động học, dung dịch pha loãng liên tiếp hai lần của Fab (0,78 nM đến 500 nM) được tiêm trong PBS với chất hoạt động bề mặt polysorbat 20 0,05% (TWEEN-20™) (PBST) ở 25°C với lưu lượng vào khoảng 25 μl /phút. Tốc độ kết hợp (k_{on}) và tốc độ phân rã (k_{off}) được tính toán sử dụng mô hình liên kết Langmuir 1:1 đơn giản (phần mềm đánh giá BIACORE® bản 3.2) bằng cách làm khớp đồng thời các đồ thị cảm biến kết hợp và phân rã. Hằng số phân ly cân bằng (Kd) được tính dưới dạng tỷ số $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. Xem, ví dụ, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Nếu tốc độ kết hợp lớn hơn $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bởi thử nghiệm cộng hưởng từ bề mặt ở trên, tốc độ kết

hợp có thể được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật dập tắt huỳnh quang xác định sự tăng hoặc sự giảm mật độ phát huỳnh quang (bước sóng kích thích = 295 nm; bước sóng phát = 340 nm, thông dải 16 nm) ở nhiệt độ 25 °C của 20 nM kháng thể kháng kháng nguyên (dạng Fab) trong PBS, pH = 7,2, khi có mặt các nồng độ tăng dần của kháng nguyên như được đo trong phổ kế, như quang phổ kế có dừng-chảy (Aviv Instruments) hoặc máy đo quang phổ 8000-series SLM-AMINCO™ (ThermoSpectronic) có cuvet được khuấy.

Mảnh kháng thể

Theo phương án nhất định, kháng thể được đề xuất theo sáng chế là mảnh kháng thể. Mảnh kháng thể gồm, nhưng không giới hạn ở, đoạn Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, và scFv, và các đoạn khác được mô tả dưới đây. Để đánh giá mảnh kháng thể nhất định, xem Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Để đánh giá đoạn scFv, xem, ví dụ, Pluckthün, trong *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg và Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); xem thêm WO 93/16185; và US 5,571,894 và US 5,587,458. Để thảo luận về các đoạn Fab và F(ab')₂ có chứa các gốc epitop liên kết thụ thể sửa chữa và có chu kỳ bán rã *in vivo* tăng, xem patent Mỹ số US 5,869,046.

Kháng thể thể đôi là mảnh kháng thể có hai vị trí liên kết kháng nguyên mà có thể có hóa trị hai hoặc đặc hiệu kép. Xem, ví dụ, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); và Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Kháng thể thể ba và kháng thể thể tư cũng được mô tả trong Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Các kháng thể miền đơn là mảnh kháng thể có chứa tất cả hoặc một phần miền biến đổi chuỗi nặng hoặc tất cả hoặc một phần miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo phương án nhất định, kháng thể miền đơn là kháng thể miền đơn của người (Domantis, Inc., Waltham, MA; xem, ví dụ, patent Mỹ số US 6,248,516 B1).

Mảnh kháng thể có thể được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, gồm, nhưng không giới hạn ở, sự phân giải bằng thủy phân protein của kháng thể nguyên vẹn cũng như quá trình sản xuất bởi tế bào chủ tái tổ hợp (ví dụ *E. coli* hoặc thực khuẩn thể), như được mô tả trong sáng chế.

Kháng thể thể khảm và kháng thể được làm tương thích với người

Theo phương án nhất định, kháng thể được đề xuất theo sáng chế là kháng thể thể khảm. Các kháng thể thể khảm nhất định được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số US 4,816,567; và Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Theo một ví dụ, kháng thể thể khảm có chứa vùng thay đổi không phải của người (ví dụ, vùng thay đổi thu được từ chuột nhắt, chuột cống, chuột đồng, thỏ, hoặc động vật linh trưởng không phải người, như khỉ) và vùng không đổi của người. Theo ví dụ khác, kháng thể thể khảm là kháng thể “chuyển lớp” trong đó lớp hoặc phân lớp được thay đổi so với lớp của kháng thể bố mẹ. Các kháng thể thể khảm gồm các đoạn liên kết kháng nguyên của nó.

Theo phương án nhất định, kháng thể thể khảm là kháng thể được làm tương thích với người. Cụ thể, kháng thể không phải của người được làm tương thích với người để giảm tính gây miễn dịch với người, trong khi vẫn giữ tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể bố mẹ không phải của người. Thông thường, kháng thể được làm tương thích với người có chứa một hoặc nhiều miền biến đổi trong đó các HVR, ví dụ, CDR, (hoặc các phần của nó) thu được từ kháng thể không phải của người, và các FR (hoặc các phần của nó) thu được từ trình tự kháng thể của người. Kháng thể được làm tương thích với người tùy ý sẽ còn chứa ít nhất là một phần vùng không đổi của người. Theo một số phương án, một số gốc FR trong kháng thể được làm tương thích với người được thay thế bằng các gốc tương ứng từ kháng thể không phải của người (ví dụ, kháng thể từ đó thu được các gốc HVR), ví dụ, để phục hồi hoặc cải thiện tính đặc hiệu hoặc ái lực của kháng thể.

Các kháng thể được làm tương thích với người và các phương pháp tạo ra chúng được xem xét, ví dụ, trong Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008), và được mô tả thêm, ví dụ, trong Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); patent Mỹ số 5, 821,337, 7,527,791, 6,982,321, và 7,087,409; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (mô tả sự ghép SDR (a-CDR)); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (mô tả “sự làm lại bề mặt”); Dall’Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (mô tả “xáo trộn FR”); và Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) và Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (mô tả phương pháp “chọn lọc hướng dẫn” để xáo trộn FR).

Vùng khung của người mà có thể được sử dụng để người hóa gồm, nhưng không giới hạn ở: các vùng khung được chọn sử dụng phương pháp "phù hợp nhất" (xem, ví dụ, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); vùng khung thu được từ trình tự liên ứng của các kháng thể của người của phân nhóm cụ thể của vùng thay đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng (xem, ví dụ, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); và Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); vùng khung trưởng thành của người (được làm đột biến tế bào sinh dưỡng) hoặc vùng khung dòng tế bào mầm của người (xem, ví dụ, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); và vùng khung thu được từ việc sàng lọc thư viện FR (xem, ví dụ, Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) và Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

Kháng thể của người

Theo phương án nhất định, kháng thể được đề xuất theo sáng chế là kháng thể của người. Các kháng thể của người có thể được tạo ra sử dụng nhiều kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực. Các kháng thể của người được mô tả cụ thể trong van Dijk và van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) và Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Các kháng thể của người có thể được điều chế bằng cách đưa chất sinh miễn dịch vào động vật chuyển gen mà được biến đổi để tạo ra các kháng thể của người nguyên vẹn hoặc các kháng thể nguyên vẹn với các vùng thay đổi của người trong đáp ứng với thử thách kháng nguyên. Các con vật này thường chứa tất cả hoặc một phần tập hợp globulin miễn dịch của người, mà thay thế tập hợp globulin miễn dịch nội sinh, hoặc có mặt ngoài nhiễm sắc thể hoặc được kết hợp ngẫu nhiên vào nhiễm sắc thể động vật. Trong các con chuột chuyển gen này, tập hợp globulin miễn dịch nội sinh thường bị vô hoạt. Để đánh giá các phương pháp thu nhận các kháng thể của người từ động vật chuyển gen, xem Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Xem thêm, ví dụ, US 6,075,181 và US 6,150,584 mô tả công nghệ XENOMOUSE™; patent Mỹ số US 5,770,429 mô tả công nghệ HUMAB®; patent Mỹ số US 7,041,870 mô tả K-M MOUSE®, và đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2007/0061900, mô tả công nghệ VELOCIMOUSE®). Vùng thay đổi của người từ các kháng thể nguyên vẹn được tạo ra bởi các con vật này có thể được biến đổi thêm, ví dụ, bằng cách kết hợp với vùng không đổi khác nhau của người.

Các kháng thể của người còn có thể được tạo ra bằng phương pháp dựa trên tế bào lai. Các dòng tế bào u tủy của người và dòng tế bào u tủy lai chuột-người để sản xuất các kháng thể đơn dòng của người đã được mô tả. (Xem, ví dụ, Kozbor J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); và Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) Các kháng thể của người được tạo ra thông qua kỹ thuật tế bào lai tế bào B của người còn được mô tả trong Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Các phương pháp khác còn gồm các phương pháp được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số US 7,189,826 (mô tả việc sản xuất các kháng thể IgM đơn dòng của người từ dòng tế bào lai tế bào) và Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (mô tả tế bào lai người - người). Kỹ thuật tế bào lai của người (kỹ thuật Trioma) cũng được mô tả trong Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) và Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Các kháng thể của người có thể còn được tạo ra bằng cách phân lập các trình tự miền biến đổi dòng Fv được chọn từ thư viện biểu hiện thực khuẩn thể thu được từ người. Trình tự miền biến đổi này sau đó có thể được kết hợp với miền không đổi mong muốn của người. Các kỹ thuật chọn lọc các kháng thể của người từ thư viện kháng thể được mô tả bên dưới.

Kháng thể thu được từ thư viện

Các kháng thể theo sáng chế có thể được phân lập bằng cách sàng lọc thư viện tổ hợp với các kháng thể với hoạt tính hoặc các hoạt tính mong muốn. Ví dụ, nhiều phương pháp khác nhau là đã biết trong lĩnh vực để tạo ra thư viện biểu hiện thực khuẩn thể và sàng lọc thư viện này đối với các kháng thể có các tính chất liên kết mong muốn. Các phương pháp này được đánh giá, ví dụ, trong Hoogenboom et al. trong *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) và được mô tả thêm, ví dụ, trong McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, trong *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); và Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004).

Theo các phương pháp biểu hiện thực khuẩn thể nhất định, danh mục các gen VH và VL được tách dòng riêng rẽ bằng phản ứng chuỗi polymeaza (PCR) và được tái tổ hợp ngẫu nhiên trong thư viện thực khuẩn thể, mà sau đó có thể được sàng lọc cho thực khuẩn thể liên kết kháng nguyên như được mô tả trong Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Thực khuẩn thể thường biểu hiện mảnh kháng thể, hoặc dưới dạng đoạn Fv chuỗi đơn (scFv) hoặc dưới dạng đoạn Fab. Các thư viện từ nguồn được gây miễn dịch cung cấp các kháng thể ái lực cao cho chất sinh miễn dịch mà không yêu cầu cấu trúc tế bào lai. Hoặc, danh mục ban đầu có thể được tách dòng (ví dụ, từ người) để cung cấp nguồn đơn các kháng thể cho phạm vi rộng các kháng nguyên tự thân và cả kháng nguyên không tự thân mà không có bất kỳ sự gây miễn dịch nào như được mô tả bởi Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Cuối cùng, thư viện ban đầu còn có thể được tạo ra tổng hợp bằng cách tách dòng các đoạn gen V chưa được sắp xếp lại từ tế bào gốc, và sử dụng các đoạn mồi PCR chứa trình tự ngẫu nhiên để mã hóa vùng CDR3 biến đổi mạnh và thực hiện sự tái sắp xếp in vitro, như được mô tả bởi Hoogenboom và Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Các công bố patent mô tả thư viện thực khuẩn thể kháng thể của người gồm, ví dụ: patent Mỹ số US 5,750,373, và công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2005/0079574, US 2005/0119455, US 2005/0266000, US 2007/0117126, US 2007/0160598, US 2007/0237764, US 2007/0292936 và US 2009/0002360.

Các kháng thể hoặc mảnh kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể người là các kháng thể của người hoặc mảnh kháng thể người được cân nhắc theo sáng chế.

Kháng thể đa đặc hiệu

Theo phương án nhất định, kháng thể được đề xuất theo sáng chế là kháng thể đa đặc hiệu, ví dụ kháng thể đặc hiệu kép. Các kháng thể đa đặc hiệu là các kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu liên kết đối với ít nhất là hai vị trí khác nhau. Theo phương án nhất định, một trong số các vị trí đặc hiệu liên kết là đối với FGFR1 và vị trí còn lại là đối với kháng nguyên bất kỳ khác, ví dụ beta-Klotho. Theo phương án nhất định, các kháng thể đặc hiệu kép có thể liên kết với hai epitop khác nhau của FGFR1. Các kháng

thể đặc hiệu kép có thể được điều chế dưới dạng các kháng thể hoặc mảnh kháng thể nguyên chiều dài.

Kỹ thuật để tạo ra các kháng thể đa đặc hiệu gồm, nhưng không giới hạn ở, đồng biểu hiện tái tổ hợp hai cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ globulin miễn dịch có tính đặc hiệu khác nhau (xem Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, và Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), và kỹ thuật “khóa trong ổ” (xem, ví dụ, US 5,731,168). Các kháng thể đa đặc hiệu có thể còn được tạo ra bằng kỹ thuật lái tĩnh điện để tạo ra phân tử kháng thể đime khác loại Fc (WO 2009/089004A1); hai hoặc nhiều kháng thể hoặc đoạn liên kết chéo (xem, ví dụ, patent Mỹ số US 4,676,980, và Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); sử dụng khóa kéo loxin để tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép (xem, ví dụ, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); sử dụng kỹ thuật “kháng thể thể đôi” để tạo ra mảnh kháng thể đặc hiệu kép (xem, ví dụ, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); và sử dụng các đime chuỗi đơn Fv (sFv) (xem, ví dụ, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); và điều chế các kháng thể 3 đặc hiệu như được mô tả, ví dụ, trong Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Các kháng thể được thiết kế có ba hoặc nhiều hơn ba vị trí liên kết kháng nguyên chức năng, bao gồm “các kháng thể octopus” cũng được gồm theo sáng chế (xem, ví dụ US 2006/0025576A1).

Kháng thể hoặc đoạn theo sáng chế còn gồm “FAB tác dụng kép” hoặc “DAF” có chứa vị trí liên kết kháng nguyên liên kết với FGFR1 cũng như kháng nguyên khác, ví dụ klothoBeta (xem, US 2008/0069820, ví dụ).

Biến thể kháng thể

Theo phương án nhất định, các biến thể trình tự axit amin của các kháng thể được đề xuất theo sáng chế được tính đến. Ví dụ, có thể mong cải thiện ái lực liên kết và/hoặc các tính chất sinh học khác của kháng thể này. Biến thể trình tự axit amin của kháng thể có thể được điều chế bằng cách đưa các cải biến thích hợp vào trình tự nucleotit mã hóa kháng thể này, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Các cải biến này gồm, ví dụ, đoạn loại bỏ từ, và/hoặc đoạn cài xen và/hoặc đoạn thể của các gốc nằm trong trình tự axit amin của kháng thể này. Hỗn hợp bất kỳ của đoạn loại bỏ, đoạn cài

xen, và đoạn thể có thể được thực hiện để đạt được cấu trúc cuối cùng, với điều kiện là cấu trúc cuối cùng này có các tính chất mong muốn, ví dụ, liên kết kháng nguyên.

Biến thể đoạn thể, đoạn cài xen và đoạn loại bỏ

Theo phương án nhất định, sáng chế đề xuất biến thể kháng thể có một hoặc nhiều đoạn thể axit amin. Vị trí quan tâm để gây đột biến thay thế gồm HVR và FR. Đoạn thể bảo toàn được thể hiện trong Bảng 1 dưới tiêu đề “đoạn thể bảo toàn”. Các thay đổi đáng kể hơn được đưa ra trong Bảng 1 dưới tiêu đề "đoạn thể mẫu" và như được mô tả thêm bên dưới là các lớp mạch bên axit amin. Đoạn thể axit amin của thể được đưa vào kháng thể quan tâm và sản phẩm được sàng lọc cho hoạt tính mong muốn, ví dụ, liên kết kháng nguyên được giữ lại/cải thiện, tính sinh miễn dịch giảm, hoặc ADCC hoặc CDC được cải thiện.

Bảng 1

Gốc ban đầu	Đoạn thể mẫu	Đoạn thể ưu tiên
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norloxin	Leu
Leu (L)	Norloxin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe

Gốc ban đầu	Đoạn thể mẫu	Đoạn thể ưu tiên
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norloxin	Leu

Axit amin của thể được nhóm theo các đặc điểm mạch bên thông thường:

- (1) kỵ nước: Norloxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) ưa nước trung tính: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) axit: Asp, Glu;
- (4) bazơ: His, Lys, Arg;
- (5) các gốc ảnh hưởng đến chiều hướng của mạch: Gly, Pro;
- (6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Đoạn thể không bảo toàn sẽ kế thừa sự trao đổi của một trong số các lớp này với lớp khác.

Một kiểu biến thể thay thế gồm thay thế một hoặc nhiều gốc vùng siêu biến của kháng thể bố mẹ (ví dụ kháng thể được làm tương thích với người hoặc kháng thể của người). Thông thường, (các) biến thể thu được được chọn để nghiên cứu tiếp sẽ có các cải biến (ví dụ, các cải tiến) về đặc tính sinh học nhất định (ví dụ, ái lực tăng, tính sinh miễn dịch giảm) so với kháng thể bố mẹ và/hoặc sẽ có về cơ bản là các đặc tính sinh học nhất định của kháng thể bố mẹ được giữ lại. Biến thể thay thế mẫu là kháng thể đã trưởng thành về ái lực, có thể được tạo ra thuận lợi, ví dụ, sử dụng kỹ thuật làm thuần thực ái lực dựa trên biểu hiện thực khuẩn thể như kỹ thuật được mô tả trong sáng chế. Nói ngắn gọn, một hoặc nhiều gốc HVR được gây đột biến và các kháng thể biến thể được biểu hiện trên thực khuẩn thể và được sàng lọc đối với hoạt tính sinh học cụ thể (ví dụ ái lực liên kết).

Các sửa đổi (ví dụ, đoạn thể) có thể được tạo ra trong các HVR, ví dụ, để cải thiện ái lực kháng thể. Các sửa đổi này có thể được tạo ra trong “điểm nóng” HVR tức là, các gốc được mã hóa bởi các codon đi qua quá trình gây đột biến ở tần suất cao trong suốt quá trình thuần thực tế bào sinh dưỡng (xem, ví dụ, Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)), và/hoặc các SDR (a-CDR), với biến thể VH hoặc VL thu được được kiểm tra ái lực liên kết. Quá trình thuần thực ái lực bằng cách tạo cấu trúc và tái chọn lọc từ thư viện bậc hai được mô tả, ví dụ, trong Hoogenboom et al.

trong *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) Theo một số phương án về quá trình thuần thực ái lực, sự đa dạng được đưa vào các gen biến đổi được chọn cho quá trình thuần thực bằng nhiều phương pháp khác nhau bất kỳ (ví dụ, PCR “úp sập sai hỏng”, xáo trộn chuỗi, hoặc gây đột biến định hướng oligonucleotit). Sau đó, thư viện bậc hai được tạo ra. Thư viện này sau đó được sàng lọc để nhận diện biến thể kháng thể bất kỳ với ái lực mong muốn. Các phương pháp khác để đưa sự đa dạng vào gồm các phương pháp định hướng HVR, trong đó một số gốc HVR (ví dụ, 4-6 gốc cùng lúc) được lấy ngẫu nhiên. Các gốc HVR được bao gồm trong liên kết kháng nguyên có thể được xác định cụ thể, ví dụ, sử dụng cơ chế gây đột biến quét alanin hoặc kiểu mẫu. CDR-H3 và CDR-L3 đặc biệt thường được nhắm đích.

Theo phương án nhất định, đoạn thể, đoạn cài xen, hoặc đoạn loại bỏ có thể xuất hiện trong một hoặc nhiều HVR miễn là các sửa đổi này về cơ bản là không làm giảm khả năng liên kết kháng thể này với kháng nguyên. Ví dụ, các sửa đổi bảo toàn (ví dụ, đoạn thể bảo toàn như được đề xuất theo sáng chế) về cơ bản là không làm giảm ái lực liên kết có thể được tạo ra trong HVR. Các sửa đổi này có thể nằm bên ngoài “điểm nóng” HVR hoặc SDR. Theo phương án nhất định của trình tự biến thể VH và VL đưa ra ở trên, mỗi HVR hoặc là chưa được sửa đổi, hoặc có không nhiều hơn một, hai hoặc ba đoạn thể axit amin.

Phương pháp hữu ích để nhận diện các gốc hoặc vùng của kháng thể mà có thể được nhắm đích để gây đột biến được gọi là "gây đột biến quét alanin" như được mô tả bởi Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Trong phương pháp này, gốc hoặc nhóm của các gốc đích (ví dụ, các gốc tích điện như arg, asp, his, lys, và glu) được nhận diện và được thay bằng axit amin trung tính hoặc tích điện âm (ví dụ, alanin hoặc polyalanin) để xác định xem tương tác của kháng thể này với kháng nguyên có bị ảnh hưởng không. Đoạn thể khác có thể được đưa vào ở vị trí axit amin chứng minh tính nhạy nhóm chức với đoạn thể ban đầu. Theo cách khác hoặc ngoài ra, cấu trúc tinh thể của phức kháng nguyên-kháng thể để xác định điểm tiếp xúc giữa kháng thể này và kháng nguyên. Các gốc tiếp xúc này và các gốc lân cận có thể được nhắm đích hoặc được loại bỏ như là các ứng cử viên cho đoạn thể. Biến thể có thể được sàng lọc để xác định xem chúng có mang các đặc tính mong muốn không.

Các đoạn cài xen trình tự axit amin gồm các dung hợp đầu tận amino và/hoặc đầu tận carboxyl sắp xếp theo chiều dài từ một gốc đến polypeptit chứa hàng trăm hoặc nhiều gốc hơn, cũng như đoạn cài xen trong trình tự của một hoặc nhiều gốc axit amin. Ví dụ về đoạn cài xen đầu tận gồm kháng thể có gốc methionyl đầu tận N. Biến thể đoạn cài xen khác của phân tử kháng thể này gồm thể dung hợp đầu tận N hoặc C của kháng thể này với enzym (ví dụ ADEPT) hoặc polypeptit mà làm tăng chu kỳ bán thải huyết thanh của kháng thể này.

Biến thể glycosyl hóa

Theo phương án nhất định, kháng thể được đề xuất theo sáng chế được sửa đổi để tăng hoặc giảm mức độ kháng thể này được glycosyl hóa. Việc chèn vào hoặc loại bỏ các vị trí glycosyl hóa ở kháng thể có thể được thực hiện thuận lợi bằng cách sửa đổi trình tự axit amin sao cho một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa được tạo ra hoặc được loại bỏ.

Trong trường hợp kháng thể này có chứa vùng Fc, hydrat cacbon được gắn với nó có thể được sửa đổi. Các kháng thể tự nhiên được tạo ra bởi tế bào động vật có vú thường chứa oligosacarit phân nhánh hai nhánh mà thường được gắn bởi liên kết N với Asn297 của miền CH2 của vùng Fc. Xem, ví dụ, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). Oligosacarit này có thể gồm các hydrat cacbon khác nhau, ví dụ, mannoza, N-acetyl glucosamin (GlcNAc), galactosa, và axit sialic, cũng như fucoza được gắn với GlcNAc trong “thân” của cấu trúc oligosacarit hai nhánh. Theo một số phương án, các cải biến của oligosacarit trong kháng thể theo sáng chế có thể được thực hiện để tạo ra biến thể kháng thể có các đặc tính được cải thiện nhất định.

Theo một phương án, biến thể kháng thể được đề xuất có cấu trúc hydrat cacbon mà không có fucoza được gắn (trực tiếp hoặc gián tiếp) với vùng Fc. Ví dụ, lượng fucoza trong kháng thể này có thể từ 1% đến 80%, từ 1% đến 65%, từ 5% đến 65% hoặc từ 20% đến 40%. Lượng fucoza được xác định bằng cách tính toán lượng fucoza trung bình trong chuỗi phân tử đường ở Asn297, so với tổng của tất cả các cấu trúc glycol được gắn với Asn 297 (ví dụ phức, cấu trúc lai và cấu trúc mannoza cao) như được đo bởi khối phổ kế MALDI-TOF, như được mô tả trong WO 2008/077546, ví dụ. Asn297 chỉ gốc asparagin nằm ở khoảng vị trí 297 trong vùng Fc (đánh số Eu của các gốc vùng Fc); tuy nhiên, Asn297 có thể còn nằm ở khoảng ± 3 axit amin ngược

chiều hoặc xuôi chiều so với vị trí 297, tức là, giữa các vị trí 294 và 300, do các thay đổi trình tự tối thiểu trong các kháng thể. Biến thể fucosyl hóa này có thể có chức năng ADCC được cải thiện. Xem, ví dụ, công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Ví dụ về các công bố liên quan đến biến thể kháng thể “được defucosyl hóa” hoặc “thiếu fucoza” gồm: công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Ví dụ về các dòng tế bào có khả năng sản xuất các kháng thể defucosyl hóa gồm tế bào Lec13 CHO khiếm khuyết quá trình fucosyl hóa protein (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); đơn sáng chế Mỹ số US 2003/0157108 A1, Presta, L; và WO 2004/056312 A1, Adams et al., đặc biệt là ở Ví dụ 11), và dòng tế bào bị bất hoạt gen, như gen alpha-1,6-fucosyltransferaza, FUT8, tế bào CHO bị bất hoạt gen (xem, ví dụ, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); và WO2003/085107).

Các biến thể kháng thể được đề xuất thêm là có các oligosacarit được cắt đôi, ví dụ, trong đó oligosacarit hai nhánh được gắn với vùng Fc của kháng thể này được cắt đôi bởi GlcNAc. Biến thể kháng thể này có thể có quá trình fucosyl hóa giảm đi và/hoặc chức năng ADCC được cải thiện. Ví dụ về biến thể kháng thể này được mô tả, ví dụ, trong WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); patent Mỹ số US 6,602,684 (Umana et al.); và US 2005/0123546 (Umana et al.). Biến thể kháng thể có ít nhất một gốc galactoza trong oligosacarit được gắn với vùng Fc cũng được đề xuất. Biến thể kháng thể này có thể có chức năng CDC được cải thiện. Biến thể kháng thể này được mô tả, ví dụ, trong WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); và WO 1999/22764 (Raju, S.).

Biến thể vùng Fc

Theo phương án nhất định, một hoặc nhiều cải biến axit amin của thể được đưa vào vùng Fc của kháng thể được đề xuất theo sáng chế, nhờ đó tạo ra biến thể vùng Fc. Biến thể vùng Fc này có thể gồm trình tự vùng Fc của người (ví dụ, vùng Fc IgG1,

IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người) có chứa cải biến axit amin (ví dụ, thay thế) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin.

Theo phương án nhất định, sáng chế tính đến biến thể kháng thể có một số nhưng không phải là tất cả các chức năng tác động, làm cho nó trở thành ứng cử viên mong đợi cho các ứng dụng trong đó chu kỳ bán rã của kháng thể *in vivo* là quan trọng tuy nhiên chức năng tác động nhất định (như thực hiện và ADCC) là không cần thiết hoặc gây hại. Thử nghiệm độc tính tế bào *in vitro* và/hoặc *in vivo* có thể được thực hiện để chắc chắn về sự giảm/giảm bớt hoạt tính CDC và/hoặc ADCC. Ví dụ, thử nghiệm liên kết thụ thể Fc (FcR) có thể được thực hiện để đảm bảo rằng kháng thể này không có liên kết FcγR (do đó có thể không có hoạt tính ADCC), nhưng giữ lại khả năng liên kết FcRn. Tế bào nguyên sinh để điều biến ADCC, tế bào NK, chỉ biểu hiện Fc(RIII, trong khi đó các đơn bào biểu hiện cả Fc(RI, Fc(RII và Fc(RIII. Sự biểu hiện FcR trên tế bào tạo máu được tổng kết trong Bảng 3 ở trang 464 của tài liệu Ravetch và Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Ví dụ không giới hạn về các thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm được mô tả trong US 5,500,362 (xem, ví dụ Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) và Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (xem Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Theo cách khác, các phương pháp thử nghiệm không hoạt tính phóng xạ có thể được sử dụng (xem, ví dụ, thử nghiệm độc tính tế bào không có hoạt tính phóng xạ ACTITM với máy đếm tế bào (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; và thử nghiệm độc tính tế bào không có hoạt tính phóng xạ CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Tế bào tác động hữu ích cho các thử nghiệm này gồm tế bào đơn nhân máu ngoại biên (peripheral blood mononuclear cell - PBMC) và tế bào giết tự nhiên (Natural Killer - NK). Theo cách khác hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, ở mẫu động vật như được bộc lộ trong Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). Thử nghiệm liên kết C1q có thể còn được tiến hành để đảm bảo rằng kháng thể này không thể liên kết C1q và do đó không có hoạt tính CDC. Xem, ví dụ, thử nghiệm ELISA liên kết C1q và C3c trong WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá sự hoạt hóa bổ sung, thử nghiệm CDC có thể được thực hiện (xem, ví dụ, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); và Cragg, M.S. và M.J. Glennie,

Blood 103:2738-2743 (2004)). Liên kết FcRn và các xác định độ thanh thải/chu kỳ bán thải *in vivo* còn có thể được thực hiện sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực (xem, ví dụ, Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

Các kháng thể có chức năng tác động bị giảm đi gồm các kháng thể có đoạn thể của một hoặc nhiều gốc vùng Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (US 6,737,056). Các thể đột biến Fc này gồm thể đột biến Fc với đoạn thể ở hai hoặc nhiều vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, gồm cái được gọi là thể đột biến Fc "DANA" với đoạn thể của các gốc 265 và 297 với alanin (US 7,332,581).

Biến thể kháng thể nhất định có liên kết với FcR được cải thiện hoặc bị giảm bớt được mô tả. (Xem, ví dụ, patent Mỹ số US 6,737,056; WO 2004/056312, và Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).)

Theo phương án nhất định, biến thể kháng thể có chứa vùng Fc có một hoặc nhiều đoạn thể axit amin mà cải thiện ADCC, ví dụ, đoạn thể ở vị trí 298, 333 và/hoặc 334 của vùng Fc (đánh số các gốc theo EU).

Theo một số phương án, các sửa đổi được thực hiện trong vùng Fc mà tạo ra liên kết C1q và/hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC) được sửa đổi (tức là, hoặc được cải thiện hoặc bị giảm bớt), ví dụ, như được mô tả trong patent Mỹ số US 6,194,551, WO 99/51642, và Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Các kháng thể có chu kỳ bán rã tăng và liên kết với thụ thể Fc mới sinh (FcRn) được cải thiện, mà chịu trách nhiệm vận chuyển các IgG từ mẹ sang bào thai (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) và Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), được mô tả trong US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Các kháng thể này chứa vùng Fc với một hoặc nhiều đoạn thể trong đó mà cải thiện liên kết của vùng Fc với FcRn. Biến thể Fc này gồm các biến thể có đoạn thể ở một hoặc nhiều gốc vùng Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 hoặc 434, ví dụ, đoạn thể của gốc 434 vùng Fc (US 7,371,826).

Xem thêm Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); patent Mỹ số US 5,648,260; US 5,624,821; và WO 94/29351 về ví dụ khác của biến thể vùng Fc.

Biến thể kháng thể được thiết kế xystein

Theo phương án nhất định, có thể mong muốn tạo ra các kháng thể được thiết kế xystein, ví dụ, “thioMAb” trong đó một hoặc nhiều gốc của kháng thể được thay thế bằng các gốc xystein. Theo phương án cụ thể, các gốc được thay thế xuất hiện ở các vị trí có thể tới được của kháng thể này. Bằng cách thay thế các gốc này bằng xystein, nhóm thiol phản ứng nhờ đó được đặt ở vị trí có thể tới được của kháng thể này và có thể được sử dụng để tiếp hợp kháng thể này với các gốc khác, như các gốc thuốc hoặc các gốc chất liên kết-thuốc, để tạo ra tiếp hợp miễn dịch, như được mô tả trong sáng chế. Theo phương án nhất định, bất kỳ một hoặc nhiều gốc dưới đây có thể được thay thế bằng xystein: V205 (đánh số Kabat) của chuỗi nhẹ; A118 (đánh số EU) của chuỗi nặng; và S400 (đánh số EU) của chuỗi nặng vùng Fc. Các kháng thể được thiết kế xystein có thể được tạo ra như được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số US 7,521,541.

Dẫn xuất kháng thể

Theo phương án nhất định, kháng thể được đề xuất theo sáng chế có thể được cải biến thêm để chứa các gốc không phải protein bổ sung mà đã biết trong lĩnh vực và có trên thị trường. Các gốc thích hợp để tạo dẫn xuất của kháng thể này gồm, nhưng không giới hạn ở, polyme tan được trong nước. Ví dụ không giới hạn về polyme tan được trong nước gồm, nhưng không giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymetylxenluloza, dextran, rượu polyvinyllic, polyvinyl pyrrolidon, poly-1, 3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme etylen/anhydrit maleic, poly axit amin (homopolyme hoặc copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrrolidon)polyetylen glycol, propylen glycol homopolyme, propylen oxit/etylen oxit copolyme, các polyol polyoxyetyl hóa (ví dụ, glyxerol), rượu polyvinyllic, và hỗn hợp của nó. Polyetylen glycol propionaldehyd có thể có các ưu điểm trong sản xuất do tính ổn định của nó trong nước. Polyme này có thể có khối lượng phân tử bất kỳ, và có thể được phân nhánh hoặc không phân nhánh. Số lượng các polyme được gắn với kháng thể này có thể thay đổi, và nếu nhiều hơn một polyme được gắn, chúng có thể là các phân tử giống hoặc khác nhau. Thông thường, số lượng và/hoặc loại polyme được sử dụng để tạo dẫn xuất có thể được xác định dựa trên các xem xét gồm, nhưng không giới hạn ở, đặc tính hoặc chức năng cụ thể của kháng thể cần được cải thiện, dù dẫn xuất kháng thể này có được sử dụng trong liệu pháp cho tình trạng bệnh xác định hay không, v.v.

Theo phương án khác, các tiếp hợp của kháng thể và gốc phi protein mà có thể được làm nóng chọn lọc bằng cách phơi phóng xạ được đề xuất. Theo một phương án, gốc phi protein là ống nano cacbon (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)). Phóng xạ có thể có bước sóng bất kỳ, và gồm, nhưng không giới hạn ở, các bước sóng không làm hại đến tế bào bình thường, nhưng làm nóng gốc phi protein đến nhiệt độ ở đó tế bào gắn với gốc kháng thể-phi protein bị bất hoạt.

Các phương pháp tái tổ hợp và hợp phân

Các kháng thể có thể được tạo ra sử dụng các phương pháp tái tổ hợp và hợp phân, ví dụ, như được mô tả trong US 4,816,567. Theo một phương án, axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể kháng FGFR1 được mô tả trong sáng chế được đề xuất. Axit nucleic này có thể mã hóa trình tự axit amin của chứa VL và/hoặc trình tự axit amin của chứa VH của kháng thể này (ví dụ, chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể này). Theo phương án khác, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều vector (ví dụ, vector biểu hiện) có chứa axit nucleic này. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào chủ có chứa axit nucleic này. Theo phương án này, tế bào chủ có chứa (ví dụ, được biến nạp với): (1) vector có chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của chứa VL của kháng thể này và trình tự axit amin của chứa VH của kháng thể này, hoặc (2) vector thứ nhất có chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của chứa VL của kháng thể này và vector thứ hai có chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của chứa VH của kháng thể này. Theo một phương án, tế bào chủ này là tế bào nhân điển hình, ví dụ tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) hoặc tế bào bạch huyết (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20). Theo một phương án, phương pháp tạo kháng thể kháng FGFR1 được đề xuất, trong đó phương pháp này có chứa môi trường nuôi cấy tế bào chủ có chứa axit nucleic mã hóa kháng thể này, như được đưa ra ở trên, trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể này, và tùy ý khôi phục kháng thể này từ tế bào chủ này (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chủ).

Để sản xuất tái tổ hợp kháng thể kháng FGFR1, axit nucleic mã hóa kháng thể, ví dụ, như được mô tả ở trên, được phân lập và được cài xen một hoặc nhiều vector để tách dòng thêm và/hoặc biểu hiện trong tế bào chủ. Axit nucleic này có thể được phân lập dễ dàng và được lập trình tự sử dụng các quy trình truyền thống (ví dụ, bằng cách sử dụng các đoạn dò oligonucleotit mà có khả năng liên kết đặc hiệu với các gen mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể này).

Tế bào chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện vector mã hóa kháng thể gồm tế bào không nhân hoặc tế bào nhân điển hình được mô tả trong sáng chế. Ví dụ, các kháng thể có thể được tạo ra trong vi khuẩn, đặc biệt là khi glycosyl hóa và chức năng tác động Fc là không cần thiết. Để biểu hiện mảnh kháng thể và polypeptit trong vi khuẩn, xem, ví dụ, US 5,648,237, 5,789,199, và 5,840,523. (Xem thêm Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, mô tả biểu hiện của mảnh kháng thể trong *E. coli*). Sau khi biểu hiện, kháng thể này có thể được phân lập từ dịch sệt tế bào vi khuẩn trong phân đoạn hòa tan và có thể được tinh sạch thêm.

Ngoài vi khuẩn tế bào không nhân, tế bào nhân điển hình như nấm sợi hoặc nấm men là thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện vật chủ đối với vector mã hóa kháng thể, gồm các chủng nấm và nấm men mà con đường glycosyl hóa của nó “được làm tương thích với người” dẫn đến việc tạo ra kháng thể có kiểu glycosyl hóa một phần hoặc hoàn toàn của người. Xem Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), và Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Tế bào chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể glycosyl hóa còn thu được từ các sinh vật đa bào (động vật không xương sống và động vật có xương sống). Ví dụ về tế bào động vật không xương sống gồm tế bào cây và côn trùng. Nhiều chủng baculovirus đã được nhận diện mà có thể được sử dụng kết hợp với tế bào côn trùng, đặc biệt là để biến nạp tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Môi trường nuôi cấy tế bào cây cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, và 6,417,429 (mô tả kỹ thuật PLANTIBODIES™ để tạo ra các kháng thể trong cây chuyển gen).

Tế bào động vật có xương sống cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, dòng tế bào động vật có vú được làm cho phù hợp để phát triển trong dịch huyền phù có thể là hữu ích. Ví dụ khác về dòng tế bào chủ động vật có vú hữu ích là dòng CV1 thận khỉ được biến nạp bởi SV40 (COS-7); dòng thận phôi của người (293 hoặc tế bào 293 như được mô tả, ví dụ, trong Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); tế bào thận chuột đồng con (BHK); tế bào sertoli của chuột (tế bào TM4 như được mô tả, ví dụ, trong Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); tế bào thận khỉ (CV1); tế bào thận khỉ xanh châu Phi (VERO-76); tế bào ung thư cổ tử cung của người (HELA); tế

bào thận chó (MDCK; tế bào gan chuột buffalo (BRL 3A); tế bào phổi của người (W138); tế bào gan của người (Hep G2); u vú của chuột (MMT 060562); tế bào TRI, như được mô tả, ví dụ, trong Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); tế bào MRC 5; và tế bào FS4. Các dòng tế bào chủ của động vật có vú hữu ích khác gồm tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), gồm tế bào DHFR⁻ CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); và dòng tế bào u tủy như Y0, NS0 và Sp2/0. Để đánh giá dòng tế bào chủ động vật có vú nhất định thích hợp để sản xuất kháng thể, xem, ví dụ, Yazaki và Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

Thử nghiệm

Các kháng thể kháng FGFR1 được đề xuất theo sáng chế có thể được nhận diện, được sàng lọc, hoặc được đặc trưng bởi các tính chất vật lý/hóa học của chúng và/hoặc các hoạt tính sinh học bằng các thử nghiệm khác nhau đã biết trong lĩnh vực.

1. Thử nghiệm liên kết và các thử nghiệm khác

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế được kiểm tra hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó, ví dụ, bằng các phương pháp đã biết như ELISA, thẩm tách Western, v.v..

2. Thử nghiệm hoạt tính

Theo một khía cạnh, các thử nghiệm được đề xuất để nhận diện các kháng thể kháng FGFR1 của nó mà có hoạt tính chủ vận. Ví dụ, hoạt tính sinh học có thể gồm khả năng hoạt hóa sự dẫn truyền tín hiệu của các con đường cụ thể mà có thể được đo, ví dụ, bằng cách xác định hàm lượng của phospho-FRS2a, phospho-MEK, phospho-ERK/MAPK, phospho-STAT3 hoặc sử dụng thử nghiệm luxiferaza dựa trên GAL-Elk1 được mô tả trong sáng chế (xem thêm, ví dụ, Wu et al. *J. Biol. Chem.* 5;282(40):29069-72 (2007) và Wu et al. *PLoS One* 18;6(3):e17868 (2011)). Các kháng thể có hoạt tính sinh học *in vivo* và/hoặc *in vitro* cũng được đề xuất.

Tiếp hợp miễn dịch

Sáng chế còn đề xuất tiếp hợp miễn dịch có chứa kháng thể kháng FGFR1 theo sáng chế được tiếp hợp với một hoặc nhiều chất gây độc tế bào, như chất hóa trị liệu hoặc thuốc, chất ức chế sự phát triển, độc tố (ví dụ, độc tố protein, độc tố có hoạt tính

enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật, hoặc đoạn của nó), hoặc chất đồng vị phóng xạ.

Theo một phương án, tiếp hợp miễn dịch là thể tiếp hợp kháng thể-thuốc (ADC) trong đó kháng thể được tiếp hợp với một hoặc nhiều thuốc, gồm, nhưng không giới hạn ở, maytansinoid (xem patent Mỹ số US 5,208,020, US 5,416,064 và patent châu Âu số EP 0 425 235 B1); auristatin như các gốc thuốc monomethylauristatin DE và DF (MMAE và MMAF) (xem patent Mỹ số US 5,635,483, US 5,780,588, và US 7,498,298); dolastatin; calicheamicin hoặc dẫn xuất của nó (xem patent Mỹ số US 5,712,374, US 5,714,586, US 5,739,116, US 5,767,285, US 5,770,701, US 5,770,710, US 5,773,001 và US 5,877,296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); và Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); anthracyclin như daunomycin hoặc doxorubicin (xem Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); và patent Mỹ số US 6,630,579); methotrexat; vindesin; taxan như docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, và ortataxel; trichothecen; và CC1065.

Theo phương án khác, thể tiếp hợp miễn dịch có chứa kháng thể như được mô tả trong sáng chế được tiếp hợp với độc tố có hoạt tính enzym hoặc đoạn của nó, gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh bạch hầu chuỗi A, các đoạn có hoạt tính phi liên kết của độc tố bệnh bạch hầu, exotoxin chuỗi A (từ *Pseudomonas aeruginosa*), rixin chuỗi A, abrin chuỗi A, modecxin chuỗi A, alpha-sarxin, protein *Aleurites fordii*, protein dianthin, protein *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curcin, crocin, chất ức chế *saponaria officinalis*, gelonin, mitogellin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin, và các hợp chất trichothecen.

Theo phương án khác, thể tiếp hợp miễn dịch có chứa kháng thể như được mô tả trong sáng chế được tiếp hợp với nguyên tử phóng xạ để tạo thành tiếp hợp phóng xạ. Nhiều chất đồng vị phóng xạ là có sẵn để tạo ra các tiếp hợp phóng xạ. Ví dụ gồm At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} và các chất đồng vị phóng xạ của Lu. Khi tiếp hợp phóng xạ này được sử dụng để dò, nó có thể gồm nguyên tử phóng xạ để nghiên cứu ảnh nhận phóng xạ, ví dụ ^{99m}Tc hoặc I^{123} , hoặc nhãn xoay

để chụp ảnh cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (còn được gọi là chụp ảnh cộng hưởng từ, mri), như iot-123, iot-131, indi-111, flo-19, cacbon-13, nitơ-15, oxy-17, gadolin, mangan hoặc sắt.

Việc tiếp hợp của kháng thể và chất gây độc tế bào có thể được thực hiện sử dụng chất ghép cặp protein hai chức năng như N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), dẫn xuất hai chức năng của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), este hoạt tính (như disuccinimidyl suberat), aldehyt (như glutaraldehyt), hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexandiamin), dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendiamin), diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và hợp chất flo hoạt tính kép (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được điều chế như được mô tả trong Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminpentaaxetic (MX-DTPA) được đánh dấu cacbon-14 là chất kìm hóa mẫu để tiếp hợp nucleotit phóng xạ với kháng thể này. Xem WO94/11026. Chất liên kết có thể là “chất liên kết phân cắt được” tạo thuận lợi cho việc giải phóng thuốc gây độc tế bào trong tế bào. Ví dụ, chất liên kết axit không bền, chất liên kết nhạy với peptidaza, chất liên kết không bền với ánh sáng, chất liên kết dimetyl hoặc chất liên kết chứa disulfua (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); patent Mỹ số US 5,208,020) có thể được sử dụng.

Thể tiếp hợp miễn dịch hoặc ADC theo sáng chế tính đến rõ ràng, nhưng không giới hạn ở, các thể tiếp hợp được điều chế với chất phản ứng liên kết chéo gồm, nhưng không giới hạn ở, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (succinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) mà có trên thị trường (ví dụ, từ Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., Mỹ).

Các phương pháp và hợp phần để chẩn đoán và phát hiện

Theo phương án nhất định, các kháng thể kháng FGFR1 bất kỳ được đề xuất theo sáng chế là hữu ích để phát hiện ra sự có mặt của FGFR1 trong mẫu sinh học. Thuật ngữ “phát hiện ra” theo sáng chế gồm phát hiện về số lượng hoặc chất lượng. Theo

phương án nhất định, mẫu sinh học có chứa tế bào hoặc mô, như mô mỡ nâu, mô tụy, mô gan, mô mỡ trắng và mô khối u.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR1 để sử dụng trong phương pháp chẩn đoán hoặc phát hiện. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của FGFR1 trong mẫu sinh học. Theo phương án nhất định, phương pháp này gồm bước cho mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể kháng FGFR1 như được mô tả trong sáng chế trong các điều kiện cho phép kháng thể kháng FGFR1 liên kết với FGFR1, và phát hiện xem phức có được tạo thành giữa kháng thể kháng FGFR1 và FGFR1 không. Phương pháp này có thể là phương pháp *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một phương án, kháng thể kháng FGFR1 được sử dụng để chọn đối tượng thích hợp cho liệu pháp với kháng thể kháng FGFR1, ví dụ trong đó FGFR1 là chất đánh dấu sinh học để chọn lọc bệnh nhân.

Theo phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng FGFR1 được đánh dấu. Các nhãn gồm, nhưng không giới hạn ở, nhãn hoặc các gốc được phát hiện trực tiếp (như nhãn huỳnh quang, nhãn mang màu, nhãn cô đặc điện tử, nhãn điện hóa phát quang, và nhãn phóng xạ), cũng như các gốc, như enzym hoặc phối tử, mà được phát hiện gián tiếp, ví dụ, qua phản ứng enzym hoặc tương tác phân tử. Các nhãn mẫu gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đồng vị phóng xạ ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , và ^{131}I , chất phát huỳnh quang như chelat đất hiếm hoặc fluorescein và dẫn xuất của nó, rhodamin và dẫn xuất của nó, dansyl, umbelliferon, luciferaza, ví dụ, luxiferaza của đom đóm và luxiferaza của vi khuẩn (patent Mỹ số US 4,737,456), luciferin, 2,3-dihydrophthalazindion, peroxidaza của cây cải ngựa (HRP), phosphataza kiềm, β -galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, sacarit oxidaza, ví dụ, glucoza oxidaza, galactoza oxidaza, và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza, các oxidaza dị vòng như uricaza và xanthin oxidaza, được ghép cặp với enzym mà sử dụng hydro peroxit để oxy hóa chất nhuộm tiền thân như HRP, lactoperoxidaza, hoặc microperoxidaza, biotin/avidin, nhãn xoay, nhãn thực khuẩn thể vi khuẩn, các gốc tự do ổn định, và các chất tương tự.

Dược phẩm

Dược phẩm của kháng thể kháng FGFR1 như được mô tả trong sáng chế được điều chế bằng cách trộn các kháng thể có độ tinh khiết mong muốn với một hoặc nhiều

chất mang được dụng tùy ý (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), ở dạng chế phẩm được làm đông khô hoặc dung dịch gốc nước. Chất mang được dụng thường là không gây độc đối với đối tượng nhận ở liều lượng và nồng độ được sử dụng, và gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxy hóa gồm axit ascorbic và methionin; chất bảo quản (như octadexyldimethylbenzyl amoni clorua; hexameton clorua; benzalkoni clorua; benzethonium clorua; phenol, rượu butylic hoặc rượu benzylic; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); polypeptit khối lượng phân tử thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); protein, như huyết thanh albumin, gelatin, hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidon; axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; monosacarit, disacarit, và các hydrat cacbon khác gồm glucoza, mannoza, hoặc dextrin; chất chelat như EDTA; các đường như sucroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; các ion đối tạo thành muối như natri; phức kim loại (ví dụ phức Zn-protein); và/hoặc chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Chất mang được dụng được lấy làm ví dụ theo sáng chế còn gồm chất phân tán thuốc qua khe như các glycoprotein hyaluronidaza hoạt tính trung tính tan được (sHASEGP), ví dụ, glycoprotein hyaluronidaza PH-20 tan được của người, như rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Các sHASEGP mẫu và các phương pháp sử dụng nhất định, gồm rHuPH20, được mô tả trong công bố đơn sáng chế số US 2005/0260186 và US 2006/0104968. Theo một khía cạnh, sHASEGP được kết hợp với một hoặc nhiều glycosaminoglycanaza như chondroitinaza bổ sung.

Chế phẩm kháng thể đông khô được lấy ví dụ được mô tả trong patent Mỹ số US 6,267,958. Chế phẩm kháng thể gốc nước gồm các chế phẩm được mô tả trong patent Mỹ số US 6,171,586 và WO2006/044908, chế phẩm sau chứa đệm histidin-axetat.

Chế phẩm theo sáng chế có thể còn chứa nhiều hơn một thành phần hoạt tính khi cần thiết cho chỉ định điều trị cụ thể, tốt hơn là thành phần này có các hoạt tính bổ sung mà không tác động bất lợi đến nhau. Ví dụ, có thể mong muốn cung cấp thêm chất tương tự glp-1, amylin tổng hợp, chất đối kháng thụ thể glucagon (ví dụ kháng thể kháng GCGR), hoặc leptin. Thành phần hoạt tính này có mặt thích hợp trong hỗn hợp ở lượng hữu hiệu cho mục đích dự tính.

Thành phần hoạt tính có thể được nhốt trong các vi nang được điều chế, ví dụ, bằng kỹ thuật giọt tụ hoặc bằng polyme hóa bề mặt chung, ví dụ, hydroxymethylxenuloza hoặc vi nang gelatin và vi nang poly-(metylmetylacrylat), theo thứ tự, trong hệ thống phân phối thuốc dạng keo (ví dụ, liposom, vi cầu albumin, vi nhũ tương, các hạt nano và nang nano) hoặc trong các nhũ tương phân tử lớn. Các kỹ thuật này được bộc lộ trong Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Các chế phẩm giải phóng kéo dài có thể được điều chế. Ví dụ thích hợp về chế phẩm giải phóng kéo dài gồm các chất nền bán thấm của các polyme rắn kỵ nước chứa kháng thể này, các chất nền này là ở dạng các vật được tạo hình, ví dụ bao phim, hoặc vi nang.

Các chế phẩm được sử dụng để sử dụng *in vivo* thường vô trùng. Việc làm vô trùng có thể được thực hiện dễ dàng, ví dụ, bằng lọc qua màng lọc vô trùng.

Các phương pháp trị liệu và hợp phần

Các kháng thể kháng FGFR1 chủ vận bất kỳ được đề xuất theo sáng chế có thể được sử dụng trong các phương pháp trị liệu.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR1 chủ vận để dùng làm thuốc chữa bệnh. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR1 chủ vận để sử dụng trong điều trị bệnh chuyển hóa. Theo phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR1 chủ vận để sử dụng trong phương pháp điều trị. Theo phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR1 chủ vận để sử dụng trong phương pháp điều trị cá thể có bệnh chuyển hóa gồm bước cho cá thể sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FGFR1. Theo một phương án này, phương pháp này còn gồm bước cho cá thể sử dụng lượng hữu hiệu của ít nhất là một chất trị liệu bổ sung, ví dụ, chất tương tự gip-1, amylin tổng hợp, chất đối kháng thụ thể glucagon (ví dụ kháng thể kháng GCGR), hoặc leptin. “Cá thể” theo phương án bất kỳ ở trên tốt hơn là người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể kháng FGFR1 chủ vận trong việc sản xuất hoặc điều chế thuốc chữa bệnh. Theo một phương án, thuốc chữa bệnh này là để điều trị bệnh chuyển hóa. Theo phương án khác, thuốc chữa bệnh này để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh chuyển hóa gồm bước cho cá thể có

bệnh sử dụng lượng hữu hiệu của thuốc chữa bệnh này. Theo phương án này, phương pháp này còn gồm bước cho cá thể sử dụng lượng hữu hiệu của ít nhất là một chất trị liệu bổ sung, ví dụ, như được mô tả bên dưới. “Cá thể” theo phương án bất kỳ ở trên tốt hơn là người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh chuyển hóa. Theo một phương án, phương pháp này gồm bước cho cá thể có bệnh chuyển hóa sử dụng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FGFR1 chủ vận. Theo phương án này, phương pháp này còn gồm cho cá thể sử dụng lượng hữu hiệu của ít nhất là một chất trị liệu bổ sung, như được mô tả bên dưới. “Cá thể” theo phương án bất kỳ ở trên tốt hơn là người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm có chứa các kháng thể kháng FGFR1 chủ vận bất kỳ được đề xuất theo sáng chế, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp trị liệu bất kỳ. Theo một phương án, được phẩm có chứa các kháng thể kháng FGFR1 chủ vận bất kỳ được đề xuất theo sáng chế và chất mang được dụng. Theo phương án khác, được phẩm có chứa các kháng thể kháng FGFR1 chủ vận bất kỳ được đề xuất theo sáng chế và ít nhất là một chất trị liệu bổ sung, ví dụ, như được mô tả bên dưới.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng một mình hoặc trong hỗn hợp với các chất khác trong liệu pháp. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng đồng thời với ít nhất là một chất trị liệu bổ sung. Theo phương án nhất định, chất trị liệu bổ sung là chất tương tự glp-1, amylin tổng hợp, chất đối kháng thụ thể glucagon (ví dụ kháng thể kháng GCGR), hoặc leptin.

Các liệu pháp hỗn hợp được lưu ý ở trên bao gồm việc sử dụng kết hợp (trong đó hai hoặc nhiều chất trị liệu được bao gồm trong cùng chế phẩm hoặc từng chế phẩm riêng biệt), và sử dụng riêng, trong trường hợp này, việc sử dụng kháng thể theo sáng chế có thể xảy ra trước, đồng thời, và/hoặc sau, việc sử dụng chất trị liệu và/hoặc tá được bổ sung.

Kháng thể theo sáng chế (và chất trị liệu bổ sung bất kỳ) có thể được sử dụng bằng phương tiện thích hợp bất kỳ, gồm sử dụng qua đường ngoài ruột, trong phổi, và trong mũi, và, nếu mong muốn để điều trị tại chỗ, dùng ở trong thương tổn. Truyền ngoài ruột gồm trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong bụng, hoặc dưới da.

Việc định liều lượng có thể bằng con đường thích hợp bất kỳ, ví dụ bằng cách tiêm, như tiêm tĩnh mạch hoặc dưới da, phụ thuộc một phần vào việc sử dụng này là ngắn hoặc kéo dài. Các kế hoạch định lượng khác nhau gồm, nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều lần đưa vào qua các thời điểm khác nhau, sử dụng viên thuốc to, và truyền mạch được tính đến theo sáng chế.

Các kháng thể theo sáng chế sẽ được tạo chế phẩm, định liều lượng, và được sử dụng theo cách phù hợp với thực tiễn y học. Các yếu tố để xem xét trong bối cảnh này gồm các rối loạn cụ thể được điều trị, động vật có vú cụ thể được điều trị, tình trạng bệnh lâm sàng của cá thể bệnh nhân, nguyên nhân rối loạn, vị trí phân phối chất, phương pháp sử dụng, kế hoạch sử dụng, và các yếu tố khác đã biết với những người thực hành y học. Kháng thể này không cần, nhưng tùy ý được tạo chế phẩm với một hoặc nhiều chất đang được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn nghi ngờ. Lượng hữu hiệu của các chất khác này phụ thuộc vào lượng kháng thể có mặt trong chế phẩm, kiểu rối loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác được thảo luận ở trên. Các chất này thường được sử dụng ở các liều lượng giống nhau và có các con đường sử dụng như được mô tả trong sáng chế, hoặc khoảng từ 1 đến 99% liều lượng được mô tả trong sáng chế, hoặc ở liều lượng bất kỳ và bằng con đường bất kỳ mà được xác định theo kinh nghiệm/lâm sàng là thích hợp.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng kháng thể theo sáng chế thích hợp (khi được sử dụng một mình hoặc trong hỗn hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung khác) sẽ phụ thuộc vào kiểu bệnh cần được điều trị, loại kháng thể, mức độ nghiêm trọng và tiến trình bệnh, dù kháng thể này được sử dụng cho mục đích ngăn ngừa hoặc trị liệu, liệu pháp trước đó, tiểu sử bệnh của bệnh nhân và đáp ứng với kháng thể này, và suy xét của thầy thuốc. Kháng thể này được sử dụng thích hợp cho bệnh nhân trong một lần điều trị hoặc qua nhiều lần điều trị. Phụ thuộc vào loại bệnh và mức độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng từ 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 15 mg/kg (ví dụ 0,1 mg/kg -10 mg/kg) của kháng thể có thể là liều lượng ứng cử để sử dụng cho bệnh nhân, dù, ví dụ, bằng một hoặc nhiều lần sử dụng riêng biệt, hoặc bằng cách truyền liên tục. Một liều lượng hàng ngày điển hình có thể nằm trong khoảng từ 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 100 mg/kg hoặc nhiều hơn, phụ thuộc vào các yếu tố được nêu ở trên. Đối với các sử dụng lặp lại trong vài ngày hoặc lâu hơn, phụ thuộc vào tình trạng bệnh, việc điều trị thường được duy trì cho đến khi có sự ức chế mong muốn việc xuất hiện triệu chứng bệnh. Một liều

lượng làm mẫu của kháng thể này nằm trong khoảng từ 0,05 mg/kg đến 10 mg/kg. Do đó, một hoặc nhiều liều lượng gồm khoảng 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg hoặc 10 mg/kg (hoặc hỗn hợp bất kỳ của nó) có thể được sử dụng cho bệnh nhân. Liều lượng này có thể được sử dụng không liên tục, ví dụ hàng tuần hoặc ba tuần một (ví dụ sao cho bệnh nhân nhận từ khoảng hai đến hai mươi, hoặc ví dụ khoảng sáu liều lượng của kháng thể này). Liều tải cao hơn ban đầu, sau đó là một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể được sử dụng. Tuy nhiên, các chế độ liều lượng khác có thể cũng hữu ích. Tiến triển của liệu pháp này được giám sát dễ dàng bằng các kỹ thuật và thử nghiệm thông thường.

Vật phẩm

Theo khía cạnh khác theo sáng chế, vật phẩm gồm các vật dụng hữu ích cho việc điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn được mô tả ở trên được đề xuất. Vật phẩm gồm vật đựng và nhãn hoặc giấy hướng dẫn sử dụng ở trên hoặc đi kèm với vật đựng. Vật đựng thích hợp gồm, ví dụ, chai, lọ, xylanh, túi dung dịch IV, v.v. Vật đựng có thể được tạo ra từ nhiều vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc nhựa. Vật đựng chứa hợp phần một mình nó hoặc được kết hợp với hợp phần khác có hiệu quả điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh và có thể có đầu vào vô trùng (ví dụ vật đựng có thể là túi dung dịch trong tĩnh mạch hoặc lọ có nút đậy kín được bởi kim tiêm dưới da). Ít nhất là một chất hoạt tính trong hợp phần là kháng thể theo sáng chế. Nhãn hoặc giấy hướng dẫn sử dụng chỉ ra hợp phần được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh được chọn. Ngoài ra, vật phẩm có thể gồm (a) vật đựng thứ nhất có chứa hợp phần bên trong, trong đó hợp phần này có chứa kháng thể theo sáng chế; và (b) vật đựng thứ hai có hợp phần bên trong, trong đó hợp phần này có chứa chất gây độc tế bào hoặc chất trị liệu khác. Vật phẩm theo phương án này của sáng chế có thể còn gồm giấy hướng dẫn sử dụng chỉ định hợp phần có thể được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh cụ thể. Theo cách khác hoặc ngoài ra, vật phẩm có thể còn gồm vật đựng thứ hai (hoặc thứ ba) có chứa chất đệm được dụng, như nước kim hãm vi khuẩn để tiêm (BWFI), nước muối biển được đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó có thể còn gồm các vật dụng khác mong muốn có trên thị trường và theo quan điểm của người sử dụng, gồm các chất đệm, chất pha loãng, bộ lọc, kim tiêm, và xy lanh khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây là ví dụ về các phương pháp và hợp phần theo sáng chế. Được hiểu rằng các phương án khác có thể được thực hiện, dựa vào phần mô tả chung được đưa ra ở trên.

Ví dụ 1. Tạo ra và mô tả đặc điểm các kháng thể chủ vận kháng FGFR1.

Tiến hành tạo ra các kháng thể đơn dòng đặc hiệu với FGFR1 sử dụng kỹ thuật biểu hiện thực khuẩn thể và IgD2-D3 được gắn His của FGFR1b của người và c ở dạng kháng nguyên. Thư viện kháng thể thực khuẩn thể của người với các đa dạng tổng hợp trong vùng quyết định bổ thể được chọn (H1, H2, H3, L3), mô phỏng sự đa dạng tự nhiên của danh mục IgG của người được sử dụng để quét. Đoạn Fab được biểu diễn có hóa trị hai trên bề mặt các hạt thực khuẩn thể vi khuẩn M13 (Lee et al., J. Immunol. Methods 284:119-32 (2004)). Protocol quét được mô tả trước đó (Liang et al., J. Mol. Biol. 366:815-29 (2007)). Sau khi sàng lọc nhiều dòng từ nhiều thư viện, các kháng thể thực khuẩn thể đơn nhất và đặc hiệu mà liên kết với cả isoform b và c của FGFR1 được nhận diện bởi thực khuẩn thể ELISA. Để kiểm tra liên kết của các kháng thể với FGFR của người, protocol ELISA thông thường được đưa vào sử dụng 2 $\mu\text{g/ml}$ protein thể khảm Fc FGFR1 ECD của người.

Tiến hành đo ái lực liên kết của các kháng thể kháng FGFR1 với FGFR1 bằng Biacore/SPR sử dụng dụng cụ Biacore™ T100 như được mô tả (Liang et al., nêu trên) với các cải biến bên dưới. Kháng thể Fc kháng người ở chuột trước tiên được phủ lên chip CM5 dextran carboxymethyl hóa Biacore™ sử dụng ghép cặp trực tiếp với nhóm amino tự do theo quy trình được mô tả bởi nhà sản xuất. Kháng thể này sau đó được bắt giữ trên chip cảm biến sinh học CM5 để thu được khoảng 200 đơn vị đáp ứng (RU). Các số đo liên kết được thực hiện sử dụng đệm chạy chứa 10 mM HEPES pH = 7,4, NaCl 150 mM, 0,005% chất hoạt động bề mặt P20 (đệm HBS-P). Chuỗi pha loãng hai lần của protein FGFR1 ECD-His được tiêm trong khoảng 1,550 nM trong đệm HBS P ở lưu lượng là 30 $\mu\text{L/phút}$ ở 25°C. Tốc độ kết hợp (K_{on} , với mỗi mol/s) và tốc độ phân rã (K_{off} , mỗi giây) được tính toán sử dụng kiểu liên kết Langmuir 1:1 đơn giản (Phần mềm đánh giá Biacore™ 3.2). Hằng số phân ly cân bằng (K_d , mỗi mol) được tính toán dưới dạng tỷ số K_{off} / K_{on} .

Hai kháng thể kháng FGFR1 được nhận diện như được mô tả ở trên trong các thử nghiệm độc lập (được chỉ định ở đây là R1MAb1 và R1MAb2) liên kết với FGFR1b

và FGFR1c ở ái lực tương tự, nhưng không với các isoform FGFR bất kỳ khác (Fig. 1A và B). Hoạt tính dẫn truyền tín hiệu của chúng được kiểm tra sử dụng thử nghiệm luxiferaza dựa trên Gal-Elk1 ở tế bào L6 của chuột cống không có FGFR nội sinh, nhưng được biến nạp để biểu hiện mỗi isoform FGFR (và KLB khi cần). Các kháng thể này là chất chủ vận tiềm năng không được mong đợi: cả hai R1MAb đều tạo ra hoạt tính luxiferaza theo cách phụ thuộc liều lượng, nhưng chỉ khi tế bào biểu hiện tái tổ hợp FGFR1b hoặc FGFR1c, chỉ ra rằng các R1MAb có tác dụng như là chất chủ vận đặc hiệu đối với FGFR1 (Fig. 1C). Theo định dạng thử nghiệm này, các R1MAb không tác động đáng kể đến hoạt tính của FGF bazơ (bFGF), phối tử FGFR1 cổ điển (Fig. 1D). Tuy nhiên, các R1MAb và FGF21 cho thấy tác dụng bổ sung khi tế bào biểu hiện FGFR1c và KLB (Fig. 1D). F(ab')₂ chứ không phải đoạn Fab của R1MAb2 cho thấy hoạt tính chủ vận phụ thuộc FGFR1, gợi ý rằng các R1MAb gây ra hoạt tính chủ vận của chúng bằng cách thúc đẩy quá trình dimer hóa đồng nhất FGFR1 (Fig. 1E). Trước đó, FGFR nhân tạo dimer hóa chất chủ vận chứa peptit liên kết FGFR1 và miền khóa kéo loxin c-jun đã được báo cáo. Phân tử được gọi là C19jun còn liên kết với heparin thông qua miền c-jun và cần heparin để hoạt hóa FGFR1 (Ballinger et al., Nature Biotechnol. 17: 1199-1204 (1999)). Ngược lại, heparin không ảnh hưởng đến hoạt tính chủ vận của R1MAb1 trong thử nghiệm luxiferaza (Fig. 5). Hoạt tính chủ vận không phụ thuộc heparin của R1MAb1 được khẳng định thêm bằng cách kiểm tra quá trình phosphoryl hóa ERK và MEK1/2, các thành phần dẫn truyền tín hiệu xuôi hướng của FGFR, trong các tế bào tạo mỡ 3T3-L1 của chuột được nuôi cấy (Fig. 1F) hoặc trong WAT của các con chuột C57BL/6 được tiêm R1MAb trong bụng (Fig. 1G).

Tiến hành thực hiện các thử nghiệm để lập bản đồ epitop FGFR1 được liên kết bởi R1MAb1 và R1MAb2. Các tác giả đã tổng hợp 30 peptit đại diện các phần của trình tự FGFR1 có thể gắn biotin đầu tận amino và sử dụng chúng cho các thử nghiệm liên kết ELISA. Các trình tự của peptit là như sau: #1: SSSEKETDNTKPNPVAPY (SEQ ID NO: 36); #2: PVAPYWTSPEKMEKKLHAV (SEQ ID NO: 37); #3: KLHAVPAAKTVKFKCPSSG (SEQ ID NO: 38); #4: CPSSGTPNPTLRWLKNGKE (SEQ ID NO: 39); #5: KNGKEFKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 40); #6: YKVRYATWSIIMDSVVPSP (SEQ ID NO: 41); #7: VVPSDKGNYTCIVENEYGS (SEQ ID NO: 42); #8: NEYGSINHTYQLDVVERSP (SEQ ID NO: 43); #9: VERSPHRPILQAGLPANKT (SEQ ID NO: 44); #10: PANKTVALGSNVEFMCKVY (SEQ ID NO: 45); #11:

MCKVYSDPQPHIQWLKHIE (SEQ ID NO: 46); #12: LKHIEVNGSKIGPDNLPLYV (SEQ ID NO: 47); #13: NLPYVQILKTAGVNTTDKE (SEQ ID NO: 48); #14: TTDKEMEVLHLRNVSFEDA (SEQ ID NO: 49); #15: SFEDAGEYTCLAGNSIGLS (SEQ ID NO: 50); #16: SIGLSHHSAWLTVLEALEE (SEQ ID NO: 51); #17: YWTSPEKMEKKLHAVPAAK (SEQ ID NO: 52); #18: EKMEKKLHAVPAAKTVKFK (SEQ ID NO: 53); #19: PAAKTVKFKCPSSGTPNPT (SEQ ID NO: 54); #20: KFKCPSSGTPNPTLRWLKN (SEQ ID NO: 55); #21: GTPNPTLRWLKNGKEFKPD (SEQ ID NO: 56); #22: TLRWLKNGKEFKPDHRIGG (SEQ ID NO: 57); #23: FKPDHRIGGYKVRYATWSI (SEQ ID NO: 58); #24: HRIGGYKVRYATWSIIMDS (SEQ ID NO: 59); #25: LHAVPAAKTVKFKCPSS (SEQ ID NO: 60); #26: KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 28); #27: AVPAAKTVKFKCPSSG (SEQ ID NO: 61); #28: FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 29); #29: KPDHRIGGYKVR (SEQ ID NO: 62); #30: GTPNPTLRWLKN (SEQ ID NO: 63). Như được thể hiện trên Fig. 17A, với cả R1MAb1 và R1MAb2, các peptit ngắn nhất mà chứng tỏ là liên kết đáng kể với chúng là peptit #26 và #28.

Ví dụ 2. Các R1MAb chứng minh hoạt tính kháng bệnh đái tháo đường kéo dài.

Tiến hành kiểm tra xem liệu các kháng thể kháng FGFR1 theo sáng chế có hoạt tính kháng bệnh đái tháo đường hay không bằng cách sử dụng các mẫu chuột bị tiểu đường. Tất cả các con chuột được mua từ Jackson Laboratory và được duy trì ở điều kiện các con vật không mang tác nhân gây bệnh ở nhiệt độ 21°C trong chu kỳ chuẩn 12 giờ sáng/12 giờ tối có lối vào chỗ thức ăn (thức ăn chuẩn cho loài gặm nhấm (Labdiet 5010, 12,7% calo từ chất béo) hoặc chế độ ăn nhiều béo, hydrat cacbon cao (Harlan Teklad TD.03584, 58,4% calo từ chất béo) và nước vừa đủ. Các con chuột db/db trong nền C57BLKS/J là các con chuột cái và các con chuột khác đều là chuột đực. Tất cả các con chuột được sử dụng để tiêm ở trong khoảng từ 9 đến 11 tuần tuổi, trừ việc các con chuột ap2-SREBP1c là 8 tháng tuổi (Fig. 3E) hoặc 4 tháng tuổi (Fig. 3F). Để truyền liên tục protein FGF21, bơm thẩm thấu (Alzet® 2001) được cấy dưới da. Hàm lượng glucoza được đo sử dụng máy đo glucoza OneTouch® Ultra®. Để phân tích lipid trong gan, lipid này được tách chiết theo phương pháp Folch và được tái tạo huyền phù trong PBS chứa 5% Triton X-100. Tổng cholesterol, triglycerit, β -hydroxybutylat (Thermo DMA) và axit béo không este hóa (Roche) được xác định

bằng cách sử dụng phản ứng enzym. Hàm lượng insulin huyết thanh được xác định bằng ELISA (Crystal Chem).

Tiến hành kiểm tra hoạt tính chủ vận của R1MAbs *in vitro* và *in vivo*, bằng cách tiêm các con chuột db/db kháng leptin tăng đường huyết với 3, 10, và 50 mg/kg (mpk) R1MAb1. Tiến hành quan sát thấy rằng hàm lượng glucoza trong máu được chuẩn hóa trong một tuần ở cả ba liều lượng, và tác dụng làm giảm glucoza quan sát được là mạnh và kéo dài không mong đợi, với hàm lượng glucoza giữ thấp hơn các con chuột đối chứng trong 30 ngày sau khi tiêm một lần (Fig 2A). Điều này kết hợp với sự giảm khối lượng cơ thể trong thời gian ngắn, nhưng đáng kể (Fig. 2A). Tác dụng làm giảm glucoza có thể thông qua sự cải thiện tính nhạy insulin, như hàm lượng insulin huyết thanh còn bị giảm đột ngột bằng cách tiêm R1MAb1 (Fig 2B). Tiến hành quan sát thấy sự giảm hàm lượng glucoza trong máu gây ra do R1MAb tương tự với R1MAb2 (Fig. 6), và trong ba con chuột mẫu khác với tính kháng insulin được đánh dấu, các con chuột ob/ob thiếu Leptin, các con chuột được cho ăn chế độ nhiều béo (HFD), và các con chuột Ins2Akita (Hong et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 293:E1687-96 (2007)) (Fig. 2C và 7). Thử nghiệm ăn ghép cặp cho thấy rằng sự giảm khối lượng do R1MAb gây ra ở các con chuột db/db và Ins2Akita là do sự giảm sự hấp thụ thức ăn; tuy nhiên, sự giảm glucoza máu quan sát được phần lớn không phụ thuộc vào sự hấp thụ thức ăn (Fig. 2D và 6-7). Trong tụy, việc tiêm R1MAb1 làm tăng diện tích dương tính với insulin với mỗi đảo so với các con chuột được cho ăn theo cặp hoặc các con chuột đối chứng không ghép cặp (Fig. 2E và 8). FGFR1 được biểu hiện trong tế bào β tụy (Hart et al., Nature 408:864-68 (2000)) và FGF21 thúc đẩy chức năng tế bào β ex vivo (Wente et al., Diabetes 55:2470-78 (2006)); do đó sự hoạt hóa FGFR1 trong tế bào β có thể trực tiếp góp phần vào việc hàm lượng insulin tụy tăng. Các số liệu này chứng tỏ rằng sự hoạt hóa FGFR1 (mà không phải là FGFR2 hoặc FGFR3) là đủ để tóm lại các hoạt tính kháng bệnh tiểu đường và kháng lipit máu của FGF21 tái tổ hợp.

Để phân tích tầm quan trọng của chức năng IgG đối với các hoạt tính R1MAb, tiến hành sử dụng hai kiểu cải biến. Kiểu gây đột biến kép (D265A/N297A; DANA) trong vùng Fc làm mất liên kết với Fc γ Rs và sự tăng thêm tế bào tác động miễn dịch bởi phân tử IgG (Gong et al., 2005). Cả hoạt tính chủ vận cũng như kháng tiểu đường của R1MAb2 đều không bị tác động bởi việc đưa thể đột biến DANA vào; do đó chức năng tác động này không đóng vai trò trong hoạt tính kháng tiểu đường của R1MAb2 (Fig. 9A-C). Tuy nhiên, bản R1MAb1 một nhánh (OA) được thiết kế (Atwell et al., J.

Mol. Biol. 270:26-35 (1997)), không có một trong số các đoạn Fab (OA-R1MAb1) (Fig. 9A và Fig. 9D) thể hiện hoạt tính chủ vận bị giảm bớt (Fig. 9E và Fig. 9F) và không làm giảm glucoza máu, khối lượng cơ thể, và hàm lượng lipit trong gan và trong huyết thanh ở các con chuột db/db (Fig. 9G và H), chỉ ra rằng cả hoạt tính chủ vận và kháng tiểu đường của R1MAb phụ thuộc vào Ab hóa trị hai (mặc dù các tác giả còn kiểm tra các kháng thể đặc hiệu kép với chỉ một nhánh kháng FGFR1 (ví dụ, có nhánh kháng beta-Klotho) và khẳng định lại rằng chúng vẫn giữ các thuộc tính có lợi của R1MAb hóa trị hai kháng FGFR1). Các tương quan này gợi ý chắc chắn rằng sự hoạt hóa con đường dẫn truyền tín hiệu cùng hướng của FGFR1 do R1MAb gây ra có thể điều tiết các tác dụng kháng tiểu đường của nó.

Các MAb nổi lên như là phương thức trị liệu mạnh mẽ để điều trị nhiều bệnh ở người. Thuyết minh của các tác giả về hoạt tính kháng sự tăng đường huyết và giảm lipit tiềm năng của MAb chủ vận kháng FGFR1 mở ra một con đường mới đối với sự phát triển của MAb trị liệu nhằm đích FGFR1 hoặc phức thụ thể chứa FGFR1 để điều trị tiểu đường typ 2 và các rối loạn lâu dài liên quan đến chứng béo phì. Việc nhằm đích FGFR1 dựa trên MAb cần đến một số đặc tính có lợi đối với liệu pháp FGF21 tái tổ hợp. Trước tiên, do bản chất của chúng, các MAb tạo ra được động lực học dự đoán được, điều biến được, và vượt trội so với FGF21 hoặc bất kỳ protein trị liệu không phải kháng thể khác nào. Quả thực, các tác giả đã chứng minh được rằng việc tiêm màng bụng một lần liều 1-3 mpk R1MAb1 hoặc R1MAb2 vào các con chuột db/db dẫn đến tác dụng làm giảm chứng tăng đường huyết kéo dài đáng kể trong 30 ngày (Fig. 2 và 5). Tác dụng đường huyết kéo dài chưa được báo cáo đối với bất kỳ chất kháng tiểu đường nào đã được mô tả trước đó.

Ví dụ 3. Tầm quan trọng của mô mỡ trong tác dụng tiểu đường của R1MAb và FGF21.

FGF21 tái tổ hợp được đề xuất để cải thiện tính nhạy insulin qua mô mỡ và gan (Berglund et al., Endocrinology 150:4084-93 (2009); Li et al., FEBS Letters 583:3230-34 (2009)). Việc tiêm FGF21 vào các con chuột gây ra sự phosphoryl hóa MEK và ERK ở bốn kiểu mô biểu hiện KLB, gan, mô mỡ trắng (WAT), mô mỡ nâu (BAT), và tụy, như đã báo cáo trước đó (Fig. 3A, ở trên) (Kurosu et al., J. Biol. Chem. 282: 26687-95 (2007); Xu et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 297(5): E1105-14 (2009)). Ngược lại, việc tiêm R1MAb1 dẫn đến sự phosphoryl hóa các cơ quan thực hiện cùng hướng giống nhau trong mô mỡ và tụy, nhưng không ở trong gan (Fig. 4A,

ở dưới), phù hợp với biểu hiện mRNA FGFR1 rất thấp trong gan (Fig. 10) (Fon Tacer et al., *Mol. Endocrinol.* 24(10): 2050-64 (2010)). Quả thực, so sánh cạnh nhau các gen biểu hiện ở gan cho thấy rằng biểu hiện của hai gen nhằm đích FGF21 được nhận diện trước đó (thụ thể leptin (LepR) và chất ức chế quá trình dẫn truyền tín hiệu xytokin 2 (SOCS2); Coskun et al., *Endocrinology* 149:6018-27 (2008), Inagaki et al., *Cell Metabolism* 8:77-83 (2008)) do FGF21 gây ra chứ không phải do R1MAb1 (Fig. 15). Mặt khác, biểu hiện ở gan của gen điều tiết insulin đã biết (acetyl-CoA carboxylaza 1 (ACC1), synthaza axit béo (FAS), elongaza của họ axit béo mạch dài 6 (Elovl6), protein liên kết yếu tố tăng trưởng giống insulin (IGF) (IGFBP)-1, phosphoenolpyruvat carboxykinaza (PEPCK)) được sửa đổi tương tự bởi cả hai FGF21 và R1MAb1, gợi ý rằng các gen này có thể được điều tiết gián tiếp thông qua các thay đổi hormon (ví dụ insulin) hoặc chuyển hóa. R1MAb1 làm giảm đáng kể lipid gan và lipid trong huyết thanh khi các con chuột được tiêm vào db/db vào ngày thứ 7 sau khi tiêm một lần, có thể là do các tác dụng phân phối lại lipid qua mô mỡ (Fig. 3B-D). Việc tiêm R1MAb1 không gây ra sự phosphoryl hóa MEK hoặc ERK trong phổi và tuyến tiền liệt (Fig. 3A), hai kiểu mô có xu hướng ung thư mà biểu hiện FGFR1. Các quan sát này cùng đề xuất rằng mô mỡ, chứ không phải gan, là trung tâm đối với hoạt tính chuyển hóa thông thường của R1MAb và FGF21.

Để kiểm tra thêm điểm này, các tác giả sử dụng các con chuột chuyển gen *ap2-srebp1c* teo mô mỡ, biểu hiện tính kháng insulin mãnh liệt, thiếu leptin, và chứng gan to, do sự thiếu mô mỡ trắng và chức năng mô mỡ nâu được đàn xếp (Fig 3E, 11) (Shimomura et al., *Genes Dev.* 12:3182-94 (1998); Shimomura et al., *Nature* 401:73-76 (1999)). Phù hợp với ý kiến rằng chức năng mô mỡ thông thường là cần cho hoạt tính chuyển hóa của R1MAb1, việc tiêm màng bụng một lần ở liều 1mpk làm cải thiện HOMA-IR và khả năng dung nạp glucoza chỉ ở các con chuột *ob/ob* đối chứng mà không có ở các con chuột *ap2-srebp1c* (Fig. 3E). Sự hấp thụ thức ăn được làm giảm bằng cách tiêm R1MAb1 ở cả các con chuột *ob/ob* và các con chuột chuyển gen *ap2-srebp1c*, khi so sánh với các con chuột được cho ăn theo cặp được tiêm đối chứng IgG (Fig. 3E). Ngoài ra, việc truyền liên tục FGF21 tái tổ hợp còn không thể cải thiện khả năng dung nạp insulin ở các con chuột *ap2-srebp1c*, mặc dù sự tăng đáng kể β -hydroxybutyrat huyết thanh (tức là chất tạo xeton) và sự giảm cholesterol được quan sát (Fig. 3F).

Ví dụ 4. Sự hoạt hóa PGC1-alpha trong mô mỡ nâu bởi R1MAb.

FGF21 gần đây được đề xuất là hoạt hóa nhân tố đồng hoạt hóa phiên mã thụ thể nhân protein PGC-1 α trong mô mỡ và gan để gây ra biểu hiện của gen cùng hướng kết hợp với cơ chế chuyển hóa oxy hóa (Chau et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 107:12553-58 (2010); Hondares et al., Cell Metabolism 11:206-12 (2010); Potthoff et al. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 30;106(26): 10853-8 (2009)). Quả thực, khi được tiêm vào các con chuột ob/ob, R1MAb1 làm tăng đáng kể biểu hiện BAT của các gen liên quan đến OXPHOS, và cơ chế chuyển hóa axit béo như được thể hiện bởi phân tích vi mảng ADN theo sau bởi phân tích làm giàu bộ gen (Fig. 4A). R1MAb1 (và FGF21) còn làm tăng biểu hiện của PGC-1 α , PGC-1 β , và các đích chính của chúng CIDEA và UCP1 trong mô mỡ nâu (được đo bằng qPCR; Fig. 4B và 16).

Quá trình phiên mã PGC-1 α được điều tiết nhờ vào các yếu tố đáp ứng cAMP (cAMP Response Element - CRE) trong vùng gen khởi đầu và yếu tố phiên mã CREB mà liên kết với CRE (Herzig et al., Nature 413:179-83 (2001); Karamitri et al., J. Biol. Chem. 284:20738-52 (2009); Muraoka et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 296:E1430-39 (2009); Shi et al., J. Biol. Chem. (2005)). Trong sàng lọc để nhận diện yếu tố phiên mã liên quan đến cơ chế chuyển hóa mà có thể được hoạt hóa bởi FGF21 trong tế bào HEK293 biểu hiện KLB, các tác giả thấy rằng protein dung hợp GAL-CREB có thể được hoạt hóa bởi FGF21 (Fig. 8A-B). Sau đó, các tác giả thấy rằng cả FGF21 và R1MAb1 có thể hoạt hóa gen chỉ thị GAL-CREB cũng như gen chỉ thị CRE-luxiferaza theo cách phụ thuộc liều lượng trong tế bào HEK293 (Fig. 4C). Phù hợp với ý kiến cho rằng chức năng CREB như là cơ quan thực hiện cùng hướng, FGF21 làm tăng quá trình phosphoryl hóa của CREB và p90RSK, CREB kinaza ngược hướng được điều tiết bởi ERK, trong mô mỡ trắng của chuột (Fig. 4D), tế bào tạo mỡ nguyên sinh được biệt hóa của người (Fig. 4E), và tế bào HEK293 (Fig. 12C). Do đó, sự hoạt hóa CREB bởi FGF21 và R1MAb có thể góp phần gây ra PGC-1 α và bộ gen cùng hướng liên quan đến cơ chế chuyển hóa oxy hóa mô mỡ (Fig. 4F và 12D). Ngoài sự điều tiết phiên mã được đề xuất ở đây, FGF21 được báo cáo là hoạt hóa PGC-1 α sau dịch mã thông qua sự hoạt hóa AMPK (Chau et al., nêu trên), mặc dù các tác giả đã thất bại trong việc quan sát bằng chứng của sự hoạt hóa AMPK *in vitro* hoặc *in vivo* bởi R1MAb (số liệu không được thể hiện). Tóm lại, các kết quả thử nghiệm chứng minh vai trò của PGC-1 α trong mô mỡ trong việc điều biến các tác dụng kháng lipid và kháng tiểu đường của FGF21 và R1MAb.

Ví dụ 5. Kiểm tra các kháng thể đặc hiệu kép kháng FGFR1/kháng beta-Klotho

Khác biệt quan trọng khác giữa R1MAb theo sáng chế và FGF21 là tính đặc hiệu thụ thể đích. FGF21 có thể tác dụng lên FGFR1c, 2c, và 3c, nhưng các tác dụng của nó có thể bị giới hạn bởi mô biểu hiện KLB (tức là gan, mô mỡ, và tụy) (Fon Tacer et al., nêu trên; Kurosu et al., J. Biol. Chem. 282:26687-95 (2007); Ogawa et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 104:7432-37 (2007)). Ngược lại, mô đích của các R1MAb được xác định bởi sự biểu hiện FGFR1 và sự phân bố mô của phân tử kháng thể này, nhưng không bị giới hạn bởi sự biểu hiện KLB. Quả thực, các tác giả đã quan sát hiện tượng giảm phosphat huyết nhẹ ở các con chuột được xử lý bằng R1MAb1, gợi ý sự hoạt hóa con đường FGF23/Klotho trong thận. Do đó, các tác giả tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/FGFR1 sử dụng kỹ thuật biểu hiện thực khuẩn thể hoặc kỹ thuật tế bào lai (các con chuột BALBc được gây miễn dịch với tế bào HEK293 biểu hiện FGFR1c và KLB) để tạo ra các kháng thể kháng KLB riêng biệt và kỹ thuật khóa trong ổ (Merchant et al. Nature Biotechnol. 16(7): 677-81 (1998)). Các tác giả kiểm tra khả năng của các kháng thể đặc hiệu kép này trong việc hoạt hóa sự biểu hiện GAL-Elk1 và khẳng định rằng các kháng thể này phụ thuộc vào sự có mặt của cả beta-Klotho và FGFR1 đối với sự hoạt hóa tín hiệu cùng hướng. Các tác giả còn khẳng định rằng một trong số các kháng thể này có thể làm tăng quá trình phosphoryl hóa chất trung gian dẫn truyền tín hiệu cùng hướng, MEK và ERK $\frac{1}{2}$ trong tế bào tạo mô nguyên sinh được biệt hóa của người. Một trong số các kháng thể đặc hiệu kép này phản ứng chéo với protein của chuột và các tác giả sử dụng kháng thể này để kiểm tra hoạt tính *in vivo* của kháng thể đặc hiệu kép. Các tác giả quan sát thấy rằng kháng thể đặc hiệu kép này làm giảm hàm lượng glucoza trong máu mà không làm tăng FGF23 huyết thanh, trong khi đó kháng thể kháng FGFR1 (đặc hiệu đơn) đối chứng tương ứng làm giảm hàm lượng glucoza trong máu đến mức độ tương tự nhưng không làm tăng đáng kể hàm lượng FGF23 huyết thanh.

Tiếp theo, các tác giả kiểm tra khả năng các kháng thể đặc hiệu kép trong việc tạo ra các lợi ích chuyển hóa của các kháng thể chủ vận kháng FGFR1. Các tác giả tạo ra các con chuột chuyển gen biểu hiện beta-Klotho của người (R1MAb1 và R1MAb2 mỗi loại nhận diện FGFR1 của chuột) và khẳng định rằng các kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/FGFR1 này được mô tả ở trên làm cải thiện khả năng dung nạp glucoza trong các mẫu chuột, ví dụ các con chuột chuyển gen hKLB được ăn theo chế độ nhiều béo. Các tác giả cũng tạo ra các kháng thể kháng beta-Klotho mà phản ứng với protein

trong các con vật mẫu khác (ví dụ chuột cống, thỏ, khỉ cynomologous và khỉ rhesus) và kiểm tra tương tự khả năng tạo ra các lợi ích chuyển hóa của các kháng thể đặc hiệu kép được cấu thành với các chất này và các kháng thể kháng FGFR1.

Mặc dù sáng chế ở trên được mô tả chi tiết ở mức độ nào đó bằng sự minh họa và ví dụ cho các mục đích làm rõ ràng ý, phần mô tả và ví dụ này không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Phần bộc lộ của tất cả các sáng chế và tài liệu khoa học được trích dẫn theo sáng chế được kết hợp rõ ràng để tham khảo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể chất chủ vận kháng yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi -1 (FGFR1), trong đó kháng thể này gắn kết với peptit #26 KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 28) hoặc peptit #28 FKPDHRIGGYKVRVY (SEQ ID NO: 29).
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này không phải là chất chủ vận của FGFR2 hoặc FGFR3.
3. Kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng.
4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này là kháng thể của người, kháng thể được làm tương thích với người hoặc kháng thể thể khảm.
5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể này là kháng thể IgG1.
6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể này bao gồm:
 - (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin GFTFX1X2X3X4IX5, trong đó X1 là S hoặc T, X2 là N hoặc S, X3 là N hoặc T, X4 là W hoặc Y, X5 là H hoặc S (SEQ ID NO: 26);
 - (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm X1X2IX3PX4DGX5TX6YADSVKG, trong đó X1 là A hoặc G, X2 là D hoặc E, X3 là D hoặc Y, X4 là N hoặc Y, X5 là A hoặc D, và X6 là D hoặc Y (SEQ ID NO: 24) và X1IX2PX3DGX4TX5YADSVKG, trong đó X1 là D hoặc E, X2 là D hoặc Y, X3 là N hoặc Y, X4 là A hoặc D, và X5 là D hoặc Y (SEQ ID NO: 25);
 - (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SSGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 16), SGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 17), EHFDAWVHYVMDY (SEQ ID NO: 18), TGTDVMDY (SEQ ID NO: 19), và GTDVMDY (SEQ ID NO: 20);
 - (d) HVRL1 chứa trình tự axit amin RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 21);
 - (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin SASFLYS (SEQ ID NO: 22); và
 - (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin QQSYTTPPT (SEQ ID NO: 23).
7. Kháng thể theo điểm 6, trong đó kháng thể này bao gồm:
 - (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin GFTFTSTWIS (SEQ ID NO: 7);

(b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm GEIDPYDGDITYYADSVKG (SEQ ID NO: 10) và EIDPYDGDITYYADSVKG (SEQ ID NO: 11); và

(c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SSGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 16) và SGYGGSDYAMDY (SEQ ID NO: 17).

8. Kháng thể theo điểm 6, trong đó kháng thể này bao gồm:

(a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin GFTFSNNYIH (SEQ ID NO: 8);

(b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm ADIYPNDGDDTYADSVKG (SEQ ID NO: 12) và DIYPNDGDDTYADSVKG (SEQ ID NO: 13); và

(c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin EHFDAWVHYVMDY (SEQ ID NO: 18).

9. Kháng thể theo điểm 6, trong đó kháng thể này bao gồm:

(a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin GFTFTSNWIS (SEQ ID NO: 9);

(b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm AEIDPYDGATDYADSVKG (SEQ ID NO: 14) và EIDPYDGATDYADSVKG (SEQ ID NO: 15); và

(c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm TGTDVMDY (SEQ ID NO: 19) và GTDVMDY (SEQ ID NO: 20).

10. Kháng thể theo điểm 6, trong đó kháng thể này bao gồm trình tự VH được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2, 3 và 4; và trình tự VL của SEQ ID NO: 6.

11. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó kháng thể kháng FGFR1 gắn kết với cả FGFR1b và FGFR1c.

12. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó kháng thể này là kháng thể đa đặc hiệu.

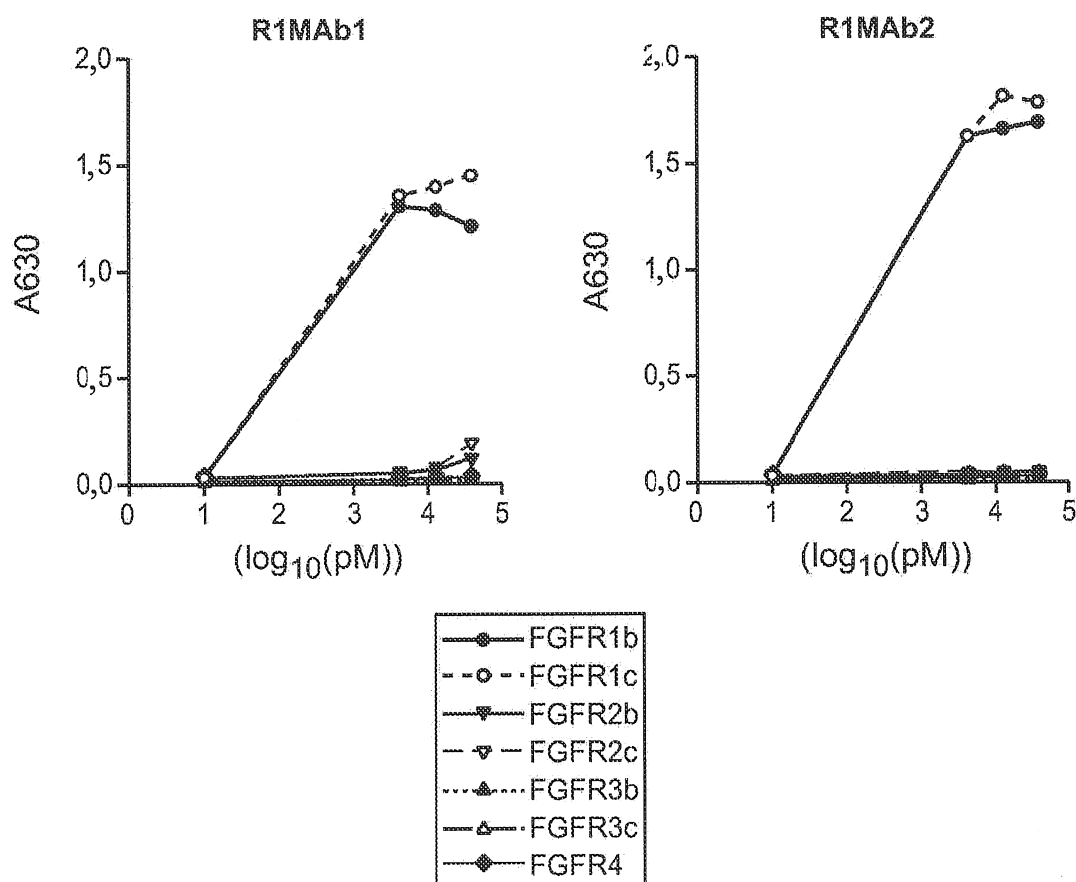
13. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó kháng thể này là kháng thể đặc hiệu kép.

14. Kháng thể theo điểm 13, trong đó kháng thể này còn gắn kết với beta-Klotho.

15. Axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14.

16. Tế bào chủ chứa axit nucleic theo điểm 15.

17. Phương pháp sản xuất kháng thể bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 16 sao cho kháng thể này được tạo ra.
18. Phương pháp theo điểm 17, phương pháp này còn bao gồm bước thu hồi kháng thể này từ tế bào chủ.
19. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, và chất mang được dụng.

**FIG. 1A**

		k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	KD (M)
R1MAb1	FGFR1b	$2,7 \times 10^6$	$1,6 \times 10^{-3}$	$5,9 \times 10^{-10}$
	FGFR1c	$3,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^{-3}$	$6,7 \times 10^{-10}$
R1MAb2	FGFR1b	$1,9 \times 10^6$	$8,2 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^{-10}$
	FGFR1c	$1,9 \times 10^6$	$8,7 \times 10^{-4}$	$4,6 \times 10^{-10}$

FIG. 1B

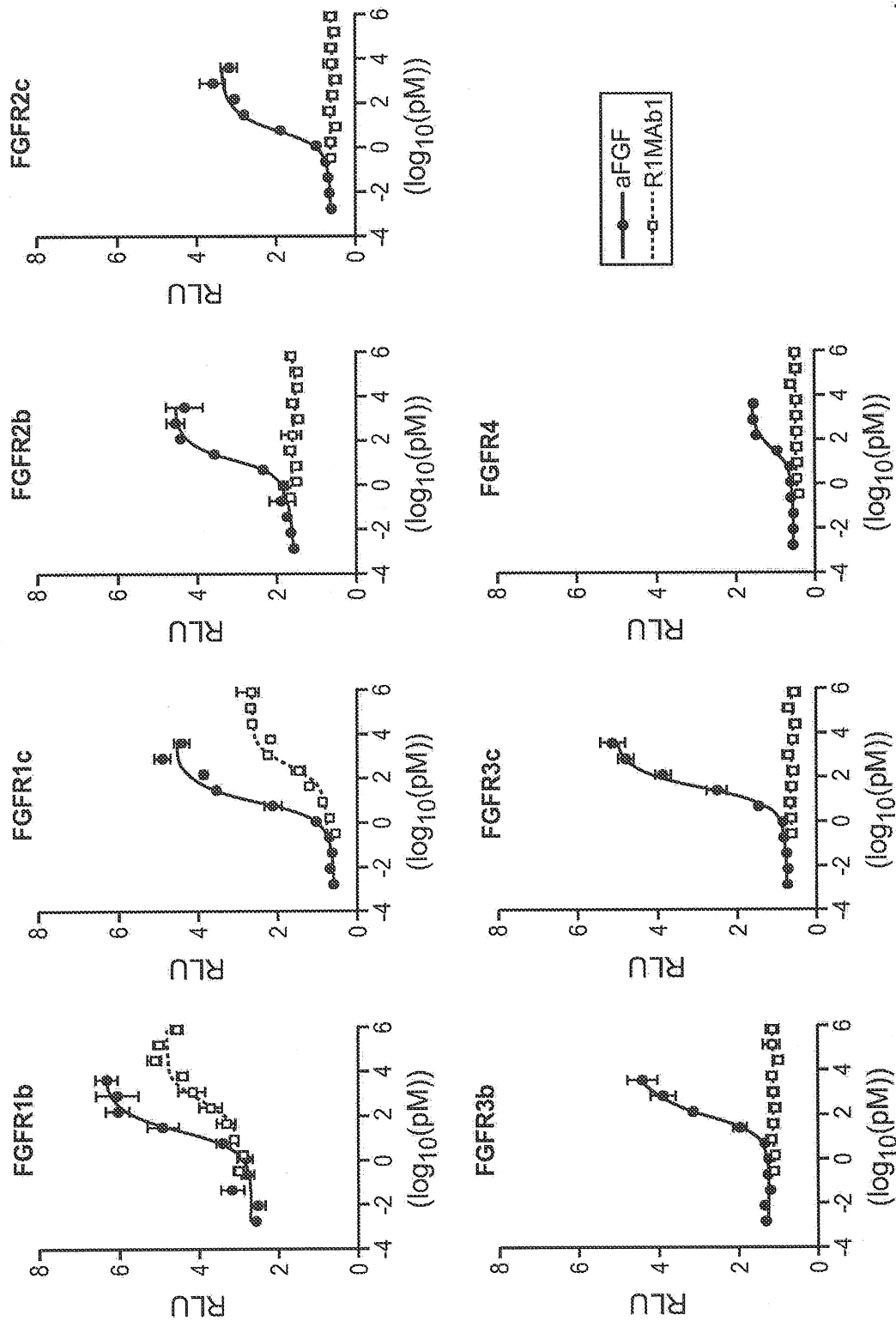
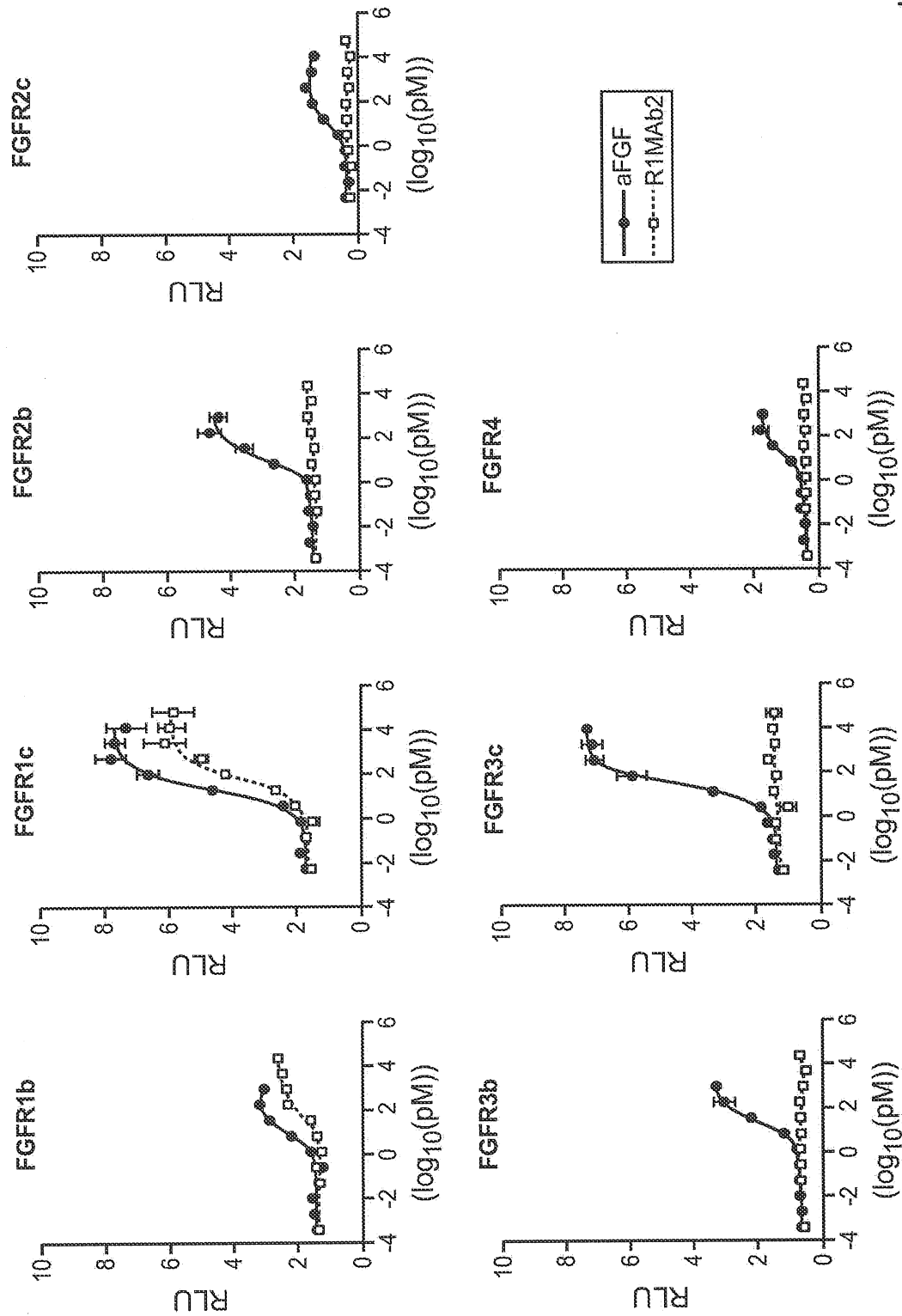
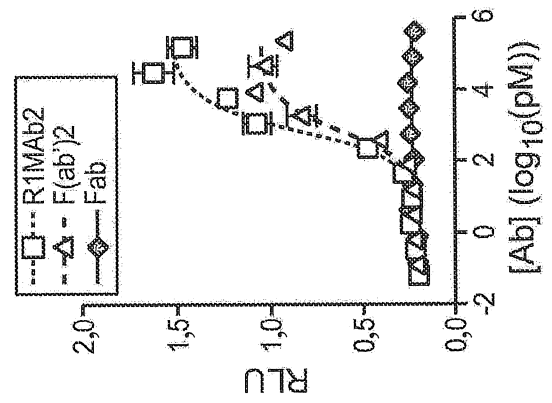
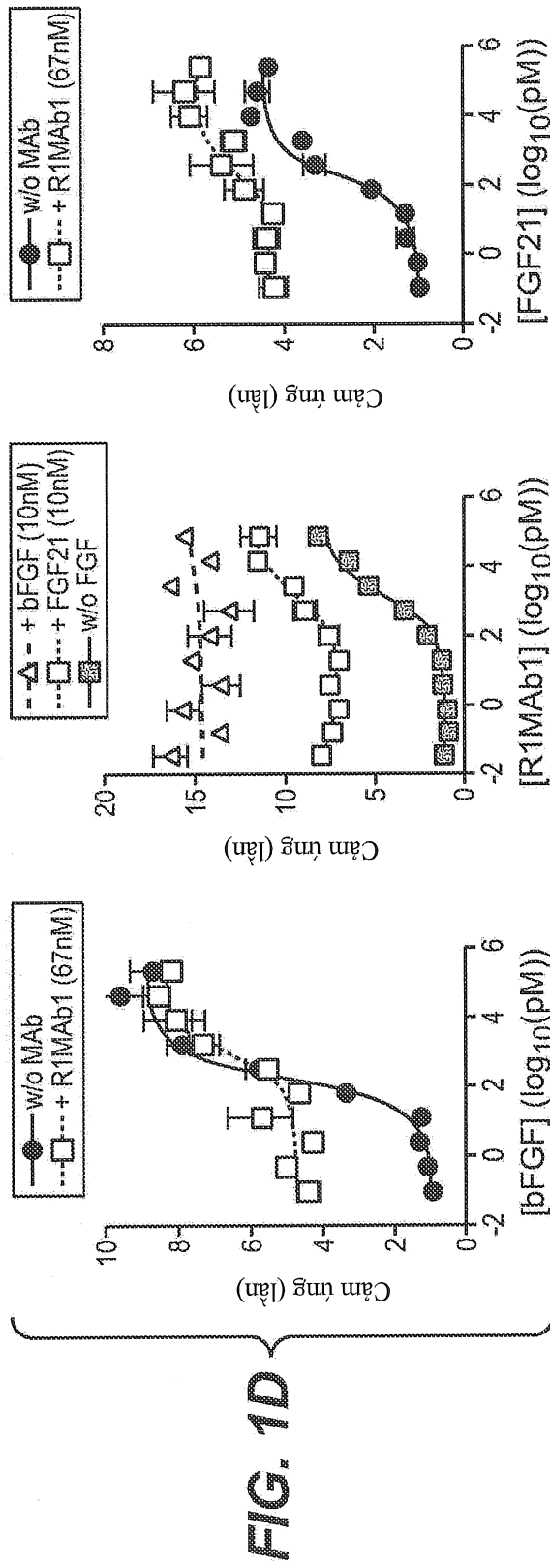
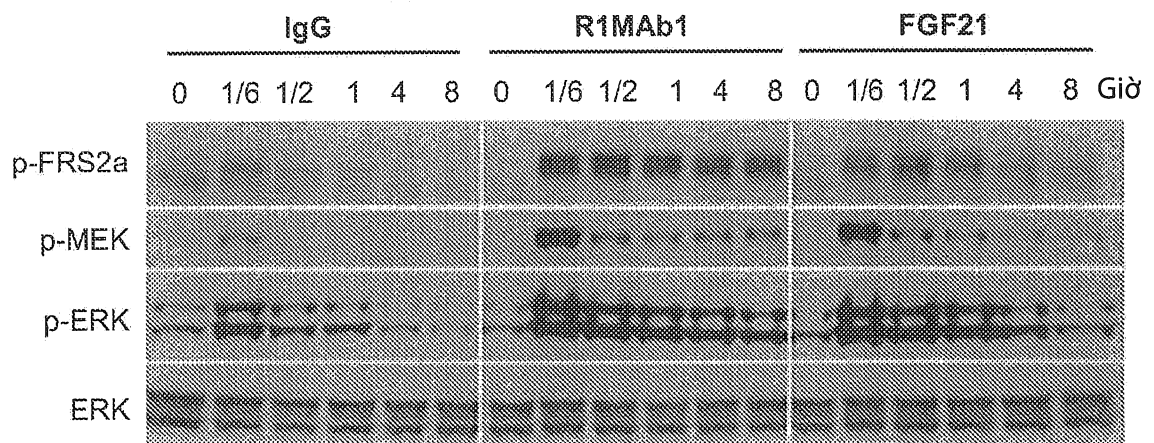
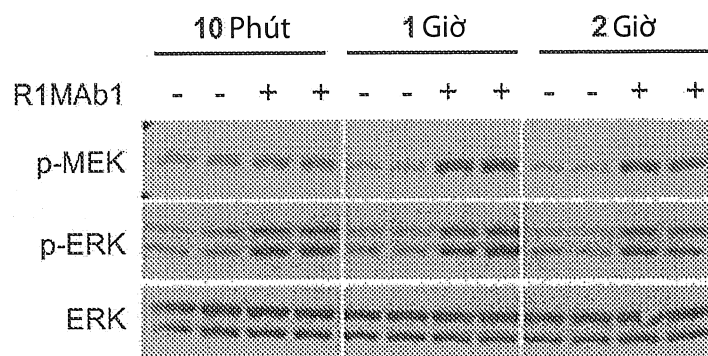
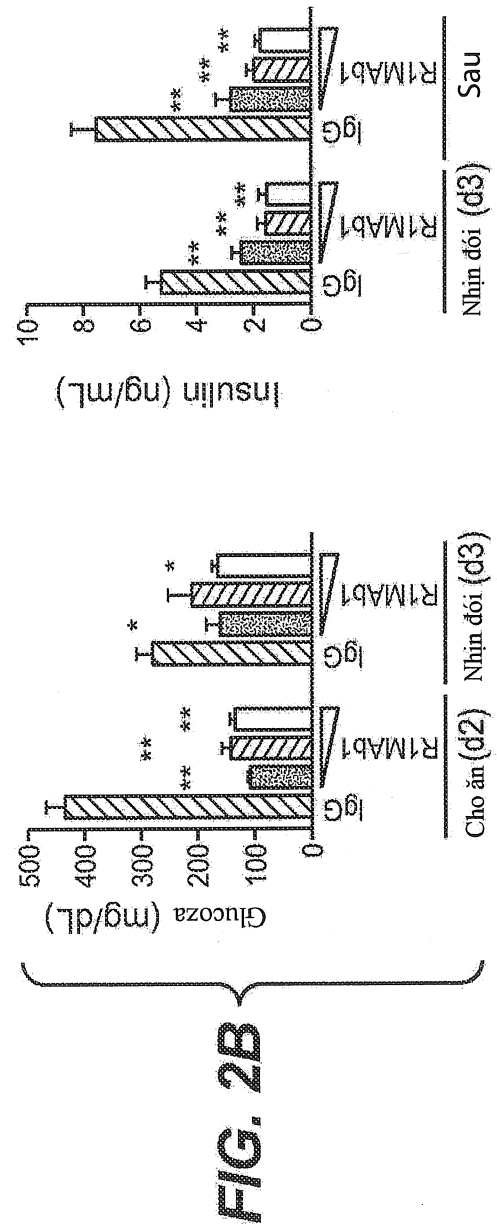
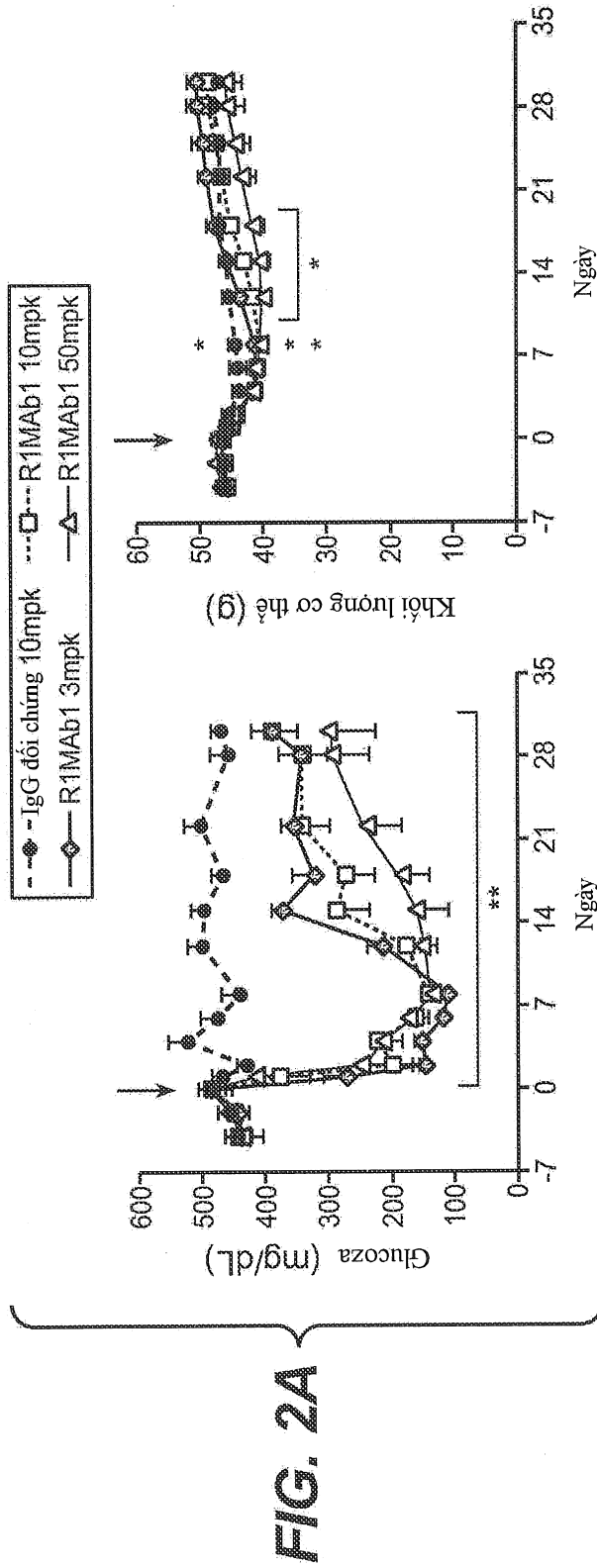


FIG. 1C-1

**FIG. 1C-2**



**FIG. 1F****FIG. 1G**



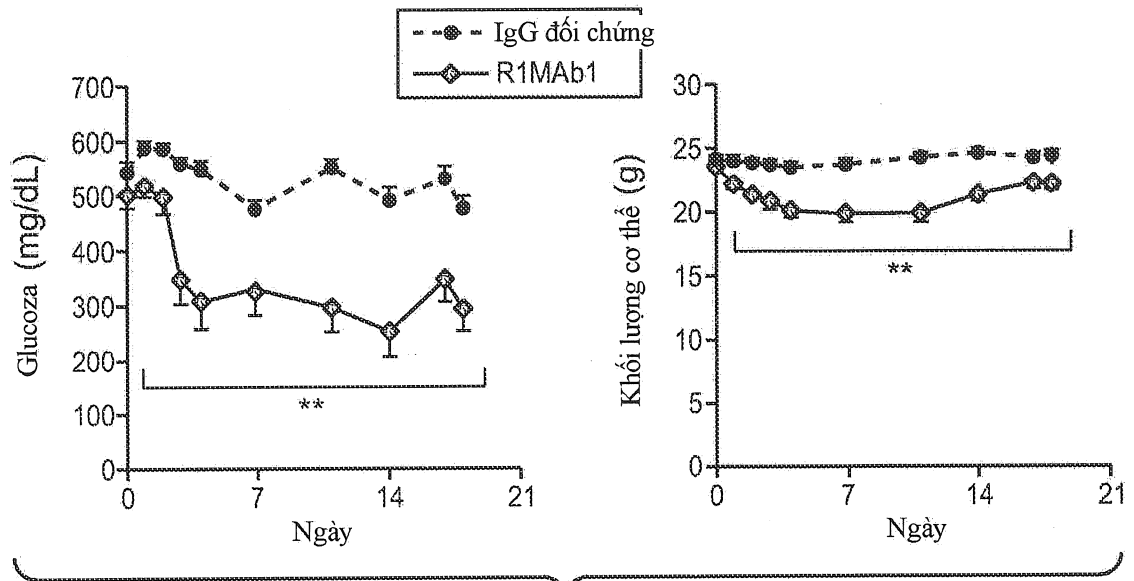


FIG. 2C

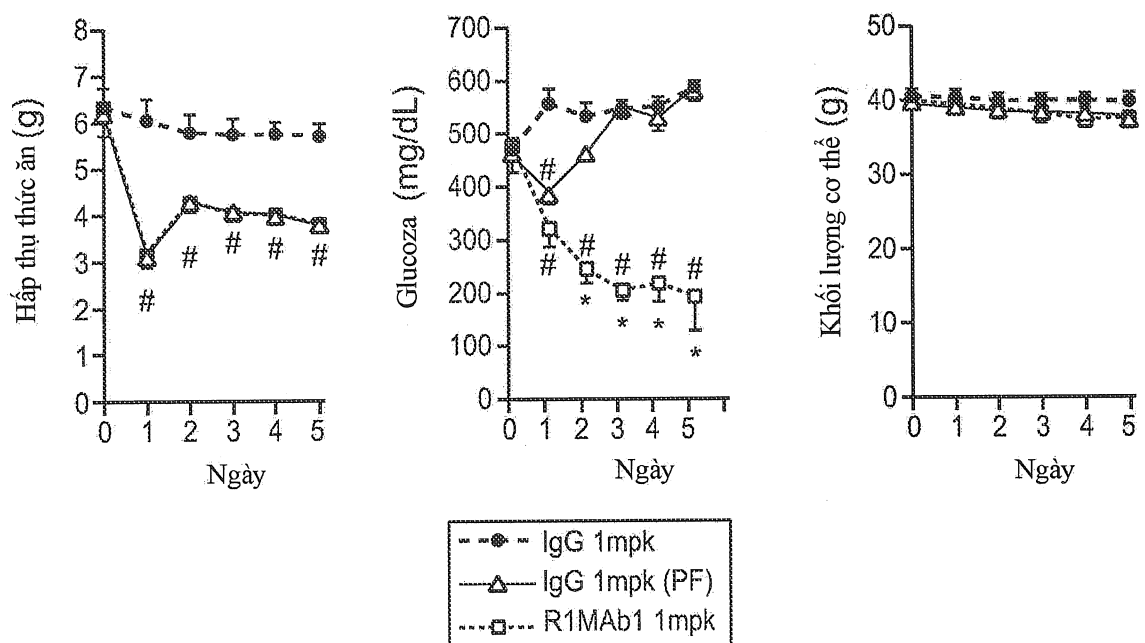
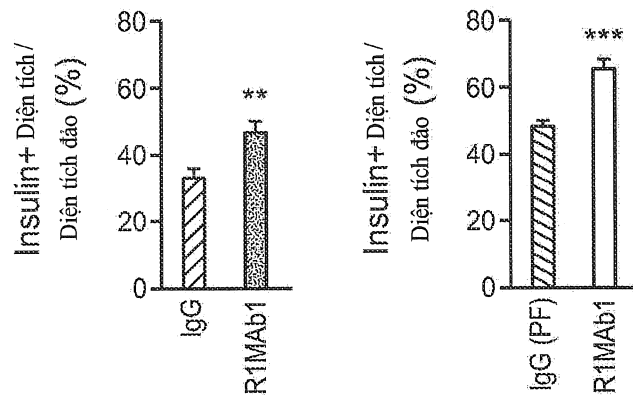
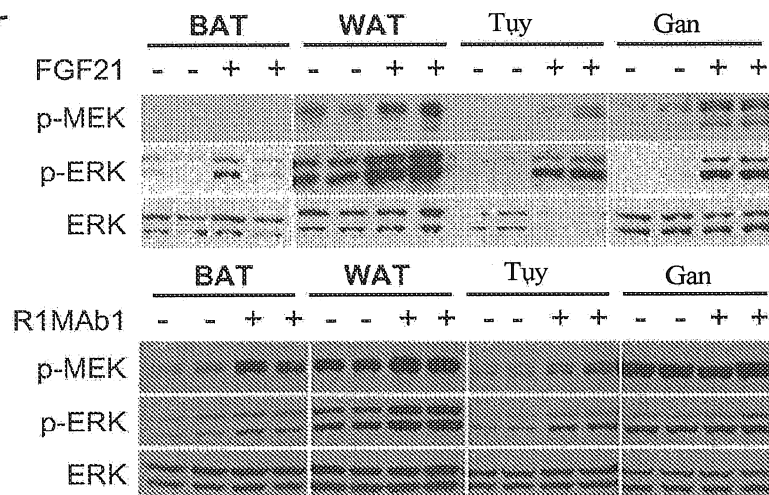
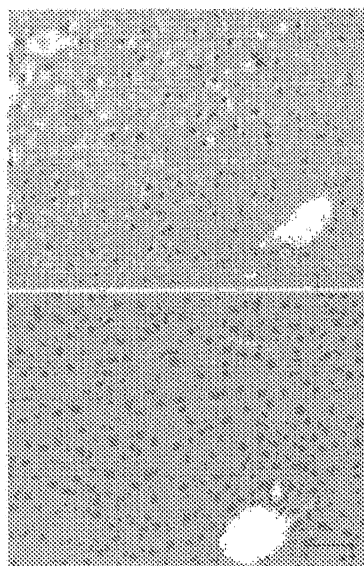


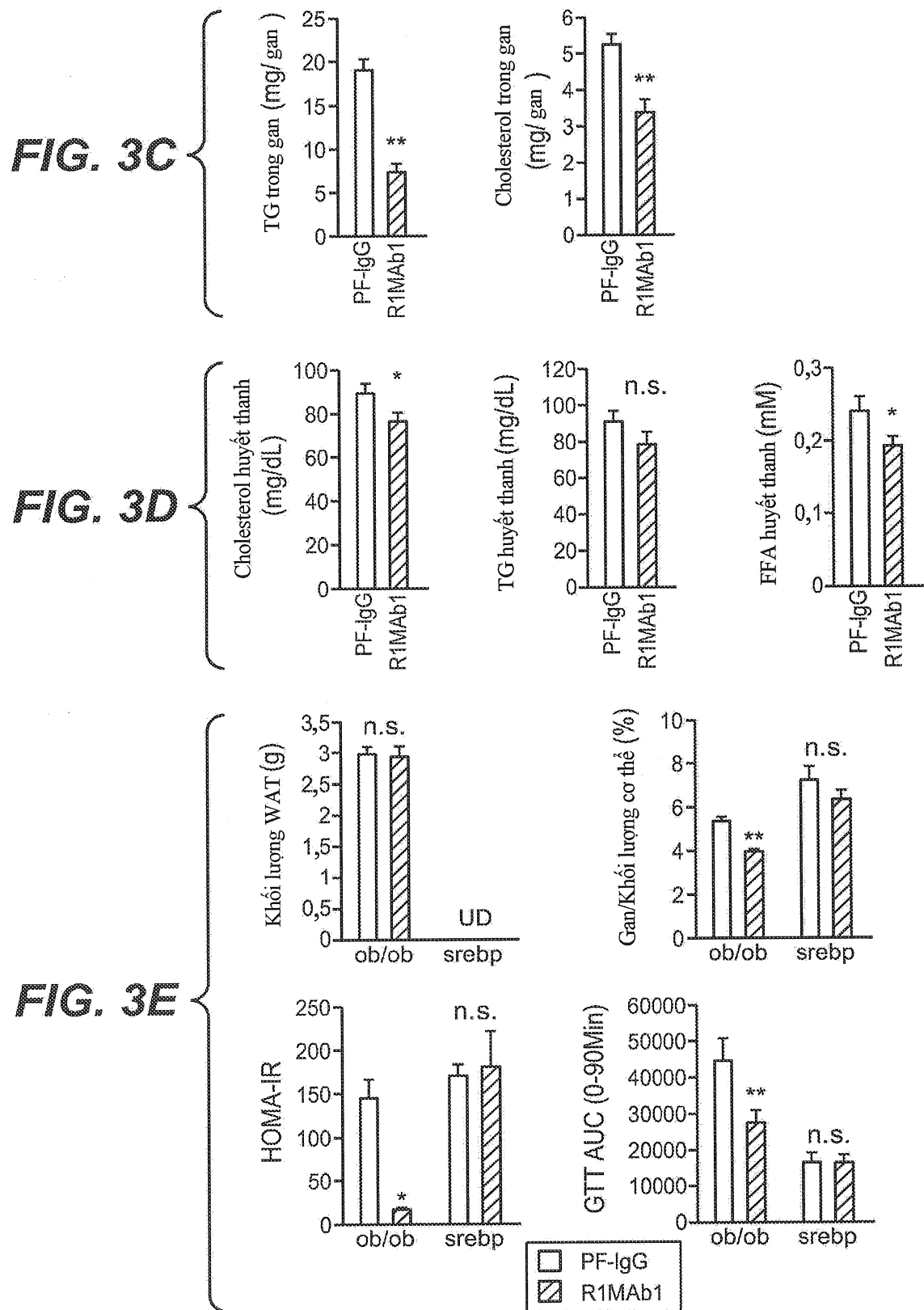
FIG. 2D

FIG. 2E**FIG. 3A**

PF -IgG đối chứng 1mpk

R1MAb1 1mpk

FIG. 3B



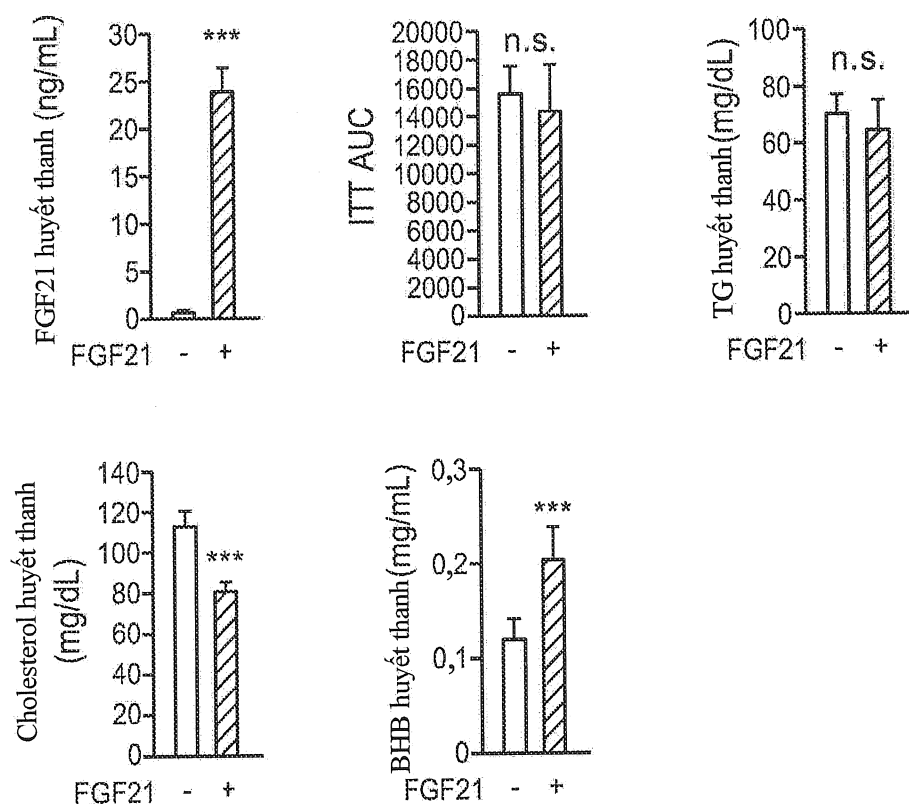
**FIG. 3F**

FIG. 4A

FIG. 4A-1 FIG. 4A-2

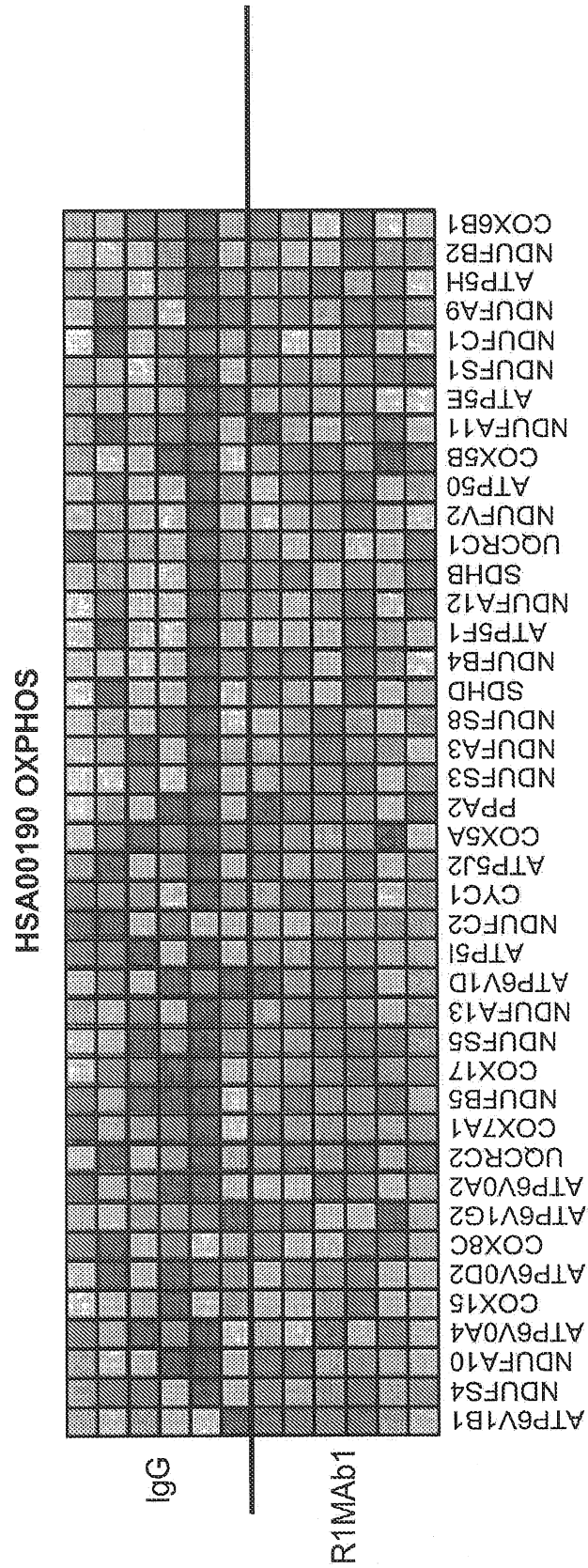


FIG. 4A-1

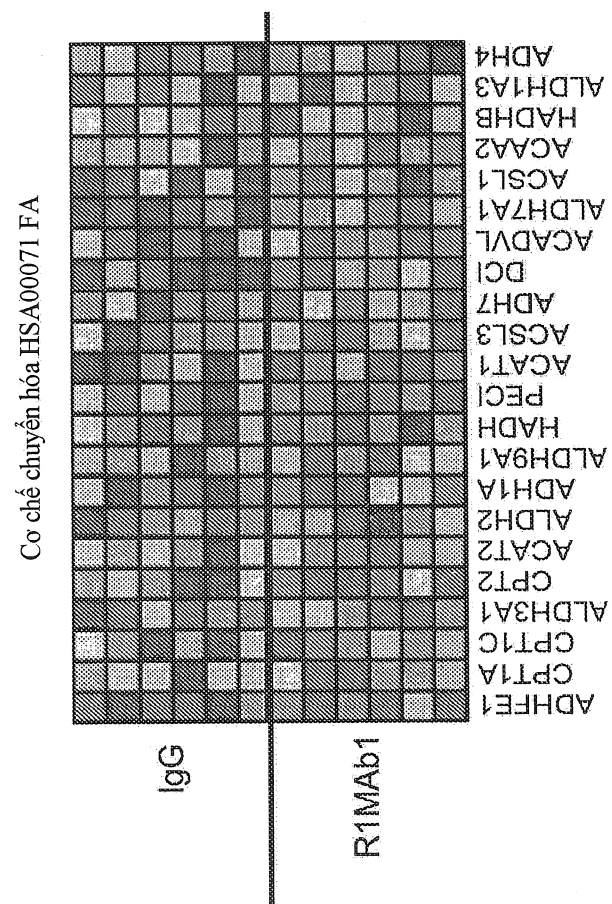
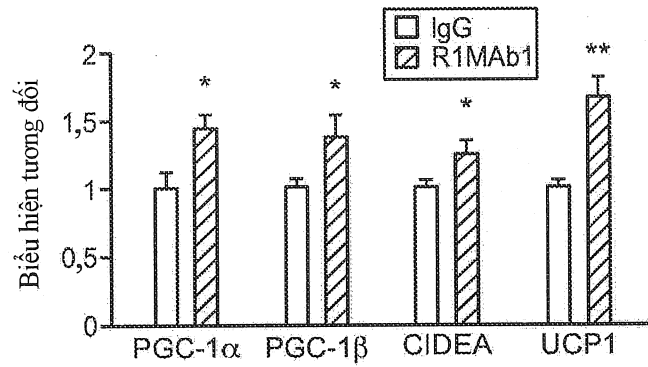
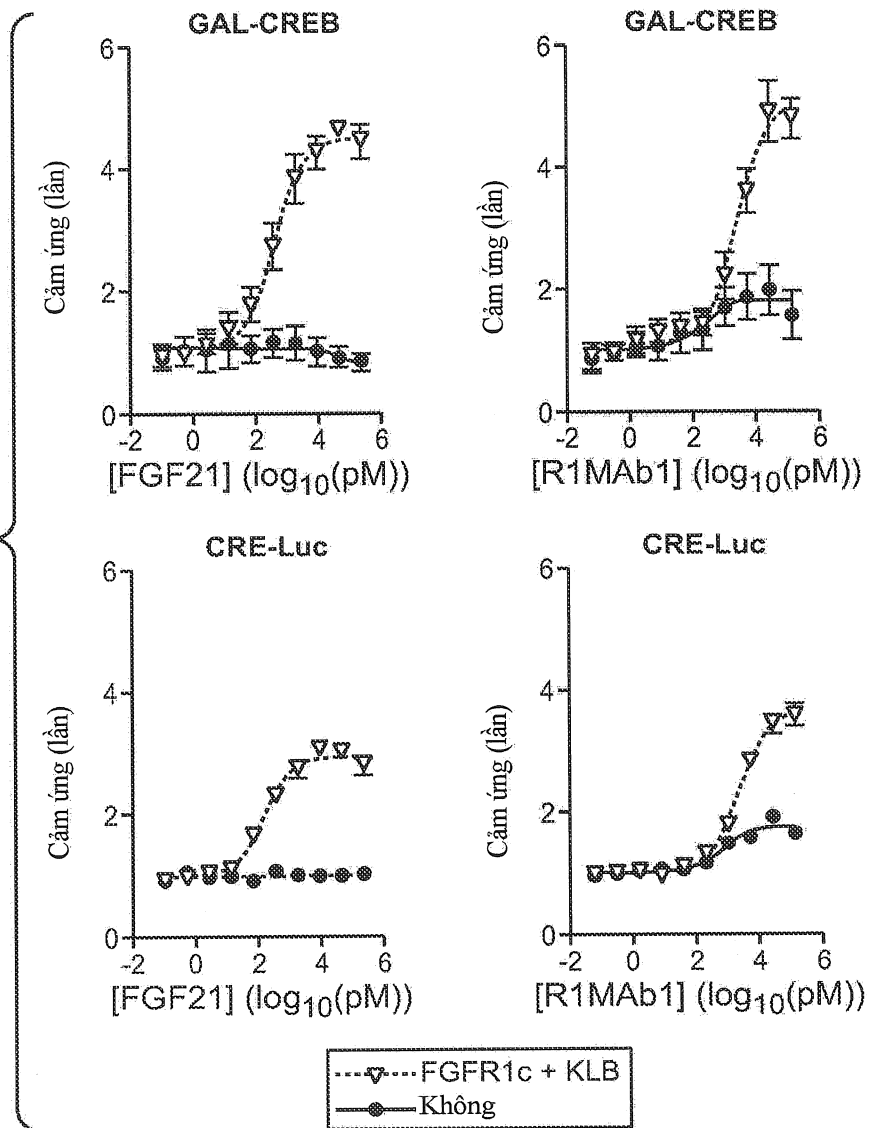


FIG. 4A-2

FIG. 4B**FIG. 4C**

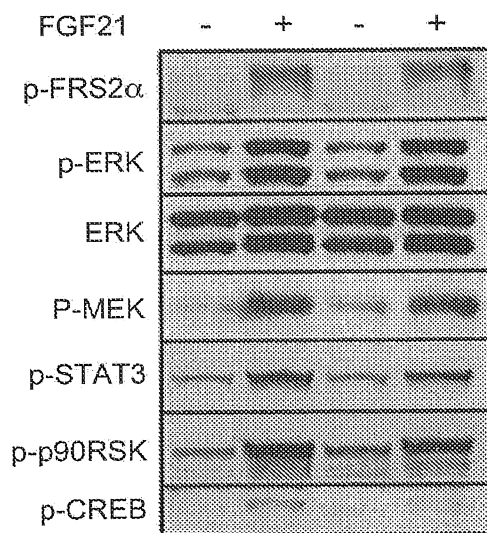
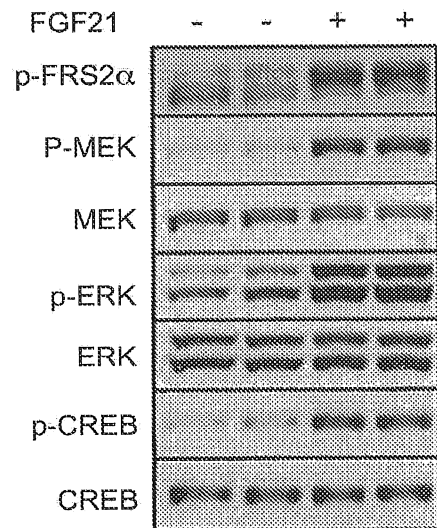
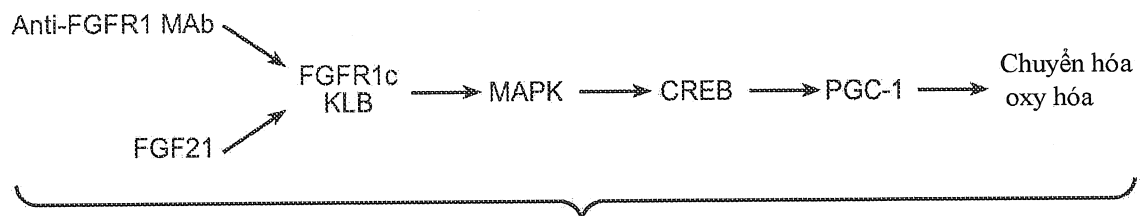
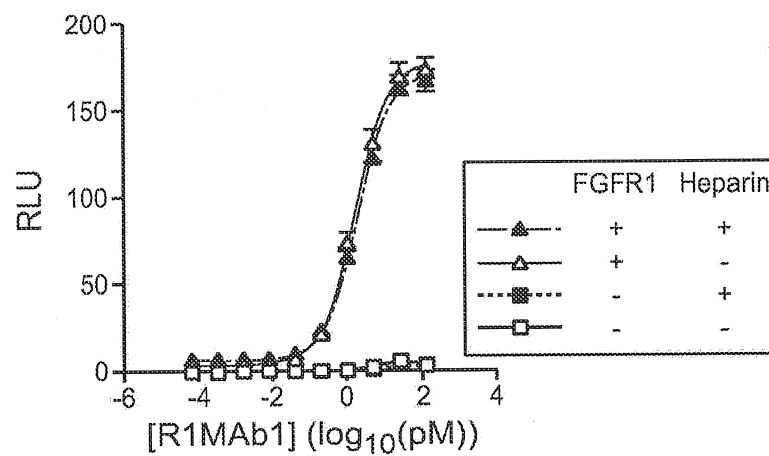
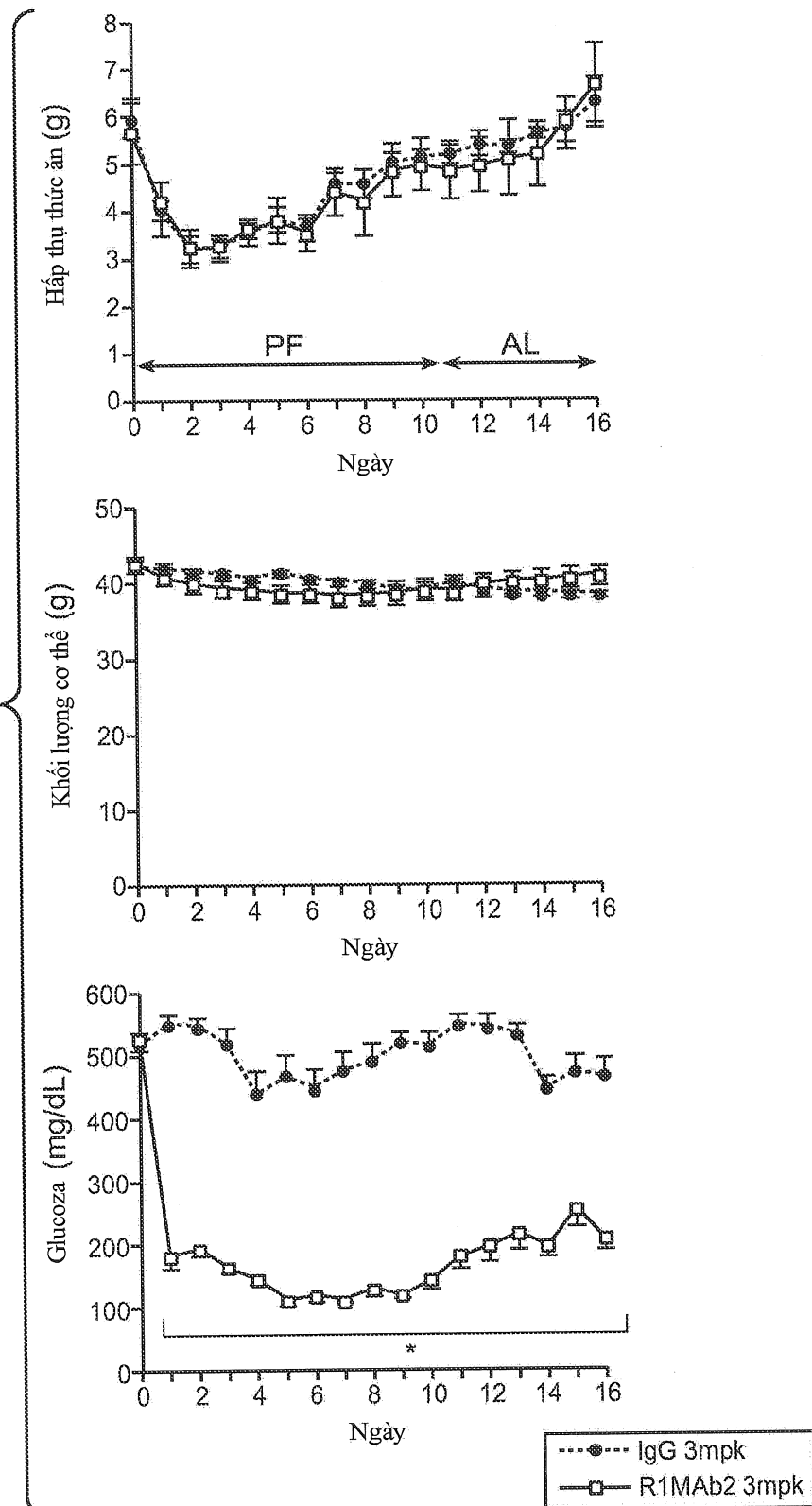
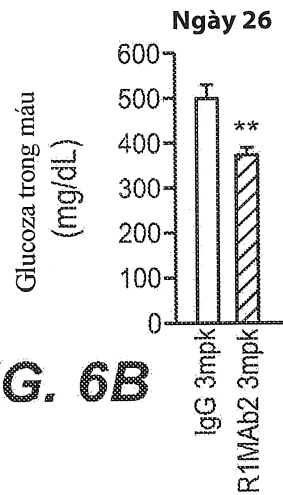
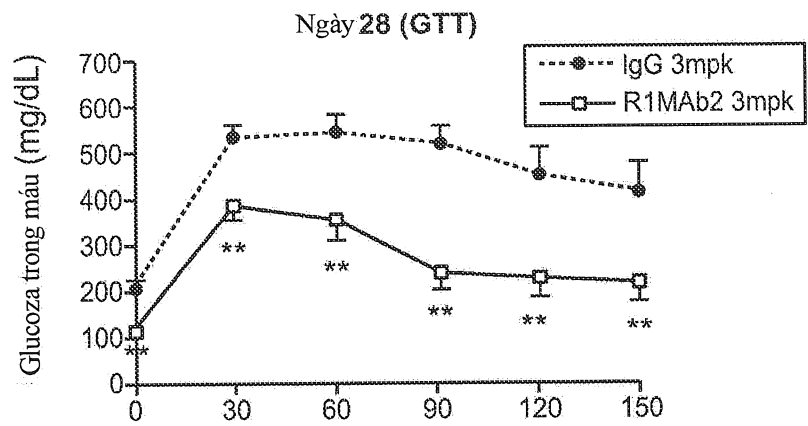
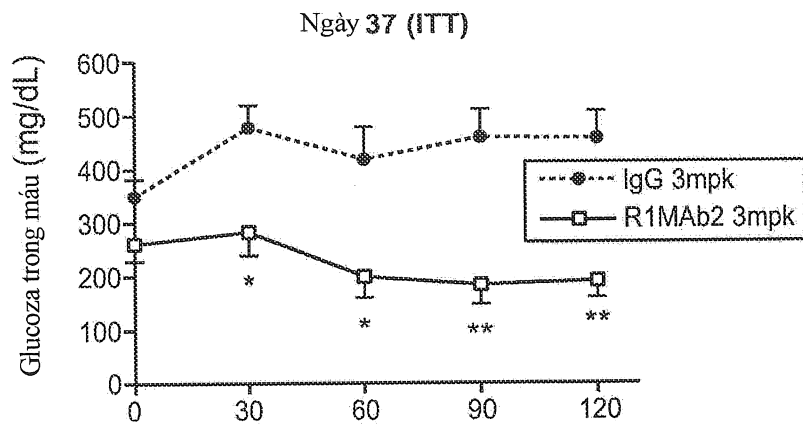
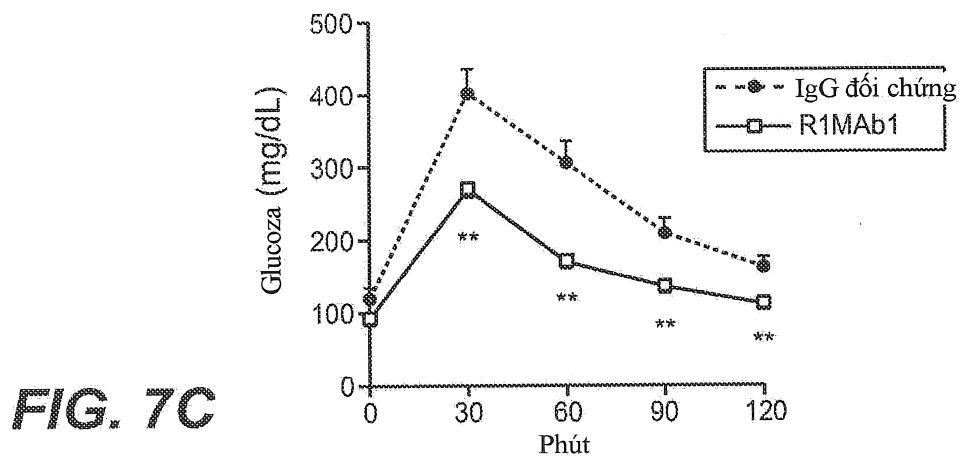
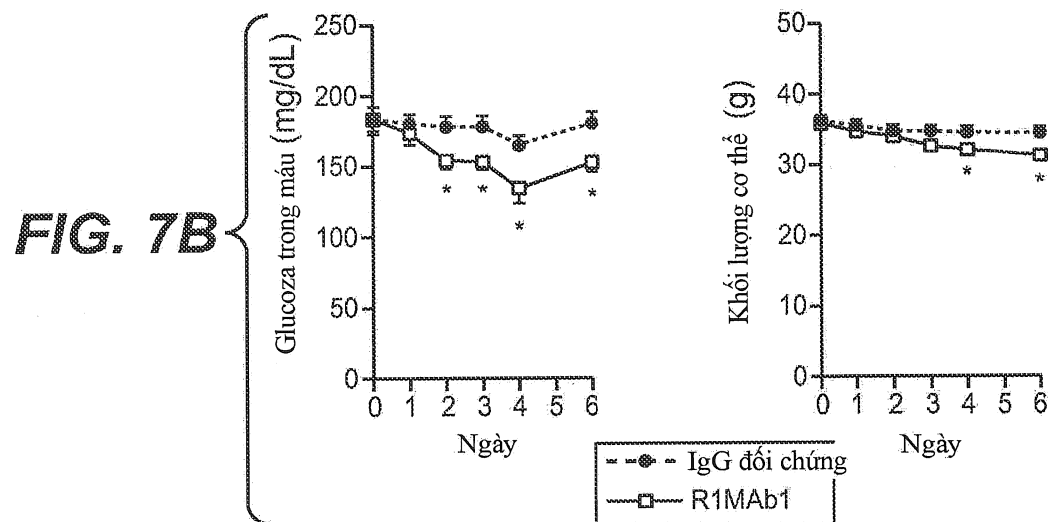
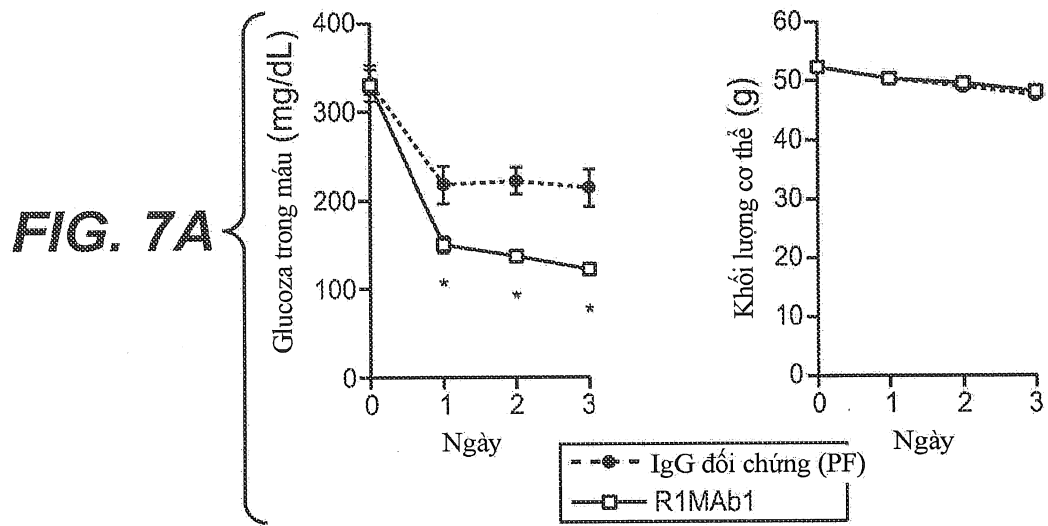
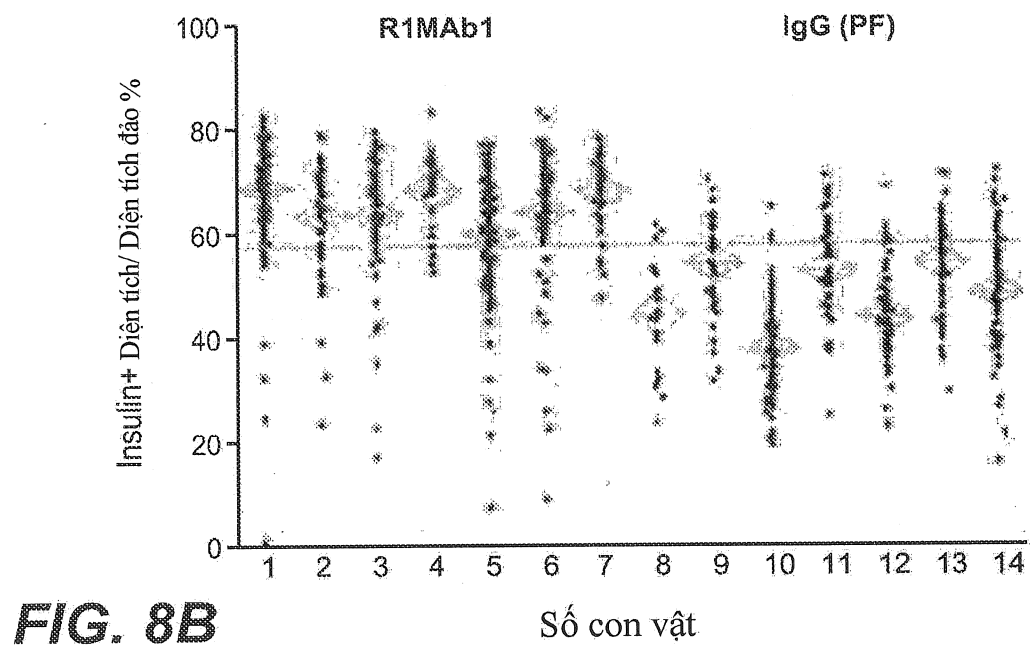
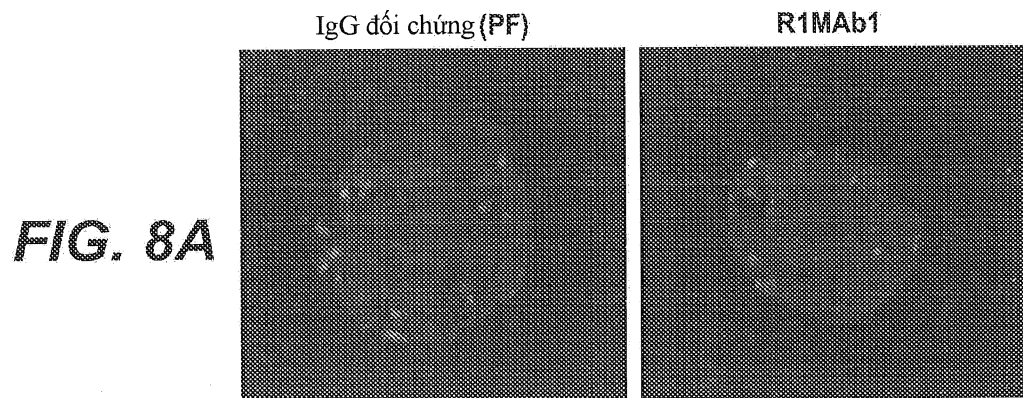
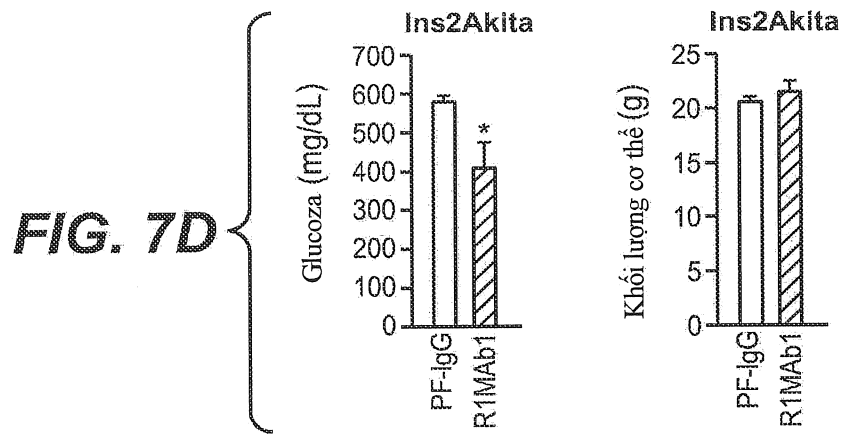
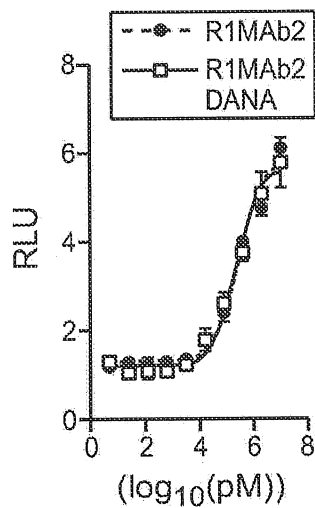
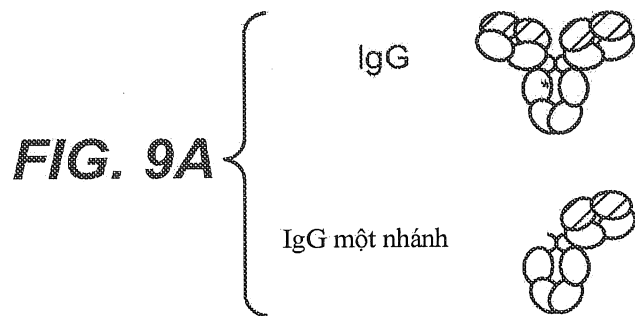
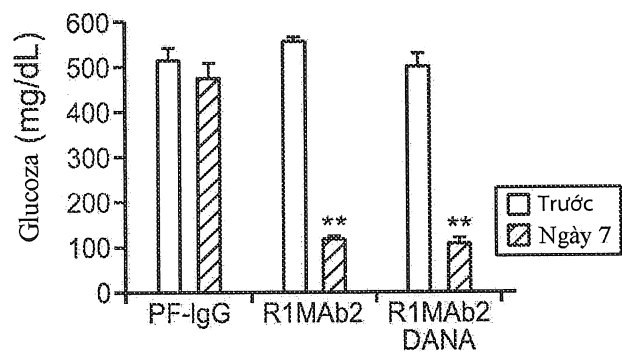
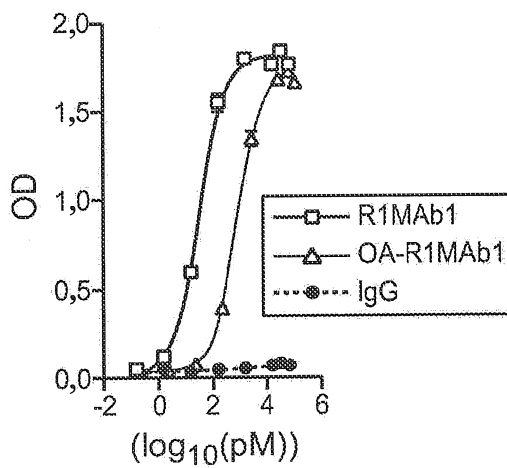
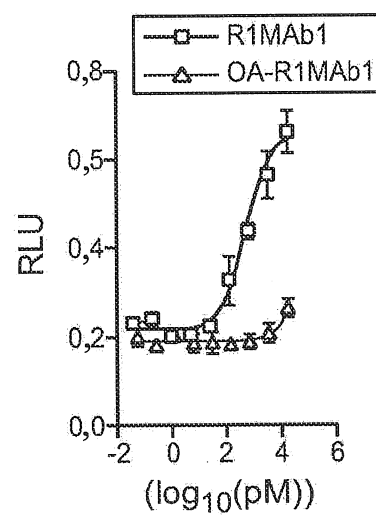
**FIG. 4D****FIG. 4E****FIG. 4F****FIG. 5**

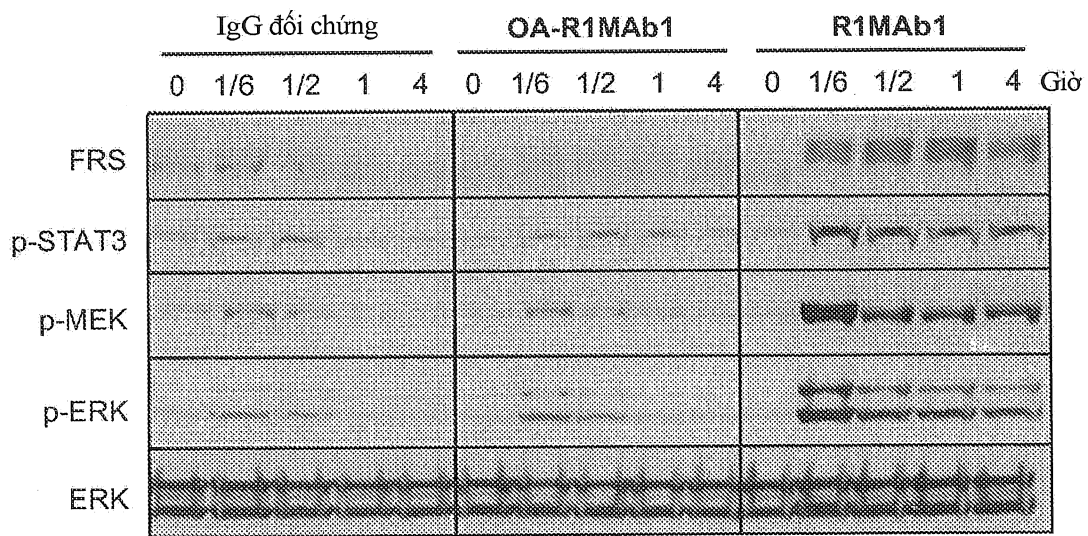
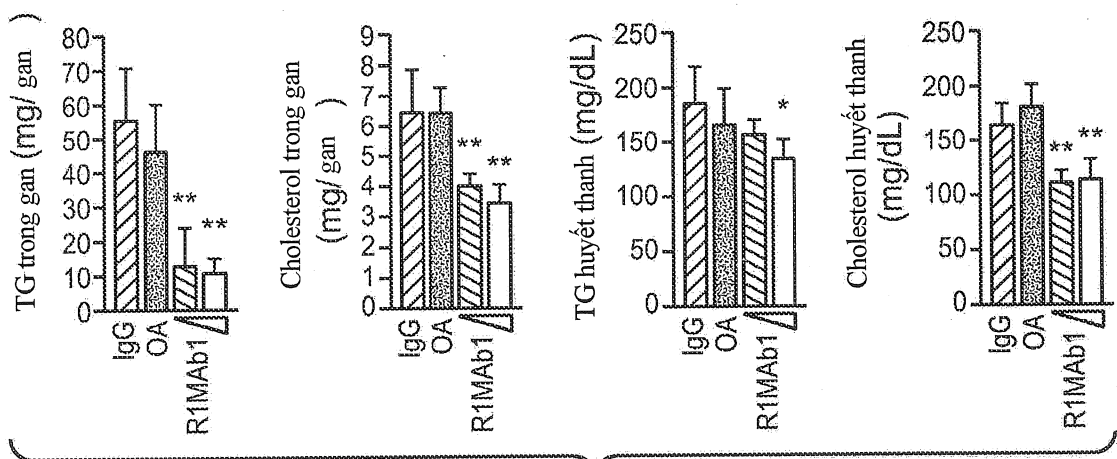
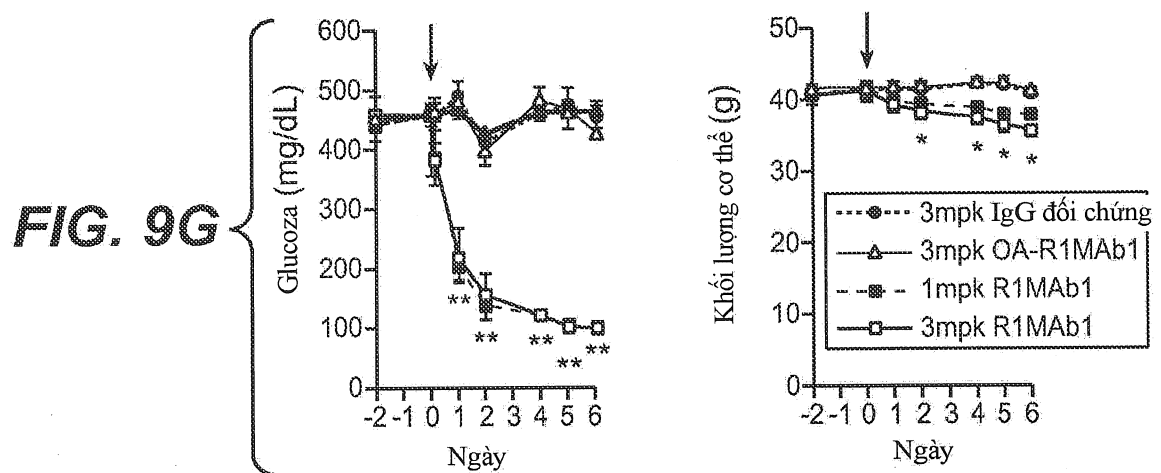
FIG. 6A

**FIG. 6B****FIG. 6C****FIG. 6D**





**FIG. 9B****FIG. 9C****FIG. 9D****FIG. 9E**

**FIG. 9F****FIG. 9H**

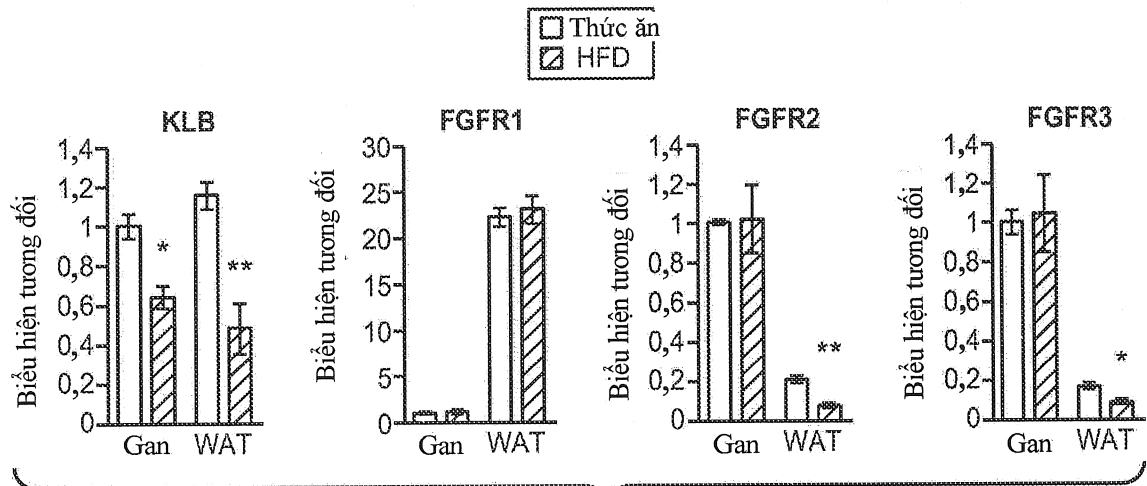


FIG. 10

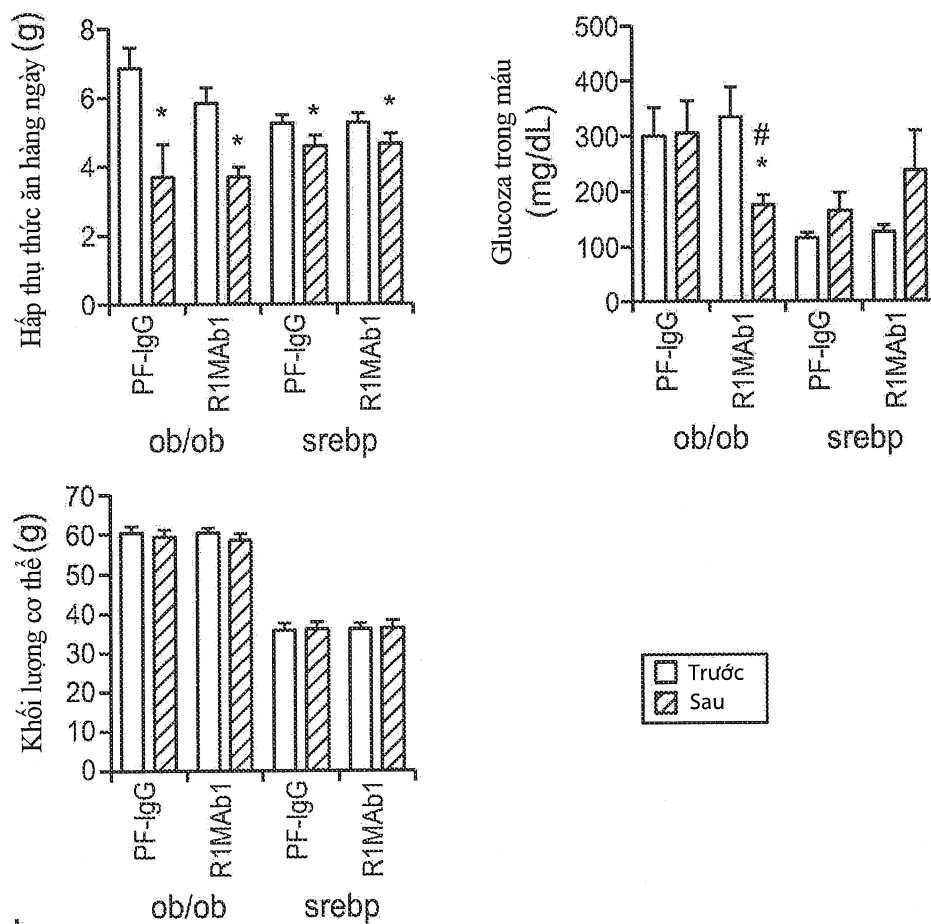


FIG. 11

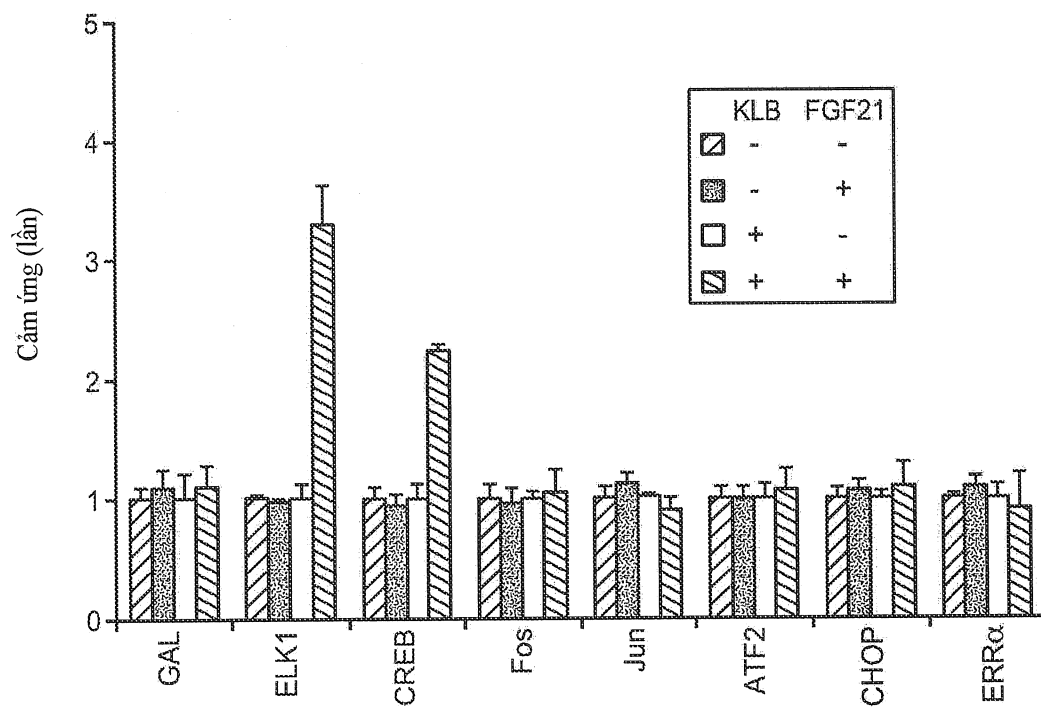


FIG. 12A

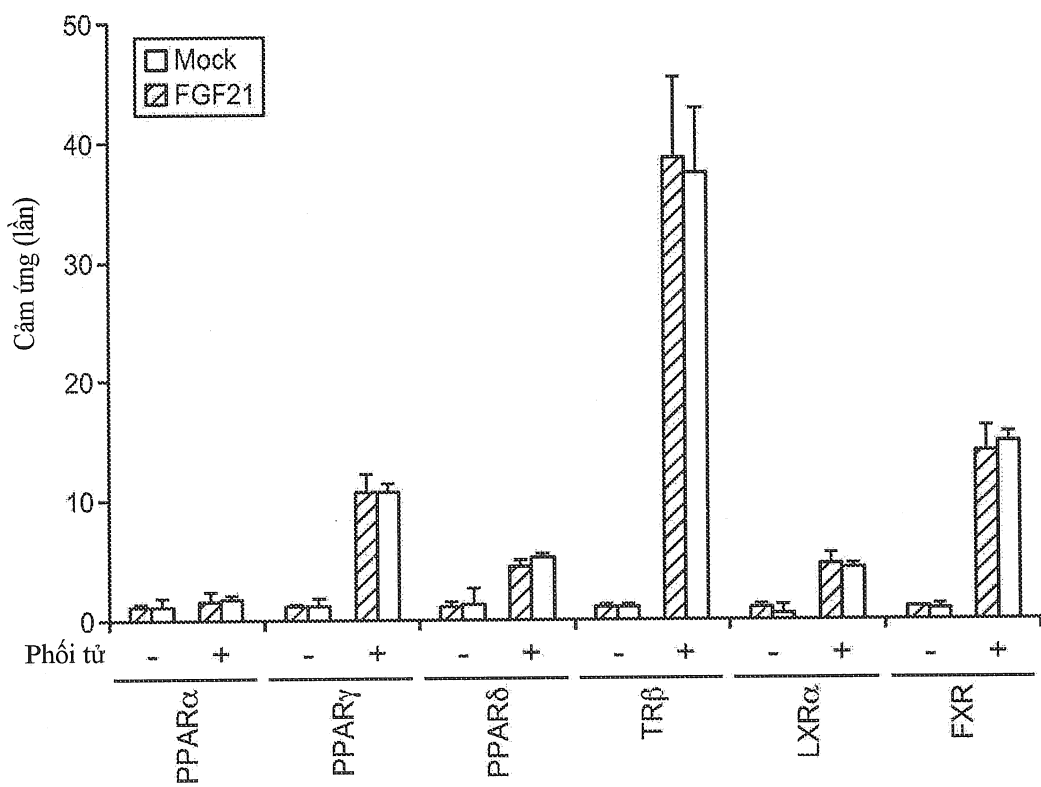
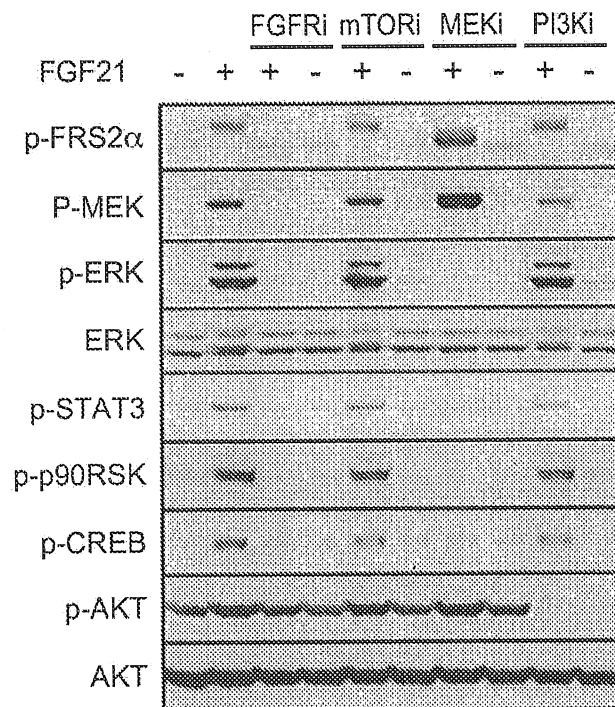
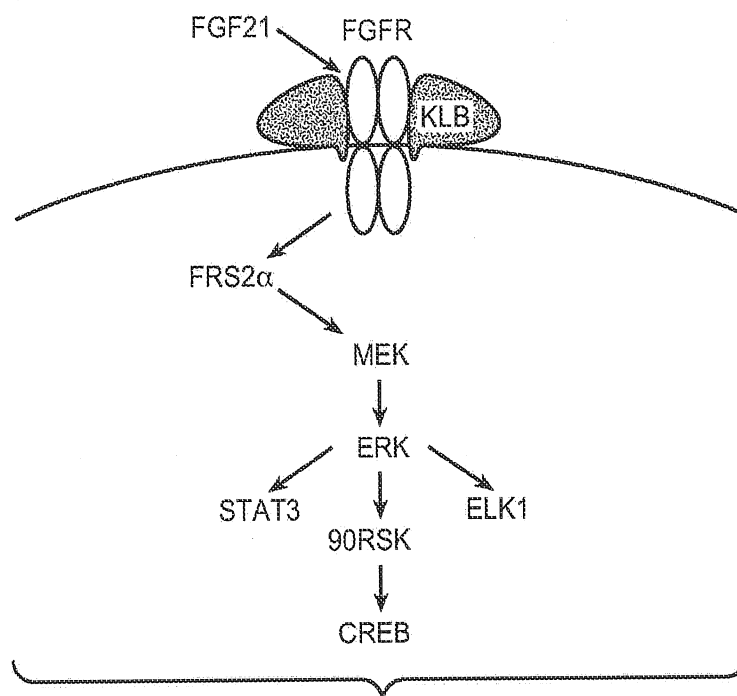


FIG. 12B

**FIG. 12C****FIG. 12D**

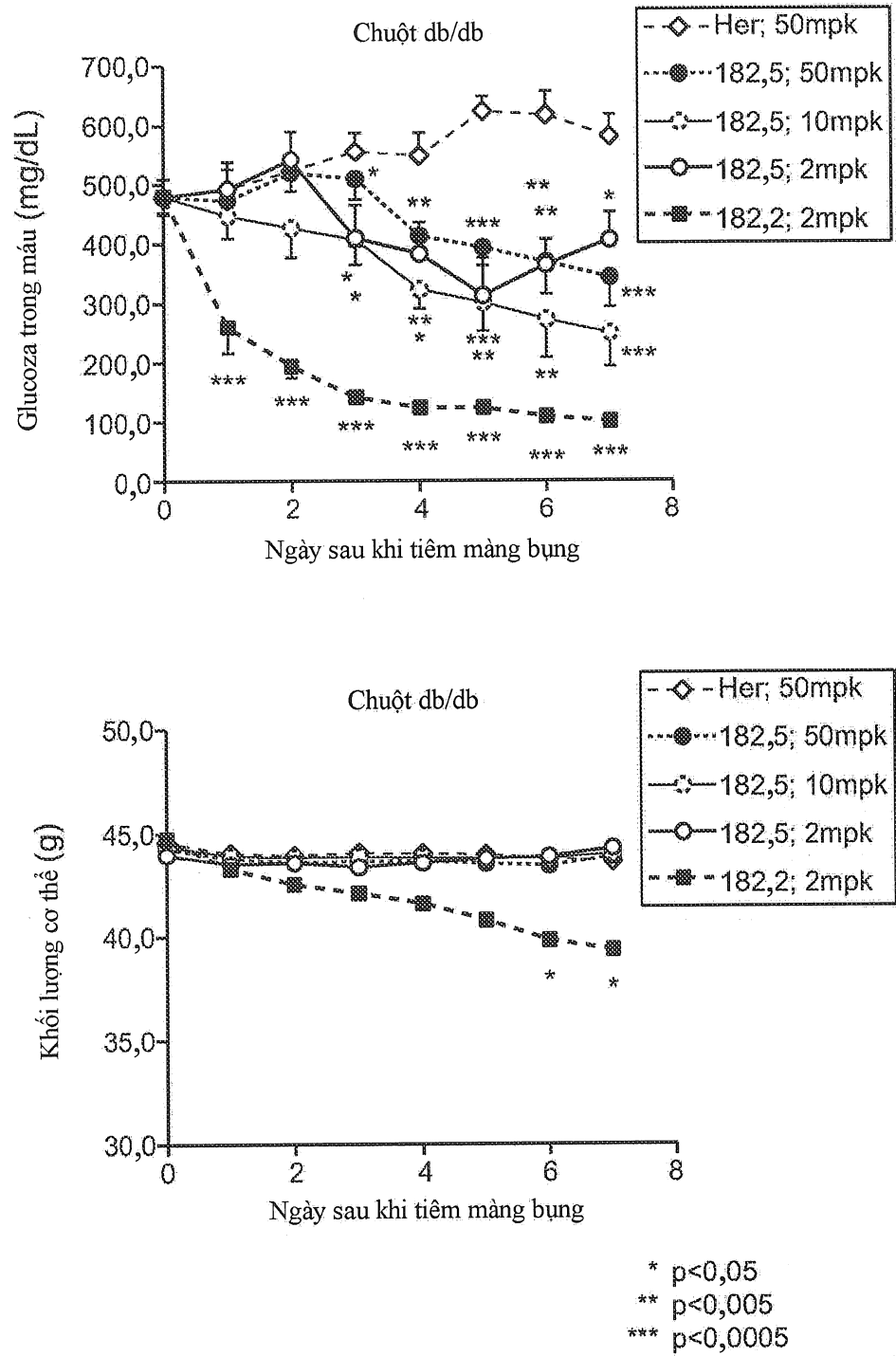


FIG. 13

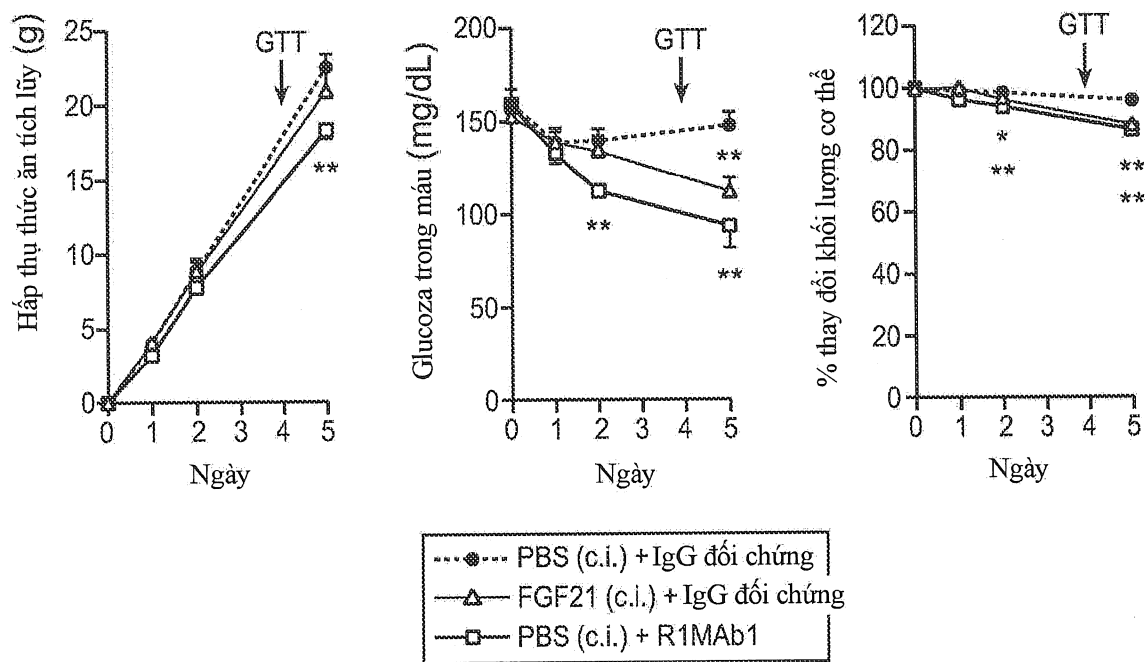


FIG. 14A

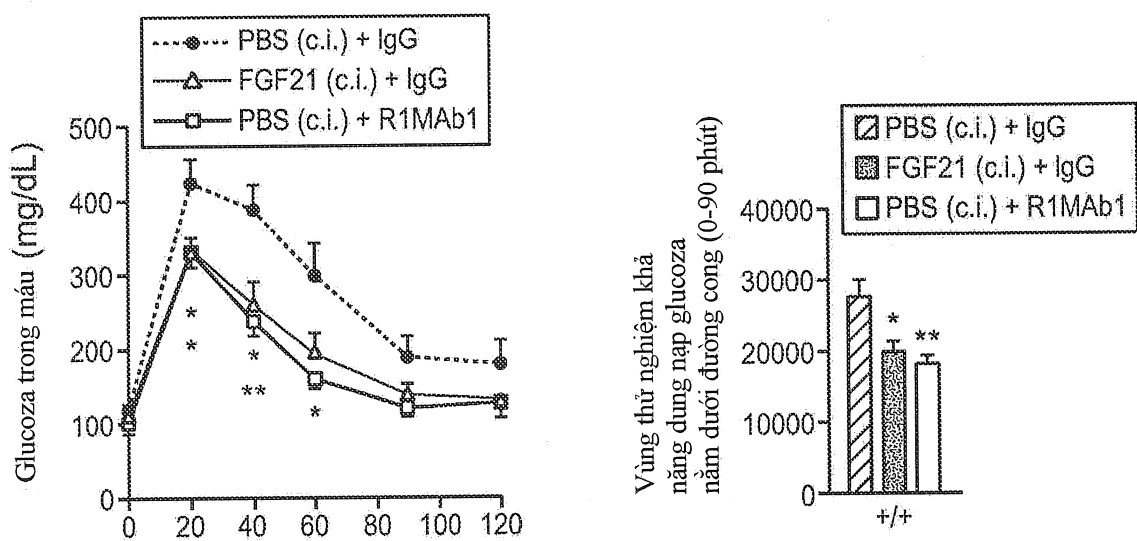


FIG. 14B

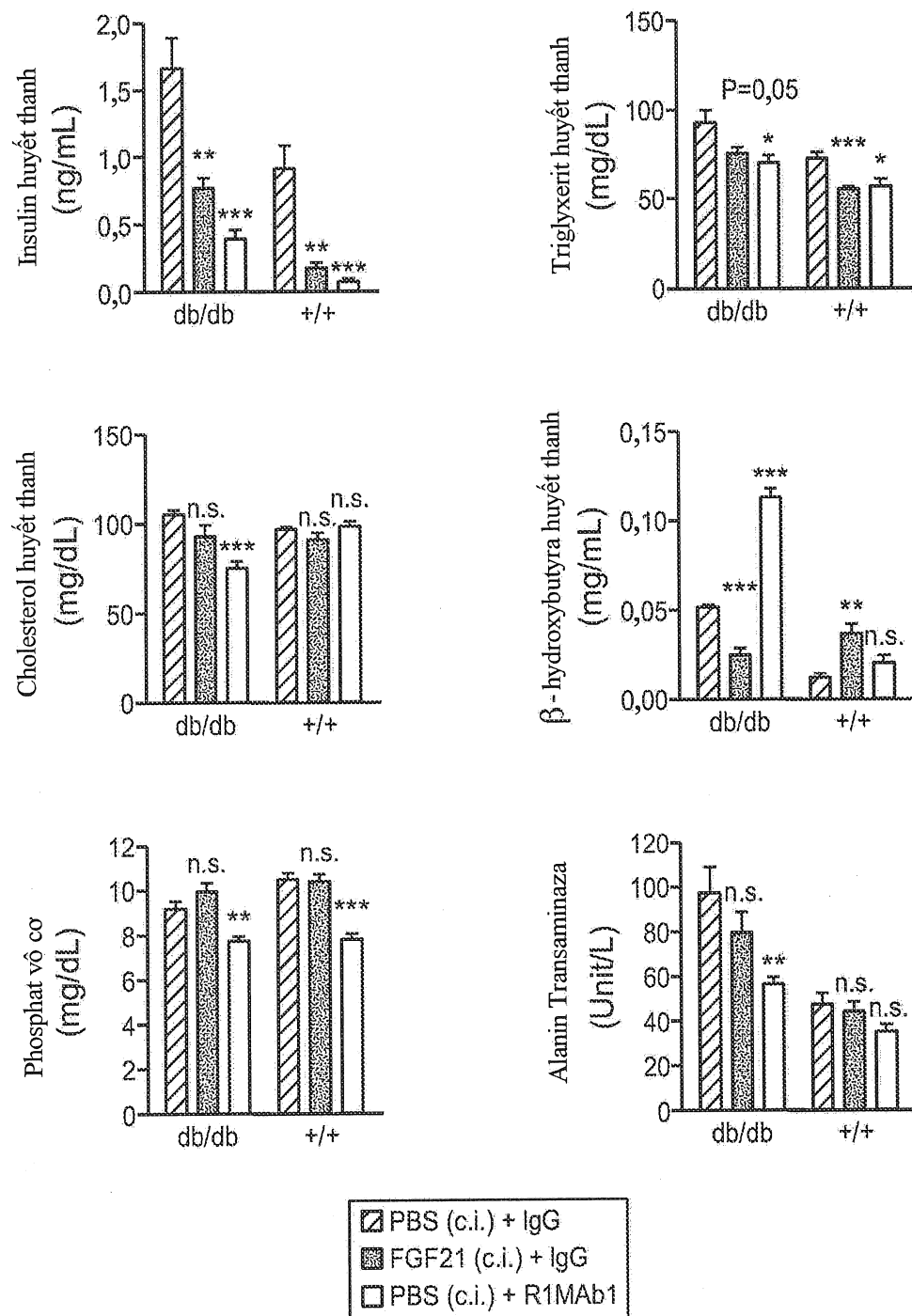
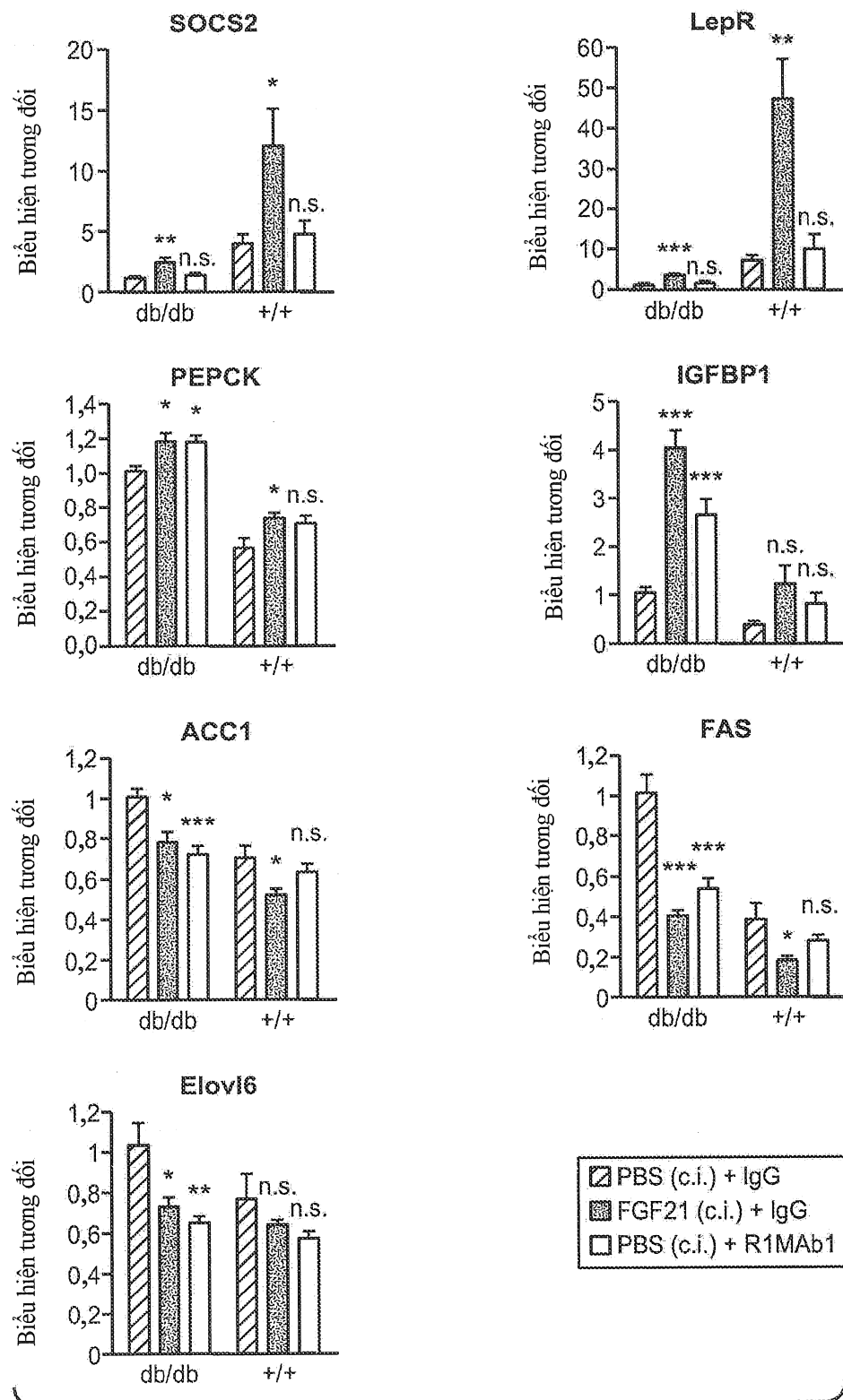


FIG. 14C

**FIG. 15**

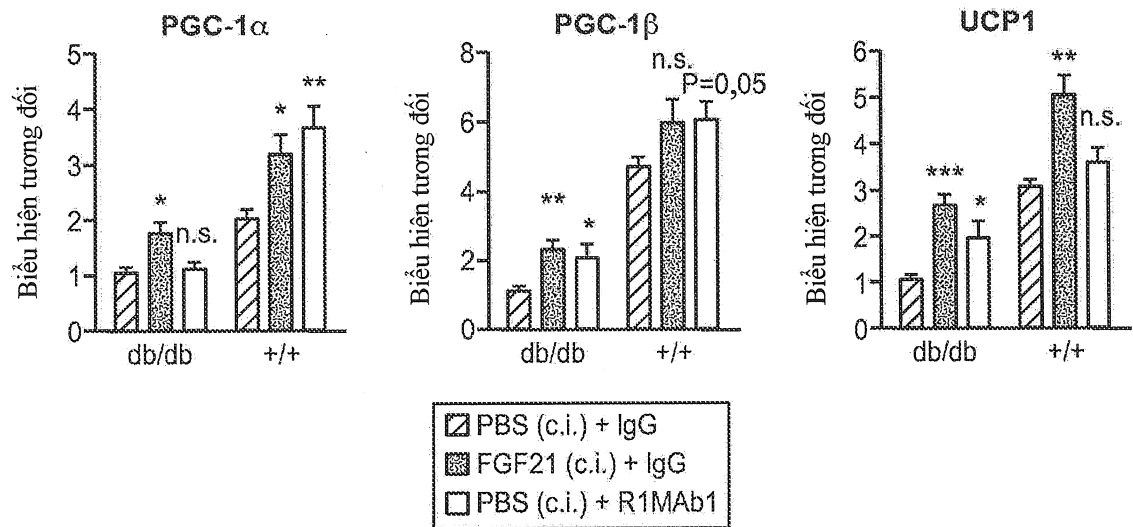


FIG. 16

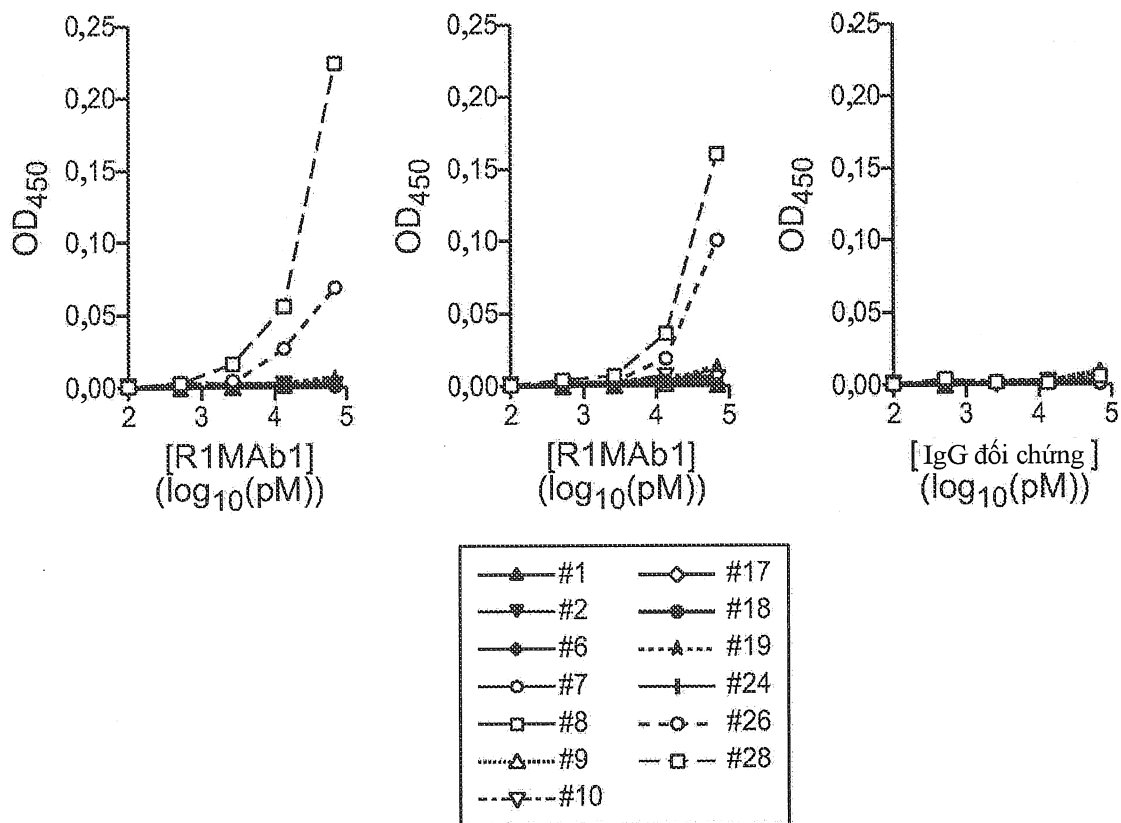


FIG. 17A

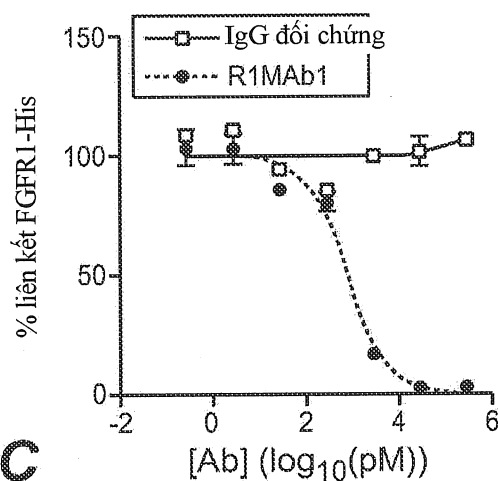
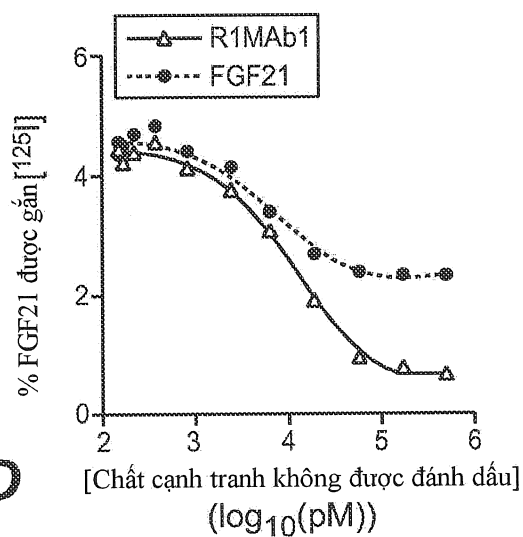
161
 ...MEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKVRYATW... 212

FGFR1: KLHAVPAAKTVKFKCP (#26) FKPDHRIGGYKVRY (#28)

FGFR2: RLHAVPAANTVKFRCP FKQEHRRIGGYKVRN

FGFR3: KLAVPAANTVRFRCP FRGEHRRIGGIKLRH

FGFR4: KLHAVPAGNTVKFRCP FHGENRRIGGIRLRH

FIG. 17B**FIG. 17C****FIG. 17D**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> GENENTECH, INC. ET AL.

<120> Kháng thể chất chủ vận kháng thụ thể yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi-1 (FGFR1) và phương pháp sản xuất và được phẩm chứa kháng thể này

<130> P4653R1WO

<140>

<141>

<150> 61/536,936

<151> 2011-09-20

<150> 61/486,731

<151> 2011-05-16

<160> 63

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 229

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asn	Thr	Lys	Pro	Asn	Pro	Val	Ala	Pro	Tyr	Trp	Thr	Ser	Pro	Glu	Lys
1				5					10					15	

Met	Glu	Lys	Lys	Leu	His	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Lys	Thr	Val	Lys	Phe
			20					25					30		

Lys	Cys	Pro	Ser	Ser	Gly	Thr	Pro	Asn	Pro	Thr	Leu	Arg	Trp	Leu	Lys
		35					40					45			

Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Pro	Asp	His	Arg	Ile	Gly	Gly	Tyr	Lys	Val
	50					55					60				

Arg	Tyr	Ala	Thr	Trp	Ser	Ile	Ile	Met	Asp	Ser	Val	Val	Pro	Ser	Asp
65					70					75				80	

Lys	Gly	Asn	Tyr	Thr	Cys	Ile	Val	Glu	Asn	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ile	Asn
				85					90					95	

His	Thr	Tyr	Gln	Leu	Asp	Val	Val	Glu	Arg	Ser	Pro	His	Arg	Pro	Ile
			100					105					110		

Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn
 115 120 125

Val Glu Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln
 130 135 140

Trp Leu Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn
 145 150 155 160

Leu Pro Tyr Val Gln Ile Leu Lys His Ser Gly Ile Asn Ser Ser Asp
 165 170 175

Ala Glu Val Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Glu Ala Gln Ser Gly Glu
 180 185 190

Tyr Val Cys Lys Val Ser Asn Tyr Ile Gly Glu Ala Asn Gln Ser Ala
 195 200 205

Trp Leu Thr Val Thr Arg Pro Val Ala Lys Ala Leu Glu Glu Arg Pro
 210 215 220

Ala Val Met Thr Ser
 225

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 2

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 Thr Ser Thr
 20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ile
 35 40 45

Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 50 55 60

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu
65 70 75 80

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

Gly Ser Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105

<210> 3

<211> 109

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 3

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 Asn
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Asp Ile
35 40 45

Tyr Pro Asn Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu
65 70 75 80

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Phe Asp
85 90 95

Ala Trp Val His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105

<210> 4

<211> 102

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /luu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 4

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 Thr Ser Asn
20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile
35 40 45

Asp Pro Tyr Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
50 55 60

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu
65 70 75 80

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

Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100

<210> 5

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asn Thr Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys
1 5 10 15

Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe
20 25 30

Lys Cys Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys
35 40 45

Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val
50 55 60

Arg Tyr Ala Thr Trp Ser Ile Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp
65 70 75 80

Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn
85 90 95

His Thr Tyr Gln Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile
100 105 110

Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn
115 120 125

Val Glu Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln
130 135 140

Trp Leu Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn
145 150 155 160

Leu Pro Tyr Val Gln Ile Leu Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp
165 170 175

Lys Glu Met Glu Val Leu His Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala
180 185 190

Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His
195 200 205

Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Glu Ala Leu Glu Glu Arg Pro Ala Val
210 215 220

Met Thr Ser
225

<210> 6
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 6
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /luu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 7
 Gly Phe Thr Phe Thr Ser Thr Trp Ile Ser
 1 5 10

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /luu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 8
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Asn Tyr Ile His
 1 5 10

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /luu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 9

Gly Phe Thr Phe Thr Ser Asn Trp Ile Ser
1 5 10

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 10

Gly Glu Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 11

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

<210> 12

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 12

Ala Asp Ile Tyr Pro Asn Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 13

<211> 17

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 13
 Asp Ile Tyr Pro Asn Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 14
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 14
 Ala Glu Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 15
 Glu Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 16
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 16

Ser Ser Gly Tyr Gly Gly Ser Asp Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 17

Ser Gly Tyr Gly Gly Ser Asp Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 18

Glu His Phe Asp Ala Trp Val His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 19

Thr Gly Thr Asp Val Met Asp Tyr
1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 20

Gly Thr Asp Val Met Asp Tyr
1 5

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 21

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 22

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 23

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)..(1)
 <223> /thay thế="Gly"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (2)..(2)
 <223> /thay thế="Glu"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> /lưu ý="Các gốc được đưa ra trong trình tự này không có ưu tiên về chú thích cho vị trí này"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (4)..(4)
 <223> /thay thế="Tyr"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> /lưu ý="Các gốc được đưa ra trong trình tự này không có ưu tiên về chú thích cho vị trí này"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (6)..(6)
 <223> /thay thế="Tyr"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> /lưu ý="Các gốc được đưa ra trong trình tự này không có ưu tiên về chú thích cho vị trí này"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (9)..(9)
 <223> /thay thế="Asp"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> /lưu ý="Các gốc được đưa ra trong trình tự này không có ưu tiên về chú thích cho vị trí này"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (11)..(11)
 <223> /thay thế="Tyr"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)

<223> /lưu ý="Các gốc được đưa ra trong trình tự này không có ưu tiên về chú thích cho vị trí này"

<400> 24

Ala	Asp	Ile	Asp	Pro	Asn	Asp	Gly	Ala	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
1				5				10						15	

Lys Gly

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (1)..(1)

<223> /thay thế="Glu"

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> /lưu ý="Các gốc được đưa ra trong trình tự này không có ưu tiên về chú thích cho vị trí này"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (3)..(3)

<223> /thay thế="Tyr"

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> /lưu ý="Các gốc được đưa ra trong trình tự này không có ưu tiên về chú thích cho vị trí này"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (5)..(5)

<223> /thay thế="Tyr"

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> /lưu ý="Các gốc được đưa ra trong trình tự này không có ưu tiên về chú thích cho vị trí này"

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (8)..(8)
 <223> /thay thế="Asp"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> /lưu ý="Các gốc được đưa ra trong trình tự này không có ưu tiên về chú thích cho vị trí này"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (10)..(10)
 <223> /thay thế="Tyr"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> /lưu ý="Các gốc được đưa ra trong trình tự này không có ưu tiên về chú thích cho vị trí này"

<400> 25
 Asp Ile Asp Pro Asn Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (5)..(5)
 <223> /thay thế="Thr"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (6)..(6)
 <223> /thay thế="Ser"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (7)..(7)
 <223> /thay thế="Thr"

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (8)..(8)
 <223> /thay thế="Tyr"

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(8)
<223> /lưu ý="Các gốc được đưa ra trong trình tự không có ưu thế
        liên quan đến các chú giải đối với các vị trí đã nêu"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> /lưu ý="Các gốc được đưa ra trong trình tự này không có ưu tiên về
        chú thích cho vị trí này"

<400> 26
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Asn Trp Ile His
1              5              10

<210> 27
<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe
1              5              10              15

Lys Cys Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys
                20              25              30

Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val
35              40              45

Arg Tyr Ala Thr Trp
50

<210> 28
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 28
Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro
1              5              10              15

```

<210> 29
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 29
 Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr
 1 5 10

<210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 30
 Arg Leu His Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro
 1 5 10 15

<210> 31
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 31
 Lys Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro
 1 5 10 15

<210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 32
 Lys Leu His Ala Val Pro Ala Gly Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 33
 Phe Lys Gln Glu His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Asn
 1 5 10

<210> 34
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 34
 Phe Arg Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His
 1 5 10

<210> 35
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 35
 Phe His Gly Glu Asn Arg Ile Gly Gly Ile Arg Leu Arg His
 1 5 10

<210> 36
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 36
 Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr Lys Pro Asn Pro Val
 1 5 10 15

Ala Pro Tyr

<210> 37
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 37
 Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu Lys Lys Leu
 1 5 10 15

His Ala Val

<210> 38
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 38
 Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro
 1 5 10 15

Ser Ser Gly

<210> 39
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 39
 Cys Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn
 1 5 10 15

Gly Lys Glu

<210> 40
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 40

Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys
1 5 10 15

Val Arg Tyr

<210> 41

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 41

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

Pro Ser Asp

<210> 42

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 42

Val Val Pro Ser Asp Lys Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu
1 5 10 15

Tyr Gly Ser

<210> 43

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 43

Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr Gln Leu Asp Val Val Glu
 1 5 10 15

Arg Ser Pro

<210> 44
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 44
 Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala
 1 5 10 15

Asn Lys Thr

<210> 45
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 45
 Pro Ala Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn Val Glu Phe Met Cys
 1 5 10 15

Lys Val Tyr

<210> 46
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 46
 Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys
 1 5 10 15

His Ile Glu

<210> 47

<211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 47
 Leu Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu
 1 5 10 15

Pro Tyr Val

<210> 48
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 48
 Asn Leu Pro Tyr Val Gln Ile Leu Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr
 1 5 10 15

Asp Lys Glu

<210> 49
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 49
 Thr Thr Asp Lys Glu Met Glu Val Leu His Leu Arg Asn Val Ser Phe
 1 5 10 15

Glu Asp Ala

<210> 50
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 50

Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile
1 5 10 15

Gly Leu Ser

<210> 51

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 51

Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Glu Ala
1 5 10 15

Leu Glu Glu

<210> 52

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 52

Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro
1 5 10 15

Ala Ala Lys

<210> 53

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn

<223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 53

Glu Lys Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val
1 5 10 15

Lys Phe Lys

<210> 54
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 54
 Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser Ser Gly Thr Pro
 1 5 10 15

Asn Pro Thr

<210> 55
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 55
 Lys Phe Lys Cys Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp
 1 5 10 15

Leu Lys Asn

<210> 56
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 56
 Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe
 1 5 10 15

Lys Pro Asp

<210> 57
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 57
 Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg
 1 5 10 15

Ile Gly Gly

<210> 58
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 58
 Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr
 1 5 10 15

Trp Ser Ile

<210> 59
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 59
 His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr Trp Ser Ile Ile
 1 5 10 15

Met Asp Ser

<210> 60
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 60
 Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser
 1 5 10 15

Ser

<210> 61
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 61
 Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser Ser Gly
 1 5 10 15

<210> 62
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 62
 Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg
 1 5 10

<210> 63
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> nguồn
 <223> /lưu ý="Mô tả trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 63
 Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn
 1 5 10