



(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)



1-0031199

(51)⁷ C07K 16/28; A61K 39/395; A61P 29/00 (13) B

(21) 1-2015-00196

(22) 21/08/2013

(86) PCT/US2013/055921 21/08/2013

(87) WO 2014/031712 27/02/2014

(30) 61/692,029 22/08/2012 US

(45) 25/02/2022 407

(43) 25/09/2015 330A

(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)

777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591, United States of America

(72) Susan D. CROLL (US); Lynn MACDONALD (US); Andrew J. MURPHY (US).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI GFR α 3 CỦA NGƯỜI VÀ ĐƯỢC PHÂN CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể liên kết với GFR α 3 của người và các phương pháp sử dụng các kháng thể đó. Theo một số phương án trình bày trong bản mô tả sáng chế, các kháng thể này là các kháng thể hoàn toàn người liên kết với GFR α 3 người. Các kháng thể nêu trong bản mô tả sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các bệnh và các rối loạn có liên quan đến một hoặc nhiều hoạt tính sinh học của GFR α 3, bao gồm việc điều trị các tình trạng đau cấp tính hoặc mãn tính, hoặc điều trị các tình trạng viêm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể của người và các mảnh liên kết kháng nguyên của các kháng thể đó, chúng liên kết đặc hiệu với thụ thể họ thành phần dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ dòng tế bào thần kinh đệm (GDNF-glial cell-line derived neurotrophic factor) của người anpha 3 ($GFR\alpha 3$), và đề cập đến việc sử dụng các kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Họ thụ thể có liên quan đến thành phần dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ dòng tế bào thần kinh đệm được cấu thành từ thành phần dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ dòng tế bào thần kinh đệm (GDNF), neurturin (NRTN), artemin (ARTN) và persephin (PSPN). Mỗi thành viên của họ GDNF này liên kết với thụ thể được neo bởi glycozylphosphatidylinositol (GPI) kết hợp với màng sinh chất. Họ thụ thể này được gọi là các anpha của thụ thể liên quan đến họ GDNF (các $GFR\alpha$). Họ thụ thể này được cấu thành từ bốn thụ thể $GFR\alpha$ khác nhau, $GFR\alpha 1-4$. GDNF ưu tiên liên kết với $GFR\alpha 1$, NRTN ưu tiên liên kết với $GFR\alpha 2$, ARTN ưu tiên liên kết với $GFR\alpha 3$, và PSPN ưu tiên liên kết với $GFR\alpha 4$. Mỗi phối tử họ GDNF truyền tín hiệu thông qua tyrosin kinaza thụ thể RET (RET - “sắp xếp lại trong quá trình chuyển nhiễm”), mà lần đầu tiên được phát hiện dưới dạng tiền gen gây ung thư. Thụ thể RET được hoạt hóa bởi các thành viên của họ GDNF chỉ nếu như phối tử này trước hết đã được liên kết với thụ thể $GFR\alpha$ của nó (xem tài liệu Airaksinen, M.S., *et al.* Nature Reviews Neuroscience (2002), 3:383-394).

Cả ARTN và $GFR\alpha 3$ đều được biểu hiện cao độ trong quá trình phát triển và có liên quan đến sự phát triển hệ thần kinh giao cảm. Ở người trưởng thành, sự biểu hiện $GFR\alpha 3$ phần lớn chỉ giới hạn ở các noron cảm thụ của các hạch rễ lưng (DRG- dorsal root ganglia) (xem tài liệu Orozco, O.E., *et al.*, European J. Neuroscience, (2001), 13:2177-2182). Ở chuột nhắt trưởng thành, artemin được biểu hiện ở tinh hoàn, tử cung, tuyến giáp, tuyến tiền liệt và mào tinh hoàn, cũng như ở các hành khứu giác và

các tiểu động mạch ở ruột và mạc treo ruột (xem các tài liệu Airaksinen, M.S., *et al.* Nature Reviews Neuroscience (2002), 3:383-394; Airaksinen, M.S. *et al.*, Brain, Behavior and Evolution, (2006), 68:181-190).

Vai trò có thể có đối với $GFR\alpha3$ và artemin trong chứng tăng cảm giác đau đã được chứng minh trong vài nghiên cứu. Ví dụ, đã chứng minh được rằng, việc tiêm protein artemin vào chân sau của động vật gặm nhấm gây ra chứng tăng cảm giác đau với nhiệt và sự cảm thụ đau này tăng lên khi artemin được tiêm cùng với thành phần tăng trưởng thần kinh (NGF) (xem tài liệu Malin, S.A., *et al.*, J. Neuroscience, (2006), 26(33): 8588-8599). Các nghiên cứu khác đã chứng minh rằng, sự biểu hiện artemin mRNA đã được điều hoà tăng trên mô hình viêm ở chuột (xem tài liệu Elitt, C.M., *et al.*, J. Neuroscience, (2006), 26(33): 8578-8587). Hơn nữa, các nghiên cứu khác đã chứng minh rằng các chuột nhắt được truyền gen artemin có biểu hiện cao của TRPV1, TRPA1 và có mức nhạy cảm tập tính tăng đối với nóng và lạnh (xem tài liệu Elitt, C.M., *et al.*, J. Neuroscience, (2006), 26(33): 8578-8587). Ngoài ra, vai trò có thể có đối với $GFR\alpha3$ trong sự quá mẫn ở phủ tạng đã được chứng minh bằng các nghiên cứu ở các chuột nhắt bị làm bất hoạt $GFR\alpha3$, theo đó các con chuột nhắt này đã thể hiện sự suy giảm tính quá mẫn ở phủ tạng sau khi điều trị theo đường trong đại tràng bằng TNBS (axit 2,4,6-trinitrobenzen sulfonic) so với các chuột nhắt C57BL/6 kiểu hoang dại (xem tài liệu Tanaka, T., *et al.*, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. (2011), 300:G418-G424). Vai trò có thể có đối với artemin và thụ thể $GFR\alpha3$ của nó trong cảm giác đau có liên quan đến viêm tụy cũng đã được chứng minh bằng nghiên cứu tiến hành trên các bệnh nhân bị phẫu thuật cắt bỏ đầu tụy (xem tài liệu Ceyhan, G.O., *et al.*, Gut, (2007), 56:534-544). Trên cơ sở các nghiên cứu nêu trên, các nghiên cứu tiếp theo đã được cho phép để xác định xem việc điều trị bằng chất ức chế hoạt tính $GFR\alpha$ có thể có lợi hay không có lợi cho các bệnh nhân bị cảm giác đau hoặc bị tăng cảm giác đau và/hoặc bị quá mẫn.

Các kháng thể liên kết với $GFR\alpha3$ được mô tả trong tài liệu US 6,861,509. Ngoài ra, tài liệu US 6,677,135 bộc lộ trình tự chiều dài toàn bộ $GFR\alpha3$ chiều dài toàn bộ, còn các biến thể nối ghép của phân tử $GFR\alpha3$ được mô tả trong các tài liệu US 7,026,138; US2007/0232535 và US2006/0216289. Tài liệu US 7,138,251 bộc lộ các trình tự axit amin có 99% độ tương đồng với chiều dài toàn bộ- $GFR\alpha3$ chiều dài toàn

bộ và việc điều chế các kháng thể đơn dòng nhân hoá với phân tử đó cũng được mô tả trong patent này. WO2006/138721 đề cập đến kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết một cách chọn lọc với GFR α 3 và ức chế sự tạo thành của phức bậc ba Neublastin-GFR α 3-Ret.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng hoàn toàn của người (các mAb) và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với GFR α 3 người và ức chế hoặc phong bế hoạt tính của nó, ví dụ như phong bế sự liên kết của GFR α 3 vào thành phần dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ dòng tế bào thần kinh đệm, artemin, và có thể phong bế sự hoạt hoá tiếp theo của tyrosin kinaza thụ thể RET và/hoặc phong bế sự truyền tín hiệu qua RET và/hoặc phong bế sự truyền tín hiệu qua chất trung gian khác với RET. Các kháng thể đó hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng có thể hữu ích để điều trị chứng tăng cảm giác đau, loạn cảm đau và/hoặc sự quá mẫn với kích thích cảm giác bất kỳ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, áp suất, nóng và/hoặc lạnh. Các kháng thể này cũng có thể được sử dụng để điều trị đau hoặc sự quá mẫn liên quan đến nhiều tình trạng và rối loạn, mà trong đó cần phong bế sự tương tác của GFR α 3 với artemin. Các kháng thể này cũng có thể được sử dụng để ức chế sự tăng trưởng, sự tăng sinh và/hoặc sự di căn của tế bào khối u.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết đặc hiệu với GFR α 3 của người, trong đó kháng thể này chứa ba chuỗi nặng CDR (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) và ba chuỗi nhẹ CDs (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) được chứa trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 381/389 và 397/405.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282,

290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 381/389 và 397/405.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm có các SEQ ID NO: 50/58, 146/154, 210/218 và 290/298.

Theo một phương án, kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết đặc hiệu với GFR α 3 của người có một hoặc nhiều đặc trưng sau đây:

(i) biểu hiện K_D nằm trong khoảng từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M khi trị số được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt;

(ii) biểu hiện khả năng phong bế khoảng từ 50-100% sự liên kết của GFR α 3 vào phối tử của nó, artemin, với trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 40pM đến 15nM;

(iii) biểu hiện khả năng phong bế khoảng từ 20% đến 100% sự liên kết của GFR α 3 vào giá thể rắn được phủ hỗn hợp gồm artemin và RET;

(iv) phong bế hoặc ức chế sự hoạt hoá phụ thuộc artemin của RET, với IC_{50} nằm trong khoảng từ 200pM đến 50nM;

(v) ức chế hoặc làm giảm một hoặc nhiều cảm thụ đau đáp ứng cảm thụ đau trên mô hình *in vivo* của đau do ung thư xương;

(vi) ức chế hoặc làm giảm sự tăng cảm giác đau với nhiệt mẫn cảm với artemin *in vivo*; hoặc

(vii) ức chế hoặc làm giảm loạn cảm đau trên mô hình thoái hóa khớp thoái hóa khớp *in vivo*; không phản ứng chéo với các đồng thụ thể GFR đối với RET(viii) vùng biến đổi vùng biến đổi Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, trong đó:

(a) kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể thể khảm, kháng thể trong nhân đơn bào hóa và kháng thể người, và/hoặc;

(b) kháng thể không phản ứng chéo với GFR α 1 của người hoặc GFR α 2 của người, và/hoặc;

(c) kháng thể là kháng thể đơn dòng của người chứa (a) vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 2, 18,

34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 381 và 397 và (b) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 389 và 405.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, trong đó:

(a) kháng thể thể hiện khả năng phong bế khoảng 50-95% sự liên kết $\text{GFR}\alpha 3$ của người vào phổi tử của nó, artemin, với trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 40pM đến khoảng 750pM;

(b) kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó phong bế khoảng 75-100% sự liên kết $\text{GFR}\alpha 3$ của người vào phổi tử của nó, artemin, với trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 400pM đến khoảng 15nM;

(c) kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó phong bế hoặc ức chế sự hoạt hoá phụ thuộc artemin của RET của người với IC_{50} nằm trong khoảng từ 300pM đến khoảng 5nM; hoặc

(d) kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó phong bế hoặc ức chế sự hoạt hoá phụ thuộc artemin của RET của khỉ cynomolgus, với IC_{50} nằm trong khoảng từ 0,7nM đến khoảng 2,5nM.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phân tử nucleic được phân lập mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vector biểu hiện chứa phân tử axit nucleic theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể kháng $\text{GFR}\alpha 3$ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm các bước đưa vector biểu hiện theo sáng chế vào tế bào chủ được phân lập, nuôi tế bào trong các điều kiện cho phép sản xuất kháng thể hoặc mảnh của chúng, và thu hồi kháng thể được tạo ra.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh của chúng theo sáng chế và chất mang hoặc chất pha loãng được dụng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế và chất điều trị thứ hai được chọn từ nhóm

gồm opioit, chất ức chế COX-2, thuốc gây tê cục bộ, chất điều biến NMDA, chất chủ vận thụ thể canabinoit, chất điều biến họ P2X, chất đối kháng VR1, chất đối kháng chất P, chất đối kháng GFR α 3 thứ hai, chất đối kháng xytokin hoặc đối kháng thụ thể xytokin, chất ức chế thành phần tăng trưởng thần kinh (NGF) (chất ức chế phân tử nhỏ hoặc kháng thể kháng NGF), chất ức chế BDNF, TrkA, TrkB hoặc p75, aspirin, NSAID, steroid, mocfin, chất ức chế tái hấp thu serotonin chọn lọc (SSRI- selective serotonin reuptake inhibitor), chất ức chế tái hấp thu serotonin norepinephrin (SNRI- serotonin norepinephrine reuptake inhibitor), chất ức chế kênh natri cổng điện áp (Na_v), chất ức chế kênh canxi, chất ức chế kênh kali, chất ức chế thành phần hoại tử khối u (TNF-tumor necrosis factor) hoặc ức chế thụ thể TNF, chất ức chế TWEAK (chất kích thích WEAK chết theo chương trình có liên quan đến TNF), chất ức chế RET, chất ức chế phối tử họ GDNF, chất ức chế GFR α 1, GFR α 2 hoặc GFR α 4, chất ức chế kênh ion mẫn cảm axit (ASIC1 hoặc ASIC3), chất chống co giật (gabapentin hoặc pregabalin), chất ức chế thụ thể prekinetixin (PROK1 và PROK2), chất ức chế caspaza, chất ức chế p38, chất ức chế IKK1/2, CTLA-4Ig và corticosteroid; và chất mang hoặc chất pha loãng được dụng; tùy ý trong đó chất đối kháng GFR α 3 thứ hai là phân tử hữu cơ nhỏ, chất đối kháng polypeptit, kháng thể thứ hai đặc hiệu với GFR α 3, siARN hoặc phân tử đối nghĩa đặc hiệu với GFR α 3; hoặc trong đó chất đối kháng xytokin hoặc đối kháng thụ thể xytokin là chất đối kháng interleukin-1 (IL-1), chất đối kháng IL-6, hoặc chất đối kháng IL-18.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, hoặc được phẩm theo sáng chế, để sử dụng trong việc điều trị tình trạng hoặc bệnh có liên quan đến GFR α 3, hoặc đau liên quan đến tình trạng hoặc bệnh có liên quan đến GFR α 3, trong đó tình trạng hoặc bệnh có liên quan đến GFR α 3 được ngăn ngừa, được làm biến chuyển tốt lên, hoặc được làm giảm mức độ nghiêm trọng hoặc tần suất xảy ra, hoặc đau có liên quan đến tình trạng hay bệnh nêu trên được ngăn ngừa, được làm biến chuyển tốt lên, hoặc được làm giảm mức độ nghiêm trọng hoặc tần suất xảy ra; trong đó tình trạng hoặc bệnh có liên quan đến GFR α 3 được chọn từ nhóm bao gồm đau cấp tính, đau mãn tính, đau do bệnh thần kinh, đau do viêm, hội chứng đau cơ năng, viêm khớp, viêm tủy, thoái hóa khớp, đau khớp, đau đầu theo cụm, đau dây thần kinh sinh ba, đau thần kinh do ecpet,

đau thần kinh toàn thân, các rối loạn thoái hoá thần kinh, các rối loạn vận động, các rối loạn thần kinh-nội tiết, mất điều vận, đau nội tạng, bệnh gút, đau thần kinh sau ecpet, bệnh thần kinh đái tháo đường, đau dây thần kinh toạ, đau lưng, đau đầu hoặc cổ, đau trầm trọng hoặc nan y, đau do đứt gãy, đau sau phẫu thuật, chứng đỏ đau đầu chi di truyền, đau răng, viêm mũi, đau do ung thư, hội chứng đau phức tạp ở một vùng (CRPS-complex regional pain syndrome), bệnh viêm ruột (chẳng hạn như bệnh Crohn hoặc viêm loét đại tràng) và các rối loạn ở bàng quang.

Theo một phương án, hội chứng đau cơ năng được chọn từ nhóm gồm có đau phần dưới lưng mãn tính, hội chứng ruột bị kích ứng (IBS- irritable bowel syndrome), đau xơ cơ (FM-fibromyalgia), hội chứng mỏi mãn tính, đau bụng, rối loạn khớp thái dương-hàm dưới (TMJD- temporomandibular joint disorder), hội chứng bàng quang đau (bệnh viêm bàng quang kẽ), các rối loạn/hội chứng cơ năng ruột-dạ dày, hội chứng đau ngực cơ năng, đau nửa đầu và đau đầu kiểu căng thẳng, hội chứng đau vùng chậu mãn tính, hội chứng tuyến tiền liệt đau (bệnh viêm tuyến tiền liệt mãn tính), hội chứng đa mẫn cảm với hoá chất và hội chứng chiến tranh vùng Vịnh; hoặc đau do ung thư có liên quan đến ung thư được chọn từ nhóm gồm ung thư nội mạc tử cung, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú, ung thư cổ tử cung, ung thư gan, ung thư tụy, ung thư đại tràng, ung thư dạ dày, ung thư tử cung, ung thư buồng trứng, ung thư thận, ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư não, bệnh bạch cầu, u lymphô, ung thư xương và đau có liên quan đến di căn ung thư.

Theo một phương án, kháng thể, mảnh liên kết kháng nguyên của chúng hoặc được phẩm để sử dụng trong việc điều trị tình trạng hoặc bệnh có liên quan đến GFR α 3 để dùng cho bệnh nhân kết hợp với chất điều trị thứ hai; trong đó chất điều trị thứ hai này tùy ý được chọn từ nhóm gồm có opioit, chất ức chế COX-2, thuốc gây tê, chất điều biến NMDA, chất chủ vận thụ thể canabinoit, chất điều biến họ P2X, chất đối kháng VR1, chất đối kháng chất P, chất đối kháng GFR α 3 thứ hai, chất đối kháng xytokin hoặc đối kháng thụ thể xytokin, chất ức chế thành phần tăng trưởng thần kinh (NGF) (chất ức chế phân tử nhỏ hoặc kháng thể kháng NGF), chất ức chế BDNF, TrkA, TrkB hoặc p75, aspirin, NSAID, steroid, mocfin, chất ức chế tái hấp thu serotonin chọn lọc (SSRI- selective serotonin reuptake inhibitor), chất ức chế tái hấp thu serotonin norepinephrin (SNRI- serotonin norepinephrine reuptake inhibitor),

tricyclic, chất ức chế kênh natri cổng điện áp (Na_v), chất ức chế kênh canxi, chất ức chế kênh kali, chất ức chế thành phần hoại tử khối u (TNF-tumor necrosis factor) hoặc ức chế thụ thể TNF, chất ức chế TWEAK (chất kích thích WEAK chết theo chương trình có liên quan đến TNF), chất ức chế RET, chất ức chế phối tử họ GDNF, chất ức chế $\text{GFR}\alpha 1$, $\text{GFR}\alpha 2$ hoặc $\text{GFR}\alpha 4$, chất ức chế kênh ion mẫn cảm axit (ASIC1 hoặc ASIC3), chất chống co giật (gabapentin hoặc pregabalin), chất ức chế thụ thể prekinetixin (PROK1 và PROK2), chất ức chế caspaza, chất ức chế p38, chất ức chế IKK1/2, CTLA-4Ig và corticosteroid; và chất mang hoặc chất pha loãng được dùng; tùy ý trong đó chất đối kháng $\text{GFR}\alpha 3$ thứ hai là phân tử hữu cơ nhỏ, chất đối kháng polypeptit, kháng thể thứ hai đặc hiệu với $\text{GFR}\alpha 3$, siARN hoặc phân tử đối nghĩa đặc hiệu với $\text{GFR}\alpha 3$; hoặc trong đó chất đối kháng xytokin hoặc đối kháng thụ thể xytokin là chất đối kháng interleukin-1 (IL-1), chất đối kháng IL-6, hoặc chất đối kháng IL-18.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được chọn từ nhóm gồm kháng thể chuột, kháng thể khảm, kháng thể trong nhân đơn bào hoá và kháng thể người.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó không phản ứng chéo với $\text{GFR}\alpha 1$ của người hoặc $\text{GFR}\alpha 2$ của người.

Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm a) vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 381 và 397; và b) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 389 và 405.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó thể hiện khả năng phong bế khoảng 50-95% sự liên kết của $\text{GFR}\alpha 3$ của người vào phối tử của nó, artemin, với trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 40pM đến 750pM.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó phong bế khoảng 75-100% sự liên kết của GFR α 3 của người vào phôi tử của nó, artemin, với trị số IC₅₀ khoảng từ 400pM đến 15nM.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó phong bế hoặc ức chế sự hoạt hoá phụ thuộc artemin đối của RET của người, với IC₅₀ nằm trong khoảng từ 300pM đến 5nM.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó phong bế hoặc ức chế sự hoạt hoá phụ thuộc artemin đối với RET của khỉ cynomolgus, với IC₅₀ nằm trong khoảng từ 0,7nM đến 2,5nM.

Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả trong bản mô tả này có thể chứa ba CDR chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) được chứa trong trình tự axit amin của HCVR được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 381 và 397; và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) được chứa trong trình tự axit amin của LCVR được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 389 và 405.

Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả trong bản mô tả này có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 381 và 397.

Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả trong bản mô tả này có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 389 và 405.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm các cặp SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 381/389 và 397/405.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm gồm các cặp SEQ ID NO: 50/58, 146/154, 210/218 và 290/298.

Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được mô tả trong bản mô tả này có thể chứa:

a) miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 383 và 399;

b) miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 385 và 401;

c) miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 387 và 403;

d) miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 391 và 407;

e) miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 393 và 409; và

f) miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 395 và 411.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó cạnh tranh để liên kết đặc hiệu vào GFR α 3 của người với kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa các cặp trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các cặp SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346 và 354/362, 381/389 và 397/405.

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với cùng một biểu vị trên GFR α 3 của người mà được nhận ra bởi kháng thể chứa các cặp trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chọn từ nhóm gồm các cặp SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346 và 354/362, 381/389 và 397/405.

Các kháng thể theo sáng chế có thể là có chiều dài toàn bộ (ví dụ như kháng thể IgG1 hoặc IgG4) hoặc có thể chỉ chứa phần liên kết kháng nguyên (ví dụ như mảnh Fab, F(ab')₂ hoặc scFv), và có thể được cải biến để gây ảnh hưởng tới chức năng, chẳng hạn như loại bỏ các chức năng phản ứng lại kích thích (xem tài liệu Reddy et al., 2000, *J. Immunol.* 164:1925-1933).

Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết đặc hiệu với GFR α 3 của người được mô tả trong bản mô tả này có thể chứa HCVR gồm ba CDR của chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) được chứa trong các trình tự axit amin HCVR được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 381 và 397; và/hoặc chứa LCVR gồm ba CDR của chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) được chứa trong các trình tự axit amin LCVR được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 389 và 405. Các phương pháp và các kỹ thuật để xác định các CDR trong các trình tự axit amin HCVR và LCVR đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sử dụng để xác định các CDR trong các trình tự axit amin HCVR và/hoặc LCVR được bộc lộ trong bản mô tả này. Chẳng hạn, các quy ước tiêu biểu có thể được sử dụng để xác định ranh giới của các CDR bao gồm, ví dụ, phép xác định Kabat, phép xác định Chothia, và phép xác định AbM. Theo thuật ngữ thông thường, phép xác định Kabat dựa trên tính khả biến của trình tự, phép xác định Chothia dựa trên việc định vị trí các vùng có cấu trúc vòng lặp, và phép xác định AbM dung hoà giữa các phương pháp Kabat và Chothia. Chẳng hạn, xin tham khảo các tài liệu Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); và

Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Các cơ sở dữ liệu đã công bố cũng có sẵn để xác định các trình tự CDR trong kháng thể.

Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết đặc hiệu với GFR α 3 của người được mô tả trong bản mô tả này có thể chứa:

a) miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 387 và 403; và

b) miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 395 và 411.

Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên liên kết đặc hiệu với GFR α 3 của người, như được mô tả ở các mục a) và b) nêu trên, có thể còn chứa:

c) miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 383 và 399;

d) miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 385 và 401;

e) miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 391 và 407; và

f) miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 393 và 409.

Được mô tả thêm trong bản mô tả này là kháng thể đơn dòng hoàn toàn người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với GFR α 3 của người, trong đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể của chúng biểu hiện một hoặc nhiều đặc điểm sau: i) chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274,

290, 306, 322, 338, 354, 381 và 397; ii) chứa LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 389 và 405; iii) chứa miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 280, 296, 312, 328, 344, 360, 387 và 403, hoặc trình tự gần như tương đồng của chúng có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng trình tự; và miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 288, 304, 320, 336, 352, 368, 395 và 411 hoặc trình tự gần như tương đồng của chúng có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng trình tự; iv) chứa miền HCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 276, 292, 308, 324, 340, 356, 383 và 399 hoặc trình tự gần như tương đồng của chúng với các trình tự vừa nêu có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%; miền HCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 278, 294, 310, 326, 342, 358, 385 và 401 hoặc trình tự gần như tương đồng của chúng có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng trình tự; miền LCDR1 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 300, 316, 332, 348, 364, 391 và 407 hoặc trình tự gần như tương đồng của chúng có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng trình tự; và miền LCDR2 có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 302, 318, 334, 350, 366, 393 và 409 hoặc trình tự gần như tương đồng của chúng có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng trình tự; v) biểu hiện K_D nằm trong khoảng từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt; vi) thể hiện khả năng phong bế khoảng 50-100% sự liên kết của $GFR\alpha 3$ vào phối tử của nó, artemin, với trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 40pM đến khoảng 15nM; vii) thể hiện khả năng phong bế khoảng từ 20% đến 100% sự liên kết của $GFR\alpha 3$ vào giá thể rắn có phủ hỗn hợp gồm artemin và RET; viii) phong bế hoặc ức chế sự hoạt hoá phụ thuộc artemin của RET

với IC₅₀ nằm trong khoảng từ 200pM đến khoảng 50nM; ix) ức chế hoặc làm giảm một hoặc nhiều cảm thụ đau đáp ứng cảm thụ đau trên mô hình đau do ung thư xương *in vivo*; x) ức chế hoặc làm giảm chứng tăng cảm giác đau mãn cảm hoá với nhiệt bởi artemin *in vivo*; xi) ức chế hoặc làm giảm loạn cảm đau trên mô hình bệnh thoái hóa khớp *in vivo*; xii) không phản ứng chéo với các đồng thụ thể GFR khác, ngoài thụ thể RET.

Được mô tả trong bản mô tả này là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể chứa miền HCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong các trình tự nêu ở Bảng 1, hoặc trình tự gần như tương đồng của chúng có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng trình tự; và miền LCDR3 có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong các trình tự nêu ở Bảng 1, hoặc trình tự gần như tương đồng của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng trình tự.

Được mô tả trong bản mô tả này là kháng thể hoặc mảnh kháng thể còn chứa miền HCDR1 có trình tự axit amin như trình tự bất kỳ trong các trình tự nêu ở Bảng 1, hoặc trình tự gần như tương đồng của chúng có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng trình tự; miền HCDR2 có trình tự axit amin như trình tự bất kỳ trong các trình tự nêu ở Bảng 1, hoặc trình tự gần như tương đồng của chúng có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng trình tự; miền LCDR1 có trình tự axit amin như trình tự bất kỳ trong các trình tự nêu ở Bảng 1, hoặc trình tự gần như tương đồng của chúng có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng trình tự; và miền LCDR2 có trình tự axit amin như trình tự bất kỳ trong các trình tự nêu ở Bảng 1, hoặc trình tự gần như tương đồng của chúng có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng trình tự.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết đặc hiệu với GFR α 3 của người chứa cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 được chọn từ cặp bất kỳ trong các trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 nêu ở Bảng 1. Theo một số phương án, kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của kháng thể chứa cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 được chọn từ nhóm gồm các cặp SEQ ID NO: 8/16, 24/32, 40/48, 56/64, 72/80, 88/96, 104/112, 120/128, 136/144,

152/160, 168/176, 184/192, 200/208, 216/224, 232/240, 248/256, 264/272, 280/288, 296/304, 312/320, 328/336, 344/352, 360/368, 387/395 và 403/411.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 4, 6 và 8, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 12, 14 và 16, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 20, 22 và 24, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 28, 30 và 32, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 36, 38 và 40, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 44, 46 và 48, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 52, 54 và 56, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 60, 62 và 64, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong SEQ ID NO: 68, 70 và 72, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 76, 78 và 80, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 84, 86 và 88, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 92, 94 và 96, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 100, 102 và 104, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 108, 110 và 112, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 116, 118 và 120, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 124, 126 và 128, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 132, 134 và 136, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 140, 142 và 144, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 148, 150 và 152, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 156, 158 và 160, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 164, 166 và 168, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 172, 174 và 176, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 180, 182 và 184, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 188, 190 và 192, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 196, 198 và 200, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 204, 206 và 208, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 212, 214 và 216, tương ứng; và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 220, 222 và 224, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 228, 230 và 232,

tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 236, 238 và 240, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 244, 246 và 248, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 252, 254 và 256, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 260, 262 và 264, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 268, 270 và 272, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 276, 278 và 280, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 284, 286 và 288, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 292, 294 và 296, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 300, 302 và 304, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 308, 310 và 312, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 316, 318 và 320, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 324, 326 và 328, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 332, 334 và 336, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 340, 342 và 344, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 348, 350 và 352, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 356, 358 và 360, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 364, 366 và 368, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 383, 385 và 387, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 391, 393 và 395, tương ứng.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa các trình tự HCDR1, HCDR2 và HCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 399, 401 và 403, tương ứng và các trình tự LCDR1, LCDR2 và LCDR3 nêu trong các SEQ ID NO: 407, 409 và 411, tương ứng.

Một số kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên làm ví dụ, không giới hạn chứa các miền HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3, tương ứng, được chọn từ trình tự bất kỳ trong các trình tự axit amin nêu ở Bảng 1.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phân tử axit nucleic mã hoá các kháng thể kháng GFR α 3 hoặc các mảnh của nó theo sáng chế. Các vector biểu hiện tái tổ hợp mang các axit nucleic theo sáng chế, và các tế bào chủ mà các vector đã được đưa vào đó, cũng được bao hàm trong sáng chế, xem như đó là các phương pháp sản xuất kháng thể bằng cách nuôi cấy các tế bào chủ trong điều kiện cho phép sản xuất các kháng thể, cũng như thu các kháng thể được sản xuất.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh của nó chứa HCVR được mã hoá bởi một trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 209, 225, 241, 257, 273, 289, 305, 321, 337, 353, 380 và 396 hoặc một trình tự gần như tương đồng có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng của chúng. Theo một phương án, HCVR được mã hoá bởi một trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 49, 145, 209 và 289.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh của nó còn chứa LCVR được mã hoá bởi một trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 9, 25, 41,

57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 217, 233, 249, 265, 281, 297, 313, 329, 345, 361, 388 và 404 hoặc trình tự gần như tương đồng có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng của chúng. Theo một phương án, LCVR được mã hoá bởi một trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 57, 153, 217 và 297.

Cũng được mô tả trong bản mô tả này là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể chứa miền HCDR3 được mã hoá bởi một trình tự nucleotit nằm trong các vùng biến đổi từ kháng thể bất kỳ trong các kháng thể nêu ở Bảng 1, hoặc một trình tự gần như tương đồng của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng trình tự; và miền LCDR3 được mã hoá bởi một trình tự nucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong các trình tự nêu ở Bảng 1, hoặc một trình tự gần như tương đồng của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng trình tự.

Cũng được mô tả trong bản mô tả này là kháng thể hoặc mảnh của nó còn chứa miền HCDR1 được mã hoá bởi một trình tự nucleotit như trình tự bất kỳ trong các trình tự được nêu ở Bảng 1, hoặc một trình tự gần như tương đồng của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng trình tự; miền HCDR2 được mã hoá bởi một trình tự nucleotit như trình tự bất kỳ trong các trình tự được nêu ở Bảng 1, hoặc một trình tự gần như tương đồng của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng trình tự; miền LCDR1 được mã hoá bởi một trình tự nucleotit như trình tự bất kỳ trong các trình tự được nêu ở Bảng 1, hoặc một trình tự gần như tương đồng của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng trình tự; và miền LCDR2 được mã hoá bởi một trình tự nucleotit như được nêu ở Bảng 1, hoặc một trình tự gần như tương đồng của nó có ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99% độ tương đồng trình tự.

Hơn nữa, được mô tả trong bản mô tả này là kháng thể kháng hGFR α 3 của người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể này chứa HCVR được mã hoá bởi các đoạn trình tự nucleotit có nguồn gốc từ các trình tự dòng mầm V_H, D_H và J_H, và LCVR được mã hoá bởi các đoạn trình tự nucleotit có nguồn gốc từ các trình tự dòng mầm V_K và J_K, theo các tổ hợp như được trình bày ở Bảng 2.

Sáng chế bao hàm các kháng thể kháng hGFR α 3 có kiểu glycozyl hoá được cải biến. Trong một số ứng dụng, việc cải biến 1 để loại bỏ các vị trí glycozyl hoá không mong muốn có thể là có ích, hoặc ví dụ, loại bỏ gốc fucoza để làm tăng chức năng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (xem tài liệu Shield et al. (2002) JBC 277:26733). Trong các ứng dụng khác, có thể thực hiện cải biến sự galactozyl hoá để cải biến tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể người tái tổ hợp hoặc mảnh của nó theo sáng chế, liên kết đặc hiệu với hGFR α 3 và chất mang dược dụng. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến dược phẩm là tổ hợp của kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế, chất điều trị thứ hai. Chất điều trị thứ hai có thể là chất bất kỳ được kết hợp theo cách có lợi với kháng thể hoặc mảnh của nó theo sáng chế, ví dụ như chất có khả năng làm giảm đau, chẳng hạn như, nhưng không giới hạn ở, các opioit, mocfin, chất ức chế COX-2, aspirin, hoặc các chất chống viêm không steroid khác, axetaminophen, duloxetine, các chất gây tê tại chỗ, các chất điều biến NMDA, các chất chủ vận thụ thể canabinoit, các chất điều biến họ P2X, các chất đối kháng VR1, và các chất đối kháng chất P. Chất điều trị thứ hai có thể là chất ức chế interleukin-1 (IL-1), ví dụ, như protein dung hợp (xem tài liệu US 6,927,044); hoặc dược chất chống động kinh/chống co giật, như gabapentin, pregabalin, topiramate; hoặc hợp chất ba vòng, như amitriptylin; chất ức chế hoặc chất đối kháng xytokin, như chất đối kháng IL-6, IL-6R, IL-18 hoặc IL-18R, hoặc chất ức chế kênh natri cổng điện áp, như chất ức chế Nav1.7, hoặc chất ức chế Nav1.8, hoặc chất ức chế Nav1.9; chất ức chế kênh kali hoặc kênh canxi; hoặc chất ức chế NGF (chất ức chế phân tử nhỏ hoặc kháng thể kháng NGF), hoặc chất ức chế hoặc chất đối kháng thứ hai đối với GFR α 3, chất ức chế thành phần hoại tử khối u (TNF) hoặc thụ thể TNF, chất ức chế TWEAK (TWEAK - chất kích thích WEAK chết theo chương trình có liên quan đến TNF), chất ức chế RET, chất ức chế phối tử họ GDNF, chất ức chế GFR α 1, GFR α 2 hoặc GFR α 4, chất ức chế kênh ion mẫn cảm với axit (chẳng hạn như ASIC1 hoặc ASIC3), hoặc chất ức chế sự tái hấp thu serotonin chọn lọc (SSRI), hoặc chất ức chế sự tái hấp thu serotonin norepinephrin (SNRI), hoặc chất ức chế thụ thể prekinetixin (chẳng hạn như PROK1 và PROK2), hoặc chất ức chế caspaza, chất ức chế p38, chất ức chế IKK1/2, CTLA-4Ig, hoặc corticosteroid. Chất điều trị thứ hai

có thể là dược chất có phân tử nhỏ hoặc chất ức chế protein/polypeptit. Chất điều trị thứ hai có thể là chất tổng hợp hoặc có nguồn gốc tự nhiên. Chất điều trị thứ hai có thể là kháng thể thứ hai đặc hiệu với GFR α 3, chất đối kháng polypeptit, siRNA hoặc phân tử đối nghĩa đặc hiệu với GFR α 3. Cũng đáng chú ý là các kháng thể và các dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng trong các liệu pháp phối hợp, nghĩa là, các kháng thể và các chế phẩm dược dụng đó có thể được sử dụng đồng thời, trước, hoặc có thể được sử dụng tiếp theo sau, một hoặc nhiều chất điều trị hay thủ thuật y học mong muốn khác. Việc phối hợp cụ thể các liệu pháp (các chất điều trị hoặc các thủ thuật) để dùng trong phác đồ phối hợp cần phải tính tới sự tương hợp của các chất điều trị và/hoặc các thủ thuật mong muốn và hiệu quả điều trị mong muốn cần đạt được. Cũng lưu ý là, các liệu pháp được sử dụng có thể đạt được hiệu quả mong muốn đối với cùng một rối loạn (ví dụ như một kháng thể có thể được dùng đồng thời với chất khác được sử dụng để điều trị cho cùng một rối loạn), hoặc chúng có thể đạt được các hiệu quả khác nhau (chẳng hạn như, kiểm soát các tác dụng bất lợi bất kỳ). Như được sử dụng trong bản mô tả này, trong bản mô tả này, các chất điều trị phụ trợ thường được dùng để điều trị hoặc phòng ngừa một tình trạng hoặc bệnh cụ thể, đều là thích hợp với tình trạng hoặc bệnh được điều trị.

Hơn nữa, được mô tả trong bản mô tả này là các phương pháp ức chế hoạt tính của hGFR α 3 bằng cách sử dụng kháng thể kháng hGFR α 3 hoặc phân liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế, trong đó các phương pháp này bao gồm việc dùng lượng hữu hiệu điều trị của một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế, hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó, hoặc dược phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Phương pháp điều trị tình trạng hoặc bệnh có liên quan đến GFR α 3, hoặc điều trị đau đi kèm theo tình trạng hoặc bệnh có liên quan đến GFR α 3 cũng được mô tả trong bản mô tả này, phương pháp này bao gồm việc dùng kháng thể kháng GFR α 3 hoặc phân liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế, hoặc chế phẩm chứa kháng thể kháng GFR α 3 hoặc mảnh của nó, cho bệnh nhân cần điều trị, trong đó tình trạng hoặc bệnh có liên quan đến GFR α 3 được ngăn ngừa, được làm biến chuyển tốt lên, hoặc được làm giảm mức độ nghiêm trọng hoặc tần suất xảy ra, hoặc đau có liên quan đến tình trạng hay bệnh nêu trên được ngăn ngừa, được làm biến chuyển tốt

lên, hoặc được làm giảm mức độ nghiêm trọng hoặc tần suất xảy ra.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập theo sáng chế hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, hoặc được phẩm chứa ít nhất là một kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế để sử dụng trong điều trị tình trạng hoặc bệnh có liên quan đến $GFR\alpha3$, hoặc điều trị đau đi kèm theo tình trạng hoặc bệnh có liên quan đến $GFR\alpha3$, trong đó tình trạng hoặc bệnh có liên quan đến $GFR\alpha3$ được ngăn ngừa, được làm biến chuyển tốt lên, hoặc được làm giảm mức độ nghiêm trọng hoặc tần suất xảy ra, hoặc đau có liên qua với tình trạng hoặc bệnh nêu trên được ngăn ngừa, được làm biến chuyển tốt lên, hoặc được làm giảm mức độ nghiêm trọng hoặc tần suất xảy ra.

Việc sử dụng kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế, hoặc được phẩm chứa ít nhất là một kháng thể theo sáng chế trong sản xuất thuốc điều trị tình trạng hoặc bệnh có liên quan đến $GFR\alpha3$, hoặc điều trị đau đi kèm theo tình trạng hoặc bệnh có liên quan đến $GFR\alpha3$, được mô tả trong bản mô tả này, trong đó tình trạng hoặc bệnh có liên quan đến $GFR\alpha3$ được ngăn ngừa, được làm biến chuyển tốt lên, hoặc được làm giảm mức độ nghiêm trọng hoặc tần suất xảy ra, hoặc đau có liên quan đến tình trạng hoặc bệnh nêu trên được ngăn ngừa, được làm biến chuyển tốt lên, hoặc được làm giảm mức độ nghiêm trọng hay tần suất xảy ra.

Theo một phương án, tình trạng hoặc bệnh có liên quan đến với $GFR\alpha3$ được chọn từ nhóm gồm đau cấp tính, đau mãn tính, đau do bệnh thần kinh, đau do viêm, hội chứng đau cơ năng, viêm khớp, viêm tụy, thoái hóa khớp, đau đầu theo cụm, đau dây thần kinh sinh ba, đau thần kinh do ecpet, đau thần kinh toàn thân, các rối loạn thoái hóa thần kinh, các rối loạn vận động, các rối loạn thần kinh-nội tiết, mất điều vận, đau nội tạng, bệnh gút, đau thần kinh sau ecpet, bệnh thần kinh đái tháo đường, đau dây thần kinh tọa, đau lưng, đau đầu hoặc cổ, đau trầm trọng hoặc nan y, đau do đứt gãy, đau sau phẫu thuật, chứng đỏ đau đầu chi di truyền, đau răng, viêm mũi, đau do ung thư, hội chứng đau phức tạp ở một vùng (CRPS), bệnh viêm ruột (ví dụ, bệnh Crohn hoặc viêm loét đại tràng) và các rối loạn ở bàng quang.

Theo một phương án, hội chứng đau cơ năng được chọn từ nhóm gồm đau phần dưới lưng mãn tính, hội chứng ruột bị kích ứng (IBS), đau xơ-cơ (FM), hội chứng mỏi mãn tính, đau bụng, rối loạn khớp thái dương-hàm dưới (TMJD), hội chứng đau bàng

quang (bệnh viêm bàng quang kẽ), các rối loạn/các hội chứng dạ dày-ruột cơ năng, hội chứng đau ngực cơ năng, chứng đau nửa đầu và đau đầu kiểu căng thẳng, hội chứng đau vùng chậu mãn, hội chứng đau tuyến tiền liệt (viêm tuyến tiền liệt mãn), hội chứng mãn cảm nhiều hoá chất và hội chứng chiến tranh vùng Vịnh.

Theo một phương án, đau do ung thư có liên quan đến ung thư được chọn từ nhóm gồm ung thư nội mạc tử cung, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú, ung thư cổ tử cung, ung thư gan, ung thư tụy, ung thư đại tràng, ung thư dạ dày, ung thư tử cung, ung thư buồng trứng, ung thư thận, ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư não, bệnh bạch cầu, u lymphô, ung thư xương và đau có liên quan đến di căn ung thư.

Theo một phương án, kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên được dùng cho bệnh nhân phối hợp với chất điều trị thứ hai.

Theo một phương án, chất điều trị thứ hai được chọn từ nhóm gồm opioit, chất ức chế COX-2, thuốc gây tê cục bộ, chất điều biến NMDA, chất chủ vận thụ thể canabinoit, chất điều biến họ P2X, chất đối kháng VR1, chất đối kháng chất P, chất đối kháng GFR α 3 thứ hai, chất đối kháng xytokin hoặc đối kháng thụ thể xytokin, chất ức chế thành phần tăng trưởng thần kinh (NGF) (chất ức chế phân tử nhỏ hoặc kháng thể kháng NGF), aspirin, chất đối kháng lại chất P, steroid, mocfin, chất ức chế tái hấp thu serotonin chọn lọc (SSRI), chất ức chế tái hấp thu serotonin norepinephrin (SNRI), hợp chất ba vòng, chất ức chế kênh natri cổng điện áp (Na_v), chất ức chế kênh canxi, chất ức chế kênh kali, chất ức chế thành phần hoại tử khối u (TNF) hoặc ức chế thụ thể TNF, chất ức chế TWEAK (TWEAK - chất kích thích WEAK chết theo chương trình có liên quan đến TNF), chất ức chế RET, chất ức chế phối tử họ GDNF, chất ức chế kênh ion mãn cảm với axit (ASIC1 hoặc ASIC3), chất chống co giật (gabapentin hoặc pregabalin), chất ức chế thụ thể prekinetixin (PROK1 và PROK2), chất ức chế caspaza, chất ức chế p38, chất ức chế IKK1/2, CTLA-4Ig và corticosteroid. Theo một phương án, chất đối kháng GFR α 3 thứ hai là phân tử hữu cơ nhỏ, kháng thể thứ hai đặc hiệu với GFR α 3, chất đối kháng polypeptit, siRNA hoặc phân tử đối nghĩa đặc hiệu với GFR α 3.

Theo một phương án, chất đối kháng xytokin hoặc thụ thể xytokin là chất đối kháng interleukin-1 (IL-1), chất đối kháng IL-6, hoặc chất đối kháng IL-18.

Rối loạn được điều trị là tình trạng hoặc bệnh bất kỳ, được cải thiện, được làm tiến triển tốt lên, bị ức chế hoặc được ngăn ngừa bằng cách loại bỏ, ức chế hoặc làm giảm hoạt tính của $\text{hGFR}\alpha 3$. Tập hợp các bệnh hay tình trạng cụ thể có thể điều trị được bằng các phương pháp điều trị được mô tả trong bản mô tả này bao gồm bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng được chọn từ nhóm: đau cấp tính, đau mãn tính, đau do thiếu máu cục bộ, đau do bệnh thần kinh hoặc đau do viêm, tình trạng quá mẫn như quá mẫn ở nội tạng, quá mẫn do nhiệt hoặc quá mẫn cơ học, viêm tụy mãn, viêm khớp, đau nửa đầu, đau đầu ở vùng sau nhãn cầu, đau dây thần kinh sinh ba, đau thần kinh do ecpet, đau thần kinh toàn thân, động kinh hoặc các trạng thái động kinh, tăng trương lực cơ, loạn nhịp, các rối loạn vận động, các rối loạn thần kinh-nội tiết, mất điều hoà, bệnh viêm ruột, viêm lách, đau dạ dày, viêm tam giác bàng quang, u xơ, viêm màng bụng, ỉa đùn, sỏi mật, quá mẫn ở trực tràng, đau nội tạng, đau do thoái hóa khớp, đau thần kinh sau ecpet, bệnh thần kinh do sỏi thận, đau rễ thần kinh, đau dây thần kinh tọa, đau lưng, đau đầu hoặc cổ, đau do đứt gãy, đau sau phẫu thuật, đau do ung thư hoặc đau do dùng liệu pháp hoá học. Các tình trạng khác có thể điều trị bằng các phương pháp điều trị được mô tả trong bản mô tả này bao gồm bệnh Hirschsprung, chứng đau đầu chi di truyền, các rối loạn ở bàng quang, viêm mũi, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú, ung thư cổ tử cung, ung thư gan, ung thư tụy, ung thư đại tràng, ung thư dạ dày, ung thư tử cung, ung thư buồng trứng, ung thư thận, ung thư ở hệ thống tạo huyết như bệnh bạch cầu hoặc u lymphô, ung thư xương hoặc đau có liên quan đến di căn ung thư, ví dụ như đau có liên quan đến di căn ung thư vào xương. Các kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng cũng có thể được sử dụng để điều trị các tình trạng sau: đau xương cấp, mãn không ác tính hoặc đau do đứt gãy; viêm khớp dạng thấp, hẹp ống sống; đau do bệnh thần kinh vùng lưng dưới; hội chứng đau cân cơ; đau tụy; đau đầu mãn tính; đau đầu do căng thẳng; bệnh thần kinh do sỏi thận; bệnh thần kinh có liên quan đến HIV; bệnh thần kinh răng Charcot-Marie; các bệnh thần kinh cảm giác di truyền; tổn thương dây thần kinh ngoại biên; các u thần kinh gây đau; các phóng xung điện gần và xa lạc chỗ; bệnh rễ thần kinh; đau do bệnh thần kinh gây ra bởi liệu pháp hoá học; đau do bệnh thần kinh gây ra bởi liệu pháp phóng xạ; đau sau phẫu thuật cắt bỏ tuyến vú; đau vùng trung tâm; đau do chấn thương tủy sống; đau sau đột quỵ; đau vùng đồi; hội chứng đau phức tạp một vùng (CRPS, cũng gọi là loạn dưỡng giao cảm phản xạ); đau ảo; đau nan y; đau bộ cơ

xương cấp; đau khớp; đau do bệnh gút; đau cơ học phần dưới lưng; đau cổ; đau do viêm gân; đau do chấn thương hoặc do luyện tập; đau bụng; đau do viêm thận-bể thận; đau do viêm ruột thừa; đau do viêm túi mật; đau do tắc ruột; đau do thoát vị; v.v...; đau vùng ngực, bao gồm đau tim; đau vùng chậu, đau do sỏi thận, đau sản khoa cấp, bao gồm đau đẻ; đau do mổ đẻ; đau do bong và chấn thương; đau do lạc nội mạc tử cung; đau do bệnh zona; thiếu máu hồng cầu hình liềm; viêm tụy cấp; đau do gãy xương; đau vùng tai-mặt bao gồm đau do viêm xoang, đau răng; đau do bệnh đa xơ cứng; đau do bệnh phong; đau do bệnh Behcet; đau do bệnh béo phì; đau do viêm tĩnh mạch; đau Guillain-Barre; đau căng chân và các ngón chân cử động; hội chứng Haglund; đau do bệnh Fabry; đau trong bệnh bàng quang và sinh dục-tiết niệu; chứng tăng hoạt động bàng quang. Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị hội chứng đau cơ năng, trong đó hội chứng đau cơ năng được chọn từ nhóm gồm đau mãn tính phần dưới lưng, hội chứng ruột bị kích ứng (IBS), đau xơ cơ (FM), hội chứng mỏi mãn tính, đau bụng, rối loạn khớp thái dương-hàm dưới (TMJD), hội chứng đau bàng quang (viêm bàng quang kẽ), các rối loạn/các hội chứng dạ dày-ruột cơ năng, hội chứng đau ngực cơ năng, đau nửa đầu và đau đầu kiểu căng thẳng, hội chứng đau vùng chậu cấp, hội chứng đau tuyến tiền liệt (viêm tuyến tiền liệt mãn), hội chứng đa mẫn cảm hoá chất và hội chứng chiến tranh vùng Vịnh.

Các kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng cũng có thể được sử dụng để ức chế sự tăng trưởng hoặc tăng sinh của tế bào khối u, hoặc ức chế sự di căn của các tế bào khối u. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng có thể được sử dụng để điều trị ung thư hoặc “đau có liên quan đến ung thư”, bao gồm ví dụ, nhưng không giới hạn ở, ung thư nội mạc tử cung, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú, ung thư cổ tử cung, ung thư gan, ung thư tụy, ung thư đại tràng, ung thư dạ dày, ung thư tử cung, ung thư buồng trứng, ung thư thận, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư não, ung thư trong hệ tạo huyết, như ung thư bệnh bạch cầu hoặc u lymphô, ung thư xương hoặc đau có liên quan đến di căn ung thư, ví dụ như đau có liên quan đến di căn ung thư vào xương. “Đau có liên quan đến ung thư” cũng bao gồm đau có liên quan phổ biến hơn đến các tình trạng ung thư, như, ví dụ ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư biểu mô tụy, ung thư vùng đầu và cổ, các u thần kinh đệm ác

tính, xacôm xương, ung thư đại-trực tràng, ung thư dạ dày, u trung biểu mô ác tính, đa u tuỷ, xacôm màng hoạt dịch, ung thư tuyến giáp hoặc u hắc sắc tố. Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể hữu ích để điều trị hoặc phòng ngừa đau gây ra bởi hoặc có liên quan đến liệu pháp ung thư hay điều trị ung thư, chẳng hạn như đau thần kinh gây ra bởi liệu pháp hoá học, ví dụ, đau do hoặc có liên quan đến điều trị bằng paclitaxel (Taxol™), docetaxel (Taxotere®); nitroso-ure, cyclophosphamid, doxorubicin, epirubicin, 5-fluoro-uraxil, topotecan, irinotecan, carmustin, estramustin, và các hợp chất hoá trị liệu trên cơ sở platin, như cisplatin, carboplatin, và iproplatin.

Các phương án khác sẽ được thể hiện rõ khi xem xét phân mô tả chi tiết sáng chế dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Ước chế chứng tăng cảm giác đau với nhiệt do capsaixin mãn cảm hoá với artemin ở các con vật được tiêm các kháng thể kháng GFR α 3 chuột nhắt (chất phong bế gián tiếp là M1M6977N hoặc chất phong bế trực tiếp là M1M6986N, n=8 đối với mỗi chất) hoặc kháng thể đối chứng (âm tính) kiểu tương đương (M2M180N, n=8), với liều 30 mg/kg, tiêm dưới da, 2 ngày trước khi được tiêm capsaixin (1 ngày trước khi tiêm 0,5 μ g artemin).

Các Fig. 2A và 2B: Loạn cảm đau xúc giác được xác định bằng phương pháp von Frey Hairs ở các con vật trong hai thực nghiệm (A & B) được tiêm xacôm sợi và điều trị bằng kháng thể đối chứng (âm tính) kiểu tương đương (M2M180N) hoặc các kháng thể kháng GFR α 3 chuột nhắt M1M6977N hoặc M1M6986N là (n=8-11 cho mỗi nhóm). *p<0,05, **p<0,01, hoặc ***p<0,001 so với đối chứng kiểu tương đương ở cùng một thời điểm.

Các Fig. 3A và 3B: Phần trăm sức mang trọng lượng của chân cùng bên ở các con vật trong hai thực nghiệm (A & B) được tiêm xacôm xơ và được điều trị bằng kháng thể đối chứng (âm tính) kiểu tương đương (M2M180N) hoặc kháng thể kháng GFR α 3 chuột nhắt M1M6977N hoặc M1M6986N (n=8-11 trong mỗi nhóm).

Các Fig. 4A và 4B: Đánh giá sự gượng nhắc chân ở các con vật trong hai thực nghiệm (A & B) được tiêm các tế bào xacôm xơ và được điều trị bằng kháng thể đối chứng (âm tính) kiểu tương đương (M2M180N) hoặc kháng thể kháng GFR α 3 chuột

nhất M1M6977N hay M1M6986N (n=8-11 trong mỗi nhóm). $**p<0,01$ so với đối chứng kiểu tương đương ở cùng một thời điểm.

Fig. 5: Loạn cảm đau xúc giác được xác định bằng phương pháp von Frey Hairs ở các con vật được tiêm các tế bào ung thư biểu mô ung thư biểu mô và được điều trị bằng kháng thể đối chứng (âm tính) kiểu tương đương (M2M180N) hoặc kháng thể kháng GFR α 3 chuột nhắt M1M6977N hoặc M1M6986N (n=9-10 trong mỗi). $*p<0,05$, $**p<0,01$, hoặc $***p<0,001$ so với đối chứng (âm tính) kiểu tương đương ở cùng một thời điểm.

Các Fig. 6A và 6B: Phần trăm sức mang trọng lượng của chân cùng bên vào hai thời điểm (A=11 ngày & B=18 ngày) ở các con vật được tiêm các tế bào ung thư biểu mô và được điều trị bằng kháng thể đối chứng (âm tính) kiểu tương đương (M2M180N) hoặc kháng thể kháng GFR α 3 chuột nhắt M1M6977N hoặc M1M6986N (n=9-10 trong mỗi nhóm). $*p<0,05$ so với kháng thể đối chứng kiểu tương đương theo như phép phân tích Dunnett tiếp sau đó.

Fig. 7: Đánh giá sự gượng nhắc chân ở các con vật được tiêm các tế bào ung thư biểu mô và được điều trị bằng kháng thể đối chứng (âm tính) kiểu tương đương (M2M180N) hoặc kháng thể kháng GFR α 3 chuột nhắt M1M6977N hoặc M1M6986N (n=9-10 trong mỗi nhóm). $*p<0,05$, $***p<0,001$ so với đối chứng kiểu tương đương ở cùng một thời điểm.

Fig. 8: Loạn cảm đau xúc giác được xác định bằng phương pháp von Frey Hairs ở các con vật bị làm lỏng lỏng sụn chêm trong khớp gối (DMM), được điều trị bằng kháng thể đối chứng (âm tính) kiểu tương đương (M2M180N) hoặc kháng thể kháng GFR α 3 chuột nhắt M1M6977N hoặc M1M6986N (n=10 trong mỗi nhóm). $**p<0,01$ hoặc $***p<0,001$ so với đối chứng kiểu tương đương ở cùng một thời điểm.

Fig. 9: Phân tích cạnh tranh chéo của các kháng thể kháng GFR α 3 để liên kết vào Biotin-hGFR α 3-mmH.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi trình bày các phương pháp của sáng chế, thì cần hiểu rằng, sáng chế không bị giới hạn ở các phương pháp cụ thể và các điều kiện thực nghiệm được mô tả, vì các phương pháp và các điều kiện đó có thể thay đổi. Cũng cần hiểu rằng, các thuật

ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, mà không nhằm giới hạn sáng chế, vì phạm vi sáng chế sẽ chỉ bị giới hạn bởi điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Trừ khi được quy định khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này có cùng ý nghĩa như được hiểu thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Mặc dù các phương pháp và các vật liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và vật liệu được mô tả trong bản mô tả này đều có thể được sử dụng trong việc thực hành hoặc thử nghiệm sáng chế, nhưng các phương pháp và các vật liệu ưu tiên vẫn sẽ được mô tả dưới đây.

Các định nghĩa

Các thuật ngữ "GFR α 3" hoặc "hGFR α 3", như được sử dụng trong bản mô tả này, để chỉ thụ thể protein được neo bởi glycozylphosphatidylinositol (GPI) cho artemin, mà thuộc họ các thành phần dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ dòng tế bào thần kinh đệm (GDNF). Đó là một trong các protein thụ thể anpha họ GDNF, mà một khi được liên kết vào phối tử của nó, artemin, thì sẽ làm trung gian hoạt hoá tyrosin kinaza thụ thể RET ("được sắp xếp lại trong quá trình chuyển nhiễm"). Cho đến nay đã có bốn thành viên của họ GFR α được nhận biết là GFR α -1-4 (xem các tài liệu Lindsay RM *et al.*, Neuron, (1996), 17:571-574; Airaksinen, MS, *et al.*, Mol. Cell Neurosci., (1999), 13:313-325). GFR α 3 trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng được gọi là thụ thể anpha 3 họ GDNF, thụ thể liên kết với GPI, hoặc thụ thể anpha 3 thuộc họ các thành phần dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ dòng tế bào thần kinh đệm. Các cách biểu đạt "GFR α 3" hoặc "hGFR α 3", hay các mảnh của nó, như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ protein GFR α 3 của người hoặc mảnh của nó, trừ khi được chỉ rõ là từ một loài không phải là người, chẳng hạn như "GFR α 3 chuột nhắt", "GFR α 3 chuột thân lớn" hoặc "GFR α 3 khỉ". Thêm nữa, cách biểu đạt "GFR α 3" hoặc "hGFR α 3", theo như được sử dụng trong bản mô tả này, để chỉ GFR α 3 của người được mã hoá bởi trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 374 (số truy cập ngân hàng gen là NM_001496) và có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 375 (số truy cập ngân hàng gen là NP_001487.2), hoặc chỉ một mảnh hoạt tính sinh học của nó. Trình tự tín hiệu bao hàm các gốc axit amin 1-31 nêu trong SEQ ID NO: 375, vùng protein trưởng thành bao hàm các gốc axit amin 32-382 nêu trong SEQ ID NO: 375,

trong khi vùng Pro đầu tận cùng C bao hàm các gốc axit amin 383-400 nêu trong SEQ ID NO: 375. Vị trí phân cắt nhóm GPI được tìm thấy ở gốc axit amin 374 trong SEQ ID NO: 375 (asparagin). Trình tự axit amin của artemin người được tìm thấy trong Ngân hàng gen với số truy cập Q5T4W7 và trình tự axit amin của artemin người (từ các axit amin A108-G220 có số truy cập Q5T4W7) với dấu myc-myc-hexahistidin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 369 (với các gốc axit amin 114-141 nêu trong SEQ ID NO: 369 là dấu myc-myc hexahistidin).

Mặc dù $GFR\alpha 3$ về mặt cấu trúc và chức năng tương tự như các thành viên khác của họ $GFR\alpha$, nhưng $GFR\alpha 3$ là thành viên có quan hệ xa nhất trong bốn thành viên đã nêu của họ này. $GFR\alpha 1$ và $GFR\alpha 2$ có khoảng 50% độ tương đồng (xem các tài liệu Sanicola, M. et al., PNAS, USA, (1997), 94:6238-43; Klein, RD, et al., (1997), Nature, 387:717-21; Buj-Bello, A. et al., Nature (1997), 387:721-4; Baloh, RH, et al., Neuron, (1997), 18:793-802), trong khi, tương ứng, $GFR\alpha 3$ chỉ có 32 và 37% độ tương đồng với các protein này (xem các tài liệu Masure, S. et al., Eur. J. Biochem., (1998), 251:622-30; Nomoto, S. et al., BBRC, (1998), 244:849-53). Trình tự axit amin của $GFR\alpha 3$ chuột nhất có Số truy cập ngân hàng gen sau đây: NP_034410.3. Trình tự axit amin của $GFR\alpha 1$ người có Số truy cập ngân hàng gen sau đây: NP_005255.1 và cũng được tìm thấy dưới dạng SEQ ID NO: 376. Trình tự axit amin của $GFR\alpha 3$ khỉ cynomolgus được nêu ở SEQ ID NO: 377 và trình tự axit amin của thụ thể RET khỉ cynomolgus được nêu ở SEQ ID NO: 378.

Thuật ngữ "kháng thể", như được sử dụng trong bản mô tả này, nhằm chỉ các phân tử globulin miễn dịch được cấu thành từ bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L), được liên kết với nhau bằng các liên kết disulfua (tức là, "các phân tử kháng thể toàn bộ"), cũng như chỉ các multime của chúng (ví dụ như IgM) hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng. Mỗi chuỗi nặng được cấu thành từ một vùng biến đổi của chuỗi nặng ("HCVR" hoặc " V_H ") và một vùng hằng định của chuỗi nặng (được cấu thành từ các miền C_{H1} , C_{H2} và C_{H3}). Mỗi chuỗi nhẹ được cấu thành từ một vùng biến đổi của chuỗi nhẹ ("LCVR hoặc " V_L ") và một vùng hằng định của chuỗi nhẹ (C_L). Các vùng V_H và V_L có thể được chia nhỏ tiếp thành các vùng rất dễ thay đổi gọi là các vùng quyết định tính bổ khuyết (CDR), xen lẫn với các vùng được bảo toàn hơn, gọi là các vùng khung (FR). Mỗi vùng V_H và V_L được cấu thành từ

ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự như sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo một số phương án của sáng chế, các FR của kháng thể kháng hGFR α 3 (hoặc của mảnh liên kết kháng nguyên của nó) có thể tương đồng với các trình tự dòng mầm của người, hoặc có thể bị cải biến trong tự nhiên hoặc cải biến nhân tạo. Trình tự liên ứng axit amin có thể được xác định trên cơ sở phép phân tích sự sắp xếp liên kề của hai hoặc nhiều CDR.

Sự thể một hoặc nhiều gốc CDR hoặc sự khuyết một hoặc nhiều CDR cũng có thể xảy ra. Các kháng thể đã được mô tả trong các tài liệu khoa học, mà trong đó có một hoặc hai CDR có thể được bỏ qua vì lý do liên kết. Padlan et al. (xem tài liệu 1995 FASEB J. 9:133-139) đã phân tích các vùng tiếp xúc giữa các kháng thể và các kháng nguyên của chúng dựa trên các cấu trúc tinh thể đã được công bố, và đã kết luận là chỉ có khoảng một phần năm đến một phần ba số gốc CDR thực tế tiếp xúc với kháng nguyên. Padlan cũng phát hiện nhiều kháng thể mà trong nó có một hoặc hai CDR không có các axit amin tiếp xúc với kháng nguyên (cũng xem tài liệu Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428).

Các gốc CDR không tiếp xúc với kháng nguyên có thể được xác định trên cơ sở các nghiên cứu trước đó (ví dụ, các gốc H60-H65 trong CDRH2 thường là không cần thiết), từ các vùng trong các CDR Kabat nằm bên ngoài các CDR Chothia, nhờ phương pháp mô hình phân tử và/hoặc bằng kinh nghiệm. Nếu CDR hoặc (các) gốc của nó bị khuyết, thì thường được thay thế bằng axit amin chiếm vị trí tương ứng trong một trình tự kháng thể người khác hoặc trình tự liên ứng trong các trình tự đó. Các vị trí để thay thế trong các CDR và các axit amin để thay thế cũng có thể được chọn theo kinh nghiệm. Các thay thế theo kinh nghiệm có thể là thay thế bảo thủ hoặc không bảo thủ.

Các kháng thể kháng hGFR α 3 hoàn toàn người được bộc lộ trong bản mô tả này có thể chứa một hoặc nhiều vị trí thay thế, vị trí chèn và/hoặc vị trí xóa axit amin trong vùng khung và/hoặc trong các vùng CDR của các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ so với các trình tự dòng mầm tương ứng. Có thể xác định một cách dễ dàng các đột biến đó bằng cách so sánh các trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này với các trình tự dòng mầm có sẵn từ, chẳng hạn như, từ các cơ sở dữ liệu về trình tự kháng thể đã được công bố. Sáng chế bao hàm các kháng thể, và các mảnh liên

kết kháng nguyên của nó, mà có nguồn gốc từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này, trong đó một hoặc nhiều axit amin nằm trong một hoặc nhiều vùng khung và/hoặc vùng CDR có thể được gây đột biến ngược thành (các) gốc dòng mầm tương ứng, hoặc thành vị trí thay thế axit amin bảo thủ (có trong tự nhiên hoặc không có trong tự nhiên) của (các) gốc dòng mầm tương ứng (trong bản mô tả này, các thay đổi trình tự đó được gọi là “các đột biến ngược trở về dòng mầm”). Bắt đầu từ các trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ trong bản mô tả này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể dễ dàng tạo ra nhiều kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên chứa một hoặc nhiều đột biến ngược trở về dòng mầm hoặc các tổ hợp của chúng. Theo một số phương án, tất cả các gốc trong vùng khung và/hoặc vùng CDR nằm trong các miền V_H và/hoặc V_L bị đột biến ngược trở về trình tự dòng mầm. Theo các phương án khác, chỉ có một số gốc bị đột biến ngược trở về trình tự dòng mầm, ví dụ, chỉ có các gốc bị đột biến được tìm thấy trong phạm vi 8 axit amin đầu tiên của FR1 hoặc trong phạm vi 8 axit amin cuối cùng của FR4, hoặc các đột biến ngược trở về dòng mầm trong phạm vi tất cả các vùng khung FR1, FR2, FR3, FR4, hoặc chỉ có các gốc bị đột biến được tìm thấy trong phạm vi CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Ngoài ra, các kháng thể theo sáng chế có thể chứa tổ hợp bất kỳ của hai hoặc vài đột biến ngược trở về dòng mầm trong phạm vi vùng khung và/hoặc vùng CDR, tức là, trong đó một số gốc đơn lẻ bị đột biến trở về trình tự dòng mầm, trong khi một số gốc khác khác với trình tự dòng mầm được bảo toàn. Khi thu được, các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên chứa một hoặc nhiều đột biến ngược trở về dòng mầm có thể dễ dàng được thử nghiệm về một hoặc nhiều tính chất mong muốn, như tính đặc hiệu liên kết được cải thiện, ái lực liên kết tăng, tính chất sinh học đối kháng hoặc chủ vận được cải thiện hoặc tăng lên (trong trường hợp có thể được), tính sinh miễn dịch giảm, v.v. Các kháng thể và các mảnh liên kết kháng nguyên thu được theo cách thông thường này được bao hàm trong sáng chế.

Thuật ngữ "kháng thể người", như được sử dụng trong bản mô tả này, nhằm bao gồm các kháng thể có các vùng biến đổi và vùng hằng định có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Các mAb người theo sáng chế có thể chứa các gốc axit amin không được mã hoá bởi các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người (ví dụ, các đột biến do gây đột biến ngẫu nhiên hoặc gây đột biến đặc

hiệu vị trí *in vitro* hoặc do đột biến soma *in vivo*), ví dụ như ở các CDR và cụ thể là CDR3. Tuy nhiên, thuật ngữ "kháng thể người", như được sử dụng trong bản mô tả này, không nhằm bao gồm các mAb mà trong đó các trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của một loài động vật có vú khác (ví dụ, chuột nhắt), đã được ghép vào các trình tự FR của người. Các kháng thể kháng GFR α 3 của người theo sáng chế có thể được ký hiệu là "kháng hGFR α 3" hoặc "kháng GFR α 3".

Thuật ngữ "liên kết đặc hiệu", hoặc các dạng tương tự, có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó tạo phức hợp với kháng nguyên tương đối ổn định trong các điều kiện sinh lý. Sự liên kết đặc hiệu có thể được đặc trưng bằng hằng số phân ly cân bằng ít nhất là khoảng 1×10^{-6} M hoặc nhỏ hơn (ví dụ, K_D nhỏ hơn biểu thị liên kết bền vững hơn). Các phương pháp để xác định xem hai phân tử có liên kết đặc hiệu hay không được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, ví dụ như, phương pháp thẩm tách cân bằng, phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, và các phương pháp tương tự. Tuy nhiên, kháng thể được phân lập liên kết đặc hiệu với hGFR α 3 có thể biểu lộ khả năng phản ứng chéo với các kháng nguyên khác, như các phân tử GFR α 3 từ các loài khác. Hơn nữa, như được sử dụng trong bản mô tả này, các kháng thể đa đặc hiệu liên kết với hGFR α 3 và một hoặc nhiều kháng nguyên phụ, hoặc đặc hiệu kép liên kết với hai vùng khác nhau của hGFR α 3, tuy nhiên vẫn được xem là các kháng thể "liên kết đặc hiệu" hGFR α 3.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "không liên kết" với phân tử đích được nêu (ví dụ, peptit GFR α 3 cụ thể) có nghĩa là kháng thể, khi được thử nghiệm cho liên kết với phân tử đích ở nhiệt độ 25°C trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon, biểu lộ K_D lớn hơn 500nM, hoặc nếu được thử nghiệm cho liên kết với phân tử đích ở nhiệt độ 25°C trong thử nghiệm chất hấp phụ miễn dịch gắn enzyme (ELISA) biểu hiện EC_{50} lớn hơn 50nM, hoặc hoàn toàn không biểu lộ sự liên kết bất kỳ trong cả hai kiểu thử nghiệm nêu trên hoặc trong kiểu thử nghiệm tương đương với các thử nghiệm đó.

Thuật ngữ kháng thể "ái lực cao" chỉ các mAb có ái lực liên kết với hGFR α 3 ít nhất là 10^{-9} M; tốt hơn là 10^{-10} M; tốt hơn nữa là 10^{-11} M, còn tốt hơn nữa là 10^{-12} M, khi được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, phương pháp BIACORE™, hoặc ELISA ái lực trong dung dịch.

Về thuật ngữ “tốc độ phân ly chậm”, thì “Koff” hoặc “kd” có nghĩa là kháng thể phân ly khỏi hGFR α 3 với hằng số tốc độ là 1×10^{-3} giây⁻¹ hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 1×10^{-4} giây⁻¹ hoặc nhỏ hơn, như được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, phương pháp BIACORE™.

Các thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể, "mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể, và thuật ngữ tương tự, như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm bất kỳ polypeptit hoặc glycoprotein nào có trong tự nhiên, thu được bằng công nghệ enzym, tổng hợp hay thu được bằng công nghệ di truyền liên kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo ra phức hợp. Các thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể, hoặc "mảnh kháng thể", như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ một hoặc nhiều mảnh kháng thể vẫn giữ được khả năng liên kết đặc hiệu với hGFR α 3.

Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc các mảnh kháng thể theo sáng chế có thể được cho tiếp hợp với gốc điều trị (“thể tiếp hợp miễn dịch”), như opioit, chất ức chế COX-2, chất gây tê tại chỗ, chất đối kháng xytokin, như chất ức chế IL-1 hoặc IL-6, chất ức chế GFR α 3 thứ hai, chất điều biến NMDA, chất chủ vận thụ thể canabinoit, chất điều biến họ P2X, chất đối kháng VR1, chất đối kháng chất P, chất hoá trị liệu, hoặc đồng vị phóng xạ.

"Kháng thể được phân lập", như được sử dụng trong bản mô tả này, nhằm chỉ kháng thể về cơ bản không lẫn với các kháng thể (các Ab) khác có các tính đặc hiệu kháng nguyên khác với kháng thể đó (ví dụ, kháng thể được phân lập liên kết đặc hiệu với hGFR α 3, hoặc mảnh của nó, về cơ bản không chứa các Ab liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên khác với hGFR α 3).

"Kháng thể trung hoà", như được sử dụng trong bản mô tả này (hoặc "kháng thể trung hoà hoạt tính của GFR α 3"), nhằm chỉ kháng thể mà có liên kết với hGFR α 3 gây ra sự ức chế của ít nhất một hoạt tính sinh học của GFR α 3. Sự ức chế hoạt tính sinh học đó của GFR α 3 có thể được đánh giá bằng cách đo một hoặc nhiều chỉ báo hoạt tính sinh học của GFR α 3 theo một hoặc nhiều tiêu chuẩn trong một số tiêu chuẩn của các thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo* đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (xem các ví dụ dưới đây).

Thuật ngữ "cộng hưởng plasmon bề mặt", như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ hiện tượng quang học cho phép phân tích các tương tác giữa các phân tử sinh học theo thời gian thực bằng cách phát hiện các thay đổi về nồng độ protein trong thể nền cảm biến sinh học, ví dụ như bằng cách sử dụng hệ thống BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.).

Thuật ngữ " K_D ", như được sử dụng trong bản mô tả này, nhằm chỉ hằng số phân ly cân bằng của tương tác kháng thể-kháng nguyên cụ thể.

Thuật ngữ "biểu vị" chỉ quyết định kháng nguyên tương tác với vị trí liên kết kháng nguyên cụ thể trong vùng biến đổi của phân tử kháng thể gọi là paratop (cận vị). Một kháng nguyên đơn lẻ có thể có nhiều hơn một biểu vị. Như vậy, các kháng thể khác nhau có thể liên kết với các vùng khác nhau trên một kháng nguyên và có thể có các tác dụng sinh học khác nhau. Thuật ngữ "biểu vị" cũng chỉ vị trí trên kháng nguyên mà các tế bào B và/hoặc T đáp ứng với vị trí đó. Nó cũng chỉ vùng trên kháng nguyên bị liên kết bởi kháng thể. Các biểu vị có thể được xác định theo cấu trúc hoặc chức năng. Các biểu vị chức năng thường là một phân nhóm trong các biểu vị cấu trúc và có các gốc đóng góp trực tiếp vào ái lực tương tác. Các biểu vị cũng có thể được xét về mặt cấu dạng, tức là được cấu thành từ các axit amin không nằm trên một đường thẳng. Theo một số phương án, các biểu vị có thể bao gồm các phần quyết định là các nhóm bề mặt có hoạt tính hoá học của các phân tử, như các axit amin, các mạch nhánh đường, các nhóm phosphoryl, hoặc các nhóm sulfonyl, và theo một số phương án, có thể có các đặc trưng cấu trúc ba chiều riêng và/hoặc các đặc trưng điện tích riêng.

Thuật ngữ "gần như tương đồng" hoặc "gần như đồng nhất", khi chỉ axit nucleic hoặc mảnh của nó, chỉ ra rằng, khi được sắp thẳng hàng tối ưu cùng với các vị trí chèn hoặc các vị trí xóa nucleotit thích hợp với một axit nucleic khác (hoặc sợi bổ sung của nó), thì có độ tương đồng trình tự nucleotit ở ít nhất là khoảng 90%, và tốt hơn nữa ít nhất là khoảng 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% các bazơ nucleotit, như được đo bằng thuật toán đã biết bất kỳ của độ tương đồng trình tự, như các thuật toán FASTA, BLAST hoặc GAP, được thảo luận dưới đây. Phân tử axit nucleic gần như tương đồng với phân tử axit nucleic tham chiếu, trong một số trường hợp, có thể mã hoá polypeptit có cùng trình tự axit amin hoặc có trình tự axit amin gần như tương tự với polypeptit được mã hoá bởi phân tử axit nucleic tham chiếu.

Khi được áp dụng cho các polypeptit, thuật ngữ "gần như tương đồng" hoặc "gần như đồng nhất" có nghĩa là, hai trình tự peptit, khi được sắp thẳng hàng so sánh một cách tối ưu, như bằng các chương trình GAP hoặc BESTFIT bằng cách sử dụng các trọng số chỗ khuyết mặc định, thì ít nhất đều phải có độ tương đồng trình tự 90%, còn tốt hơn nữa có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95%, 98% hoặc 99%. Tốt hơn là, các vị trí gốc không tương đồng thì khác nhau do sự thay thế bằng các axit amin bảo thủ. "Thay thế bằng axit amin bảo thủ" là sự thay thế trong đó một gốc axit amin được thay thế bằng một gốc axit amin khác có mạch nhánh (nhóm R) mang các tính chất hoá học tương tự (ví dụ, điện tích hoặc tính kỵ nước). Thông thường, sự thay thế bằng axit amin bảo thủ sẽ không làm thay đổi về cơ bản các tính chất chức năng của protein. Trong các trường hợp mà hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau bởi các thay thế bảo thủ, thì tỷ lệ phần trăm hoặc độ tương đồng có thể được điều chỉnh tăng lên nhằm hiệu chỉnh bản chất bảo thủ của sự thay thế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đều biết rõ cách tiến hành việc điều chỉnh đó (ví dụ, xem tài liệu Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331). Các ví dụ về các nhóm axit amin có các mạch nhánh mang tính chất hoá học tương tự bao gồm: 1) nhóm có các mạch nhánh béo: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; 2) nhóm có các mạch nhánh béo chứa nhóm hydroxyl: serin và threonin; 3) nhóm có các mạch nhánh chứa nhóm amit: asparagin và glutamin; 4) nhóm có các mạch nhánh thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; 5) nhóm có các mạch nhánh bazơ: lysin, arginin, và histidin; 6) nhóm có các mạch nhánh axit: aspartat và glutamat, và 7) nhóm có các mạch nhánh chứa lưu huỳnh: xystein và methionin. Các nhóm thay thế axit amin bảo thủ được ưu tiên là: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat, và asparagin-glutamin. Theo cách khác, sự thay thế bảo thủ là sự thay đổi bất kỳ có trị số dương trong ma trận log-hợp lẽ PAM250 được trình bày trong bài báo của Gonnet *et al.* (xem tài liệu Gonnet *et al.*, *Science*, (1992), 256:1443-45). Sự thay thế "bảo thủ vừa phải" là sự thay đổi bất kỳ có trị số không âm trong ma trận log-hợp lẽ PAM250.

Độ tương đồng trình tự đối với các polypeptit thường được đo bằng cách sử dụng các phần mềm phân tích trình tự. Phần mềm phân tích protein so khớp các trình tự tương đồng bằng cách sử dụng các số đo độ tương đồng được gán cho các vị trí thay

thể, các vị trí xóa khác nhau và các vị trí cải biến khác, bao gồm các vị trí thay thế axit amin bảo thủ. Ví dụ, phần mềm GCG chứa các chương trình như GAP và BESTFIT có thể được sử dụng với các thông số mặc định để xác định sự tương đồng trình tự hoặc độ tương đồng trình tự giữa các polypeptit có liên quan chặt chẽ với nhau, như các polypeptit tương đồng từ các loài sinh vật khác nhau, hoặc giữa một protein kiểu hoang dại và mutein của nó. Ví dụ, xin tham khảo GCG phiên bản 6.1. Các trình tự polypeptit cũng có thể được so sánh bằng cách sử dụng phần mềm FASTA với các thông số mặc định hoặc các thông số được khuyến cáo; GCG phiên bản 6.1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) cung cấp chương trình sắp thẳng hàng và tỷ lệ phần trăm độ tương đồng trình tự của các vùng có sự chồng phủ tốt nhất giữa trình tự văn bản và trình tự tìm kiếm (xem tài liệu Pearson (2000) nêu trên). Một thuật toán được ưu tiên khác khi so sánh trình tự theo sáng chế với dữ liệu cơ sở chứa số lớn các trình tự từ các sinh vật khác nhau là chương trình máy tính BLAST, đặc biệt là BLASTP hoặc TBLASTN, bằng cách sử dụng các thông số mặc định (ví dụ, xem tài liệu Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 và (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402).

Theo các phương án cụ thể, kháng thể hoặc mảnh kháng thể để sử dụng trong theo sáng chế trong bản mô tả này có thể là đơn đặc hiệu, đặc hiệu kép, hoặc đa đặc hiệu. Các kháng thể đa đặc hiệu có thể đặc hiệu đối với các biểu vị khác nhau của một polypeptit đích hoặc có thể chứa các miền liên kết kháng nguyên đặc hiệu với các biểu vị của hơn một polypeptit đích. Một dạng thức kháng thể đặc hiệu kép tiêu biểu có thể được sử dụng dựa theo sáng chế là sử dụng miền globulin miễn dịch (Ig) C_H3 thứ nhất và miền Ig C_H3 thứ hai, trong đó các miền Ig C_H3 thứ nhất và thứ hai khác nhau ít nhất là một axit amin, và trong đó sự khác nhau ít nhất một axit amin gây giảm mức liên kết của kháng thể đặc hiệu kép này với protein A so với kháng thể đặc hiệu kép không có sự khác nhau về axit amin. Theo một phương án, miền Ig C_H3 thứ nhất liên kết với protein A và miền Ig C_H3 thứ hai chứa sự đột biến gây giảm hoặc loại bỏ sự liên kết với protein A, như sự cải biến H95R (theo cách đánh số vùng ngoại của IMGT; H435R là theo cách đánh số của EU). Miền C_H3 thứ hai còn có thể chứa sự cải biến Y96F (theo IMGT; Y436F theo EU). Các cải biến tiếp có thể được tìm thấy trong miền C_H3 thứ hai bao gồm: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, và V82I (theo IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M và V422I là theo EU) trong trường hợp các

mAb IgG1; N44S, K52N, và V82I (theo IMGT; N384S, K392N, và V422I là theo EU) trong trường hợp các mAb IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, và V82I (theo IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, và V422I là theo EU) trong trường hợp các mAb IgG4. Các thay đổi về dạng thức kháng thể đặc hiệu kép nêu trên được được bao hàm trong phạm vi của sáng chế này.

Cụm từ “lượng hữu hiệu điều trị” có nghĩa là lượng tạo ra hiệu quả mong muốn mà vì vậy lượng này được sử dụng. Lượng chính xác này tùy thuộc vào mục đích điều trị, và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định bằng các kỹ thuật đã biết (xem, ví dụ, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Thuật ngữ “(các) hội chứng đau cơ năng” chỉ các hội chứng trên cơ sở các triệu chứng mãn tính ảnh hưởng tới 15% dân cư trên toàn thế giới. Các hội chứng này được đặc trưng bởi cảm giác đau mãn tính và cảm giác khó chịu đối với các vùng khác nhau trên cơ thể. Không nhận thấy có các bất thường được thừa nhận rộng rãi về cấu trúc, về tình trạng viêm hoặc về sinh hoá có khả năng giải thích đầy đủ các triệu chứng đó. Các bệnh nhân có biểu hiện bị giảm nhiều về chất lượng sống, nhưng các lựa chọn điều trị vẫn bị hạn chế, sự phát triển của các phương pháp điều trị mới đang gây thất vọng. Một số rối loạn phổ biến thuộc loại này bao gồm đau mãn tính phần lưng dưới, hội chứng ruột bị kích ứng (IBS), đau xơ cơ (FM), hội chứng mỏi mãn tính, hội chứng đau bụng cơ năng, rối loạn khớp thái dương-hàm dưới (TMJD), hội chứng đau bàn quang (viêm bàn quang kẽ), các rối loạn/các hội chứng cơ năng ruột-dạ dày, hội chứng đau trực tràng cơ năng, hội chứng đau ngực cơ năng, đau nửa đầu và đau đầu kiểu căng thẳng, hội chứng đau vùng chậu mãn tính, hội chứng đau tuyến tiền liệt (viêm tuyến tiền liệt mãn tính), hội chứng đa mẫn cảm với hoá chất và hội chứng chiến tranh vùng Vịnh.

Mô tả chung

Họ thụ thể có liên quan đến thành phần dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ dòng tế bào thần kinh đệm gồm thành phần dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ dòng tế bào thần kinh đệm (GDNF), neurturin (NRTN), persephin (PSPN), và artemin (ARTN). Các protein họ GDNF có liên quan khác nhau với sự phát triển và nuôi

đưỡng các noron giác quan, noron ở ruột, noron giao cảm và noron phó giao cảm, cũng như các mô phi thần kinh khác nhau (xem các tài liệu Henderson, C.E., *et al.*, (1994), *Science* 266:1062-1064; Kotzbauer, P.T. *et al.*, (1996), *Nature* 384:467-470; Springer, J.E., *et al.* (1994), *Exp. Neurol.* 127:167-170; Schaar. D.G., *et al.*, (1993), *Exp. Neurol.* 124:368-371). GDNF là một yếu tố trường tồn đặc biệt mạnh mẽ đối với noron bị kích thích bởi dopamin, noron bị kích thích bởi noradrenalin và noron vận động cột sống (xem các tài liệu Yan, Q. *et al.* (1995), *Nature*, 373:341-344; Henderson, C.E., *et al.*, (1994), *Science*, 266:1062-1064; Buj-Bello, A. *et al.*, (1995), *Neuron*, 15:821-828). Các thành phần sinh trưởng khác thuộc họ GDNF có các chức năng bên ngoài hệ thần kinh (xem các tài liệu Trupp, M. *et al.*, (1995), *J. Cell Biol.* 130:137-148; Kotzbauer, P.T. *et al.*, (1996), *Nature* 384:467-470; Springer, J.E., *et al.* (1994), *Exp. Neurol.* 127:167-170; Schaar. D.G., *et al.*, (1993), *Exp. Neurol.* 124:368-371). Ví dụ, NRTN, ARTN, và PSPN cũng được biểu hiện ở thận đang phát triển. GDNF cũng có vai trò quan trọng bên ngoài hệ thần kinh trong việc điều hòa hình thái của thận và sự sinh tinh trùng (xem tài liệu Airaksinen, M.S. *et al.*, (2002), *Nature Reviews* 3:383-392).

Mỗi thành viên của họ GDNF ưu tiên liên kết với (tức là phối tử đối với) một thụ thể protein được neo bởi glycozylphosphatidylinositol (GPI), mà thụ thể này kết hợp động với màng chất nguyên sinh. Họ thụ thể anpha thuộc họ GDNF được cấu thành từ bốn loại thụ thể khác nhau: GFRanpha1 (GFR α 1, GDNFR-anpha); GFRanpha2 (GFR α 2/TrnR2/GDNFR-beta/NTNR-anpha/RETL2); GFRanpha3 (GFR α 3); và GFRanpha4 (GFR α 4). GDNF ưu tiên liên kết với GFR α 1, NRTN ưu tiên liên kết với GFR α 2, ARTN ưu tiên liên kết với GFR α 3 và PSPN ưu tiên liên kết với GFR α 4 (xem tài liệu Airaksinen, M.S., *et al.* *Nature Reviews Neuroscience* (2002), 3:383-394).

GFR α 2 được biểu hiện cao ở vỏ não, phần đáy não trước và các lớp đặc biệt của hành khứu giác; và được biểu hiện kém ở chất đen, tiểu não và các nhân vận động. GFR α 3 được biểu hiện ở các dây thần kinh phôi chuột nhắt và các dây thần kinh chuột nhắt trưởng thành, các hạch thần kinh giao cảm và hạch thần kinh giác quan, ở ruột, tim, não, phổi và thận. GFR α 4 được biểu hiện mức độ thấp ở các vùng khác nhau của não ở chuột nhắt trưởng thành, cũng như ở một số mô ngoại biên, bao gồm tinh hoàn

và tim. Mặc dù các ưu tiên liên kết của thành viên thuộc họ GDNF được nêu ra ở trên là của GDNF đối với GFR α 1; neurturin đối với GFR α 2; artemin đối với GFR α 3; và persephin đối với GFR α 4, nhưng cấp thụ thể-phối tử nêu trên là không nghiêm ngặt (xem tài liệu Airaksinen, M.S., *et al.* Nature Reviews Neuroscience (2002), 3:383-394). Ví dụ, GDNF liên kết GFR α 2 và GFR α 3 với hiệu lực thấp hơn so với liên kết của nó vào GFR α 1.

Các phối tử thuộc họ GDNF, điển hình mà không phải là chỉ độc nhất, truyền các tín hiệu của chúng thông qua các phức hệ gồm nhiều cấu phần, bao gồm phối tử, thụ thể GFR anpha của nó và tyrosin kinaza thụ thể, c-Ret. Ret là phần tử thông thường của các phức hợp truyền tín hiệu phối tử này. Ret là tiền yếu tố gây ung thư, hoạt hoá mạnh các tín hiệu chống lại sự chết tế bào theo chương trình thông qua sự hoạt hoá các phosphoinositol-3 kinaza (PI3-K)/PDK/AKT(PKB) và các con đường Ras/Raf/MEK/ERK. Ret cũng có khả năng hoạt hoá phospholipaza C gamma (PLCgamma), mà làm tăng canxi nội bào và thúc đẩy sự hoạt hoá các thành viên của họ protein kinaza C (PKC) thông thường và thành viên của họ mới. Các phức hợp thụ thể-phối tử họ GDNF không bị giới hạn chỉ truyền tín hiệu thông qua Ret. GDNF:GFRanpha1 có thể liên kết với NCAM trong các tế bào không có RET và hoạt hoá Fyn và FAK. Trong một số điều kiện, các phức hợp GDNF:GFRanpha hoạt hoá trực tiếp src kinaza.

Theo một số phương án của sáng chế, một hoặc nhiều miền bất kỳ trong số ba miền giàu xystein hình cầu (1, 2 hoặc 3) của GFR α 3, hay mảnh của nó, có thể được sử dụng để điều chế các kháng thể liên kết GFR α 3 và ức chế chức năng của thụ thể này hoặc ức chế khả năng của nó liên kết với phối tử của mình, như với artemin. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế đặc hiệu với GFR α 3 có thể liên kết với miền liên kết phối tử trên GFR α 3, và như vậy, có thể phong bế sự liên kết của phức hợp phối tử (là artemin)-GFR α 3 vào RET. Trình tự axit amin với chiều dài toàn bộ của GFR α 3 của người được thể hiện bằng SEQ ID NO: 375. Axit nucleic mã hoá cho GFR α 3 của người được thể hiện ở SEQ ID NO: 374. Miền 1 trải dài suốt từ gốc axit amin 44 đến gốc 124 của SEQ ID NO: 375; miền 2 xuyên suốt từ gốc 162 đến gốc 239 của SEQ ID NO: 375; miền 3 xuyên suốt từ gốc 248 đến gốc 340 của SEQ ID NO: 375. (xem SEQ ID NO. 375 hoặc Genbank NP_001487.2).

Miền bất kỳ trong số các miền này, tức là miền 1, 2 hoặc 3, hay các mảnh có nguồn gốc từ các miền đó, có thể được sử dụng để điều chế các kháng thể liên kết đặc hiệu với GFR α 3 và ức chế hoạt tính của nó, hoặc ít nhất là ức chế một chức năng có liên quan đến GFR α 3. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế liên kết đặc hiệu với GFR α 3 và có thể ngăn cản sự truyền tín hiệu qua trung gian GFR α 3. Theo một số phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với GFR α 3 có thể ngăn cản sự liên kết của GFR α 3 vào phối tử của nó, như artemin (xem tài liệu Wang, X. *et al.* Structure, (2006), 14:1083-1092). Theo một số phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với GFR α 3 có thể ngăn cản sự hoạt hoá tyrosin kinaza thụ thể RET. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế có thể liên kết đặc hiệu với GFR α 3 mà không ngăn cản sự hoạt hoá tyrosin kinaza thụ thể RET. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế có thể liên kết đặc hiệu với GFR α 3 và ngăn cản sự truyền tín hiệu thông qua RET, hoặc thông qua phần tử trung gian khác với RET. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để ức chế sự tăng trưởng/tăng sinh của tế bào khối u, và như vậy, có thể hữu ích để điều trị một số ung thư hay u ác tính, hoặc đau có liên quan đến các ung thư hay u ác tính đó, hoặc đau có liên quan đến di căn của các ung thư hay u ác tính đó (xem các tài liệu See Tang, J-Z, *et al.* Mol Cancer Ther (2010), 9(6): 1697-1708; Kang, J. *et al.* Oncogene, (2009), 28:2034-2045; Ceyhan, G.O. *et al.* Annals of Surgery, (2006), 244(2):274-281; Banerjee, A., *et al.* Breast Cancer Res (2011), 13:R112; Pandey, V. *et al.*, Endocrinology, (2010), 151(3):909-920; Kang, J. *et al.*, Oncogene, (2010), 29:3228-3240; Li, S. *et al.* J Biomed Sci (2011), 18:24). Theo một số phương án, các kháng thể liên kết đặc hiệu với GFR α 3 có thể được điều chế bằng cách sử dụng các mảnh của các vùng nêu trên, hoặc các peptit mở rộng vượt ra khỏi các vùng nêu trên khoảng từ 10 đến 50 gốc axit amin kể từ một trong hai hoặc cả hai đầu tận cùng N hoặc tận cùng C của các vùng nêu trên. Theo một số phương án, tổ hợp bất kỳ của các vùng nêu trên hoặc của các mảnh của các vùng đó có thể được sử dụng trong việc điều chế các kháng thể đặc hiệu với GFR α 3. Như đã nêu ở trên, chuỗi axit amin hoặc số gốc axit amin bao quanh ba miền đó của hGFR α 3 có thể thay đổi khoảng từ 10 đến 50 gốc axit amin mở rộng ra từ một trong hai hoặc từ cả hai đầu tận cùng N hoặc tận cùng C của miền chiều dài toàn bộ, hoặc mảnh của chuỗi axit amin vừa nêu, được sử dụng để

điều chế các kháng thể đặc hiệu kháng hGFR α 3.

Các mảnh liên kết kháng nguyên của các kháng thể

Trừ khi được chỉ ra khác, thuật ngữ "kháng thể", như được sử dụng trong bản mô tả này, sẽ được hiểu là bao hàm các phân tử kháng thể chứa hai chuỗi nặng globulin miễn dịch và hai chuỗi nhẹ globulin miễn dịch (tức là, "các phân tử kháng thể hoàn toàn") cũng như các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng. Các thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể, "mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể, và các thuật ngữ tương tự, như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein bất kỳ có trong tự nhiên, có thể thu được bằng công nghệ enzym, bằng tổng hợp hoặc bằng công nghệ di truyền, mà liên kết đặc hiệu với một kháng nguyên để tạo ra một phức hợp. Các thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể, hoặc "mảnh kháng thể", như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ một hoặc nhiều mảnh kháng thể vẫn còn giữ được khả năng liên kết đặc hiệu với hGFR α 3. Mảnh kháng thể có thể gồm mảnh Fab, mảnh F(ab')₂, mảnh Fv, mảnh dAb, mảnh chứa CDR, hoặc một CDR được phân lập. Các mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể có nguồn gốc từ, ví dụ từ các phân tử kháng thể hoàn toàn nhờ sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp, như phân giải protein hoặc các kỹ thuật công nghệ di truyền tái tổ hợp, bao gồm thao tác công nghệ và biểu hiện các miền biến đổi và (tùy ý) miền hằng định kháng thể mã hóa ADN. ADN này đã được biết và/hoặc có thể dễ dàng có được, ví dụ từ các nguồn thương mại, các thư viện ADN (bao gồm, ví dụ, các thư viện thực khuẩn thể-kháng thể), hoặc có thể được tổng hợp. ADN này có thể được xác định trình tự và thực hiện các thao tác hoá học trên chúng, hoặc bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử, ví dụ để sắp xếp một hoặc nhiều miền biến đổi và/hoặc miền hằng định thành một cấu hình thích hợp, hoặc đưa các codon vào, tạo ra các gốc xystein, cải biến, thêm hoặc xóa các axit amin, v.v.

Các ví dụ không giới hạn về các mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm: (i) các mảnh Fab; (ii) các mảnh F(ab')₂; (iii) các mảnh Fd; (iv) các mảnh Fv; (v) các phân tử Fv (scFv) đơn chuỗi; (vi) các mảnh dAb; và (vii) các đơn vị nhận biết tối thiểu gồm các gốc axit amin đẳng hiệu với vùng siêu biến của kháng thể (ví dụ, vùng quyết định tính bổ khuyết (CDR) được phân lập). Các phân tử khác được tạo ra bằng công nghệ, như các kháng thể dime, các kháng thể trime, các kháng thể tetrame và các tiểu thể,

cũng được bao hàm vào từ ngữ "mảnh liên kết kháng nguyên", như được sử dụng trong bản mô tả này.

Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể thông thường sẽ chứa ít nhất là một miền biến đổi. Miền biến đổi này có thể có kích thước hoặc thành phần axit amin bất kỳ và thường sẽ chứa ít nhất là một CDR, mà nằm kề hoặc nằm trong cùng một cơ cấu với một hoặc nhiều trình tự vùng khung. Trong các mảnh liên kết kháng nguyên có miền V_H kết hợp với miền V_L , thì các miền V_H và V_L có thể được bố trí tương đối với nhau theo cách sắp xếp thích hợp. Ví dụ, vùng biến đổi có thể là đime và chứa đime $V_H - V_H$, $V_H - V_L$ hoặc $V_L - V_L$. Theo cách khác, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa miền monome V_H hoặc V_L .

Theo một số phương án, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất là một miền biến đổi, liên kết cộng hoá trị với ít nhất là một miền hằng định. Các cấu hình tiêu biểu không giới hạn của miền biến đổi và miền hằng định có thể tìm thấy trong mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bao gồm: (i) $V_H - CH_1$; (ii) $V_H - CH_2$; (iii) $V_H - CH_3$; (iv) $V_H - CH_1 - CH_2$; (v) $V_H - CH_1 - CH_2 - CH_3$; (vi) $V_H - CH_2 - CH_3$; (vii) $V_H - CL$; (viii) $V_L - CH_1$; (ix) $V_L - CH_2$; (x) $V_L - CH_3$; (xi) $V_L - CH_1 - CH_2$; (xii) $V_L - CH_1 - CH_2 - CH_3$; (xiii) $V_L - CH_2 - CH_3$; và (xiv) $V_L - CL$. Theo cấu hình bất kỳ của miền biến đổi và miền hằng định, bao gồm cấu hình bất kỳ trong các cấu hình tiêu biểu liệt kê ở trên, miền biến đổi và miền hằng định có thể được liên kết trực tiếp với nhau hoặc có thể được liên kết thông qua một vùng bản lề đầy đủ hoặc một phần, hay thông qua một vùng liên kết. Vùng bản lề có thể gồm axit amin ít nhất là 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều hơn), tạo ra sự liên kết linh hoạt hoặc nửa linh hoạt giữa miền biến đổi và/hoặc miền hằng định nằm liền kề nhau trong cùng một phân tử polypeptit. Ngoài ra, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể chứa một homo-đime hoặc hetero-đime (hoặc multime khác) có cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình miền biến đổi và miền hằng định liệt kê ở trên, liên kết không cộng hoá trị với nhau và/hoặc với một hay nhiều miền monome V_H hoặc V_L (ví dụ, bằng (các) liên kết disulfua).

Cũng như các phân tử kháng thể hoàn toàn, các mảnh liên kết kháng nguyên có thể là đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Mảnh liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu của kháng thể thông thường sẽ chứa ít nhất là hai miền biến đổi

khác nhau, trong đó mỗi miền biến đổi có thể liên kết đặc hiệu với một kháng nguyên riêng biệt hoặc với biểu vị khác trên cùng một kháng nguyên. Bất cứ dạng thức kháng thể đa đặc hiệu nào, bao gồm các dạng thức kháng thể đặc hiệu kép làm ví dụ được bộc lộ trong bản mô tả này, đều có thể được điều chỉnh thích hợp để sử dụng dựa trên nền tảng mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế nhờ sử dụng các kỹ thuật thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Điều chế các kháng thể người

Các phương pháp tạo ra các kháng thể người ở chuột nhắt chuyển gen đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Có thể dùng các phương pháp đã biết bất kỳ dựa trên nền tảng của sáng chế để tạo ra các kháng thể người liên kết đặc hiệu với GFR α 3 của người.

Bằng cách sử dụng công nghệ VELOCIMMUNE™ hoặc phương pháp bất kỳ đã biết để tạo ra các kháng thể đơn dòng, mà các kháng thể khả năng có ái lực cao đối với GFR α 3 được phân lập ban đầu có vùng biến đổi của người và vùng hằng định của chuột nhắt. Như được nêu trong phần thực nghiệm dưới đây, các kháng thể này được xác định đặc điểm và được chọn lọc theo các đặc điểm mong muốn, bao gồm ái lực, tính chọn lọc, biểu vị, v.v. Các vùng hằng định của chuột nhắt được thay thế bằng vùng hằng định mong muốn của người để tạo ra kháng thể hoàn toàn người theo sáng chế, ví dụ như IgG1 hoặc IgG4 kiểu hoang dại hay kiểu được cải biến. Mặc dù vùng hằng định được chọn có thể thay đổi theo ứng dụng cụ thể, các đặc tính liên kết kháng nguyên với ái lực cao và đặc hiệu đích lại nằm trong vùng biến đổi.

Thông thường, các kháng thể theo sáng chế có ái lực rất cao, thường có K_D vào khoảng từ 10^{-13} đến 10^{-8} M, hoặc khoảng từ 10^{-12} đến 10^{-9} M khi được xác định bằng cách cho liên kết vào kháng nguyên cố định trên pha rắn hoặc trong pha dung dịch. Các vùng hằng định của chuột nhắt được thay thế bằng các vùng hằng định của người để tạo ra các kháng thể của người trọn vẹn theo sáng chế. Mặc dù vùng hằng định được chọn có thể thay đổi theo ứng dụng cụ thể, các đặc tính liên kết kháng nguyên với ái lực cao và đặc hiệu đích lại nằm trong vùng biến đổi.

Các tương đương sinh học

Các kháng thể kháng GFR α 3 và các mảnh kháng thể được mô tả trong bản mô

tả này bao hàm các protein có các trình tự axit amin khác với các trình tự axit amin của các kháng thể được mô tả, nhưng vẫn giữ được khả năng liên kết với $\text{GFR}\alpha 3$ của người. Các biến thể kháng thể và mảnh kháng thể đó chứa một hoặc nhiều vị trí thêm, vị trí xóa hoặc vị trí thay thế các axit amin khi so với trình tự ban đầu, nhưng vẫn biểu lộ hoạt tính sinh học tương đương về cơ bản với hoạt tính sinh học của các kháng thể được mô tả. Tương tự, các trình tự ADN mã hoá kháng thể kháng $\text{GFR}\alpha 3$ theo sáng chế bao hàm các trình tự chứa một hoặc nhiều vị trí thêm, vị trí xóa hoặc vị trí thay thế các nucleotit nếu so sánh với trình tự đã nêu, nhưng việc mã hoá kháng thể kháng $\text{GFR}\alpha 3$ hoặc mảnh kháng thể thì về cơ bản vẫn tương đương sinh học với kháng thể kháng $\text{GFR}\alpha 3$ hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế.

Hai protein, hoặc kháng thể, liên kết kháng nguyên được xem là tương đương sinh học nếu, ví dụ, chúng là các dược phẩm tương đương hoặc các dược phẩm thay thế được mà tốc độ và mức độ hấp thụ không thể hiện sự khác nhau đáng kể khi được sử dụng với cùng một liều lượng tính theo mol trong các điều kiện thực nghiệm tương tự, hoặc dưới dạng một liều duy nhất hoặc dưới dạng đa liều. Một số kháng thể sẽ được xem là tương đương hoặc là các dược phẩm thay thế được nếu chúng tương đương về mức độ hấp thụ nhưng không tương đương về tốc độ hấp thụ, và vẫn có thể được xem là tương đương sinh học, bởi vì các khác nhau đó về tốc độ hấp thụ là theo sự chủ quan và được phản ánh trên nhãn ghi, không cần thiết đối với việc đạt được nồng độ dược chất hiệu dụng trên cơ thể, ví dụ, khi dùng lâu dài, và được xem là không có ý nghĩa về mặt y tế đối với sản phẩm thuốc cụ thể được nghiên cứu.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học, nếu như không có các khác nhau có ý nghĩa lâm sàng về độ an toàn, độ tinh khiết và hiệu lực.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học, nếu như có thể chuyển đổi một hoặc nhiều lần việc điều trị cho bệnh nhân, giữa việc điều trị bằng sản phẩm quy chiếu và việc điều trị bằng sản phẩm sinh học, mà không xảy ra nguy cơ tăng tác dụng phụ như dự đoán, bao gồm sự thay đổi có ý nghĩa lâm sàng về tính sinh miễn dịch, hoặc sự giảm hiệu quả điều trị, so với việc điều trị liên tục không có sự chuyển đổi này.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh

học, nếu như cả hai protein đó tác động theo một cơ chế chung hoặc theo các cơ chế chung hoạt động ở điều kiện hoặc ở các điều kiện sử dụng, tới mức độ nhất định đã biết đối với các cơ chế đó.

Sự tương đương sinh học có thể được chứng minh bằng các phương pháp *in vivo* và/hoặc *in vitro*. Chẳng hạn, việc xác định sự tương đương sinh học bao gồm: a) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc các động vật có vú khác, trong đó nồng độ của kháng thể hoặc của các sản phẩm chuyển hoá của nó được đo trong máu, huyết tương, huyết thanh, hoặc trong các dịch sinh học khác, thay đổi theo thời gian; b) thử nghiệm *in vitro* đã được liên hệ với các số liệu sinh khả dụng *in vivo* ở người và được suy đoán một cách hợp lý về các số liệu đó; c) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc các động vật có vú khác, trong đó tác dụng dược lý nhạy bén thích hợp của kháng thể (hoặc đích của nó) được đo, thay đổi theo thời gian; và d) thử nghiệm lâm sàng được kiểm soát chặt chẽ, giúp thiết lập tính an toàn, hiệu lực, hoặc mức sinh khả dụng hay sự tương đương sinh học của kháng thể.

Các biến thể tương đương sinh học của các kháng thể kháng GFR α 3 theo sáng chế có thể được tạo ra, chẳng hạn như bằng cách thực hiện các thay thế khác nhau đối với các gốc hoặc các trình tự, hoặc xóa các gốc tận cùng hay ở bên trong, hay loại bỏ các chuỗi axit amin không cần thiết đối với hoạt tính sinh học. Ví dụ, các gốc xystein là không cần thiết đối với hoạt tính sinh học thì có thể được xóa hoặc được thay thế bằng các gốc axit amin khác để tránh sự tạo thành các cầu disulfua nội phân tử không cần thiết hoặc không chính xác sau khi hồi tính. Trong các tình huống khác, các kháng thể tương đương sinh học có thể bao gồm các biến thể kháng thể kháng GFR α 3 chứa các thay đổi về axit amin, mà các thay đổi này làm thay đổi các đặc điểm glycozyl hoá của các kháng thể đó, ví dụ, các đột biến loại trừ hoặc loại bỏ sự glycozyl hoá.

Các kháng thể kháng GFR α 3 chứa các biến thể Fc

Theo một số phương án của sáng chế, các kháng thể kháng GFR α 3 được tạo ra có miền Fc chứa một hoặc nhiều vị trí đột biến, mà làm tăng hoặc làm giảm sự liên kết kháng thể vào thụ thể FcRn, ví dụ, ở độ pH axit so với độ pH trung tính. Ví dụ, sáng chế bao hàm các kháng thể kháng GFR α 3 chứa vị trí đột biến ở vùng C_H2 hoặc vùng C_H3 của miền Fc, trong đó (các) đột biến này làm tăng ái lực của miền Fc với FcRn

trong môi trường axit (ví dụ, trong thể trong nhân đơn bào, mà có khoảng pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,0). Các đột biến đó có thể dẫn tới làm tăng thời gian bán tồn trong huyết thanh của kháng thể khi huyết thanh được sử dụng cho động vật. Chẳng hạn, các ví dụ không giới hạn về các cải biến Fc này bao gồm cải biến ở vị trí 250 (ví dụ, E hoặc Q); 250 và 428 (ví dụ, L hoặc F); 252 (ví dụ, L/Y/F/W hoặc T), 254 (ví dụ, S hoặc T), và 256 (ví dụ, S/R/Q/E/D hoặc T); hoặc cải biến ở vị trí 428 và/hoặc 433 (ví dụ, H/L/R/S/P/Q hoặc K) và/hoặc 434 (ví dụ, H/F hoặc Y); hoặc cải biến ở vị trí 250 và/hoặc 428; hoặc cải biến ở vị trí 307 hay 308 (ví dụ, 308F, V308F), và 434. Theo một phương án, cải biến này bao gồm cải biến 428L (ví dụ, M428L) và 434S (ví dụ, N434S); cải biến 428L, 259I (ví dụ, V259I), và 308F (ví dụ, V308F); cải biến 433K (ví dụ, H433K) và 434 (ví dụ, 434Y); cải biến 252, 254 và 256 (ví dụ, 252Y, 254T, và 256E); cải biến 250Q và 428L (ví dụ, T250Q và M428L); và cải biến 307 và/hoặc 308 (ví dụ, 308F hoặc 308P).

Ví dụ, sáng chế bao hàm các kháng thể kháng GFR α 3 có miền Fc chứa một hoặc nhiều cặp hoặc nhóm đột biến được chọn từ nhóm gồm: 250Q và 248L (ví dụ, T250Q và M248L); 252Y, 254T và 256E (ví dụ, M252Y, S254T và T256E); 428L và 434S (ví dụ, M428L và N434S); và 433K và 434F (ví dụ, H433K và N434F). Tất cả các tổ hợp có thể có của các đột biến nêu trên của miền Fc, và các đột biến khác trong các miền biến đổi kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này đều được xem là thuộc phạm vi của sáng chế này.

Các đặc tính sinh học của các kháng thể

Thông thường, các kháng thể theo sáng chế có thể hoạt động theo cách liên kết với một hoặc hơn một miền trong số ba miền giàu xystein hình cầu (1, 2, hoặc 3) của hGFR α 3. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với một biểu vị trên ít nhất một trong các miền giàu xystein của hGFR α 3. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với các gốc axit amin của miền 1 trong GFR α 3, khoảng từ gốc 44 đến gốc 124 nêu trong SEQ ID NO: 375. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với các gốc axit amin của miền 2 trong GFR α 3, khoảng từ gốc 162 đến gốc 239 nêu trong SEQ ID NO: 375. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với các gốc axit amin của miền 3 trong GFR α 3, khoảng từ gốc 248 đến gốc 340 nêu trong SEQ ID NO: 375. Theo một

số phương án, các kháng thể theo sáng chế có thể hoạt động theo cách phong bế hoặc ức chế hoạt tính GFR α 3 bằng cách liên kết với vùng nằm trong miền bất kỳ trong các miền hoạt động như miền liên kết phối tử, do đó ngăn cản sự liên kết của phối tử, như artemin, vào vị trí đó. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể liên kết vào vị trí liên kết phối tử ở một trong các miền của GFR α 3 và ngăn cản sự liên kết tiếp theo của phức hợp artemin-GFR α 3 vào RET. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với một hoặc nhiều biểu vị bất kỳ trong các biểu vị ở phức hợp artemin-GFR α 3, mà có thể quyết định hoặc có vai trò đối với tính đặc hiệu giữa phối tử và GFR α 3, như trong vùng từ gốc 167 đến gốc 184 nêu trong SEQ ID NO: 375. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với một hoặc nhiều gốc của miền 2, mà có vai trò quyết định tính đặc hiệu giữa artemin và GFR α 3, ví dụ, các gốc axit amin ở các vị trí 167 (met), 176 (asp) và/hoặc vị trí 184 (glu) nêu trong SEQ ID NO: 375 và với sự liên kết này, có thể ngăn cản sự liên kết của phối tử vào thụ thể của nó, do đó có thể ngăn cản sự truyền tín hiệu thông qua tyrosin kinaza thụ thể RET, hoặc thông qua phần tử trung gian truyền tín hiệu hoặc phần tử điều biến truyền tín hiệu khác với RET. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với dạng bị liên kết vào màng của GFR α 3 hoặc với dạng hoà tan của GFR α 3. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với GFR α 3, nhưng không phản ứng chéo với GFR α 1, GFR α 2, hoặc GFR α 4. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế có thể là các kháng thể đặc hiệu kép. Các kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có thể liên kết với một biểu vị trong một vùng giàu xystein của một miền và cũng có thể liên kết với một vùng giàu xystein trong miền thứ hai của hGFR α 3. Theo một số phương án, các kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có thể liên kết với hai vùng khác nhau trong cùng một miền. Theo một số phương án, một nhánh của kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có thể liên kết với một vùng giàu xystein của một miền trong hGFR α 3 và nhánh kia có thể liên kết với RET, hoặc với phần tử điều biến khác RET. Theo một số phương án, các kháng thể đặc hiệu kép có thể liên kết với một miền trong GFR α 3 và một miền trong GFR α 1 hoặc GFR α 2.

Cụ thể hơn, các kháng thể kháng GFR α 3 theo sáng chế có thể biểu hiện một hoặc nhiều đặc điểm sau:

- (i) biểu hiện K_D nằm trong khoảng từ 10^{-8} M đến khoảng 10^{-13} M khi được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt;
- (ii) thể hiện khả năng phong bế khoảng từ 50 đến 100% sự liên kết của $GFR\alpha 3$ vào phối tử của nó, artemin, với trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 40pM đến khoảng 15nM;
- (iii) thể hiện khả năng phong bế từ khoảng 20% đến khoảng 100% sự liên kết của $GFR\alpha 3$ vào một giá thể rắn được phủ hỗn hợp gồm artemin và RET;
- (iv) phong bế hoặc ức chế sự hoạt hoá phụ thuộc artemin đối với RET, với IC_{50} nằm trong khoảng từ 200pM đến khoảng 50nM;
- (v) ức chế hoặc làm giảm một hoặc nhiều đáp ứng cảm thụ đau trên mô hình đau do ung thư xương *in vivo*;
- (vi) ức chế hoặc làm giảm chứng tăng cảm giác đau với nhiệt mẫn cảm với ARTEMIN *in vivo*;
- (vii) ức chế hoặc làm giảm loạn cảm đau trên mô hình bệnh viêm xương-khớp *in vivo*; hoặc
- (viii) không phản ứng chéo với các đồng thụ thể GFR khác đối với RET;

Một số kháng thể kháng $GFR\alpha 3$ theo sáng chế có khả năng ức chế hoặc làm giảm bớt hoạt tính của $GFR\alpha 3$ trong thử nghiệm *in vitro*. Khả năng của các kháng thể theo sáng chế liên kết và ức chế sự liên kết của $GFR\alpha 3$ vào phối tử artemin của nó ở trạng thái đơn lẻ hoặc khi có mặt RET có thể được đo bằng cách sử dụng phương pháp tiêu chuẩn bất kỳ mà người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật đã biết, bao gồm các thử nghiệm liên kết, hoặc các thử nghiệm để xác định xem các kháng thể có phong bế sự hoạt hoá RET hay không bằng cách ức chế sự liên kết của $GFR\alpha 3$ vào thụ thể artemin của nó, như các thử nghiệm được bộc lộ trong bản mô tả này. Các thử nghiệm *in vitro* làm ví dụ, không giới hạn để đo hoạt tính của $GFR\alpha 3$ được minh hoạ trong các Ví dụ 4 và 5, dưới đây.

Sáng chế bao hàm các kháng thể kháng $GFR\alpha 3$ và các mảnh liên kết kháng nguyên của nó, mà liên kết với một hoặc nhiều miền hình cầu giàu xystein của $GFR\alpha 3$, như được thể hiện trong SEQ ID NO: 375, hoặc liên kết với một mảnh của của nó. Các kháng thể đặc hiệu với $GFR\alpha 3$ có thể không chứa các nhãn ghi dấu phụ hoặc các gốc phụ, hoặc chúng có thể chứa nhãn ghi dấu hoặc gốc tận cùng bằng N

hoặc tận cùng C. Theo một phương án, nhãn ghi dấu hoặc gốc đó là biotin. Trong thử nghiệm liên kết, vị trí của nhãn (nếu có) có thể xác định sự định hướng của peptit so với bề mặt mà peptit đó được liên kết. Ví dụ, nếu bề mặt được phủ avidin, thì peptit chứa biotin tận cùng N sẽ được định hướng sao cho phần tận cùng C của peptit đó sẽ cách xa bề mặt đã nêu.

Sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng hoàn toàn người hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu với hGFR α 3 và trung hoà hoạt tính của hGFR α 3, trong đó kháng thể hoặc mảnh của nó biểu hiện một hoặc nhiều đặc điểm sau: (i) chứa HCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 381 và 397; (ii) chứa LCVR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 389 và 405; (iii) chứa một hoặc nhiều trình tự bất kỳ trong các trình tự CDR1, CDR2 và CDR3 của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ nêu trong Bảng 1 và các tổ hợp của chúng; (iv) đặc hiệu để liên kết vào GFR α 3 và/hoặc để phong bế hoạt tính của GFR α 3, mà không liên kết vào các thụ thể GFR anpha khác và/hoặc không phong bế các thụ thể GFR anpha khác, bao gồm GFR α 1, GFR α 2 và GFR α 4; (v) thể hiện tính đặc hiệu liên kết đối với một hoặc nhiều miền bất kỳ trong các miền hình cầu giàu xystein của GFR α 3; (vi) phong bế sự hoạt hoá tyrosin kinaza thụ thể RET và sự truyền tín hiệu thông qua tyrosin kinaza thụ thể RET; (vii) ức chế hoặc làm giảm chứng tăng cảm giác đau với nhiệt mẫn cảm với ARTEMIN *in vivo*; (viii) ức chế hoặc làm giảm loạn cảm đau trên mô hình bệnh thoái hóa khớp *in vivo*; hoặc ức chế hay làm giảm một hoặc nhiều đáp ứng cảm thụ đau trên mô hình đau do ung thư xương *in vivo*.

Lập bản đồ biểu vị và các kỹ thuật có liên quan

Có thể sử dụng các kỹ thuật khác nhau quen thuộc đối với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này để xác định xem một kháng thể có "tương tác với một hoặc nhiều axit amin" nằm trong một polypeptit hoặc protein hay không. Ví dụ, các kỹ thuật làm ví dụ bao gồm thử nghiệm phong bế chéo thông thường, như có thể thực hiện kỹ thuật được mô tả trong tài liệu Antibodies, Harlo and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY). Các phương pháp khác bao gồm phân tích đột

biến quét alanin, phân tích thẩm peptit (xem tài liệu Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248:443-63), các nghiên cứu tinh thể học phân tích sự phân cắt peptit và phân tích phổ NMR. Ngoài ra, còn có thể sử dụng các phương pháp như cắt bỏ biểu vị, chiết xuất biểu vị và cải biến hoá học các kháng nguyên (xem tài liệu Tomer (2000) *Protein Science* 9: 487-496). Một phương pháp khác có thể được sử dụng để xác định định tính các axit amin trong một polypeptit, mà kháng thể phản ứng với, là phương pháp sử dụng phản ứng trao đổi hydro/đơteri được phát hiện bằng trắc khối phổ. Theo các thuật ngữ thông thường, phương pháp trao đổi hydro/đơteri bao gồm việc đánh dấu protein được xem xét bằng đơteri, sau đó liên kết kháng thể vào protein được đánh dấu bằng đơteri. Tiếp theo, phức hợp protein/kháng thể được chuyển vào nước và các proton có thể trao đổi trong các axit amin, mà được bảo vệ bởi phức hợp kháng thể trải qua sự trao đổi ngược đơteri thành hydro ở tốc độ chậm hơn so với các proton có thể trao đổi trong các axit amin không nằm trong một phần của mặt phân cách. Kết quả là, các axit amin tạo thành một phần của mặt phân cách protein/kháng thể có thể giữ đơteri và do đó biểu hiện khối lượng tương đối cao hơn so với các axit amin không thuộc mặt phân cách. Sau khi phân ly khỏi kháng thể, protein đích được phân cắt bằng proteaza và phân tích bằng phương pháp trắc phổ khối, nhờ đó phát hiện được các gốc được đánh dấu bằng đơteri tương ứng với các axit amin cụ thể mà kháng thể tương tác với chúng. Ví dụ, xem các tài liệu Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Thuật ngữ "biểu vị" chỉ vị trí trên kháng nguyên mà các tế bào B và/hoặc T đáp ứng với chúng. Các biểu vị tế bào B có thể được tạo thành cả từ các axit amin kề nhau hoặc các axit amin không kề nhau được kề nhau do sự tạo nếp gấp bậc ba của protein. Các biểu vị được tạo thành từ các axit amin kề nhau thường vẫn được giữ khi tiếp xúc với các dung môi gây biến tính, trong khi các biểu vị được tạo thành do sự tạo nếp gấp bậc ba thường bị mất đi khi xử lý bằng các dung môi gây biến tính. Một biểu vị thường gồm ít nhất là 3, và thường hơn, ít nhất là 5 hoặc 8-10 axit amin trong một cấu dạng không gian duy nhất.

Việc xác định hồ sơ được hỗ trợ bằng cải biến (MAP- Modification-Assisted Profiling), còn được gọi là xác định hồ sơ kháng thể trên cơ sở cấu trúc kháng nguyên (ASAP- Antigen Structure-based Antibody Profiling), là phương pháp phân loại số lớn

các kháng thể đơn dòng (các mAb) có xu hướng kháng lại cùng một kháng nguyên theo sự tương tự về các hồ sơ liên kết của mỗi kháng thể với các bề mặt kháng nguyên được cải biến bằng hoá học hoặc bằng enzym (ví dụ, xem tài liệu US 2004/0101920). Mỗi loại có thể phản ánh một biểu vị duy nhất, hoặc khác biệt rõ ràng với hoặc chồng lấn một phần với biểu vị được biểu diễn bởi một loại khác. Kỹ thuật này cho phép sàng lọc nhanh các kháng thể tương đồng về mặt di truyền, sao cho việc xác định đặc điểm có thể tập trung vào các kháng thể khác nhau về mặt di truyền. Khi áp dụng cho việc sàng lọc khối tế bào lai, thì MAP có thể giúp dễ dàng nhận dạng các dòng tế bào lai hiếm tạo ra các mAb mang các đặc điểm mong muốn. MAP có thể được sử dụng để phân loại các kháng thể theo sáng chế thành các nhóm kháng thể liên kết với các biểu vị khác nhau.

Theo một số phương án, kháng thể kháng GFR α 3 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết với biểu vị trong ít nhất một miền trong số các miền giàu xystein GFR α 3 1, 2, 3, hoặc với một mảnh của nó, trong đó miền 1 nằm trong khoảng từ gốc số 44 đến khoảng gốc số 124 nêu trong SEQ ID NO: 375; miền 2 nằm trong khoảng từ gốc số 162 đến gốc số 239 nêu trong SEQ ID NO: 375; miền 3 nằm trong khoảng từ gốc số 248 đến khoảng gốc số 340 nêu trong SEQ ID NO: 375.

Theo một số phương án, kháng thể kháng GFR α 3 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết với biểu vị trong miền 1, hoặc mảnh của nó, trong GFR α 3 người.

Theo một số phương án, kháng thể kháng GFR α 3 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết với biểu vị trong miền 2, hoặc mảnh của nó, trong GFR α 3 người.

Theo một số phương án, kháng thể kháng GFR α 3 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết với biểu vị trong miền 3, hoặc mảnh của nó, trong GFR α 3 người.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh kháng thể liên kết với một biểu vị, bao gồm hơn một biểu vị trong các biểu vị đã được nêu của GFR α 3 trong miền 1, 2, hoặc 3, và/hoặc trong hai miền khác nhau (ví dụ như, các biểu vị trong các miền 1 và 2, hoặc trong các miền 2 và 3, hoặc trong các miền 1 và 3).

Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép liên kết với một biểu vị trong một miền của $\text{GFR}\alpha 3$ và với một biểu vị khác trong một miền khác của $\text{GFR}\alpha 3$. Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép liên kết với một biểu vị nằm trong miền 1 của $\text{GFR}\alpha 3$ và với một biểu vị khác nằm trong miền 2 của $\text{GFR}\alpha 3$. Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép liên kết với một biểu vị nằm trong miền 1 của $\text{GFR}\alpha 3$ và với một biểu vị khác trong miền 3 của $\text{GFR}\alpha 3$. Theo một phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép liên kết với một biểu vị nằm trong miền 2 của $\text{GFR}\alpha 3$ và với một biểu vị khác trong miền 3 của $\text{GFR}\alpha 3$.

Sáng chế bao hàm các kháng thể kháng $\text{GFR}\alpha 3$ liên kết với cùng một biểu vị, như kháng thể bất kỳ trong các kháng thể làm ví dụ cụ thể được nêu trong bản mô tả này (ví dụ, H4H2207N, H4H2212N, H4H2236N3, H4H2243N2, H4H2210N, H4H2234N, H4H2291S, H4H2292S, H4H2293P, H4H2294S, H4H2295S, H4H2296S, H4H2341S, H4H2342P, H4H2344S, H4H2345S, H4H2346S, H4H2350P, H4H2352S, H4H2354S, H4H2355S, H4H2357S, H4H2364S, H1M2243N và H1M2236N). Tương tự, sáng chế cũng bao hàm các kháng thể kháng $\text{GFR}\alpha 3$ cạnh tranh để liên kết với $\text{GFR}\alpha 3$ hoặc với mảnh của $\text{GFR}\alpha 3$ với kháng thể bất kỳ trong các kháng thể làm ví dụ cụ thể được nêu trong bản mô tả này.

Có thể dễ dàng xác định xem, kháng thể có liên kết với cùng một biểu vị, hoặc cạnh tranh liên kết với kháng thể kháng $\text{GFR}\alpha 3$ tham chiếu hay không, bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, để xác định xem kháng thể thử nghiệm có liên kết với cùng biểu vị như kháng thể kháng $\text{GFR}\alpha 3$ tham chiếu theo sáng chế hay không, thì kháng thể tham chiếu được cho liên kết với protein hoặc peptit $\text{GFR}\alpha 3$ ở các điều kiện bão hoà. Tiếp theo, khả năng của kháng thể thử nghiệm liên kết với phân tử $\text{GFR}\alpha 3$ được đánh giá. Nếu kháng thể thử nghiệm có khả năng liên kết vào $\text{GFR}\alpha 3$ sau khi liên kết bão hoà với kháng thể kháng $\text{GFR}\alpha 3$ tham chiếu, thì có thể kết luận rằng, kháng thể thử nghiệm liên kết với một biểu vị khác với kháng thể kháng $\text{GFR}\alpha 3$ tham chiếu. Mặt khác, nếu kháng thể thử nghiệm không có khả năng liên kết vào phân tử $\text{GFR}\alpha 3$ sau khi liên kết bão hoà với kháng thể kháng $\text{GFR}\alpha 3$ tham chiếu, thì có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với cùng biểu vị như biểu vị bị liên kết bởi kháng thể kháng $\text{GFR}\alpha 3$ tham

chiếu theo sáng chế.

Để xác định xem kháng thể có cạnh tranh để liên kết với kháng thể kháng $\text{GFR}\alpha 3$ tham chiếu hay không, thì phương pháp luận liên kết nêu trên được thực hiện theo hai hướng: theo hướng thứ nhất, kháng thể tham chiếu được cho liên kết với phân tử $\text{GFR}\alpha 3$ ở các điều kiện bão hoà, sau đó đánh giá sự liên kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử $\text{GFR}\alpha 3$. Theo hướng thứ hai, kháng thể thử nghiệm được cho liên kết với phân tử $\text{GFR}\alpha 3$ ở điều kiện bão hoà, sau đó đánh giá sự liên kết của kháng thể tham chiếu với phân tử $\text{GFR}\alpha 3$. Nếu như theo cả hai hướng chỉ có kháng thể thứ nhất (bão hoà) có khả năng liên kết với phân tử $\text{GFR}\alpha 3$, thì sau đó kết luận rằng, kháng thể thử nghiệm và kháng thể tham chiếu cạnh tranh với nhau để liên kết với $\text{GFR}\alpha 3$. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ đánh giá cao rằng, một kháng thể cạnh tranh để liên kết với kháng thể tham chiếu có thể không nhất thiết phải liên kết vào cùng một biểu vị như kháng thể tham chiếu, mà có thể chỉ là phong bế về mặt không gian sự liên kết của kháng thể tham chiếu bằng cách liên kết với một biểu vị chồng phủ hoặc biểu vị liền kề.

Hai kháng thể liên kết với cùng một biểu vị hoặc với biểu vị chồng phủ, nếu mỗi kháng thể đó cạnh tranh ức chế (phong bế) sự liên kết của kháng thể kia vào kháng nguyên. Tức là, lượng dư gấp 1, 5, 10, 20 hoặc 100 lần của một kháng thể sẽ ức chế sự liên kết của kháng thể kia ít nhất là 50%, nhưng tốt hơn là 75%, 90%, hoặc thậm chí 99%, như được đo trong thử nghiệm liên kết cạnh tranh (xem, ví dụ, tài liệu Junghans et al., Cancer Res. 1990 50:1495-1502). Theo cách khác, hai kháng thể có cùng biểu vị nếu như về cơ bản tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết của một kháng thể sẽ làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết của kháng thể kia. Hai kháng thể có các biểu vị chồng phủ, nếu như một số đột biến axit amin làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết của một kháng thể sẽ làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết của kháng thể kia.

Thực nghiệm thông thường bổ sung (ví dụ, các phân tích đột biến và liên kết peptit) sau đó có thể được tiến hành để khẳng định xem sự giảm liên kết quan sát thấy của kháng thể thử nghiệm trên thực tế có phải là do sự liên kết vào cùng một biểu vị như kháng thể tham chiếu, hoặc xem, sự phong bế không gian (hoặc một hiện tượng khác) là nguyên nhân gây giảm liên kết được quan sát. Các thực nghiệm kiểu như vậy

có thể được thực hiện nhờ sử dụng các thử nghiệm ELISA, RIA, cộng hưởng plasmon bề mặt, đo tế bào dòng hoặc bất kỳ thử nghiệm liên kết kháng thể định lượng hoặc định tính khác bất kỳ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Tính chọn lọc loài và khả năng phản ứng chéo loài

Theo một số phương án của sáng chế, các kháng thể kháng GFR α 3 liên kết với GFR α 3 của người mà không liên kết với GFR α 3 từ các loài khác. Theo cách khác, theo một số phương án, các kháng thể kháng GFR α 3 theo sáng chế liên kết với GFR α 3 của người và với GFR α 3 từ một hoặc nhiều loài không phải là người. Ví dụ, các kháng thể kháng GFR α 3 theo sáng chế có thể liên kết với GFR α 3 của người và, tùy theo trường hợp, có thể liên kết hoặc không liên kết với một hoặc nhiều GFR α 3 của chuột nhắt, chuột thân lớn, chuột lang, chuột túi má, chuột nhảy, lợn, mèo, chó, thỏ, dê, cừu, bò, ngựa, lạc đà, khỉ cynomolgus, khỉ sóc, khỉ rezut hoặc hắc tinh tinh.

Các thể liên hợp miễn dịch

Được mô tả trong bản mô tả này là kháng thể đơn dòng kháng GFR α 3 của người liên hợp với một gốc điều trị (“thể liên hợp miễn dịch”), như một chất có khả năng làm giảm đau và/hoặc giảm viêm, một dược chất hoá trị liệu hoặc một đồng vị phóng xạ. Kiểu gốc điều trị có thể được liên hợp với kháng thể kháng GFR α 3 phải tương ứng với bệnh được điều trị và hiệu quả điều trị mong muốn đạt được. Ví dụ, để điều trị đau cấp tính hoặc mãn tính, một chất như NSAID, opioit, hoặc chất ức chế Cox-2 hay chất gây tê tại chỗ, hoặc chất ức chế GFR α 3 thứ hai có thể được liên hợp với kháng thể kháng GFR α 3. Theo cách khác, nếu hiệu quả điều trị mong muốn là điều trị viêm đi kèm với tình trạng đau, thì có thể có lợi là liên hợp một chất chống viêm với kháng thể kháng GFR α 3, ví dụ như, nhưng không giới hạn ở, celecoxib, hoặc chất đối kháng xytokin, như chất ức chế IL-1 hoặc IL-6. Nếu tình trạng được điều trị là tình trạng ung thư, thì có thể có lợi là liên hợp dược chất hoá trị liệu hoặc đồng vị phóng xạ với kháng thể kháng GFR α 3. Các ví dụ về các chất thích hợp để tạo ra các thể liên hợp miễn dịch đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này, xem ví dụ trong tài liệu WO 05/103081.

Các kháng thể đa đặc hiệu

Các kháng thể theo sáng chế có thể là đơn đặc hiệu, đặc hiệu kép, hoặc đa đặc hiệu. Các kháng thể đa đặc hiệu có thể đặc hiệu với các biểu vị khác nhau trong một polypeptit đích hoặc có thể chứa các miền liên kết kháng nguyên đặc hiệu với hơn một polypeptit đích. Ví dụ, xem các tài liệu Tutt *et al.*, 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Các kháng thể kháng GFR α 3 theo sáng chế có thể được liên kết hoặc được đồng biểu hiện với một phân tử chức năng khác, ví dụ như một peptit hoặc protein khác. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh của nó có thể được liên kết theo chức năng (ví dụ, bằng cách ghép hoá học, dung hợp di truyền, kết hợp không cộng hoá trị hoặc bằng cách khác) vào một hoặc nhiều phân tử khác, như một kháng thể hoặc mảnh kháng thể khác để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể đa đặc hiệu mang tính đặc hiệu liên kết thứ hai. Ví dụ, sáng chế bao hàm các kháng thể đặc hiệu kép mà trong đó một nhánh trong globulin miễn dịch đặc hiệu với GFR α 3 của người hoặc mảnh của nó, và nhánh kia trong globulin miễn dịch đặc hiệu với đích điều trị thứ hai hoặc được liên hợp với một gốc điều trị. Theo một số phương án của sáng chế, một nhánh trong globulin miễn dịch đặc hiệu với biểu vị trên một miền của hGFR α 3 hoặc trên mảnh của nó, và nhánh kia trong globulin miễn dịch đó đặc hiệu với biểu vị trên miền thứ hai của hGFR α 3. Theo một số phương án, một nhánh trong globulin miễn dịch đặc hiệu với một biểu vị trên một miền của hGFR α 3, và nhánh kia đặc hiệu với biểu vị thứ hai trên chính miền đó của hGFR α 3.

Một dạng thức kháng thể đặc hiệu kép làm ví dụ có thể được sử dụng trong ngữ cảnh sáng chế có liên quan đến việc sử dụng miền C_H3 globulin miễn dịch (Ig) thứ nhất và miền C_H3 Ig thứ hai, trong đó các miền C_H3 thứ nhất và thứ hai khác nhau bởi ít nhất là một axit amin, và trong đó, sự khác nhau ít nhất một axit amin sẽ làm giảm sự liên kết của kháng thể đặc hiệu kép vào Protein A so với kháng thể đặc hiệu kép không có sự khác nhau về axit amin. Theo một phương án, miền C_H3 Ig thứ nhất liên kết với Protein A và miền C_H3 Ig thứ hai chứa một đột biến gây giảm hoặc loại bỏ sự liên kết với Protein A, ví dụ như sự cải biến H95R (theo cách đánh số exon IMGT; H435R theo cách đánh số của EU). Miền C_H3 thứ hai còn có thể chứa cải biến Y96F (theo IMGT; Y436F theo EU). Các cải biến tiếp theo có thể được tìm thấy trong phạm vi miền C_H3 thứ hai bao gồm: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, và V82I (theo IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, và V422I theo EU) trong trường

hợp các kháng thể IgG1; N44S, K52N, và V82I (IMGT; N384S, K392N và V422I theo EU) trong trường hợp các kháng thể IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, và V82I (theo IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, và V422I theo EU) trong trường hợp các kháng thể IgG4. Các biến đổi về dạng thức kháng thể đặc hiệu kép nêu trên đều được bao hàm trong phạm vi của sáng chế.

Việc sử dụng trong điều trị và các dạng bào chế

Sáng chế đề xuất các dược phẩm chứa các kháng thể kháng $\text{GFR}\alpha 3$ hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Các dược phẩm theo sáng chế sẽ được sử dụng cùng với các chất mang, các tá dược, và các chất khác thích hợp, mà được đưa vào các dạng bào chế để cải thiện việc truyền thuốc, phân phối thuốc, dung nạp thuốc và các dạng tương tự. Có thể tìm thấy nhiều dạng bào chế thích hợp trong cuốn tuyển tập dạng bào chế quen thuộc với tất cả các nhà hoá dược: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Ví dụ, các dạng bào chế này bao gồm các bột, các bột nhão, các thuốc mỡ, các gel, các sáp, các dầu, các lipit, các nang chứa lipit (cation hoặc anion) (như LIPOFECTIN™), các thể liên hợp ADN, các bột hấp thụ khan, nhũ tương dầu trong nước và nhũ tương nước trong dầu, các nhũ tương carbovắc (các polyetylen glycol có phân tử lượng khác nhau), các gel dạng sánh đặc và các hỗn hợp dạng sánh đặc chứa carbovắc. Cũng xem tài liệu Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Liều lượng của kháng thể có thể thay đổi tùy theo tuổi và thể trọng của người được cho sử dụng thuốc, bệnh đích, tình trạng bệnh, đường dùng thuốc và các yếu tố tương tự. Khi kháng thể theo sáng chế được sử dụng để điều trị đau có liên quan đến hoạt tính $\text{GFR}\alpha 3$ trong các tình trạng bệnh và các bệnh khác nhau, mà trong đó tình trạng bệnh hoặc bệnh gây ra đau cấp tính hoặc đau mãn tính, đau do viêm, đau do bệnh thần kinh và đau tương tự, ở bệnh nhân lớn tuổi, thì có lợi là dùng theo đường tĩnh mạch kháng thể theo sáng chế, thường với liều lượng duy nhất khoảng 0,01 đến khoảng 20 mg/kg thể trọng, tốt hơn nữa là khoảng 0,02 đến khoảng 7, khoảng 0,03 đến khoảng 5, hoặc khoảng 0,05 đến khoảng 3 mg/kg thể trọng. Tùy thuộc mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh, mà tần suất và khoảng thời gian điều trị có thể được điều chỉnh cho phù hợp.

Các hệ phân phối thuốc khác nhau đã được biết đến và có thể được sử dụng cho các dược phẩm theo sáng chế, ví dụ, hệ đóng nang dạng liposom, hệ vi hạt, hệ vi nang, hệ các tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện các virus đột biến, hệ nhập nội bào qua trung gian thụ thể (ví dụ, xem tài liệu Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Các phương pháp đưa bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tiêm nội bì, tiêm bắp, tiêm trong phúc mạc, dùng theo đường tĩnh mạch, tiêm dưới da, dùng đường trong mũi, tiêm trên màng cứng và dùng theo đường uống. Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng theo bất kỳ đường dùng thuốc thích hợp nào, ví dụ như theo đường truyền hoặc tiêm lượng lớn, đường hấp thụ qua lớp biểu mô hoặc lớp niêm mạc (ví dụ như niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và niêm mạc ruột, v.v.) và có thể được sử dụng phối hợp với các chất có hoạt tính sinh học khác. Việc sử dụng thuốc có thể là toàn thân hoặc tại chỗ.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được phân phối dưới dạng nang, cụ thể là dạng liposom (ví dụ, xem tài liệu Langer (1990) Science 249:1527-1533).

Trong một số tình huống, dược phẩm theo sáng chế có thể được phân phối dưới dạng hệ giải phóng có kiểm soát. Theo một phương án, có thể sử dụng bơm. Theo một phương án khác, có thể sử dụng các vật liệu polyme. Theo một phương án khác nữa, hệ giải phóng có kiểm soát có thể được đặt gần đích đạt đến của dược phẩm, do đó chỉ cần một phần của liều lượng toàn thân.

Các chế phẩm tiêm có thể gồm các dạng liều lượng để tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da, tiêm trong da và tiêm bắp, truyền nhỏ giọt, v.v. Có thể điều chế các chế phẩm tiêm này bằng các phương pháp đã biết rộng rãi. Ví dụ, các chế phẩm tiêm có thể được điều chế, ví dụ, bằng cách hoà tan, huyền phù hoá hoặc nhũ tương hoá kháng thể hoặc muối của nó nêu trên trong môi trường nước vô khuẩn hoặc trong môi trường dầu thường dùng cho thuốc tiêm. Ví dụ, làm môi trường nước cho thuốc tiêm có dung dịch muối sinh lý, dung dịch đẳng trương chứa glucoza và các chất phụ trợ khác, v.v., mà chúng có thể được sử dụng phối hợp với chất hòa tan thích hợp như alcohol (ví dụ, etanol), polyalcol (ví dụ, propylen glycol, polyetylen glycol), chất hoạt động bề mặt không ion [ví dụ, polysorbat 80, HCO-50 (sản phẩm cộng polyoxyetylen (50 mol) của dầu thầu dầu được hydro hoá)], v.v.. Làm môi trường dầu, ví dụ, có thể sử dụng dầu vùng, dầu đậu tương, v.v., mà có thể được sử dụng phối hợp với chất hòa tan như

benzyl benzoat, benzyl alcol, v.v. Tốt hơn là, thuốc tiêm điều chế này được đổ đầy vào ống tiêm thích hợp.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được phân phối theo đường dưới da hoặc đường tĩnh mạch, với kim và bơm tiêm tiêu chuẩn. Ngoài ra, đối với phân phối theo đường dưới da, thì thiết bị phân phối dạng ngòi bút có các ứng dụng trong việc phân phối dược phẩm theo sáng chế. Thiết bị phân phối dạng ngòi bút này có thể được tái sử dụng hoặc sử dụng một lần. Thông thường, thiết bị phân phối dạng ngòi bút tái sử dụng có chứa một ống có thể thay thế mà chứa dược phẩm. Khi toàn bộ dược phẩm trong ống nêu trên đã được sử dụng hết và ống trở nên trống rỗng, thì ống rỗng này có thể được bỏ đi và được thay bằng một ống mới có chứa dược phẩm. Sau đó, thiết bị phân phối dạng ngòi bút có thể được tái sử dụng. Trong thiết bị phân phối dạng ngòi bút sử dụng một lần thì không có ống có thể thay thế. Thay vào đó, thiết bị phân phối dạng ngòi bút sử dụng một lần được đổ đầy trước dược phẩm giữ trong ngăn chứa nằm trong thiết bị đó. Khi ngăn chứa không còn dược phẩm nữa, thì toàn bộ thiết bị được bỏ đi.

Nhiều thiết bị phân phối dạng ngòi bút tái sử dụng và thiết bị tiêm tự động có các ứng dụng trong việc phân phối theo đường dưới da dược phẩm theo sáng chế. Các ví dụ bao gồm, nhưng tất nhiên không giới hạn ở, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), ngòi DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Switzerland), ngòi HUMALOG MIX 75/25™, ngòi HUMALOG™, ngòi HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), ngòi BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, và OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany), với nêu tên một số ít thiết bị. Ví dụ về các thiết bị phân phối dạng ngòi bút sử dụng một lần có các ứng dụng trong việc phân phối theo đường dưới da dược phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng tất nhiên không giới hạn ở, ngòi SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) và KWIKPEN™ (Eli Lilly), thiết bị tiêm tự động SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) và ngòi HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), với nêu tên một số ít thiết bị.

Có lợi là, các dược phẩm để sử dụng theo đường uống hoặc sử dụng theo đường ngoài đường tiêu hoá nêu trên được bào chế thành các dạng liều lượng theo liều đơn vị, khớp với liều lượng của các thành phần hoạt tính. Ví dụ, các dạng liều lượng này theo liều đơn vị bao gồm viên nén, viên tròn, viên nang, thuốc tiêm (đựng trong ống tiêm), thuốc đạn, v.v. Lượng kháng thể nêu trên chứa trong mỗi dạng liều lượng thường nằm khoảng từ 5 đến 500mg cho mỗi dạng liều lượng theo liều đơn vị; đặc biệt, ở dạng thuốc tiêm, được ưu tiên là kháng thể nêu trên được chứa với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 100mg và đối với các dạng liều lượng khác nằm khoảng từ 10 đến 250mg.

Sử dụng các kháng thể trong điều trị

Các kháng thể theo sáng chế hữu ích để điều trị, phòng ngừa và/hoặc cải thiện bệnh bất kỳ, rối loạn hoặc tình trạng liên quan đến hoạt tính của $GFR\alpha 3$, hoặc để cải thiện ít nhất là một triệu chứng có liên quan đến bệnh, rối loạn, hoặc tình trạng nêu trên, hoặc để làm thuyên giảm đau có liên quan đến bệnh, rối loạn hoặc tình trạng nêu trên. Ví dụ về các tình trạng, các bệnh, và/hoặc các rối loạn, và/hoặc đau có liên quan đến các tình trạng, các bệnh, hoặc các rối loạn đó, mà có thể được điều trị bằng các kháng thể kháng $GFR\alpha 3$ theo sáng chế bao gồm đau cấp tính, đau mãn tính, đau do bệnh thần kinh, hoặc đau do viêm, viêm khớp, viêm bàng quang kẽ, viêm tụy, đau nửa đầu, đau đầu theo cụm, đau dây thần kinh sinh ba, đau thần kinh do ecpet, đau thần kinh toàn thân, động kinh hoặc các tình trạng động kinh, tăng trương lực cơ, loạn nhịp, các rối loạn vận động, các rối loạn thần kinh-nội tiết, mất điều vận, hội chứng ruột bị kích ứng, hội chứng viêm ruột, ỉa đùn, đái dầm, quá mẫn trực tràng, đau nội tạng, đau do thoái hóa khớp, bệnh gut, đau thần kinh sau ecpet, bệnh thần kinh đái tháo đường, đau rễ dây thần kinh, đau dây thần kinh tọa, đau lưng, đau đầu hoặc cổ, đau do đứt gãy, đau sau phẫu thuật, đau do ung thư, bao gồm đau có liên quan đến ung thư xương hoặc ung thư tụy.

Các tình trạng khác có thể điều trị bằng các phương pháp điều trị theo sáng chế được mô tả trong bản mô tả này bao gồm chứng đỏ đau đầu chi di truyền, viêm mũi, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú, ung thư xương, ung thư cổ tử cung hoặc các rối loạn ở bàng quang. Các kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng cũng có thể được sử dụng để điều trị các tình trạng sau: đau cấp hoặc mãn

không ác tính hoặc đau do gãy xương; viêm khớp dạng thấp, thắt hẹp cột sống; đau do bệnh thần kinh phần dưới lưng; hội chứng đau cơ-mạch; đau xơ cơ; đau khớp thái dương-hàm dưới; đau nội tạng, bao gồm đau bụng; đau tụy; đau đầu mãn tính; đau đầu do căng thẳng, bao gồm đau đầu theo cụm; bệnh thần kinh đái tháo đường; bệnh thần kinh có liên quan đến HIV; bệnh thần kinh răng Charcot-Marie; bệnh thần kinh cảm giác di truyền; tổn thương thần kinh ngoại biên; u thần kinh đau; tình trạng phóng luồng thần kinh gần và xa lạc chỗ; bệnh rã thần kinh; đau do bệnh thần kinh gây ra bởi liệu pháp hoá học; đau do bệnh thần kinh gây ra bởi liệu pháp phóng xạ; đau sau phẫu thuật cắt bỏ vú; đau vùng trung tâm; đau do tổn thương tuỷ sống; đau sau đột quỵ; đau vùng đồi; hội chứng đau phức tạp ở một vùng (CRPS), đau ảo tưởng; đau nan y; đau hệ cơ-xương; đau khớp; đau trong bệnh gút; đau cơ lực phần dưới lưng; đau cổ; viêm gân; đau do tổn thương hoặc do luyện tập; đau bụng; viêm thận-bể thận; viêm ruột thừa; viêm túi mật, tắc ruột; thoát vị, v.v.; đau vùng ngực, bao gồm đau tim; đau vùng chậu; đau do sỏi thận, đau sản khoa cấp tính bao gồm đau đẻ; đau do mổ đẻ; đau do bỏng và chấn thương; lạc nội mạc tử cung; đau do bệnh zona; thiếu máu hồng cầu hình liềm; viêm tụy cấp; đau do đứt gãy; đau vùng miệng-mặt bao gồm đau do viêm xoang, đau răng; đau do xơ cứng rải rác; đau do bệnh phong; đau do bệnh Behcet; bệnh phi đau; đau do viêm tĩnh mạch; đau trong hội chứng Guillain-Barre; chân và ngón chân cử động đau; hội chứng Haglund; đau trong bệnh Fabry; bệnh bàng quang và tiết niệu-sinh dục; bàng quang tăng hoạt động.

Theo một phương án, các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị hội chứng đau cơ năng, trong đó hội chứng đau cơ năng được chọn từ nhóm gồm có đau phần dưới lưng mãn tính, hội chứng ruột bị kích ứng (IBS- irritable bowel syndrome), đau xơ cơ (FM- fibromyalgia), hội chứng mỏi mãn tính (CFS- chronic fatigue syndrome), đau bụng, rối loạn khớp thái dương-hàm dưới (TMJD- temporomandibular joint disorder), hội chứng bàng quang đau (bệnh viêm bàng quang kẽ), các rối loạn/hội chứng cơ năng ruột-dạ dày, hội chứng đau ngực cơ năng, đau nửa đầu và đau đầu kiểu căng thẳng, hội chứng đau vùng chậu mãn tính, hội chứng tuyến tiền liệt đau (bệnh viêm tuyến tiền liệt mãn tính), hội chứng đa mẫn cảm với hoá chất và hội chứng chiến tranh vùng Vịnh.

Các kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của nó cũng

có thể được sử dụng để ức chế sự tăng trưởng hoặc tăng sinh tế bào khối u, hoặc ức chế di căn của các tế bào khối u. Do đó, theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng có thể được sử dụng để điều trị ung thư, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ung thư nội mạc tử cung, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú, ung thư cổ tử cung, ung thư gan, ung thư tụy, ung thư đại tràng, ung thư dạ dày, ung thư tử cung, ung thư buồng trứng, ung thư thận, ung thư phổi tế bào không nhỏ, ung thư não, bệnh bạch cầu, u lympho, ung thư xương hoặc đau có liên quan đến di căn ung thư, ví dụ như di căn của ung thư vào xương. (xem các tài liệu Tang, J-Z, *et al.* Mol Cancer Ther (2010), 9(6): 1697-1708; Kang, J. *et al.* Oncogene, (2009), 28:2034-2045; Ceyhan, G.O. *et al.* Annals of Surgery, (2006), 244(2):274-281; Banerjee, A., *et al.* Breast Cancer Res (2011), 13:R112; Pandey, V. *et al.*, Endocrinology, (2010), 151(3):909-920; Kang, J. *et al.*, Oncogene, (2010), 29:3228-3240; Li, S. *et al.* J Biomed Sci (2011), 18:24).

Các kháng thể theo sáng chế cũng hữu ích để điều trị hoặc phòng ngừa đau có liên quan đến ung thư. "Đau có liên quan đến ung thư" bao gồm, ví dụ, đau do ung thư xương, gồm cả đau do ung thư đã di căn đến xương (ví dụ, ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư phổi, xacôm, ung thư thận, đa u tủy, v.v.). "Đau có liên quan đến ung thư" cũng bao gồm đau có liên quan phổ biến hơn với các tình trạng ung thư, ví dụ như ung thư biểu mô tế bào thận, ung thư biểu mô tụy, ung thư vú, ung thư vùng đầu và cổ, ung thư tuyến tiền liệt, các u thần kinh đệm ác tính, xacôm xương, ung thư đại-trực tràng, ung thư dạ dày, u trung biểu mô ác tính, đa u tủy, ung thư buồng trứng, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư phổi tế bào không nhỏ, xacôm màng hoạt dịch, ung thư tuyến giáp hoặc u hắc sắc tố. Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa đau gây ra bởi hoặc có liên quan đến liệu pháp chữa ung thư hoặc việc điều trị nội khoa ung thư, ví dụ, đau do bệnh thần kinh gây ra bởi liệu pháp hoá học, như đau gây ra bởi hoặc có liên quan đến việc điều trị bằng paclitaxel (Taxol™), docetaxel (Taxotere®); nitroso-ure, cyclophosphamid, doxorubicin, epirubicin, 5-fluorouracil, topotecan, irinotecan, carmustin, estramustin và các hợp chất hoá trị liệu trên cơ sở platin, như cisplatin, carboplatin, và iproplatin.

Các liệu pháp phối hợp

Các liệu pháp phối hợp có thể bao gồm một kháng thể kháng hGFR α 3 theo

sáng chế và, ví dụ, một chất đối kháng $GFR\alpha3$ khác (ví dụ, kháng thể kháng $GFR\alpha3$ hoặc chất ức chế phân tử nhỏ của $GFR\alpha3$); chất ức chế COX-2; chất gây tê tại chỗ; chất điều biến NMDA; chất chủ vận thụ thể canabinoit; chất điều biến họ P2X; chất đối kháng VR1; chất đối kháng chất P; chất ức chế kênh natri cổng điện áp (Nav), ví dụ như chất đối kháng $Nav1.7$ hoặc chất đối kháng $Nav1.8$ (ví dụ, kháng thể kháng $Nav1.7$ hoặc kháng thể kháng $Nav1.8$, hoặc chất ức chế phân tử nhỏ), chất đối kháng $Nav1.9$ (ví dụ, kháng thể kháng $Nav1.9$ hoặc chất ức chế phân tử nhỏ đối với $Nav1.9$); chất ức chế kênh canxi; chất ức chế kênh kali; chất ức chế xytokin hoặc chất đối kháng thụ thể xytokin (ví dụ, chất ức chế interleukin-1 (IL-1) (như rilonacept (“IL-1 trap”; Regeneron) hoặc anakinra (KINERET®, Amgen), chất đối kháng IL-1 phân tử nhỏ, hoặc kháng thể kháng IL-1); chất ức chế IL-18 (như chất đối kháng IL-18 phân tử nhỏ hoặc kháng thể kháng IL-18); chất ức chế IL-6 hoặc IL-6R (như chất đối kháng IL-6 phân tử nhỏ, kháng thể kháng IL-6 hoặc kháng thể kháng thụ thể IL-6); thuốc chống động kinh/chống co giật (ví dụ, gabapentin, pregabalin); chất ức chế thành phần tăng trưởng thần kinh (NGF) (ví dụ, chất đối kháng NGF phân tử nhỏ hoặc kháng thể kháng NGF); chất ức chế BDNF, TrkA, TrkB hoặc p75; opioit; mocphin; coxixin liều thấp; aspirin hoặc NSAID khác; các steroid (ví dụ, prednison, metotrexat, v.v.); cyclosporin A liều thấp; chất ức chế tái hấp thu serotonin chọn lọc (SSRI-selective serotonin reuptake inhibitor); chất ức chế tái hấp thu serotonin norepinephrin (SNRI-serotonin norepinephrine reuptake inhibitor); hợp chất ba vòng; chất ức chế thành phần hoại tử khối u (TNF- tumor necrosis factor) hoặc chất ức chế thụ thể TNF (ví dụ, chất đối kháng TNF hoặc TNFR phân tử nhỏ, hoặc kháng thể kháng TNF hoặc kháng TNFR); chất ức chế TWEAK (TWEAK - chất kích thích YẾU sự chết theo chương trình có liên quan đến TNF); chất ức chế RET; chất ức chế phối tử họ GDNF; chất ức chế $GFR\alpha1$, $GFR\alpha2$ hoặc $GFR\alpha4$; chất ức chế kênh ion mẫn cảm với axit (ví dụ, ASIC1 hoặc ASIC3; các chất ức chế tổng hợp axit uric (ví dụ, alopurinol); các chất thúc đẩy sự bài xuất axit uric (ví dụ, probenexin, sulfinpyrazon, benzbromaron, v.v.); chất ức chế thụ thể prekinetixin (PROK1 và PROK2); các chất ức chế viêm khác (ví dụ, các chất ức chế caspaza-1, p38, IKK1/2, CTLA-4Ig, v.v.); và/hoặc các corticosteroid.

Các chế độ sử dụng thuốc

Nhiều liều lượng của kháng thể kháng GFR α 3 có thể được sử dụng cho một đối tượng trong một khoảng thời gian xác định. Các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này bao gồm việc sử dụng tuần tự cho một đối tượng nhiều liều lượng của kháng thể kháng GFR α 3. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "việc sử dụng tuần tự" có nghĩa là mỗi liều lượng của kháng thể kháng GFR α 3 được sử dụng cho đối tượng ở thời điểm khác nhau, ví dụ, vào các ngày khác nhau cách nhau một khoảng thời gian định trước (ví dụ, vài giờ, vài ngày, vài tuần hoặc vài tháng). Sáng chế bao hàm các phương pháp gồm việc sử dụng tuần tự cho bệnh nhân liều lượng ban đầu duy nhất của kháng thể kháng GFR α 3, tiếp sau là một hoặc nhiều liều thứ hai của kháng thể kháng GFR α 3, và tùy ý, tiếp theo là một hoặc nhiều liều lượng thứ ba của kháng thể kháng GFR α 3.

Các thuật ngữ "liều lượng ban đầu", "các liều lượng thứ hai", và "các liều lượng thứ ba" chỉ trình tự theo thời gian của việc sử dụng kháng thể kháng GFR α 3. Do đó, "liều lượng ban đầu" là liều lượng được sử dụng lúc bắt đầu chế độ điều trị (còn được gọi là "liều đường cơ sở"); "các liều lượng thứ hai" là các liều lượng được sử dụng sau liều lượng ban đầu; và "các liều lượng thứ ba" là các liều lượng được sử dụng sau các liều lượng thứ hai. Tất cả liều lượng ban đầu, các liều lượng thứ hai, và các liều lượng thứ ba đều có thể chứa cùng một lượng kháng thể kháng GFR α 3, nhưng thường có thể khác nhau về tần suất sử dụng. Tuy nhiên, theo một số phương án, lượng kháng thể kháng GFR α 3 chứa trong liều lượng ban đầu, liều lượng thứ hai và/hoặc liều lượng thứ ba khác nhau (ví dụ, được điều chỉnh tăng lên hoặc giảm xuống cho thích hợp) trong liệu trình. Theo một số phương án, hai hoặc hơn hai (ví dụ, 2, 3, 4 hoặc 5) liều lượng được sử dụng lúc bắt đầu chế độ điều trị như "các liều lượng tải nạp", rồi đến các liều lượng tiếp theo được sử dụng trên cơ sở tần suất nhỏ hơn (ví dụ, "các liều lượng duy trì").

Ví dụ, mỗi liều lượng thứ hai và/hoặc thứ ba được sử dụng sau liều ngay trước đó từ 1 đến 26 (ví dụ, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, 26½, hoặc

hơn) tuần. Cụm từ "liều ngay trước đó", như được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa là liều kháng thể kháng GFR α 3 được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân liền ngay trước khi sử dụng liều tiếp theo trong chuỗi tiếp nối liên tục nhiều lần sử dụng, không có các liều xen kẽ.

Các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân số lượng liều lượng thứ hai và/hoặc liều lượng thứ ba bất kỳ của kháng thể kháng GFR α 3. Ví dụ, theo một số phương án, chỉ có một liều lượng thứ hai duy nhất được sử dụng cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn) liều lượng thứ hai được sử dụng cho bệnh nhân. Tương tự, theo một số phương án, chỉ có một liều lượng thứ ba duy nhất được sử dụng cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều hơn (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn liều lượng thứ ba được sử dụng cho bệnh nhân.

Theo các phương án về nhiều liều lượng thứ hai, thì mỗi liều lượng thứ hai có thể được sử dụng với cùng tần suất như các liều lượng thứ hai khác. Ví dụ, mỗi liều lượng thứ hai có thể được sử dụng cho bệnh nhân từ 1 đến 2 tuần sau liều ngay trước đó. Tương tự, theo các phương án về nhiều liều lượng thứ ba, thì mỗi liều lượng thứ ba có thể được sử dụng với cùng tần suất như các liều lượng thứ ba khác. Ví dụ, mỗi liều lượng thứ ba có thể được sử dụng cho bệnh nhân từ 2 đến 4 tuần sau liều ngay trước đó. Theo cách khác, tần suất sử dụng các liều lượng thứ hai và/hoặc các liều lượng thứ ba cho bệnh nhân có thể thay đổi trong quá trình điều trị. Tần suất sử dụng cũng có thể được điều chỉnh trong quá trình điều trị bởi bác sĩ, tùy thuộc vào nhu cầu đối với từng cá thể bệnh nhân.

Sử dụng các kháng thể trong chẩn đoán

Các kháng thể kháng GFR α 3 theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để phát hiện và/hoặc đo GFR α 3 trong một mẫu, ví dụ cho mục đích chẩn đoán. Ví dụ, kháng thể kháng GFR α 3 hoặc mảnh của nó có thể được sử dụng để chẩn đoán tình trạng hoặc bệnh đặc trưng ở sự biểu hiện dị thường (ví dụ, sự biểu hiện quá mức, sự biểu hiện dưới mức, sự không biểu hiện, v.v.) của GFR α 3. Các thử nghiệm chẩn đoán làm ví dụ đối với GFR α 3 có thể bao gồm, ví dụ, cho mẫu nghiên cứu lấy từ bệnh nhân tiếp xúc với kháng thể kháng GFR α 3 theo sáng chế, trong đó kháng thể kháng GFR α 3 được

đánh dấu bằng nhãn ghi dấu có thể phát hiện hoặc bằng phân tử thông báo. Theo cách khác, kháng thể kháng GFR α 3 không đánh dấu có thể được sử dụng trong các ứng dụng chẩn đoán phối hợp với kháng thể thứ hai mà bản thân kháng thể này được đánh dấu theo kiểu có thể phát hiện. Nhãn ghi dấu có thể phát hiện hoặc phân tử thông báo có thể là một đồng vị phóng xạ, như ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S hoặc ^{125}I ; gốc phát huỳnh quang hoặc phát quang hoá học như fluorescein isothiocyanat, hoặc rodamin; hoặc enzym như phosphatase kiềm, β -galactosidase, peroxidase củ cải ngựa hoặc luxiferase. Các thử nghiệm làm ví dụ cụ thể có thể được sử dụng để phát hiện hoặc đo GFR α 3 trong mẫu bao gồm thử nghiệm chất hấp phụ miễn dịch gắn enzym (ELISA-enzymelinked immunosorbent assay), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA- radioimmunoassay), và phép tuyển tế bào hoạt hoá huỳnh quang (FACS-fluorescence-activated cell sorting).

Các mẫu có thể được sử dụng trong xét nghiệm chẩn đoán GFR α 3 theo sáng chế bao gồm mẫu mô hoặc mẫu dịch lỏng bất kỳ lấy từ bệnh nhân, chứa lượng có thể phát hiện được của protein GFR α 3, hoặc mảnh của nó, ở tình trạng bình thường hoặc tình trạng bệnh lý. Thông thường, các mức GFR α 3 trong một mẫu cụ thể lấy từ đối tượng nghiên cứu khoẻ mạnh (ví dụ, người không mắc tình trạng hoặc bệnh có liên quan đến các mức hoặc hoạt tính bất thường của GFR α 3) sẽ được đo để trước hết thiết lập đường cơ sở, hoặc tiêu chuẩn, mức của GFR α 3. Sau đó, mức đường cơ sở của GFR α 3 này có thể được so sánh với các mức GFR α 3 đo được trong mẫu lấy từ các cá thể bị nghi là mắc tình trạng hoặc bệnh có liên quan đến GFR α 3, hoặc bị đau có có liên quan đến tình trạng hoặc bệnh đó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các nỗ lực được thực hiện để đảm bảo độ chính xác của các số được sử dụng (ví dụ, các lượng, nhiệt độ, v.v.), nhưng một số sai số thực nghiệm và độ lệch cần được tính đến. Trừ khi có sự chỉ dẫn khác đi, thì phần là phần tính theo trọng lượng, phân tử lượng là phân tử lượng trung bình, nhiệt độ là nhiệt độ tính bằng độ bách phân, và áp suất là áp suất khí quyển hoặc gần với áp suất khí quyển.

Ví dụ 1: Tạo các kháng thể người kháng GFR α 3 của người

Chất sinh miễn dịch bao gồm peptit bất kỳ trong các peptit GFR α 3 có các trình tự axit amin được thể hiện như các SEQ ID NO: 370, 371, 372 và 373, hoặc các mảnh

của chúng, có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể kháng GFR α 3 của người. Các peptit này được liên hợp vào một chất mang, ví dụ như KLH, sau đó được sử dụng cùng với một tá chất để kích thích đáp ứng miễn dịch cho chuột nhắt VELOCIMMUNE[®] chứa ADN mã hoá các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kappa trong globulin miễn dịch của người. Đáp ứng miễn dịch tạo kháng thể được theo dõi bằng thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu với GFR α 3. Khi đạt được đáp ứng miễn dịch mong muốn thì thu lấy các bạch cầu nội biểu bì và cho dung hợp với các tế bào khối u tuỷ của chuột nhắt để bảo toàn khả năng sống của chúng và tạo ra các dòng tế bào lai. Các dòng tế bào lai này được sàng lọc và lựa chọn để xác định các dòng tế bào sản xuất các kháng thể đặc hiệu với GFR α 3. Nhờ sử dụng kỹ thuật này, đã thu được một số kháng thể kháng GFR α 3 (tức là, các kháng thể chứa các miền biến đổi của người và các miền hằng định của chuột nhắt). Các kháng thể kháng GFR α 3 được tạo ra bằng phương pháp này được ký hiệu là H1M2207N, H1M2212N, H1M2236N, H1M2236N3, H1M2243N, H1M2243N2, H1M2210N và H1M2234N.

Các kháng thể kháng GFR α 3 đó cũng được phân lập trực tiếp từ các tế bào B dương tính với kháng nguyên mà không cho dung hợp với các tế bào khối u tuỷ, như được mô tả trong tài liệu U.S. 2007/0280945A1. Nhờ sử dụng phương pháp này, đã thu được một số kháng thể kháng GFR α 3 của người hoàn toàn (tức là, các kháng thể chứa các miền biến đổi của người và các miền hằng định của người); các kháng thể làm ví dụ được tạo ra theo cách này được ký hiệu như sau: H4H2207N, H4H2212N, H4H2236N, H4H2243N, H4H2210N, H4H2234N, H4H2291S, H4H2292S, H4H2293P, H4H2294S, H4H2295S, H4H2296S, H4H2341S, H4H2342P, H4H2344S, H4H2345S, H4H2346S, H4H2350P, H4H2352S, H4H2354S, H4H2355S, H4H2357S và H4H2364S.

Các tính chất sinh học của các kháng thể kháng GFR α 3 làm ví dụ được tạo ra theo các phương pháp trong ví dụ này, sẽ được mô tả chi tiết trong các ví dụ dưới đây.

Ví dụ 2: Các trình tự axit amin vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

Bảng 1 trình bày các cặp trình tự axit amin vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong các kháng thể kháng GFR α 3 được chọn và các số định danh kháng thể tương ứng của chúng. Trong bản mô tả này, các kháng thể thường được đề cập theo

danh pháp sau: phần tiền tố Fc (ví dụ, “H4H”, “H1M”, “H2M”), sau đó là số định danh (ví dụ, “2207” như được trình bày ở Bảng 1), tiếp sau là các phần hậu tố “P”, “S”, hoặc “N”. Do đó, theo danh pháp này, thì kháng thể có thể được đề cập dưới dạng “H4H2207N”. Các tiền tố H4H, H1M, và H2M ở các ký hiệu kháng thể sử dụng trong bản mô tả này chỉ vùng Fc cụ thể của kháng thể. Ví dụ, kháng thể “H2M” có IgG2 Fc của chuột nhắt, còn kháng thể “H4H” có IgG4 Fc của người. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ đánh giá rằng, kháng thể H1M hoặc H2M có thể được chuyển thành kháng thể H4H và ngược lại, nhưng bất luận thế nào, các miền biến đổi (bao gồm các CDR), mà được chỉ ra bằng các số định danh được trình bày trong Bảng 1, vẫn sẽ không thay đổi. Các kháng thể có cùng ký hiệu kháng thể bằng số, nhưng khác nhau phần hậu tố bằng chữ N, B, S hoặc P chỉ các kháng thể chứa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có các trình tự CDR tương đồng, nhưng có sự khác nhau về trình tự ở các vùng nằm bên ngoài các trình tự CDR (tức là, trong các vùng khung). Do đó, các biến thể phân biệt bằng các chữ N, B, S và P của một kháng thể cụ thể có các trình tự CDR tương đồng trong các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của chúng, nhưng khác nhau trong các vùng khung của chúng.

Bảng 1:

Ký hiệu kháng thể	Các SEQ ID NO AXIT AMIN:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H2207N	2	4	6	8	10	12	14	16
H4H2212N	18	20	22	24	26	28	30	32
H4H2236N3	34	36	38	40	42	44	46	48
H4H2243N2	50	52	54	56	58	60	62	64
H4H2210N	66	68	70	72	74	76	78	80
H4H2234N	82	84	86	88	90	92	94	96
H4H2291S	98	100	102	104	106	108	110	112
H4H2292S	114	116	118	120	122	124	126	128

H4H2293P	130	132	134	136	138	140	142	144
H4H2294S	146	148	150	152	154	156	158	160
H4H2295S	162	164	166	168	170	172	174	176
H4H2296S	178	180	182	184	186	188	190	192
H4H2341S	194	196	198	200	202	204	206	208
H4H2342P	210	212	214	216	218	220	222	224
H4H2344S	226	228	230	232	234	236	238	240
H4H2345S	242	244	246	248	250	252	254	256
H4H2346S	258	260	262	264	266	268	270	272
H4H2350P	274	276	278	280	282	284	286	288
H4H2352S	290	292	294	296	298	300	302	304
H4H2354S	306	308	310	312	314	316	318	320
H4H2355S	322	324	326	328	330	332	334	336
H4H2357S	338	340	342	344	346	348	350	352
H4H2364S	354	356	358	360	362	364	366	368
H1M2243N	381	383	385	387	389	391	393	395
H1M2236N	397	399	401	403	405	407	409	411

Ví dụ 2: Phân tích việc sử dụng gen biến đổi

Để phân tích cấu trúc của các kháng thể được sản xuất, các axit nucleic mã hoá các vùng biến đổi của kháng thể đã được tách dòng và xác định trình tự. Từ trình tự axit nucleic và trình tự axit amin được dự đoán của các kháng thể, cách sử dụng gen được xác định cho mỗi vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR-Heavy Chain Variable Region) và mỗi vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR-Light Chain Variable Region). Bảng 2 trình bày cách sử dụng gen đối với các kháng thể được chọn lọc theo sáng chế.

Bảng 2:

Ký hiệu kháng thể	HCVR			LCVR	
	V _H	D _H	J _H	V _K	J _K
H1M2207N	3-9	6-6	4	1-5	2
H1M2212N	3-23	1-26	4	4-1	1
H1M2236N	3-23	3-3	6	1-16	4
H4H2236N3	3-23	3-3	6	1-16	4
H1M2243N	1-18	6-6	6	1-16	3
H4H2243N2	1-18	6-6	6	1-16	3
H2M2210N	3-23	1-20	3	3-20	4
H2M2234N	3-23	5-18	4	4-1	1
H4H2291S	3-23	6-6	6	1D-12	4
H4H2292S	3-33	1-7	3	1-39	3
H4H2293P	3-33	2-15	3	1-39	2
H4H2294S	3-23	6-6	6	1D-12	3
H4H2295S	3-23	6-6	6	1D-12	3
H4H2296S	3-23	6-6	6	1D-12	3
H4H2341S	1-69	3-10	5	1-39	5
H4H2342P	3-23	1-26	4	1-27	3
H4H2344S	3-33	2-15	3	1-39	2
H4H2345S	3-9	1-26	4	1-27	4
H4H2346S	3-33	2-15	3	1-39	2
H4H2350P	4-59	2-21	4	1-9	1
H4H2352S	1-18	3-3	3	3-20	2
H4H2354S	3-33	2-15	3	1-39	2

H4H2355S	3-23	6-6	4	1-5	4
H4H2357S	3-23	3-10	6	1-12	4
H4H2364S	3-23	6-6	6	1D-12	3

Ví dụ 3: Ải lực liên kết của các kháng thể GFR α 3

Các hằng số tốc độ kết hợp liên kết và phân ly liên kết (k_a và k_d , tương ứng), và các hằng số cân bằng phân ly tính toán được và các thời gian bán tồn phân ly (K_D và $t_{1/2}$, tương ứng) đối với sự liên kết kháng nguyên vào các kháng thể kháng GFR α 3 đã được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt thời gian thực (Biacore T200) ở nhiệt độ 25°C và 37°C. Các kháng thể đã được thử nghiệm cho liên kết với GFR α 3 của người được biểu hiện với đầu myc-myc-hexahistidin tận cùng C (hGFR α 3-mmh; SEQ ID: 370), đầu hFc tận cùng C (hGFR α 3-hFc; SEQ ID:371), hoặc đầu mFc tận cùng C (hGFR α 3-mFc; SEQ ID:372), cũng như cho liên kết với GFR α 3 khỉ được biểu hiện với đầu myc-myc-hexahistidin tận cùng C (MfGFR α 3-mmh; SEQ ID:373). Các kháng thể kháng GFR α 3 đã được bắt bằng cách cho gắn lên bề mặt kháng thể đa dòng kháng IgG chuột nhắt ở dê (GE Healthcare, # BR-1008-38) hoặc kháng thể đơn dòng kháng IgG người ở chuột nhắt (GE Healthcare, #BR-1008-39) được tạo ra thông qua việc ghép đôi amin trực tiếp với chip cảm biến Biacore CM5. Các thử nghiệm động học được tiến hành bằng cách sử dụng HBS-EP (HEPES 10mM, NaCl 150mM, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,05%, ở pH 7,4) hoặc dung dịch đệm PBS chứa 0,05% thể tích/thể tích chất hoạt động bề mặt P20, vừa để làm dung dịch đệm chạy và vừa để làm dung dịch đệm cho mẫu. Sự liên kết vào GFR α 3-mmh người hoặc GFR α 3-mmh khỉ được đánh giá bằng cách tiêm vài nồng độ, nằm trong khoảng từ 200 đến 7,4nM (các dung dịch pha loãng theo cấp 3 lần), xuyên qua bề mặt kháng thể bị bắt. Sự liên kết vào GFR α 3-mFc người hoặc GFR α 3-hFc người đã được đánh giá bằng cách cách tiêm các dung dịch có vài nồng độ, trong khoảng từ 100 đến 3,7nM (các dung dịch pha loãng gấp 3 lần) xuyên qua bề mặt kháng thể bị bắt. Sự kết hợp kháng thể-kháng nguyên đã được theo dõi trong khoảng thời gian tới 4 phút, còn sự phân ly trong dung dịch đệm đã được theo dõi trong khoảng thời gian tới 20 phút. Hằng số tốc độ kết hợp động học (k_a) và hằng

số tốc độ phân ly (k_d) được xác định bằng cách xử lý và hiệu chỉnh các dữ liệu cho phù hợp với mô hình liên kết 1:1 bằng cách sử dụng phần mềm hiệu chỉnh đường cong Scrubber 2.0c. Các hằng số cân bằng phân ly liên kết (K_D) và các chu kỳ bán phân ly ($t_{1/2}$) được tính toán từ các hằng số tốc độ động học là: $K_D (M) = k_d/k_a$ và $t_{1/2} (\text{phút}) = [\ln 2 / (60 * k_d)]$.

Như được trình bày trong Bảng 3, ở nhiệt độ 25°C, toàn bộ 25 kháng thể kháng GFR α 3 được liên kết vào hGFR α 3-mmh với các trị số K_D nằm trong khoảng từ 82,0pM đến 29,7nM. Ở nhiệt độ 37°C, toàn bộ 25 kháng thể kháng GFR α 3 được liên kết vào hGFR α 3-mmh với các trị số K_D nằm trong khoảng từ 118pM đến 47,3nM. Như được trình bày ở Bảng 4, ở nhiệt độ 25°C, toàn bộ 23 kháng thể kháng GFR α 3 được liên kết vào MfGFR α 3-mmh với các trị số K_D nằm trong khoảng từ 2,90pM đến 97,2nM. Ở nhiệt độ 37°C, toàn bộ 23 kháng thể kháng GFR α 3 được liên kết vào MfGFR α 3-mmh với các trị số K_D nằm trong khoảng từ 11,7pM đến 145nM. Như được trình bày trong Bảng 5, ở nhiệt độ 25°C và 37°C, 6 trong số 23 kháng thể kháng GFR α 3 được thử nghiệm cho liên kết với hGFR α 3-hFc, trong khi 17 kháng thể khác được thử nghiệm cho liên kết với hGFR α 3-mFc. Ở nhiệt độ 25°C, 6 kháng thể kháng GFR α 3 đã được thử nghiệm cho liên kết với hGFR α 3-hFc, được liên kết với các trị số K_D nằm trong khoảng từ 7,50pM đến 220pM. Ở nhiệt độ 37°C, 6 kháng thể kháng GFR α 3 được thử nghiệm cho liên kết với hGFR α 3-hFc, được liên kết với các trị số K_D nằm trong khoảng từ 41,3pM đến 531pM. Ở nhiệt độ 25°C, 17 kháng thể kháng GFR α 3 đã được thử nghiệm cho liên kết với hGFR α 3-mFc, được liên kết với các trị số K_D nằm trong khoảng từ 0,467pM đến 58,4pM. Ở nhiệt độ 37°C, 17 kháng thể kháng GFR α 3 được thử nghiệm cho liên kết với hGFR α 3-mFc, được liên kết với các trị số K_D nằm trong khoảng từ 13,2pM đến 106pM.

Bảng 3: Động học của liên kết hGFR α 3-mmH với các kháng thể kháng GFR α 3 khác nhau ở nhiệt độ 25°C và 37°C

	25°C				37°C			
Ký hiệu kháng thể	k_a (1/Mgiây)	k_d (1/giây)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)	k_a (1/Mgiây)	k_d (1/giây)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)

H4H2291S	4,18E+05	1,64E-04	3,93E-10	70	5,58E+05	3,23E-04	5,80E-10	36
H4H2292S	1,08E+05	5,19E-05	4,83E-10	223	1,28E+05	2,49E-04	1,94E-09	46
H4H2293P	5,81E+05	1,27E-04	2,19E-10	91	7,81E+05	2,44E-04	3,13E-10	47
H4H2294S	5,63E+05	7,99E-05	1,42E-10	145	7,73E+05	2,61E-04	3,38E-10	44
H4H2295S	4,75E+05	2,56E-04	5,40E-10	45	6,69E+05	1,19E-03	1,77E-09	10
H4H2296S	5,63E+05	1,87E-04	3,32E-10	62	7,65E+05	6,14E-04	8,02E-10	19
H4H2341S	1,59E+05	2,67E-04	1,68E-09	43	2,48E+05	7,37E-04	2,98E-09	16
H4H2342P	1,86E+05	2,04E-04	1,10E-09	57	3,30E+05	6,71E-04	2,03E-09	17
H4H2344S	1,83E+05	2,40E-04	1,31E-09	48	2,80E+05	7,24E-04	2,58E-09	16
H4H2345S	1,09E+05	3,23E-03	2,97E-08	4	1,84E+05	8,70E-03	4,73E-08	1
H4H2346S	1,86E+05	7,99E-05	4,30E-10	145	4,19E+05	5,89E-04	1,41E-09	20
H4H2350P	1,03E+05	2,07E-04	2,01E-09	56	1,34E+05	1,28E-03	9,61E-09	9
H4H2352S	7,09E+05	5,81E-05	8,20E-11	199	1,18E+06	1,39E-04	1,18E-10	83
H4H2354S	2,00E+05	1,10E-04	5,48E-10	105	2,81E+05	6,49E-04	2,31E-09	18
H4H2355S	1,86E+05	1,52E-04	8,21E-10	76	2,81E+05	1,23E-03	4,37E-09	9
H4H2357S	2,30E+05	5,57E-04	2,42E-09	21	2,95E+05	2,10E-03	7,12E-09	6
H4H2364S	3,53E+05	3,67E-05	1,04E-10	315	3,38E+05	2,73E-04	8,09E-10	42
H1M2207N	5,61E+04	9,00E-04	1,60E-08	13	1,33E+05	1,44E-03	1,08E-08	8
H2aM2210N	6,73E+04	8,63E-04	1,28E-08	13	2,12E+05	3,35E-03	1,58E-08	3
H1M2212N	8,00E+05	1,58E-04	1,97E-10	73	1,02E+06	3,03E-04	2,97E-10	38
H2aM2234N	6,57E+05	7,11E-04	1,08E-09	16	7,93E+05	2,72E-03	3,43E-09	4
H1M2236N	7,60E+05	2,08E-04	2,75E-10	56	1,03E+06	5,50E-04	5,32E-10	21
H4H2236N3	9,22E+05	2,33E-04	2,53E-10	50	1,96E+06	7,48E-04	3,82E-10	15
H4H2243N2	2,67E+05	7,80E-04	2,92E-09	15	4,69E+05	2,44E-03	5,20E-09	5
H1M2243N	1,28E+05	2,61E-04	2,04E-09	44	1,37E+05	5,95E-04	4,35E-09	19

Bảng 4: Động học của liên kết MfGFR α 3-mmH với các kháng thể kháng GFR α 3 khác nhau ở nhiệt độ 25°C và 37°C

	25°C				37°C			
Ký hiệu kháng thể	k_a (1/Mgiây)	k_d (1/giây)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)	k_a (1/Mgiây)	k_d (1/giây)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H2291S	1,51E+05	2,79E-04	1,85E-09	41	3,57E+05	6,93E-04	1,94E-09	17
H4H2292S	7,76E+04	1,22E-04	1,57E-09	95	8,95E+04	1,95E-04	2,18E-09	59
H4H2293P	2,90E+05	4,17E-05	1,44E-10	277	4,41E+05	1,58E-04	3,58E-10	73
H4H2294S	3,25E+05	2,04E-04	6,27E-10	57	4,33E+05	9,74E-04	2,25E-09	12
H4H2295S	1,83E+05	9,73E-04	5,32E-09	12	2,76E+05	5,61E-03	2,04E-08	2
H4H2296S	1,93E+05	6,51E-04	3,37E-09	18	2,77E+05	2,85E-03	1,03E-08	4
H4H2341S	9,38E+04	1,30E-04	1,39E-09	89	1,44E+05	5,08E-04	3,53E-09	23
H4H2342P	9,37E+04	5,50E-04	5,87E-09	21	1,50E+05	1,66E-03	1,11E-08	7
H4H2344S	1,04E+05	1,15E-04	1,10E-09	101	1,61E+05	5,75E-04	3,57E-09	20
H4H2345S	9,75E+04	2,79E-03	2,87E-08	4	1,34E+05	3,53E-03	2,63E-08	3
H4H2346S	1,08E+05	5,98E-05	5,56E-10	193	1,53E+05	5,11E-04	3,34E-09	23
H4H2350P	6,47E+04	1,11E-04	1,71E-09	104	7,48E+04	8,96E-04	1,20E-08	13
H4H2352S	3,45E+05	1,00E-06	2,90E-12	11550	5,57E+05	6,53E-05	1,17E-10	177
H4H2354S	1,09E+05	6,23E-05	5,74E-10	185	1,57E+05	4,35E-04	2,78E-09	27
H4H2355S	1,05E+05	6,78E-05	6,49E-10	170	1,73E+05	9,13E-04	5,29E-09	13
H4H2357S	1,40E+05	3,15E-04	2,26E-09	37	1,72E+05	1,35E-03	7,86E-09	9
H4H2364S	1,22E+05	1,30E-04	1,06E-09	89	1,68E+05	8,61E-04	5,14E-09	13
H1M2207N	3,99E+04	3,88E-03	9,72E-08	3	4,58E+04	6,63E-03	1,45E-07	2
H2aM2210N	4,16E+04	1,20E-03	2,89E-08	10	8,09E+04	6,18E-03	7,64E-08	2
H1M2212N	3,84E+05	1,12E-04	2,93E-10	103	8,84E+05	2,60E-04	2,94E-10	44
H2aM2234N	4,27E+05	5,71E-04	1,34E-09	20	4,29E+05	2,11E-03	4,91E-09	5
H1M2236N	2,96E+05	2,86E-04	9,70E-10	40	4,34E+05	1,12E-03	2,58E-09	10
H1M2243N	6,46E+04	6,58E-04	1,02E-08	18	5,02E+04	2,75E-03	5,47E-08	4

Bảng 5: Động học của liên kết hGFR α 3-hFc hoặc hGFR α 3-mFc với các kháng thể kháng GFR α 3 khác nhau ở nhiệt độ 25°C và 37°C

	25°C				37°C			
Ký hiệu kháng thể	k _a (1/Mgiây)	k _d (1/giây)	K _D (M)	t _{1/2} (phút)	k _a (1/Mgiây)	k _d (1/giây)	K _D (M)	t _{1/2} (phút)
H4H2291S	1,03E+06	4,78E-06	4,63E-12	2417	1,33E+06	3,84E-05	2,89E-11	301
H4H2292S	5,34E+05	1,00E-06	1,87E-12	11550	5,96E+05	2,57E-05	4,32E-11	449
H4H2293P	1,22E+06	1,93E-06	1,59E-12	5988	1,71E+06	5,13E-05	2,99E-11	225
H4H2294S	1,22E+06	5,63E-06	4,63E-12	2052	1,66E+06	3,46E-05	2,09E-11	334
H4H2295S	1,08E+06	1,69E-06	1,57E-12	6822	1,62E+06	4,88E-05	3,01E-11	237
H4H2296S	1,24E+06	4,17E-06	3,37E-12	2770	1,61E+06	4,74E-05	2,94E-11	244
H4H2341S	5,96E+05	1,00E-06	1,68E-12	11550	9,61E+05	7,58E-05	7,89E-11	152
H4H2342P	6,61E+05	1,00E-06	1,51E-12	11550	1,21E+06	4,28E-05	3,54E-11	270
H4H2344S	5,79E+05	1,56E-06	2,69E-12	7409	1,01E+06	8,96E-05	8,91E-11	129
H4H2345S	5,16E+05	3,01E-05	5,84E-11	384	7,00E+05	7,44E-05	1,06E-10	155
H4H2346S	6,47E+05	1,44E-05	2,22E-11	803	1,75E+06	1,37E-04	7,81E-11	84
H4H2350P	5,09E+05	2,12E-05	4,16E-11	545	2,56E+06	1,26E-04	4,92E-11	92
H4H2352S	2,14E+06	1,00E-06	4,67E-13	11550	2,28E+06	3,00E-05	1,32E-11	385
H4H2354S	5,80E+05	1,09E-05	1,89E-11	1056	1,02E+06	9,11E-05	8,95E-11	127
H4H2355S	6,11E+05	1,00E-06	1,64E-12	11550	1,10E+06	3,39E-05	3,10E-11	341
H4H2357S	7,79E+05	2,52E-05	3,24E-11	458	1,19E+06	9,40E-05	7,93E-11	123
H4H2364S	7,71E+05	1,00E-06	1,30E-12	11550	1,26E+06	4,14E-05	3,28E-11	279
H1M2207N*	1,59E+05	2,60E-05	1,63E-10	444	2,03E+05	1,08E-04	5,31E-10	107
H2aM2210N*	1,68E+05	3,69E-05	2,20E-10	313	3,16E+05	7,66E-05	2,42E-10	151
H1M2212N*	1,12E+06	1,44E-05	1,28E-11	800	1,49E+06	6,17E-05	4,13E-11	187
H2aM2234N*	9,50E+05	9,60E-05	1,01E-10	120	1,26E+06	1,46E-04	1,16E-10	79
H1M2236N*	1,28E+06	1,76E-05	1,37E-11	658	1,58E+06	9,65E-05	6,10E-11	120
H1M2243N*	1,34E+05	1,00E-06	7,50E-12	11550	1,86E+05	2,18E-05	1,17E-10	529

Ghi chú: * Được thử nghiệm cho liên kết với hGFR α 3-hFc, còn tất cả các kháng thể khác được thử nghiệm cho liên kết với hGFR α 3-mFc

Ví dụ 4: Phong bế sự liên kết GFR α 3 của người với ARTEMIN của người bằng các kháng thể kháng GFR α 3

Khả năng của các kháng thể kháng GFR α 3 phong bế sự liên kết của GFR α 3 người với ARTEMIN của người khi có mặt hoặc không có mặt đồng thụ thể RET của người được xác định bằng cách sử dụng hai dạng thức ELISA phong bế khác nhau.

Ở dạng thức thứ nhất, protein ARTEMIN tái tổ hợp của người có dấu myc-myc-hexahistidin tận cùng C (hARTEMIN-mmH; SEQ ID:369) được phủ với nồng độ 2 μ g/ml lên các đĩa vi chuẩn 96 giếng trong dung dịch đệm PBS để qua đêm ở nhiệt độ 4°C và sau đó được phong bế bằng dung dịch BSA 0,5% (trọng lượng/thể tích). Lượng hằng định GFR α 3 của người được dung hợp với dấu Fc tận cùng C của người (hGFR α 3-hFc; SEQ ID:371) với nồng độ 120pM được trộn sơ bộ với các lượng các kháng thể khác nhau, có nồng độ trong khoảng từ 0 tới ~10nM trong các dung dịch pha loãng theo nhiều cấp, sau đó ủ trong khoảng thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng (RT) để sự liên kết kháng thể-hGFR α 3-hFc đạt đến cân bằng. Sau đó, các dung dịch mẫu đã cân bằng được chuyển lên đĩa đã phủ hARTEMIN-mmH. Sau khoảng thời gian 1 giờ liên kết, thì rửa đĩa; sau đó hGFR α 3-hFc bị liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu kháng IgG Fc người liên hợp với HRP (Jackson Immunochemical, #109-035-098), và các tín hiệu thu được từ phương pháp so màu đã được hiện bằng cách sử dụng cơ chất TMB HRP (BD Biosciences, #51-2606KC và #51-2607KC). Độ hấp thụ được ghi lại ở 450nm trên đầu đọc đĩa Victor X5 (Perkin Elmer) để xác định lượng hGFR α 3-hFc tự do trong các dung dịch hGFR α 3-hFc-kháng thể được cân bằng trước mà có thể liên kết với đĩa đã phủ hARTEMIN-mmH. Các trị số IC₅₀, được định nghĩa là nồng độ kháng thể cần thiết để làm giảm 50% tín hiệu từ nồng độ hằng định của hGFR α 3-hFc, được tính toán từ dữ liệu bằng cách sử dụng phần mềm Prism của GraphPad. Độ hấp thụ đo được với lượng hằng định của hGFR α 3-hFc 120pM khi không có mặt kháng thể kháng GFR α 3 được xác định là phong bế 0%, và độ hấp thụ khi không bổ sung hGFR α 3-hFc được xác định là phong bế 100%. Độ hấp thụ quan sát thấy ở các giếng chứa nồng độ kháng thể cao nhất được sử dụng để tính toán phần trăm phong bế tối đa trình bày trong bảng. Các kết quả được tổng hợp ở Bảng 6.

Ở dạng thức ELISA thứ hai, các đĩa, các và dữ liệu đã được xử lý tương tự như

đối với dạng thức thứ nhất, ngoại trừ việc cả hARTEMIN-mmH và RET của người có dấu 10 histidin tận cùng C (hRET-10His; R&D Systems, # 1168-CR/CF) được phủ đối với thử nghiệm ELISA phong bế. Các đĩa vi chuẩn 96 giếng được phủ hỗn hợp gồm các protein hARTEMIN-mmH 1,2 $\mu\text{g/ml}$ và hRET-10His 6,9 $\mu\text{g/ml}$ trong PBS để qua đêm ở nhiệt độ 4°C và sau đó được phong bế bằng dung dịch BSA 0,5% (trọng lượng/thể tích). Lượng hằng định của GFR α 3 người được biotin hoá có dấu myc-myc-hexahistidin tận cùng C (biotin-hGFR α 3-mmH; SEQ ID:370) ở nồng độ 1nM được trộn sơ bộ với các lượng khác nhau của các kháng thể kháng GFR α 3 có nồng độ trong khoảng từ 0 đến ~100nM trong các dung dịch pha loãng theo nhiều cấp, sau đó ủ trong khoảng thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng RT để sự liên kết kháng thể-biotin-hGFR α 3-mmH đạt đến cân bằng. Sau đó, các mẫu đã cân bằng được chuyển lên các đĩa đã phủ. Sau khoảng thời gian 1 giờ liên kết, thì rửa đĩa, sau đó biotin-hGFR α 3-mmH bị liên kết đã được phát hiện bằng cách sử dụng streptavidin liên hợp với HRP (Pierce, #N200), và các tín hiệu phép so màu đã được hiện bằng cách sử dụng các cơ chất TMB HRP. Các trị số IC₅₀ và sự phong bế tối đa bởi mỗi kháng thể được trình bày ở Bảng 6.

Như được trình bày trong Bảng 6, ở dạng thức ELISA thứ nhất, 9 trong số 23 kháng thể kháng GFR α 3 phong bế 51-94% sự liên kết hGFR α 3-hFc vào hARTEMIN-mmH đã được phủ, với các trị số IC₅₀ nằm trong khoảng từ 43,8pM đến 723pM. Ở dạng thức ELISA thứ nhất, tám trong số 23 kháng thể kháng GFR α 3 đã gây tăng cường tín hiệu liên kết của hGFR α 3-hFc (tức “thành phần tăng cường thành phần tăng cường” nêu trong Bảng 6) ở nhiều nồng độ kháng thể thử nghiệm cao hơn. Sáu trong số 23 kháng thể được thử nghiệm ở dạng thức ELISA thứ nhất không phong bế hoặc làm tăng cường độ tín hiệu liên kết của hGFR α 3-hFc với hARTEMIN-mmH đã được phủ. Như được trình bày trong Bảng 6, đối với dạng thức ELISA thứ hai, 17 trong số 23 kháng thể kháng GFR α 3 phong bế 75-100% sự liên kết của biotin-hGFR α 3-mmH với hARTEMIN-mmH phủ kép và hRET-10His, với các trị số IC₅₀ nằm trong khoảng từ 403pM đến 14,6nM. Cũng ở dạng thức ELISA thứ hai, năm trong số 23 kháng thể kháng GFR α 3 đã gây tăng cường tín hiệu liên kết của biotin-hGFR α 3-mmH ở các nồng độ thấp hơn của kháng thể, nhưng lại phong bế 28-95% sự liên kết của biotin-hGFR α 3-mmH với hARTEMIN-mmH và hRET-10His ở các nồng độ kháng thể 1nM

và lớn hơn (“thành phần tăng cường” nêu trong Bảng 6). Ở dạng thức ELISA thứ hai, một kháng thể kháng GFR α 3 đã gây tăng cường tín hiệu liên kết của biotin-hGFR α 3-mmH (“thành phần tăng cường” nêu trong Bảng 6) ở các nồng độ kháng thể thử nghiệm cao hơn, không có sự phong bế ở nồng độ bất kỳ.

Bảng 6: ELISA phong bế sự liên kết của GFR α 3 của người với ARTEMIN của người đơn lẻ hoặc với ARTEMIN của người và RET của người

	Dạng thức ELISA 1: Ab phong bế sự liên kết của hGFR α 3-hFc 120pM với hARTEMIN-mmH đã được phủ		Dạng thức ELISA 2: Ab phong bế sự liên kết của biotin-hGFR α 3-mmH 1nM với hARTEMIN-mmH đã được phủ và hRET-10His	
Ký hiệu kháng thể	IC ₅₀ (M)	% phong bế tối đa	IC ₅₀ (M)	% phong bế tối đa
H4H2207N	thành phần tăng cường	NB	7,30E-09	85
H4H2210N	thành phần tăng cường	NB	thành phần tăng cường	NB
H4H2212N	4,38E-11	81	4,03E-10	99
H4H2234N	8,29E-11	70	3,42E-09	97
H4H2236N3	thành phần tăng cường	NB	thành phần tăng cường	68
H4H2243N2	thành phần tăng cường	NB	1,12E-09	95
H4H2291S	NB	NB	thành phần tăng cường	28
H4H2292S	7,23E-10	89	1,76E-09	100
H4H2293P	2,60E-10	93	7,38E-09	95

H4H2294S	NB	NB	9,52E-10	95
H4H2295S	thành phần tăng cường	NB	thành phần tăng cường	44
H4H2296S	NB	NB	thành phần tăng cường	91
H4H2341S	thành phần tăng cường	NB	1,62E-09	98
H4H2342P	thành phần tăng cường	NB	1,08E-09	97
H4H2344S	1,33E-10	94	4,59E-10	100
H4H2345S	thành phần tăng cường	NB	1,46E-08	75
H4H2346S	9,78E-11	92	7,971E-10	99
H4H2350P	4,96E-10	93	1,29E-09	91
H4H2352S	6,58E-11	51	7,61E-10	100
H4H2354S	1,16E-10	92	1,32E-09	97
H4H2355S	NB	NB	thành phần tăng cường	95
H4H2357S	NB	NB	3,28E-09	86
H4H2364S	NB	NB	1,45E-09	100
NB = không phong bế				

Ví dụ 5: Đo khả năng của các kháng thể kháng GFR α 3 phong bế sự hoạt hoá GFR α 3 và RET bởi phối tử ARTEMIN *in vitro*

Khả năng của các kháng thể kháng GFR α 3 phong bế sự hoạt hoá GFR α 3 và thụ thể RET bởi phối tử ARTEMIN của nó *in vitro* đã được đo bằng cách sử dụng thực

nghiệm trên cơ sở tế bào. Các tế bào HEK293 được cải biến để biểu hiện ổn định cả GFR α 3 của người (các axit amin 1-400 có số truy cập NP_001487.2) và RET của người (các axit amin 1-1072 có số truy cập NP_065681) được tạo ra và sau đó được tải nạp phần tử thông báo luxiferaza đáp ứng SRE (SRE-luc; Sabiosciences, CCS-010L) (các tế bào HEK293/hGFR α 3/hRET).

Hai mươi nghìn tế bào HEK293/hGFR α 3/hRET/SRE-luc đã được cấy lên các đĩa 96 giếng phủ Poly D-Lysin (Greiner, #35-4620) trong Optimem (GIBCO, #31985) chứa 0,5% FBS (huyết thanh phôi bò) và sau đó được nuôi cấy qua đêm trong CO₂ 5% ở nhiệt độ 37°C. Tiếp sau, các tế bào này được ủ trong khoảng thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng cùng với các dung dịch pha loãng theo nhiều cấp của các kháng thể kháng GFR α 3 có nồng độ nằm trong khoảng từ 5pM đến 300nM. Sau đó, liều hằng định (100pM) của ARTEMIN của người được biểu hiện có dấu myc myc hexahistidin tận cùng C (SEQ ID:369) được bổ sung vào các tế bào nêu trên và ủ thêm 6 giờ nữa. Hoạt tính của luxiferaza được đo bằng các đơn vị ánh sáng tương đối (RLU- relative light unit) trên quang kế Victor (Perkin Elmer) sau khi bổ sung thuốc thử OneGlo (Promega, #E6051). Các trị số EC₅₀ và IC₅₀ được tính toán từ phương trình logit bốn tham số, tương ứng với đường cong đáp ứng 12 điểm, bằng cách sử dụng phần mềm phân tích dữ liệu GraphPad Prism.

Hai mươi ba kháng thể kháng GFR α 3 được thử nghiệm về khả năng của chúng ức chế sự hoạt hoá các tế bào HEK293/hGFR α 3/hRET/SRE-luc phụ thuộc ARTEMIN. Như được trình bày trong Bảng 7, toàn bộ 23 kháng thể thử nghiệm đã phong bế hoạt tính của luxiferaza, với các trị số IC₅₀ nằm trong khoảng từ 0,2nM đến 48,3nM, và 19 trong số 23 kháng thể đã phong bế đến đường cơ sở ở nồng độ 300nM. Bốn trong 23 kháng thể (H4H2344S, H4H2345S, H4H2346S, và H4H2354S-1) không phong bế đến đường cơ sở ở nồng độ kháng thể thử nghiệm bất kỳ.

Bảng 7: Ức chế kích thích phụ thuộc ARTEMIN của các tế bào HEK293/hGFR α 3/hRET/ SRE-luc bởi các kháng thể kháng GFR α 3

Ký hiệu	
kháng thể	IC ₅₀ (nM)

H4H2294S	0,27
H4H2342P	1,0
H4H2212N	0,80
H4H2292S	4,6
H4H2243N2	0,30
H4H2352S	0,92
H4H2207N	2,4
H4H2210N	2,9
H4H2234N	2,3
H4H2236N3	1,5
H4H2291S	1,3
H4H2293P	20
H4H2294S	1,7
H4H2295S	1,5
H4H2296S	1,4
H4H2341S	7,1
H4H2344S	48
H4H2345S	26
H4H2346S	26

H4H2354S	22
H4H2355S	2,3
H4H2357S	4,9
H4H2364S	2,3

Ví dụ 6: Ức chế sự tăng cảm giác đau với nhiệt do capsaixin mẫn cảm với ARTEMIN

Để gây ra sự tăng cảm giác đau với nhiệt mẫn cảm với ARTEMIN ở chuột nhắt, mỗi con chuột nhắt được điều trị sơ bộ bằng cách tiêm vào bàn chân 0,5 microgam ARTEMIN tái tổ hợp chuột nhắt (R&D Systems, #1085-AR) 24 giờ trước khi tiêm vào bàn chân 0,5 microgam capsaixin (liều dưới tối ưu) từ dung dịch 100mM trong DMSO (Sigma-Aldrich, #M-2028). Sự tăng cảm giác đau với nhiệt được đánh giá bằng thử nghiệm Hargreaves; trong đó một chùm ánh sáng được chiếu rọi trực tiếp vào chân đã tiêm cho tới khi con vật rút chân lại. Thời gian chờ tới khi rút chân được ghi lại làm số đo hành vi cảm thụ đau. Trên cơ sở thời gian chờ tới khi rút chân giảm một cách đáng kể, nên rút ra rằng, sự tăng cảm giác đau với nhiệt luôn luôn mẫn cảm với ARTEMIN sau khi tiêm capsaixin được 3 ngày. Đối với các nghiên cứu này, trị số đường cơ sở về thời gian chờ tới khi rút chân đã được đo trước khi dùng liều lượng ARTEMIN hoặc capsaixin; sau đó ba ngày sau khi tiêm capsaixin thì đo lần thứ hai. Nhà thử nghiệm tiến hành các xét nghiệm này không được cho biết rõ về nhóm con vật được điều trị.

Đối với tất cả các thử nghiệm đánh giá hiệu lực của các kháng thể kháng $GFR\alpha 3$ của người trong trường hợp tăng cảm giác đau mẫn cảm với ARTEMIN, đã sử dụng đồng hợp tử chuột nhắt trưởng thành để biểu hiện $GFR\alpha 3$ của người thay cho $GFR\alpha 3$ của chuột nhắt (“ $GFR\alpha 3$ nhân hoá”). Cả chuột nhắt đực và cái đều được sử dụng trong mỗi thử nghiệm, với giới tính đã được cân đối cho tất cả các nhóm điều trị (tổng số có 8 con chuột trong mỗi nhóm điều trị hoặc trong nhóm đối chứng). Các chuột nhắt có $GFR\alpha 3$ nhân hoá đã được xác định từ trước là có các đáp ứng thời gian

chờ cho tới tăng cảm giác đau với nhiệt do capsaixin mẫn cảm với ARTEMIN, tương tự như các đáp ứng được quan sát thấy ở các chuột nhất kiểu hoang dại.

Sáu kháng thể kháng GFR α 3 (H4H2212N, H4H2243N2, H4H2292S, H4H2294S, H4H2342P, và H4H2352S-1) được thử nghiệm trên mô hình này. Tất cả các kháng thể được pha loãng bằng dung dịch muối đệm phosphat (PBS- phosphate-buffered saline) và được dùng dưới da ở 25 mg/kg theo tỷ lệ thể tích trên thể trọng là 1ml/100g trong khoảng thời gian 24 giờ trước khi tiêm ARTEMIN vào chân sau. Trong mỗi thử nghiệm, một nhóm chuột được tiêm kháng thể đối chứng kiểu tương đương.

Độ nhạy cảm đau đối với mỗi nhóm điều trị hoặc nhóm đối chứng đã được xác định bằng tỷ lệ phần trăm của thời gian chờ cơ sở tính cho tới khi rút chân (%BWL), được tính bằng sự thay đổi cấp phân số đối với thời gian chờ cho tới khi rút chân (WL) theo thời gian của mỗi con vật sau khi tiêm capsaixin được ba ngày, so với thời gian chờ cơ sở tính cho tới khi rút chân của chúng không tiêm capsaixin:

$$\%BWL = [WL_{(capsaixin)} - WL_{(không\ capsaixin)} / WL_{(không\ capsaixin)}] \times 100$$

Khi sử dụng %BWL, các trị số âm càng lớn cho thấy sự tăng cảm giác đau với nhiệt càng mạnh.

Bảng 8 trình bày các trị số trung bình nhóm (in đậm) và sai số tiêu chuẩn của trị số trung bình (in nghiêng) đối với tỷ lệ phần trăm trong thời gian chờ cơ sở tính cho tới lúc rút chân (%BWL) theo mô hình tăng cảm giác đau với nhiệt do capsaixin mẫn cảm với ARTEMIN, được đánh giá sau khi tiêm capsaixin được ba ngày.

Như được trình bày trong Bảng 8, các chuột nhất được tiêm kháng thể kháng hGFR α 3 có biểu hiện tăng %BWL (các trị số âm hoặc các trị số dương nhỏ hơn) so với các chuột nhất được tiêm kháng thể đối chứng kiểu tương đương. Bốn kháng thể H4H2352S, H4H2243N2, H4H2294S, và H4H2342P đã thúc đẩy sự kháng lại mạnh nhất đối với sự tăng cảm giác đau với nhiệt trong tất cả các thử nghiệm đã được tiến hành.

Bảng 8: Tổng hợp dữ liệu thu được theo mô hình tăng cảm giác đau với nhiệt do capsaixin mãn cảm với ARTEMIN, được đánh giá sau khi tiêm capsaixin được ba ngày.

Ký hiệu kháng thể	%BWL			
	Thử nghiệm 323	Thử nghiệm 361	Thử nghiệm 367	Thử nghiệm 380
Đối chứng kiểu tương đương	$-17 \pm 7,6$	$-32 \pm 6,8$	$-40 \pm 4,8$	$-35 \pm 3,5$
H4H2292S	$0,72 \pm 19$	nd	nd	$-26 \pm 5,9$
H4H2352S	27 ± 15	nd	$-5,6 \pm 9,4^{**}$	nd
H4H2243N2	20 ± 18	nd	nd	$21 \pm 6,4^{***}$
H4H2294S	nd	$-9,0 \pm 12$	$2,3 \pm 12^{**}$	nd
H4H2342P	nd	$-12 \pm 9,3$	$18 \pm 8,3^{***}$	nd
H4H2212N	nd	$-22 \pm 6,9$	nd	nd

khác đáng kể so với đối chứng kiểu tương đương, $^{**}p < 0,01$; $^{***}p < 0,001$

(nd = không được thử trong thí nghiệm này)

Ví dụ 7: Thử nghiệm các kháng thể kháng GFR α 3 về khả năng phản ứng chéo với GFR α 1 và GFR α 2

Khả năng liên kết với các thụ thể họ GDNF của các kháng thể kháng GFR α 3 được đánh giá bằng cách sử dụng cảm biến sinh học Octet Red (ForteBio, Inc.). Các kháng thể được thử nghiệm cho liên kết với GFR α 1 của người được biểu hiện với dấu Fc người tận cùng C và dấu hexahistidin (hGFR α 1-hFc-6His, R&D Systems # 714-GR), với GFR α 1 của người chỉ được biểu hiện với dấu Fc người tận cùng C (hGFR α 1-hFc; SEQ ID: 376), với GFR α 2 người được biểu hiện với dấu Fc người tận cùng C và dấu hexahistidin (hGFR α 2-hFc-6His, R&D Systems #613-FR), với GFR α 3 của người được biểu hiện với dấu Fc người tận cùng C (hGFR α 3-hFc, SEQ ID:371), hoặc với protein có dấu Fc người không liên quan. Các kháng nguyên được bắt lên trên các đầu

cảm biến kháng Fc người từ các dung dịch 10 µg/ml trong khoảng thời gian 5 phút. Các đầu cảm biến được phủ sau đó đã được phong bế bằng dung dịch 100 µg/ml của các kháng thể Fc người không liên quan, trong khoảng thời gian 5 phút. Các đầu cảm biến đã bị phong bế sau đó được nhúng vào các giếng chứa 667µM của mỗi kháng thể kháng GFRα3, hoặc chỉ chứa dung dịch đệm, trong khoảng thời gian 10 phút. Thử nghiệm này được tiến hành ở nhiệt độ 25°C, với tốc độ dòng là 1.000 vòng/phút sử dụng dung dịch đệm HBST+BSA (HEPES 10mM, NaCl 150mM, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,05% trọng lượng/thể tích, BSA 0,1 mg/ml, pH 7,4). Đáp ứng liên kết (được đo bằng đơn vị nm) trong mỗi bước thử nghiệm đã được theo dõi và ghi lại.

Toàn bộ sáu kháng thể kháng GFRα3 được thử nghiệm đã thể hiện mức liên kết trên 1,0nm với protein hGFRα3-hFc, nhưng không thể hiện bất kỳ mức liên kết nào có thể đo được với các thụ thể họ GDNF khác hoặc với protein có dấu Fc người không liên quan, như được trình bày trong Bảng 9.

Bảng 9: Khả năng phản ứng của các kháng thể kháng GFRα3 với GFRα1, GFRα2 và GFRα3

Kháng nguyên	Mức độ liên kết (nm) +/- độ lệch tiêu chuẩn	100 µg/ml H4H2294 S bị liên kết (nm)	100 µg/ml H4H2342P bị liên kết (nm)	100 µg/ml H4H2243N 2 bị liên kết (nm)	100 µg/ml H4H2212N bị liên kết (nm)	100 µg/ml H4H2352S bị liên kết (nm)	100 µg/ml H4H2292S bị liên kết (nm)	Đệm
hGFRα1-hFc	1,89±0,14	0,04	0,06	0,03	0,00	0,02	0,05	-0,07
hGFRα1-hFc-6his	1,66±0,10	0,03	0,08	0,03	-0,01	0,03	0,03	-0,07
hGFRα2-hFc-6his	1,49±0,09	0,06	0,12	0,06	0,02	0,04	0,05	-0,06
hGFRα3-hFc	1,68±0,10	1,17	1,59	1,11	1,18	1,25	1,04	-0,09
Protein có dấu hFc không liên quan	1,00±0,06	0,03	0,07	0,03	0,00	0,03	0,02	-0,08

Ví dụ 8: Đo khả năng của các kháng thể kháng GFR α 3 phong bế sự kích thích ARTEMIN trong thử nghiệm sinh học HEK293/MfGFR α 3/MfRet/SRE-Luc

Khả năng của các kháng thể kháng GFR α 3 phong bế sự hoạt hoá GFR α 3 khi cynomolgus và RET khi cynomolgus bởi phối tử ARTEMIN của nó *in vitro* đã được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm trên cơ sở tế bào. Các tế bào HEK293 được biến đổi để biểu hiện ổn định cả GFR α 3 khi cynomolgus (MfGFR α 3; SEQ ID: 377) và RET khi cynomolgus (MfRET; SEQ ID: 378) được tạo ra và sau đó được tải nạp trình tự thông báo Cignal Lenti SRE (SA Biosciences, #CLS-010L) biểu hiện gen luxiferaza đom đóm dưới sự kiểm soát của chất xúc tiến CMV tối thiểu và các đoạn lặp tiếp đôi phần tử đáp ứng huyết thanh để tạo ra dòng tế bào HEK293/MfGFR α 3/MfRet/SRE-Luc.

Để tiến hành thử nghiệm sinh học, 20.000 tế bào HEK293/MfGFR α 3/MfRet/SRE-Luc đã được cấy lên các đĩa 96 giếng phủ Poly D-Lysin (Greiner, #35-4620) trong Optimem (GIBCO, #31985) chứa 0,5% FBS (huyết thanh phôi bò), rồi sau đó để nuôi cấy qua đêm với CO₂ 5% ở nhiệt độ 37°C. Tiếp sau, các tế bào này được ủ trong khoảng thời gian 1 giờ với các dung dịch pha loãng theo nhiều cấp của các kháng thể kháng GFR α 3 có nồng độ trong khoảng từ 5pM đến 300nM. Sau đó, liều hằng định (500pM) của ARTEMIN của người được biểu hiện với đầu myc-myc-hexahistidin tận cùng C (Human ARTEMIN-MMH; SEQ ID: 369) được bổ sung vào các tế bào, và ủ thêm 6 giờ nữa. Để xác định trị số EC₅₀ của ARTEMIN-MMH của người từ các đường cong đáp ứng liều lượng, các dung dịch pha loãng theo nhiều cấp của ARTEMIN-MMH của người trong khoảng từ 0,5pM đến 10nM được bổ sung vào các tế bào mà không có các kháng thể, và ủ trong khoảng thời gian 6 giờ ở nhiệt độ 37°C. Hoạt tính luxiferaza đã được đo bằng đơn vị ánh sáng tương đối (RLU- relative light unit) trên quang kế Victor (Perkin Elmer) sau khi bổ sung thuốc thử OneGlo (Promega, #E6051). Các trị số EC₅₀ và IC₅₀ được tính toán từ phương trình logitíc bốn tham số tương ứng với đường cong đáp ứng 12 điểm bằng cách sử dụng phần mềm phân tích dữ liệu GraphPad Prism.

Sáu kháng thể kháng GFR α 3 được thử nghiệm về khả năng của chúng ức chế sự hoạt hoá phụ thuộc ARTEMIN của các tế bào HEK293/MfGFR α 3/MfRET/SRE-luc. Như được thể hiện trong Bảng 10, tất cả sáu kháng thể thử nghiệm đã phong bế

hoàn toàn hoạt tính luxiferaza, với các trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 0,7nM đến 2,5nM. ARTEMIN-MMH của người đã kích thích hoạt tính luxiferaza phụ thuộc SRE ở dòng tế bào HEK293/mfGFR α 3/mfRet/SRE-LUC với trị số EC_{50} là 70pM.

Bảng 10: Ước chế sự kích thích phụ thuộc ARTEMIN của các tế bào HEK293/MfGFR α 3/MfRET/SRE-luc bằng các kháng thể kháng GFR α 3

Kháng thể	IC_{50} (nM)
H4H2294S	0,7
H4H2342P	2,5
H4H2212N	1,8
H4H2292S	1,5
H4H2243N2	0,8
H4H2352S	1,3

Ví dụ 9: Tạo ra các kháng thể kháng GFR α 3 đặc hiệu kép

Các kháng thể đặc hiệu kép khác nhau được tạo ra để sử dụng trong việc thực hiện các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu với GFR α 3 được tạo ra dưới dạng thức đặc hiệu kép ("đặc hiệu kép"), trong đó các vùng biến đổi liên kết với các biểu vị riêng biệt trên GFR α 3 được gắn kết với nhau để tạo ra tính đặc hiệu với hai biểu vị trong một phân tử liên kết. Các dạng đặc hiệu kép được thiết kế thích hợp có thể làm tăng tổng hiệu lực phong bế GFR α 3 thông qua việc làm tăng cả tính đặc hiệu với GFR α 3 và ái lực liên kết. Các vùng biến đổi có tính đặc hiệu với các biểu vị khác nhau riêng lẻ ở đoạn lặp bất kỳ trong ba đoạn lặp xystein hoặc có thể liên kết với các vùng khác nhau trong một biểu vị của đoạn lặp bất kỳ trong ba đoạn lặp xystein được ghép cặp trên bộ khung cấu trúc, cho phép mỗi vùng biến đổi liên kết đồng thời với các biểu vị riêng biệt, hoặc với các vùng khác nhau trong một biểu vị. Theo một ví dụ về kháng thể đặc hiệu kép, các vùng biến đổi của chuỗi nặng (V_H) từ một chất liên kết có tính đặc hiệu với một biểu vị trong một đoạn

lập xystein được tái tổ hợp với các vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (V_L) của một loạt chất liên kết có tính đặc hiệu với biểu vị thứ hai ở đoạn lặp bất kỳ trong hai đoạn lặp xystein khác để xác định các phần kết hợp V_L tương đồng không cùng nguồn gốc có thể được ghép cặp với một V_H nguyên gốc mà không loại bỏ đi tính đặc hiệu vốn có đối với V_H đó. Theo cách này, một mảnh V_L (ví dụ, V_{L1}) có thể được kết hợp với hai miền V_H khác nhau (ví dụ, V_{H1} và V_{H2}) để tạo ra một kháng thể đặc hiệu kép gồm hai "nhánh" liên kết ($V_{H1}-V_{L1}$ và $V_{H2}-V_{L1}$). Việc sử dụng mảnh V_L duy nhất làm giảm mức độ phức tạp của hệ thống này và nhờ vậy đơn giản hoá và làm tăng được hiệu quả trong các quy trình nhân dòng, biểu hiện, và tinh chế được sử dụng để tạo ra dạng đặc hiệu kép (ví dụ, xem tài liệu USSN13/022759 và US2010/0331527).

Theo cách khác, các kháng thể liên kết với cả $GFR\alpha3$ và đích thứ hai, ví dụ như, nhưng không giới hạn ở, RET, có thể được tạo ra dưới dạng thức đặc hiệu kép bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này, hoặc bằng các kỹ thuật khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Các vùng biến đổi kháng thể liên kết với các vùng $GFR\alpha3$ riêng biệt mà được bọc lộ ngoại bào được liên kết với các vùng biến đổi mà liên kết vào các vị trí thích hợp, ví dụ như trên phối tử artemin, trên các thụ thể $GFR\alpha$ khác, hoặc RET, để tạo ra tính đặc hiệu lưỡng kháng nguyên trong một phân tử liên kết. Các vùng biến đổi có tính đặc hiệu với các biểu vị riêng biệt của $GFR\alpha3$ được kết hợp với vùng biến đổi có tính đặc hiệu, ví dụ, artemin, và được ghép cặp trên bộ khung cấu trúc, cho phép mỗi vùng biến đổi liên kết với các kháng nguyên riêng biệt.

Các chất liên kết đặc hiệu kép được thử nghiệm về khả năng liên kết và phong bế chức năng các kháng nguyên đích, ví dụ, $GFR\alpha3$ và/hoặc artemin, các thụ thể $GFR\alpha$ khác, hoặc RET, trong thử nghiệm bất kỳ trong các thử nghiệm nêu trên về các kháng thể. Ví dụ, các phương pháp tiêu chuẩn đo sự liên kết của protein hoà tan được sử dụng để đánh giá sự tương tác đặc hiệu kép với (các) kháng nguyên của nó, như các phương pháp Biacore, ELISA, sắc ký loại trừ kích thước, tán xạ ánh sáng laze đa góc, đo nhiệt lượng quét trực tiếp, và các phương pháp khác. Sự liên kết của các kháng thể đặc hiệu kép vào các tế bào biểu hiện $GFR\alpha3$ được xác định bằng phương pháp đo tế bào dòng, bằng cách sử dụng kháng thể thứ cấp đánh dấu nhãn huỳnh quang nhận biết được kháng nguyên đích trên các tế bào đó. Các thử nghiệm liên kết với các peptid

cũng có thể được tiến hành bằng cách sử dụng các thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt, trong đó tương tác liên kết theo thời gian thực của peptit với kháng thể được đo bằng cách cho peptit hoặc kháng thể đặc hiệu kẹp đi xuyên qua bề mặt cảm biến mà trên đó, tương ứng, kháng thể đặc hiệu kẹp hoặc peptit được bắt lấy. Sự phong bế chức năng *in vitro* thụ thể $\text{GFR}\alpha 3$ bằng kháng thể đặc hiệu kẹp được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm sinh học bất kỳ, như thử nghiệm được mô tả trong bản mô tả này, hoặc bằng cách xác định *in vivo* sự phản ứng với đau ở các mô hình trên động vật thích hợp, như các mô hình được mô tả trong bản mô tả này. Sự phong bế chức năng *in vitro* đối với $\text{GFR}\alpha 3$ hoặc phối tử của nó, artemin, bằng kháng thể đặc hiệu kẹp được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm sinh học bất kỳ, như thử nghiệm sinh học được mô tả trong tài liệu WO2010/077854 hoặc trong US2010/0166768, hoặc bằng cách xác định *in vivo* tính quá mẫn với các kích thích nhiệt ở các mô hình thích hợp trên động vật, như các mô hình được mô tả trong bản mô tả này.

Ví dụ 10: Ái lực liên kết và các hằng số động học của các kháng thể kháng $\text{GFR}\alpha 3$ chuột nhắt đơn dòng xác định được bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt

Các hằng số tốc độ kết hợp liên kết và phân ly liên kết (k_a và k_d , tương ứng) và các hằng số cân bằng phân ly và thời gian bán tồn phân ly tính toán được (K_D và $t_{1/2}$, tương ứng) đối với sự liên kết kháng nguyên vào các kháng thể kháng $\text{GFR}\alpha 3$ chuột nhắt được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm cảm biến sinh học (Biacore 3000) cộng hưởng plasmon bề mặt thời gian thực ở nhiệt độ 25°C . Các kháng thể được thử nghiệm cho liên kết với $\text{GFR}\alpha 3$ của chuột nhắt được biểu hiện cùng với dấu myc-myc-hexahistidin (m $\text{GFR}\alpha 3$ -MMH; SEQ ID: 379,). Các kháng thể kháng $\text{GFR}\alpha 3$ của chuột nhắt được bắt lên bề mặt kháng thể đa dòng dê kháng IgG của chuột nhắt (GE Healthcare, # BR-1008-38 được tạo ra bằng cách ghép đôi amin trực tiếp với chip cảm biến Biacore CM5. Các thử nghiệm động học được tiến hành bằng cách sử dụng HBS-EP (HEPES 10mM, NaCl 150mM, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,05%, ở pH 7,4) vừa làm đệm chạy và vừa làm đệm cho mẫu. Sự liên kết vào $\text{GFR}\alpha 3$ -MMH của chuột nhắt được đánh giá bằng cách tiêm vài nồng độ, trong khoảng từ 100nM đến 6,25nM (các dung dịch pha loãng 2 lần), xuyên qua bề mặt kháng thể bắt được. Sự kết hợp kháng thể-kháng nguyên được quan sát trong khoảng thời gian tới 5 phút, còn sự

phân ly trong dung dịch đệm được quan sát trong khoảng thời gian tới 10 phút. Các hằng số tốc độ kết hợp động học (k_a) và phân ly (k_d) được xác định bằng cách xử lý và hiệu chỉnh dữ liệu với mô hình liên kết 1:1, bằng cách sử dụng phần mềm hiệu chỉnh đường cong Scrubber 2.0c. Các hằng số cân bằng phân ly liên kết (K_D) và các thời gian bán tồn phân ly ($t_{1/2}$) được tính toán từ các hằng số tốc độ động học như sau: $K_D (M) = k_d / k_a$ và $t_{1/2} (\text{phút}) = [\ln 2 / (60 * k_d)]$.

Như được trình bày trong Bảng 11, hai kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt được thử nghiệm là M1M6986N và M1M6977N, được cho liên kết với mGFR α 3-MMH ở nhiệt độ 25°C, với các trị số K_D là 23,1pM và 107pM, tương ứng.

Bảng 11: Động học liên kết mGFR α 3-MMH vào các kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt khác nhau ở nhiệt độ 25°C

Ký hiệu kháng thể	k_a (1/Mgiây)	k_d (1/giây)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
M1M6986N	1,02E+06	2,35E-05	2,31E-11	491
M1M6977N	3,84E+05	4,1E-05	1,07E-10	282

Ví dụ 11: ELISA phong bế GFR α 3 của chuột nhắt

Khả năng của các kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt phong bế sự liên kết GFR α 3 của chuột nhắt với ARTEMIS của chuột nhắt khi có mặt hoặc không có mặt đồng thụ thể RET của chuột nhắt được xác định bằng cách sử dụng hai dạng thức ELISA phong bế khác nhau. Ở dạng thức thứ nhất, protein ARTEMIS của chuột nhắt tái tổ hợp (R&D cat# 1085-AR/CF) được phủ với nồng độ 2 μ g/ml (166nM) lên các đĩa vi chuẩn 96 giếng trong dung dịch đệm PBS để qua đêm ở nhiệt độ 4°C và sau đó phong bế bằng dung dịch BSA 0,5% (trọng lượng/thể tích). Lượng hằng định (3,5nM) của GFR α 3 chuột nhắt biotin hoá có dấu myc-myc-hexahistidin tận cùng C (Biotin-mGFR α 3-MMH, SEQ ID:379) được trộn sơ bộ với các lượng khác nhau của các kháng thể có nồng độ trong khoảng từ 100nM đến 1,6pM trong các dung dịch pha loãng theo nhiều cấp, sau đó ủ trong khoảng thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng (RT) để sự liên kết kháng thể-biotin-mGFR α 3-MMH đạt được cân bằng. Các dung

dịch mẫu đã cân bằng sau đó được chuyển lên đĩa đã phủ mARTEMIN. Sau khoảng thời gian 1 giờ liên kết, thì rửa đĩa, sau đó biotin-mGFR α 3-MMH bị liên kết được phát hiện bằng cách sử dụng Streptavidin-HRP (Pierce, #N200) và các tín hiệu so màu được hiện bằng cách sử dụng cơ chất TMB HRP (BD Biosciences, #51-2606KC và #51-2607KC). Độ hấp thụ được ghi ở 450nm trên đầu đọc đĩa Victor X5 (Perkin Elmer) để xác định lượng biotin-mGFR α 3-MMH tự do trong các dung dịch biotin-mGFR α 3-MMH-kháng thể đã cân bằng trước, mà có khả năng liên kết với mARTEMIN được phủ lên đĩa. Các trị số IC₅₀ – được xác định là nồng độ của kháng thể cần thiết để làm giảm 50% tín hiệu từ một nồng độ hằng định của biotin-mGFR α 3-MMH – được tính toán từ các dữ liệu bằng cách sử dụng phần mềm Prism của GraphPad. Độ hấp thụ được đo với lượng hằng định của biotin-mGFR α 3-MMH khi không có mặt kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt được xác định là mức phong bế 0%, và độ hấp thụ khi không bổ sung biotin-mGFR α 3-MMH được xác định là mức phong bế 100%. Độ hấp thụ quan sát thấy ở các giếng chứa nồng độ kháng thể cao nhất được sử dụng để tính toán phần trăm phong bế tối đa được trình bày trong bảng. Các kết quả đã được tổng hợp ở Bảng 12.

Ở dạng thức ELISA thứ hai, các đĩa, các mẫu và dữ liệu được xử lý tương tự như đối với dạng thức thứ nhất, ngoại trừ cả RET của chuột nhắt được biểu hiện với các đầu hFc và hexahistidin tận cùng C (mRET-hFc-6His; R&D cat# 482-RT/CF) và mARTEMIN (R&D cat# 1085-AR/CF) đều được phủ đối với thử nghiệm ELISA phong bế. Các đĩa vi chuẩn 96 giếng được phủ hỗn hợp gồm mARTEMIN 1,2 μ g/ml (100nM) và các protein mRET-hFc-6His 9,5 μ g/ml (100nM) trong PBS để qua đêm ở nhiệt độ 4°C, và sau đó được phong bế bằng dung dịch BSA 0,5% (trọng lượng/thể tích). Lượng hằng định (350pM) của biotin-mGFR α 3-MMH được trộn sơ bộ với các lượng khác nhau của các kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt, có nồng độ trong khoảng từ 100nM đến 1,6pM trong các dung dịch pha loãng theo nhiều cấp, sau đó ủ trong khoảng thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng (RT) để sự liên kết kháng thể-biotin-mGFR α 3-MMH đạt được cân bằng. Các mẫu đã cân bằng sau đó được chuyển lên đĩa đã phủ. Sau khoảng thời gian 1 giờ liên kết, thì rửa đĩa, sau đó biotin-mGFR α 3-MMH bị liên kết đã được phát hiện bằng cách sử dụng streptavidin liên hợp với HRP và các tín hiệu so màu đã được hiện bằng cách sử dụng cơ chất TMB HRP. Các trị số

IC₅₀ và mức phong bế tối đa bởi mỗi kháng thể được trình bày ở Bảng 12.

Như được trình bày trong Bảng 12, chỉ có một kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt được thử nghiệm là M1M6986N, đã thể hiện khả năng phong bế sự liên kết biotin-mGFR α 3-MMH vào đĩa đã phủ mARTEMIN, với trị số IC₅₀ là 69,1pM. Kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt khác được thử nghiệm, là M1M6977N, thì không thể hiện bất kỳ sự phong bế nào có thể đo được ở dạng thức ELISA này. Cả hai kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt được thử nghiệm là M1M6986N và M1M6977N đều thể hiện khả năng phong bế hoàn toàn sự liên kết của biotin-mGFR α 3-MMH vào các đĩa đã phủ cả mARTEMIN và mRET-hFc-6His, với các trị số IC₅₀ là 47,2pM và 366pM, tương ứng.

Bảng 12: ELISA phong bế sự liên kết của GFR α 3 của chuột nhắt với ARTEMIN của chuột nhắt đơn lẻ, hoặc với ARTEMIN của chuột nhắt và RET của chuột nhắt

ELISA dạng thức 1: Kháng thể phong bế sự liên kết của biotin-mGFR α 3-MMH 3,5nM với mARTEMIN đã phủ			ELISA dạng thức 2: Kháng thể phong bế sự liên kết của biotin-mGFR α 3-MMH 350pM với mARTEMIN và mRET-hFc-6His đã phủ	
Ký hiệu kháng thể	IC ₅₀ (M)	% phong bế tối đa	IC ₅₀ (M)	% phong bế tối đa
M1M6986N	6,91E-11	100%	4,72E-11	100%
M1M6977N	NB		3,66E-10	100%
NB = không phong bế				

Ví dụ 12: Thử nghiệm sinh học luxiferaza trên cơ sở tế bào

Khả năng của các kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt phong bế sự hoạt hoá GFR α 3 của chuột nhắt và RET của chuột nhắt bởi phối tử của nó ARTEMIN của chuột nhắt được xác định *in vitro* bằng cách sử dụng thử nghiệm trên cơ sở tế bào. Các tế bào HEK293 được biến đổi để biểu hiện ổn định cả GFR α 3 của chuột nhắt (các axit amin 1-397 có số truy cập AAH66202.1) và RET của chuột nhắt (các axit amin 1-1115 có số truy cập NP_033076.2) được tạo ra và sau đó được tải nạp phần tử thông báo

luxiferaza phụ thuộc SRE) (SRE-luc; Sabiosciences, CCS-010L) (các tế bào 293/mGFR α 3/mRET/SRE-luc).

Hai mươi nghìn tế bào 293/mGFR α 3/mRET/SRE-luc đã được cấy lên các đĩa 96 giếng phủ Poly D-Lysin (Greiner, #35-4620) trong Optimem (GIBCO, #31985) chứa FBS 0,5% và sau đó được nuôi cấy qua đêm trong CO₂ 5% ở nhiệt độ 37°C. Tiếp sau, các tế bào này đã được ủ trong khoảng thời gian 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng với các dung dịch pha loãng theo nhiều cấp của các kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt, có nồng độ trong khoảng từ 3nM đến 44nM. Lượng hằng định (100pM) của ARTEMIN của chuột nhắt (R&D, # 1085-AR/CF) được bổ sung vào các tế bào nêu trên và ủ thêm 6 giờ nữa. Hoạt tính luxiferaza được xác định theo các đơn vị ánh sáng tương đối (RLU-relative light unit) trên quang kế Victor (Perkin Elmer) sau khi bổ sung thuốc thử OneGlo (Promega, #E6051). Các trị số EC₅₀ và IC₅₀ được tính toán từ phương trình logistic bốn tham số tương ứng với đường cong đáp ứng 12 điểm bằng cách sử dụng phần mềm phân tích dữ liệu GraphPad Prism.

Như được trình bày trong Bảng 13, cả hai kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt được thử nghiệm là M1M6986N và M1M6977N đều thể hiện khả năng ức chế sự kích thích phụ thuộc ARTEMIN của chuột nhắt đối với các tế bào 293/mGFR α 3/mRET/SRE-luc, với các trị số IC₅₀ xấp xỉ 44nM và 3nM, tương ứng.

Bảng 13: Ức chế sự kích thích phụ thuộc ARTEMIN của các tế bào 293/mGFR α 3/mRET/SRE-luc bằng các kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt

Kháng thể	IC ₅₀ (nM)
M1M6986N	44 $\pm$ 3 (n=2)
M1M6977N	3 $\pm$ 1 (n=3)

Các ví dụ 13, 14 và 15: Tác dụng của các kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt ở các mô hình đau do ung thư xương và đau do thoái hóa khớp trên động vật

Các kháng thể được nêu trong bản mô tả này là các kháng thể người có ái lực cao đối với thụ thể anpha liên kết với GPI cho artemin, tức là GFR α 3. Bởi vì các kháng thể kháng GFR α 3 của người này không phản ứng chéo với GFR α 3 của chuột

nhất, nên các thử nghiệm *in vivo* với các kháng thể đó chỉ có thể được thực hiện ở các chuột nhất được cải biến về di truyền để thay thế trình tự GFR α 3 của chuột nhất bằng trình tự GFR α 3 của người. Nhờ sử dụng ức chế bằng được lý đối với capsaixin mẫn cảm với artemin, các thử nghiệm *in vivo* ban đầu ở các chuột nhất GFR α 3^{hu/hu} này đã bộc lộ hiệu lực của bốn kháng thể người trong thử nghiệm *in vivo* đó. Để xúc tiến việc thu lấy các dữ liệu về hiệu lực, các kháng thể GFR α 3 của chuột nhất được tạo ra để thay thế cho các kháng thể người. Các chuột nhất chủng C57BL6/129Sv hỗn hợp, mà là đồng hợp tử khuyết gen GFR α 3 nội sinh, được tạo miễn dịch bằng miễn ngoại bào GFR α 3 của chuột nhất tái tổ hợp được biểu hiện ở các tế bào buồng trứng chuột túi má Trung Quốc. Đáp ứng miễn dịch đặc hiệu đối với GFR α 3 đã được xác nhận bằng các thử nghiệm miễn dịch đối với huyết thanh lấy từ các chuột nhất được tạo miễn dịch. Lách được lấy từ các chuột nhất có đáp ứng miễn dịch đặc hiệu cao, và các tế bào lai sản xuất kháng thể được tạo ra bằng cách cho các tế bào lách được phân lập dung hợp với các tế bào khối u tuỷ của chuột nhất theo quy trình tế bào lai tiêu chuẩn. Tiếp theo, các dịch nổi tế bào lai được sàng lọc trong các thử nghiệm miễn dịch về khả năng liên kết với GFR α 3 và khả năng của chúng phong bế sự liên kết của GFR α 3 với artemin hoặc với artemin/Ret được phủ lên một bề mặt rắn trong một dạng thức thử nghiệm miễn dịch. Các dịch nổi cũng được sàng lọc về khả năng của chúng phong bế sự kích thích của artemin của con đường GFR α 3/đồng thụ thể Ret trong một thử nghiệm sinh học trên cơ sở tế bào. Các trình tự vùng biến đổi của kháng thể đạt được bằng cách khuếch đại PCR của các dòng tế bào lai được chọn lọc, mà các protein kháng thể của chúng đã biểu hiện sự phong bế mạnh trong thử nghiệm trên cơ sở tế bào, và các trình tự này được sử dụng để sản xuất các kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhất tái tổ hợp chiều dài toàn bộ với kiểu tương đương IgG1 của chuột nhất. Hai kháng thể được chọn để thử nghiệm *in vivo* mà ức chế mạnh sự truyền tín hiệu artemin trong thử nghiệm trên cơ sở tế bào. Trong thử nghiệm miễn dịch liên kết *in vitro*, kháng thể M1M6986N phong bế sự liên kết của GFR α 3 vào cả artemin và artemin/Ret được phủ lên một bề mặt rắn và được gọi trong bản mô tả này là phần tử phong bế trực tiếp. Kháng thể M1M6977N phong bế sự liên kết của GFR α 3 với artemin/Ret được phủ, mà không phải với artemin đơn lẻ trong thử nghiệm miễn dịch *in vitro* và được gọi trong bản mô tả này là phần tử phong bế gián tiếp. Hai kháng thể chuột nhất M1M6986N và M1M6977N được chọn để thử nghiệm trên mô hình làm giảm đau với nhiệt do

capsaixin mẫn cảm với artemin (được mô tả trong Ví dụ 6), vì hai kháng thể đó có các thông số liên kết và phong bế tương tự như các kháng thể người có hiệu lực. Hai kháng thể này được sàng lọc về khả năng của chúng phong bế sự mẫn cảm tăng cảm giác đau do artemin *in vivo* ở các chuột nhất kiểu hoang dại. Tương tự như các kháng thể người tương đương, hai kháng thể đó ức chế đáng kể tác dụng gây mẫn cảm của artemin đối với sự tăng cảm giác đau với nhiệt do capsaixin sau khi tiêm capsaixin được ba ngày (Fig. 1).

Ví dụ 13: Mô hình đau do ung thư xương dạng xacôm sợi

Đối tượng

Các chuột nhất đực trưởng thành chủng nền C57Bl6 được sử dụng cho hai thử nghiệm xacôm sợi, lúc khoảng 12 tuần tuổi. Những người tiến hành thử nghiệm đo dữ liệu kết quả cho các thí nghiệm này không được cho biết rõ về các nhóm động vật được điều trị trong suốt quá trình thu thập, xử lý và phân tích dữ liệu.

Mô hình đau do ung thư xương

Để gây đau do ung thư xương, các chuột nhất được gây mê và sau đó được tiêm trong đùi $1,0 \times 10^6$ tế bào xacôm sợi MC57G. Các tế bào này được lấy từ dòng tế bào khối u sacôm sợi chuột nhất C57Bl/6. Các khối u thường tăng trưởng mạnh trên mô hình này, cho nên sự huỷ hoại xương đã trở nên rõ ràng sau khi cấy khối u 14 ngày. Các phim X quang được chụp vào các ngày 7, 10, và 14 sau khi cấy khối u để kiểm tra sự tăng trưởng khối u và sự huỷ hoại xương. Sự huỷ hoại xương được đánh giá theo thang ba điểm, sao cho điểm 0 ứng với không có sự huỷ hoại và điểm 3 ứng với sự huỷ hoại hoàn toàn xương đùi trong vùng có khối u.

Điều trị bằng kháng thể

Mỗi con chuột được tiêm dưới da kháng thể theo liều 30 mg/kg thể trọng vào ngày trước khi cấy tế bào ung thư và tiêm lại vào ngày thứ 7. Các chuột nhất được phân chia giả ngẫu nhiên vào mỗi nhóm trong hai hoặc ba nhóm điều trị: 1) nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng (âm tính) kiểu tương tự M2M180N, trong hai thử nghiệm riêng biệt, 2) nhóm điều trị bằng kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhất M1M6977N, trong hai thử nghiệm riêng biệt hoặc 3) nhóm điều trị bằng kháng thể

kháng GFR α 3 của chuột nhắt M1M6986N chỉ trong thử nghiệm thứ hai. M1M6986N phong bế sự tương tác của artemin với GFR α 3, và do đó được xem là phần tử phong bế "trực tiếp" tác dụng của artemin. Trái lại, M1M6977N ức chế tác dụng của artemin thông qua phức hợp GFR α 3/RET, và do đó được xem là phần tử ức chế "gián tiếp".

Các phép đo cảm thụ đau

Các đáp ứng cảm thụ đau do khối u xương được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm von Frey Hair về sự loạn cảm đau cơ học (xúc giác) được gây ra, thử nghiệm sức mang trọng lượng động học (DWB- dynamic weight bearing) chịu sức mang trên một chân và thử nghiệm về hành vi gượng nhấc chân. Các kết quả thử nghiệm von Frey được biểu thị bằng gam áp lực cần thiết để rút chân. Các kết quả thử nghiệm sức mang trọng lượng được biểu diễn bằng phần trăm thể trọng đặt lên chân cùng bên. Hành vi gượng nhấc chân được biểu diễn bằng thời gian tiêu tốn để gượng nhấc chân theo dõi trong khoảng thời gian hai phút.

Kết quả

Sự huỷ hoại xương

Không thấy tác dụng đáng kể của việc điều trị bằng kháng thể đối với điểm số đánh giá sự huỷ hoại xương trong cả hai thử nghiệm, cho thấy việc điều trị bằng kháng thể không có tác động đến mức độ nghiêm trọng của bản thân chịu ung thư xương (dữ liệu không được thể hiện).

Hành vi cảm thụ đau

Đã nhận thấy sự giảm đáng kể về mặt thống kê trong thử nghiệm về loạn cảm đau do tác động vào xúc giác khi điều trị bằng kháng thể GFR α 3 sau khi tiêm các tế bào xacôm sợi trong thử nghiệm thứ nhất ($F(1,20)=9,189$; $p=0,007$, Fig. 2A) và xu hướng có ý nghĩa thống kê về hiệu lực tổng thể trong thử nghiệm thứ hai ($F(2,29)=3,069$, $p<0,062$, Fig. 2B), mà trong thử nghiệm thứ hai này, sự so sánh các trường hợp riêng biệt đôi khi có ý nghĩa (Fig. 2B).

Không có tác dụng đáng kể về mặt thống kê của các kháng thể GFR α 3 đối với sức mang trọng lượng động học ở chi cùng bên được đo sau khi cấy vào xương các tế bào xacôm sợi được 14 ngày trong cả hai thử nghiệm, mặc dù thử nghiệm thứ nhất cho

thấy xu hướng có ý nghĩa thống kê về hiệu lực khi điều trị bằng M1M6977N ($t(10)=2,047$, $p=0,068$, Fig. 3A; $F(2,28)=1,598$, $p=0,220$, Fig. 3B).

Các kháng thể GFR α 3 làm giảm đáng kể sự gượng nhắc chân sau khi cấy các tế bào ung thư xương trong cả hai thí nghiệm về xacôm sợi ($F(1,20)=12,270$, $p=0,002$, Fig. 4A; $F(2,29)=3,576$, $p=0,041$, Fig. 4B).

Kết luận

Việc điều trị bằng các kháng thể kháng GFR α 3 chuột nhắt đã làm giảm đáng kể các hành vi cảm thụ đau trong mô hình đau do ung thư xương này, khi được đo bằng cách đánh giá sự gượng nhắc chân và đánh giá loạn cảm đau do tác động vào xúc giác trong thử nghiệm von Frey. Ngoài ra, có xu hướng mang ý nghĩa thống kê về hiệu lực của kháng thể M1M6977N có sự chênh lệch về sức mang trọng lượng trong một thử nghiệm. Các điểm số đánh giá sự huỷ hoại xương không khác nhau ở các nhóm được điều trị bằng các kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt, cho thấy rằng, không thể giải thích các khác biệt về các trị số đo liên quan đến đau bằng các khác biệt về mức độ nghiêm trọng của ung thư. Do đó, các dữ liệu mà các tác giả sáng chế thu thập được cho thấy rằng, các kháng thể trung hoà kháng GFR α 3 có thể có hiệu lực kháng đau do ung thư xương gây ra. Bởi vì các tế bào xacôm thường là các khối u nguyên phát hơn là di căn vào xương, và bởi vì hầu hết ung thư xương là do các di căn của các khối u nguyên phát từ các vị trí khác, các kháng thể này cũng đã được thử nghiệm trên mô hình đau do ung thư xương di căn từ ung thư biểu mô vú. Các khối u vú và tuyến tiền liệt thuộc trong số các khối u phổ biến nhất được phát hiện di căn vào xương.

Ví dụ 14: Mô hình đau do ung thư xương di căn từ ung thư biểu mô vú

Đối tượng

Các chuột nhắt đực trưởng thành chủng nền Balb/c được sử dụng cho thử nghiệm ung thư xương di căn từ ung thư biểu mô vú, lúc khoảng 12 tuần tuổi. Những người tiến hành thử nghiệm đo dữ liệu kết quả cho thử nghiệm này không được cho biết rõ về nhóm động vật được điều trị trong suốt quá trình thu thập, xử lý, và phân tích dữ liệu.

Mô hình đau do ung thư xương

Để gây đau do ung thư xương, các chuột nhắt được gây mê và sau đó được tiêm vào đùi 10.000 tế bào ung thư biểu mô vú 4T-1. Các tế bào này có nguồn gốc từ dòng tế bào khối u ung thư biểu mô động vật có vú Balb/c. Trên mô hình này, các khối u thường tăng trưởng mạnh mẽ, cho nên 18 ngày sau khi cấy, các u đã gây nên tình trạng trầm trọng. Các phim X quang được chụp vào các ngày thứ 10, 14, và 19 sau khi cấy để kiểm tra sự tăng trưởng khối u và sự huỷ hoại xương. Sự huỷ hoại xương đã được đánh giá theo thang ba điểm, sao cho điểm 0 ứng với không xảy ra sự huỷ hoại, và điểm 3 ứng với sự huỷ hoại hoàn toàn xương đùi trong vùng có khối u.

Điều trị bằng kháng thể

Mỗi con chuột được tiêm dưới da các liều kháng thể 30 mg/kg thể trọng vào ngày trước khi cấy tế bào ung thư và hai lần mỗi tuần sau đó. Các chuột được phân bố giả ngẫu nhiên vào mỗi nhóm trong ba nhóm điều trị: 1) nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng (âm tính) kiểu tương đương M2M180N, 2) nhóm điều trị bằng kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt M1M6977N, hoặc 3) nhóm điều trị bằng kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt M1M6986N. M1M6986N phong bế sự tương tác của artemin với GFR α 3 và do đó được xem là phân tử phong bế "trực tiếp" tác dụng của artemin. Trái lại, M1M6977N ức chế tác dụng của artemin thông qua phức hợp GFR α 3/RET, và do đó được xem là phân tử ức chế "gián tiếp".

Các phép đo cảm thụ đau

Các đáp ứng cảm thụ đau do khối u xương được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm von Frey Hair về sự loạn cảm đau cơ học (xúc giác) được gây ra, thử nghiệm về sức mang trọng lượng động học (DWB- dynamic weight bearing) chịu sức mang trên một chân và thử nghiệm về hành vi gượng nhấc chân. Các kết quả của thử nghiệm von Frey được biểu thị bằng gam áp lực cần thiết để rút chân. Các kết quả thử nghiệm sức mang trọng lượng được biểu diễn bằng phần trăm thể trọng đặt lên chân cùng bên. Hành vi gượng nhấc chân được biểu diễn bằng thời gian tiêu tốn để gượng nhấc chân, theo dõi trong khoảng thời gian hai phút.

Kết quả

Sự huỷ hoại xương

Không thấy tác dụng đáng kể của việc điều trị bằng kháng thể đối với điểm số đánh giá sự huỷ hoại xương trên mô hình này, cho thấy rằng, việc điều trị bằng kháng thể không có tác động đến mức độ nghiêm trọng của bản thân chịu ung thư xương.

Hành vi cảm thụ đau

Đã nhận thấy sự giảm đáng kể về mặt thống kê trong thử nghiệm về sự loạn cảm đau tác động vào xúc giác khi điều trị bằng kháng thể GFR α 3 sau khi tiêm các tế bào ung thư biểu mô ($F(2, 25)=8,626$; $p=0,01$, Fig. 5).

Không có ảnh hưởng tổng thể đáng kể về mặt thống kê của các kháng thể GFR α 3 đối với sức mang trọng lượng động học ở chi cùng bên, mặc dù tác dụng tổng thể của việc điều trị đã đạt được xu hướng mang ý nghĩa thống kê và M1M6977N đạt được hiệu lực đáng kể khi so sánh sau đó ở 11 ngày (A), mà không phải là 18 ngày (B), sau khi cấy các tế bào ung thư biểu mô vào xương (11 ngày $F(2,25)=2,939$, $p=0,071$, Fig. 6A; 18 ngày $F(2,25)=0,149$, $p=0,862$, Fig. 6B).

Các kháng thể GFR α 3 làm giảm đáng kể sự gượng nhắc chân sau khi cấy các tế bào ung thư xương trên mô hình này ($F(2,25)=4,222$, $p=0,026$, Fig. 7)

Kết luận

Việc điều trị bằng các kháng thể kháng GFR α 3 chuột nhắt làm giảm đáng kể các hành vi cảm thụ đau trên mô hình đau do ung thư xương này, khi được đo bằng cách đánh giá sự gượng nhắc chân và đánh giá sự loạn cảm đau do tác động vào xúc giác trong thử nghiệm von Frey. Ngoài ra, có bằng chứng về hiệu lực của kháng thể REGN1967 dựa trên sự khác biệt về sức mang trọng lượng ở một thời điểm. Các điểm số đánh giá sự huỷ hoại xương không khác nhau ở các nhóm được điều trị bằng các kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt, cho thấy rằng, không thể giải thích các khác biệt về các trị số đo liên quan đến đau bằng các khác biệt về mức độ nghiêm trọng của ung thư. Do đó, dữ liệu mà các tác giả sáng chế thu thập được cho thấy rằng, các kháng thể trung hoà kháng GFR α 3 có thể có hiệu lực kháng đau do ung thư xương trên mô hình đau do ung thư xương di căn này.

Ví dụ 15: Mô hình đau do thoái hóa khớp gây ra bằng cách làm lỏng lẻo sụn chêm trong khớp gối (DMM- Medial Meniscus)

Đối tượng

Các chuột nhắt đực trưởng thành chủng nền C57Bl6 được sử dụng cho thử nghiệm DMM, lúc khoảng 12 tuần tuổi. Những người tiến hành thử nghiệm đo dữ liệu kết quả của thử nghiệm này không được cho biết rõ về nhóm động vật được điều trị trong suốt quá trình thu thập, xử lý, và phân tích dữ liệu.

Mô hình gây lỏng lẻo sụn chêm trong khớp gối DMM

Ở mô hình DMM này, sụn chêm trong một khớp gối bị gây lỏng lẻo và chuột được để phát bệnh trong vòng 16 tuần. Trong khoảng thời gian 16 tuần này, ở các chuột thấy phát lộ loạn cảm đau do tác động vào xúc giác và tăng thể tích xương và hàm lượng chất khoáng của xương ở đầu gối bị tổn thương, giống như bệnh thoái hóa khớp lúc ban đầu ở người. Loạn cảm đau do tác động vào xúc giác đã được kiểm tra ở các chuột bằng thử nghiệm von Frey trước lúc bắt đầu điều trị bằng kháng thể 16 tuần.

Điều trị bằng kháng thể

Mỗi con chuột được tiêm dưới da kháng thể với liều 30 mg/kg thể trọng mỗi tuần, bắt đầu từ sau khi phẫu thuật DMM 16 tuần. Các chuột được phân bố giả ngẫu nhiên vào mỗi nhóm trong ba nhóm điều trị: 1) nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng (âm tính) kiểu tương đương M2M180N, 2) nhóm điều trị bằng kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt M1M6977N, hoặc 3) nhóm điều trị bằng kháng thể kháng GFR α 3 của chuột nhắt M1M6986N. M1M6986N phong bế sự tương tác của artemin với GFR α 3, và do đó được xem là phần tử phong bế "trực tiếp" tác dụng của artemin. Trái lại, M1M6977N ức chế tác dụng của artemin thông qua phức hợp GFR α 3/RET, và do đó được xem là phần tử ức chế "gián tiếp".

Các phép đo cảm thụ đau

Các đáp ứng cảm thụ đau đối với tình trạng bệnh của khớp gối đã được đo bằng thử nghiệm von Frey Hair đối với loạn cảm đau cơ học (do tác động vào xúc giác) được gây ra.

Kết quả

Hành vi cảm thụ đau

Có sự giảm đáng kể về mặt thống kê về sự loạn cảm đau do tác động vào xúc giác khi điều trị bằng kháng thể GFR α 3 sau DMM F(2, 27)=21,68, p=0,0001, Fig. 8).

Kết luận

Việc điều trị bằng các kháng thể GFR α 3 của chuột nhắt có tác dụng đáng kể về mặt thống kê đối với sự loạn cảm đau do tác động vào xúc giác, cho nên các nhóm được điều trị bằng hai kháng thể GFR α 3 thể hiện ổn định sự loạn cảm đau ít hơn so với đối chứng kiểu tương đương sau khi bắt đầu điều trị hàng tuần 14 ngày. Dữ liệu này cho thấy các kháng thể GFR α 3 có thể có hiệu lực kháng đau do thoái hóa khớp mãn tính ở người.

Ví dụ 16: Phân tích cạnh tranh chéo của các kháng thể kháng GFR α 3

Thử nghiệm cạnh tranh chéo đã được tiến hành nhằm đánh giá khả năng của các kháng thể lựa chọn để chúng cạnh tranh với nhau liên kết với GFR α 3 của người bằng cách sử dụng cảm biến sinh học Octet RED384 (ForteBio Inc.). Toàn bộ thử nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ 25°C, với tốc độ dòng là 1.000 vòng/phút trong dung dịch đệm Octet HBST (HEPES 0,01M pH 7,4, NaCl 0,15M, EDTA 3mM, chất hoạt động bề mặt P20 0,05% thể tích/thể tích, BSA 0,1 mg/ml). Để đánh giá xem 2 kháng thể có thể cạnh tranh với nhau liên kết vào các biểu vị tương ứng của chúng hay không trên GFR α 3 của người tái tổ hợp biotin hoá được biểu hiện với dấu myc-myc-hexahistidin tận cùng C (biotin-hGFR α 3-mmH; SEQ ID:370), thì trước hết khoảng 1,2nm biotin-hGFR α 3-mmH được bắt cho liên kết vào các đầu cảm biến Octet phủ streptavidin (ForteBio Inc, # 18-5019) bằng cách nhúng các đầu này vào dung dịch của biotin-hGFR α 3-mmH có nồng độ 10 μ g/ml trong khoảng thời gian 1 phút. Các đầu cảm sau đó được nhúng vào các giếng có chứa dung dịch kháng thể đơn dòng kháng GFR α 3 thứ nhất 25 μ g/ml trong thời gian 4 phút để làm bão hoà bề mặt bằng biotin-hGFR α 3-mmH. Các đầu cảm biến tiếp sau đó đã được nhúng vào các giếng chứa dung dịch kháng thể đơn dòng kháng GFR α 3 thứ hai 25 μ g/ml. Các đầu cảm biến được rửa trong dung dịch đệm Octet HBST giữa mỗi bước của thử nghiệm. Đáp ứng liên kết theo thời gian thực được theo dõi trong tiến trình thực nghiệm và đáp ứng liên kết khi kết thúc mỗi bước đã được ghi lại như được trình bày trong Fig. 9. Đáp ứng liên kết của mAb-2 với biotin-hGFR α 3-mmH tạo phức trước với kháng thể thứ

nhất được so sánh và hành vi cạnh tranh hoặc không cạnh tranh của các kháng thể đơn dòng kháng GFR α 3 khác nhau được xác định.

Như được trình bày trong Fig. 9, các ô màu xám đậm với phông chữ màu đen biểu diễn đáp ứng liên kết tự cạnh tranh. Các kháng thể cạnh tranh theo cả hai hướng, độc lập với trình tự liên kết, được biểu diễn bằng các ô màu đen với phông chữ màu trắng. Không có sự cạnh tranh giữa các kháng thể, mà cho thấy biểu vị liên kết riêng biệt được biểu diễn bằng các ô màu trắng với phông chữ màu đen.

Chín kháng thể (H4H2236N3, H4H2342P, H4H2295S, H4H2294S, H4H2291S, H4H2357S, H4H2355S, H4H2296S, và H4H2243N2) cạnh tranh với nhau theo hai hướng để liên kết với biotin-hGFR α 3-mmH. Tám trong số 9 kháng thể đó (H4H2236N3, H4H2342P, H4H2295S, H4H2294S, H4H2291S, H4H2357S, H4H2355S, và H4H2296S) không cạnh tranh với kháng thể kháng GFR α 3 khác bất kỳ được thử nghiệm, trong khi H4H2243N2 cũng cạnh tranh theo hai hướng với hai kháng thể kháng GFR α 3 khác được thử nghiệm (H4H2212N và H4H2352S). Các kháng thể H4H2212N và H4H2352S cạnh tranh với nhau theo hai hướng và cạnh tranh với kháng thể H4H2243N2 để liên kết với biotin-hGFR α 3-mmH, mà trong khi đó thì kháng thể H4H2212N không cạnh tranh với kháng thể kháng GFR α 3 khác bất kỳ được thử nghiệm, kháng thể H4H2352S cũng cạnh tranh theo hai hướng với một kháng thể kháng GFR α 3 bổ sung được thử nghiệm (H4H2292S). Một kháng thể kháng GFR α 3 được thử nghiệm, là H4H2350P, không cạnh tranh với bất kỳ kháng thể nào trong các kháng thể kháng GFR α 3 được thử nghiệm để liên kết vào biotin-hGFR α 3-mmH.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với GFR α 3 của người, trong đó kháng thể này chứa ba CDR chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) và ba CDR chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) được chứa trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 381/389 và 397/405.
2. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/266, 274/282, 290/298, 306/314, 322/330, 338/346, 354/362, 381/389 và 397/405.
3. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 50/58, 146/154, 210/218 và 290/298.
4. Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này có một hoặc nhiều đặc điểm sau:
 - (i) có K_D nằm trong khoảng từ 10^{-8} M đến khoảng 10^{-13} M khi được đo bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt;
 - (ii) biểu hiện khả năng phong bế khoảng 50-100% sự liên kết của GFR α 3 với phối tử của nó, artemin, với trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 40pM đến 15nM;
 - (iii) biểu hiện khả năng phong bế khoảng từ 20% đến khoảng 100% sự liên kết của GFR α 3 vào giá thể rắn được phủ hỗn hợp gồm artemin và thụ thể RET;
 - (iv) phong bế hoặc ức chế sự hoạt hoá phụ thuộc artemin của thụ thể RET, với trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 200pM đến khoảng 50nM;

(v) ức chế hoặc làm giảm một hoặc nhiều đáp ứng cảm thụ đau trên mô hình đau do ung thư xương *in vivo*;

(vi) ức chế hoặc làm giảm chứng tăng cảm giác đau với nhiệt mẫn cảm với artemin *in vivo*;

(vii) ức chế hoặc làm giảm loạn cảm đau trên mô hình thoái hóa khớp *in vivo*; hoặc

(viii) không phản ứng chéo với các đồng thụ thể GFR khác đối với thụ thể RET.

5. Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó:

(a) kháng thể này được chọn từ nhóm bao gồm kháng thể thể khảm và kháng thể người, và/hoặc;

(b) trong đó kháng thể không phản ứng chéo với GFR α 1 của người hoặc GFR α 2 của người, và/hoặc;

(c) trong đó kháng thể là kháng thể đơn dòng của người chứa (a) vùng biến đổi của chuỗi nặng (HCVR- heavy chain variable region) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 274, 290, 306, 322, 338, 354, 381 và 397; và (b) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (LCVR- light chain variable region) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362, 389 và 405.

6. Kháng thể đơn dòng được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó:

(a) kháng thể này biểu hiện khả năng phong bế khoảng 50-95% sự liên kết của GFR α 3 của người vào phối tử của nó, artemin, với trị số IC₅₀ nằm trong khoảng từ 40pM đến khoảng 750pM;

(b) kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó phong bế khoảng 75-100% sự liên kết của GFR α 3 của người vào phối tử của nó, artemin, với trị số IC₅₀ nằm trong khoảng từ 400pM đến khoảng 15nM;

(c) kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó phong bế hoặc ức chế sự hoạt hoá phụ thuộc artemin đối với thụ thể RET của người, với trị số IC₅₀ nằm trong khoảng từ 300pM đến khoảng 5nM; hoặc

(d) kháng thể này hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó phong bế hoặc ức chế sự hoạt hoá phụ thuộc artemin đối với thụ thể RET của khỉ cynomolgus, với trị số IC_{50} nằm trong khoảng từ 0,7nM đến khoảng 2,5nM.

7. Phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6.

8. Vector biểu hiện chứa phân tử axit nucleic theo điểm 7.

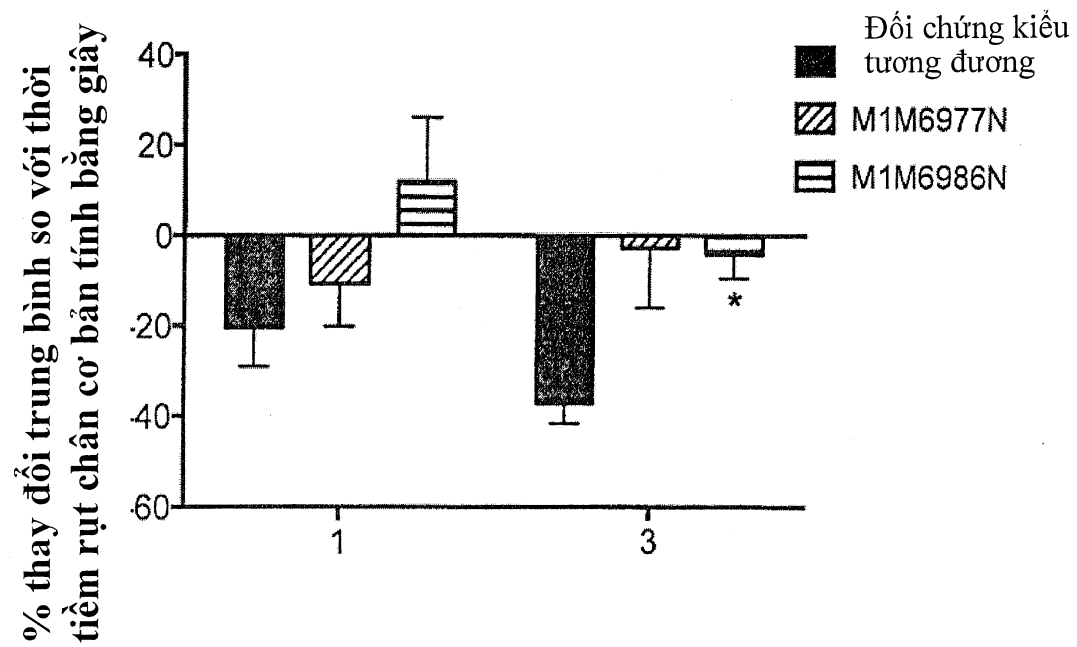
9. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng $GFR\alpha 3$ hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm các bước đưa vector biểu hiện theo điểm 8 vào tế bào chủ được phân lập, nuôi cấy tế bào này ở các điều kiện cho phép sản xuất ra kháng thể hoặc mảnh của nó, và thu lấy kháng thể được sản xuất ra.

10. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.

11. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6 và chất điều trị thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm opioit, chất ức chế COX-2, thuốc gây tê tại chỗ, chất điều biến NMDA, chất chủ vận thụ thể canabinoit, chất điều biến họ P2X, chất đối kháng VR1, chất đối kháng chất P, chất đối kháng $GFR\alpha 3$ thứ hai, chất đối kháng xytokin hoặc đối kháng thụ thể xytokin, chất ức chế thành phần tăng trưởng thần kinh (NGF- nerve growth factor) (chất ức chế phân tử nhỏ hoặc kháng thể kháng NGF), chất ức chế BDNF, TrkA, TrkB hoặc p75, aspirin, NSAID, steroid, mocfin, chất ức chế tái hấp thu serotonin chọn lọc (SSRI-selective serotonin reuptake inhibitor), chất ức chế tái hấp thu serotonin norepinephrin (SNRI- serotonin norepinephrine reuptake inhibitor), hợp chất ba vòng, chất ức chế kênh natri cổng điện áp (Na_v), chất ức chế kênh canxi, chất ức chế kênh kali, chất ức chế thành phần hoại tử khối u (TNF- tumor necrosis factor) hoặc chất ức chế thụ thể TNF, chất ức chế TWEAK (chất kích thích WEAK sự chết theo chương trình có liên quan đến TNF), chất ức chế thụ thể RET, chất ức chế phối tử họ GDNF, chất ức chế $GFR\alpha 1$, $GFR\alpha 2$ hoặc $GFR\alpha 4$, chất ức chế kênh ion mẫn cảm với axit (ASIC1 hoặc ASIC3), chất chống co giật (gabapentin hoặc pregabalin), chất ức chế thụ thể prekinetixin (PROK1 và PROK2), chất ức chế caspaza, chất ức chế p38, chất ức chế IKK1/2, CTLA-4Ig và corticosteroid; và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng;

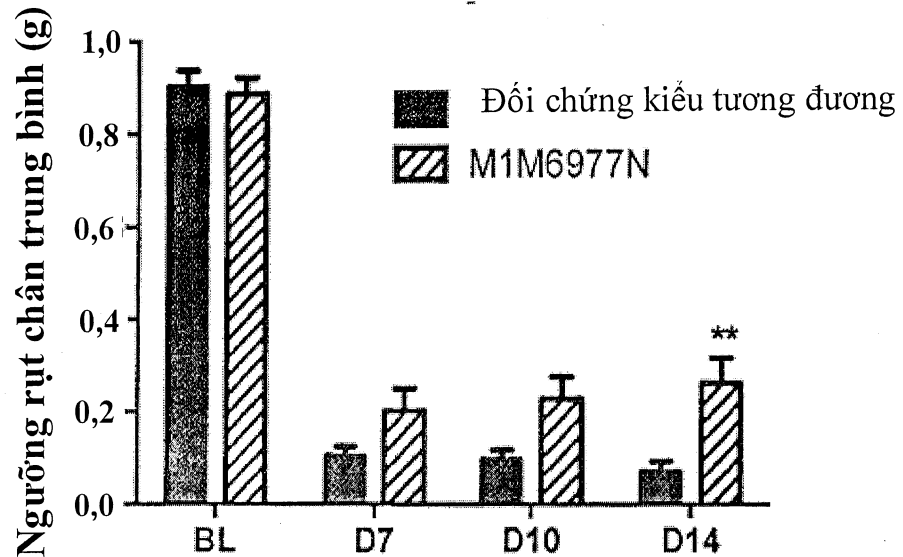
tùy ý trong đó chất đối kháng GFR α 3 thứ hai là phân tử hữu cơ nhỏ, chất đối kháng polypeptit, kháng thể thứ hai đặc hiệu với GFR α 3, siARN hoặc phân tử đối nghĩa đặc hiệu với GFR α 3; hoặc trong đó chất đối kháng xytokin hoặc đối kháng thụ thể xytokin là chất đối kháng interleukin-1 (IL-1), chất đối kháng IL-6, hoặc chất đối kháng IL-18.

12. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1, kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này chứa trình tự axit amin HCDR1 có SEQ ID NO: 148; và trình tự axit amin HCDR2 có SEQ ID NO: 150; trình tự axit amin HCDR3 có SEQ ID NO: 152; trình tự axit amin LCDR1 có SEQ ID NO: 156; trình tự axit amin LCDR2 có SEQ ID NO: 158; và trình tự axit amin LCDR3 có SEQ ID NO: 160.

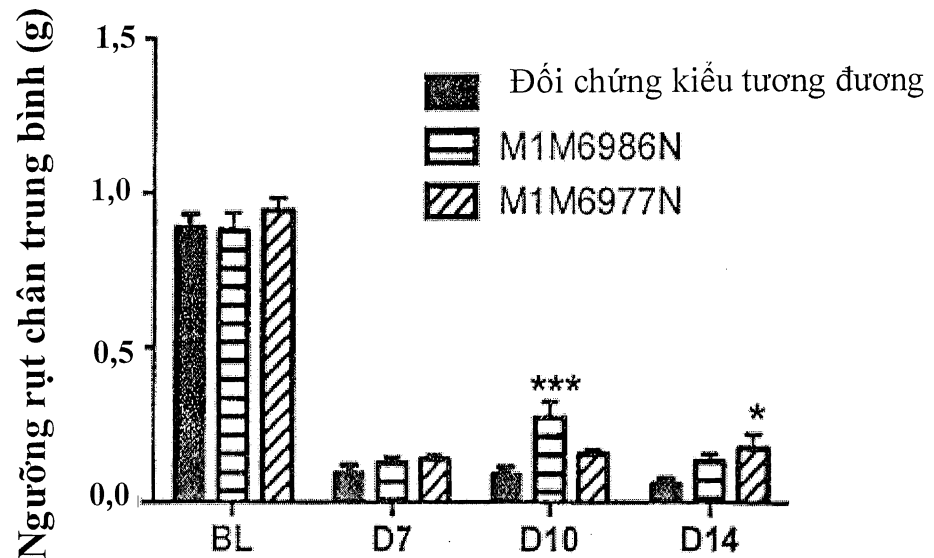


Ngày sau khi tiêm capsaixin

Fig. 1

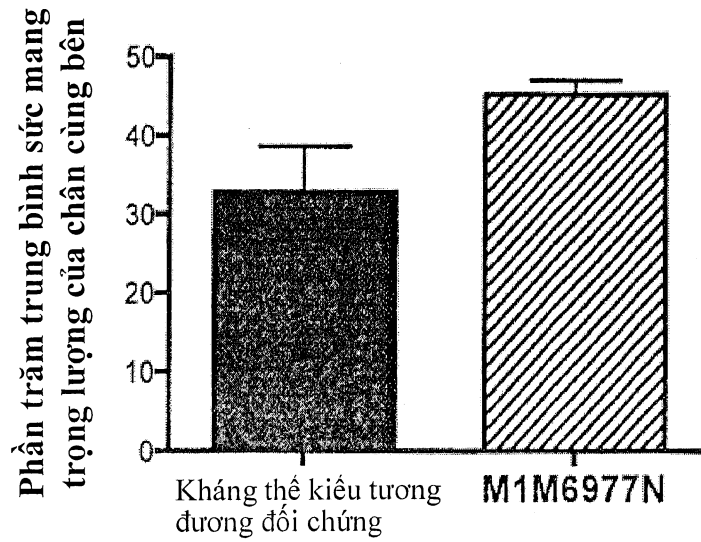
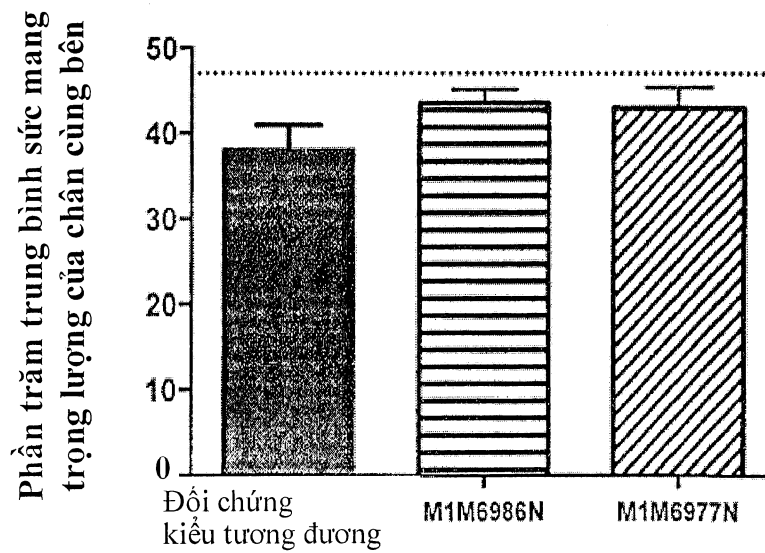
A.**Loạn cảm đau**

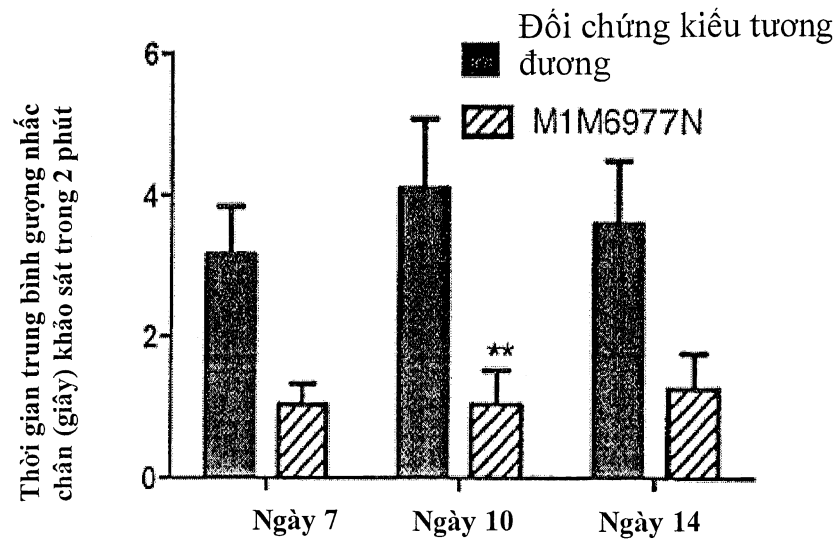
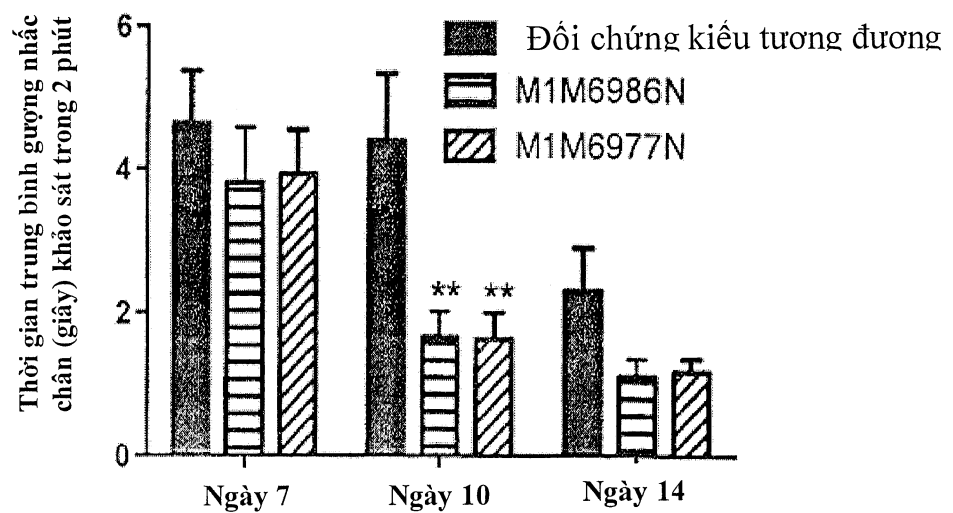
Ghi chú: BL - thời gian chờ rút chân cơ sở

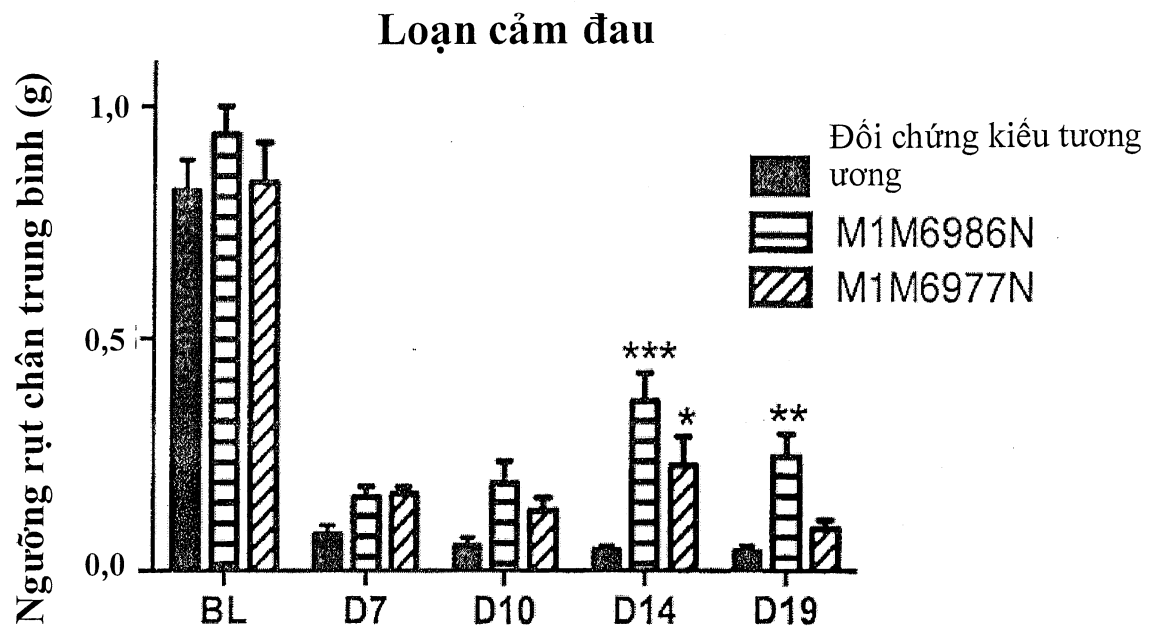
B.**Loạn cảm đau**

Ghi chú: BL - thời gian chờ rút chân cơ sở

Fig. 2

A.**Sức mang trọng lượng****B.****Sức mang trọng lượng****Fig. 3**

A.**Sự gượng nhấc chân****B.****Sự gượng nhấc chân****Fig. 4**

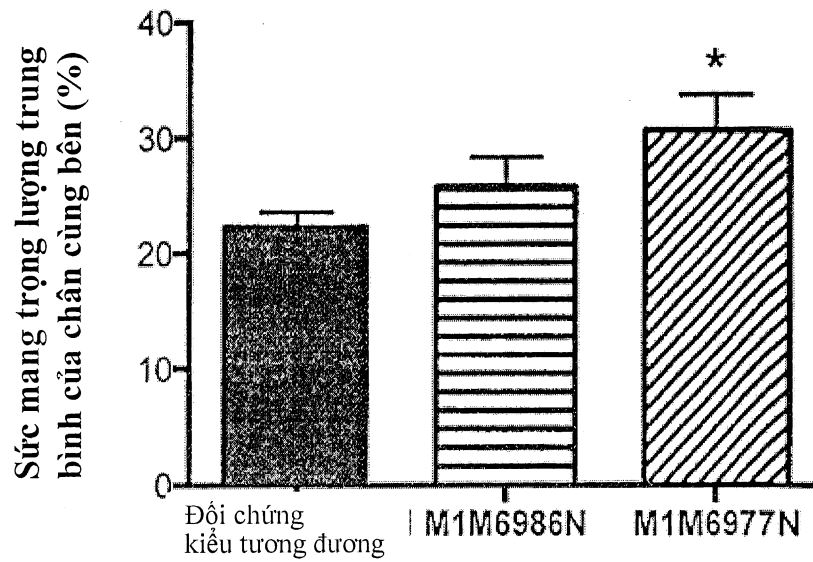


Ghi chú: BL - thời gian chờ rứt chân cơ sở

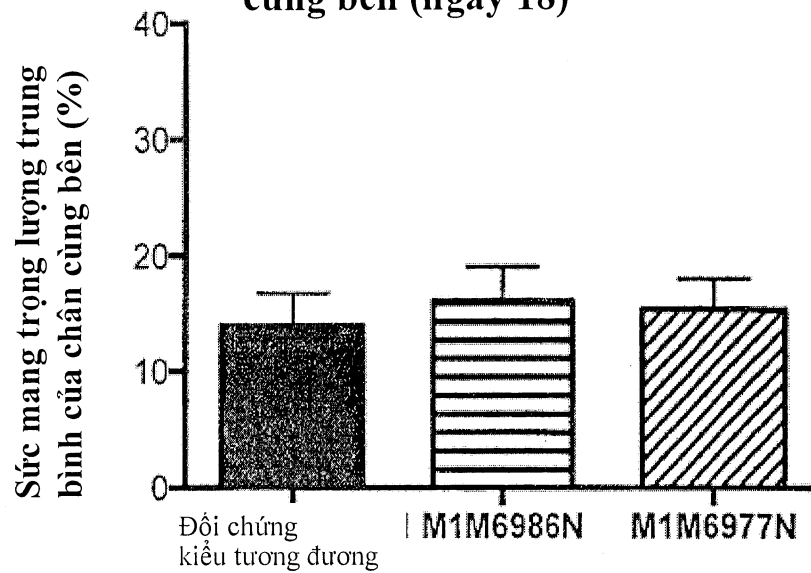
Fig 5

A.

**Phần trăm trọng lượng trên chân
cùng bên (ngày 11)**

**B.**

**Phần trăm trọng lượng trên chân
cùng bên (ngày 18)**

**Fig. 6**

Sự gượng nhấc chân

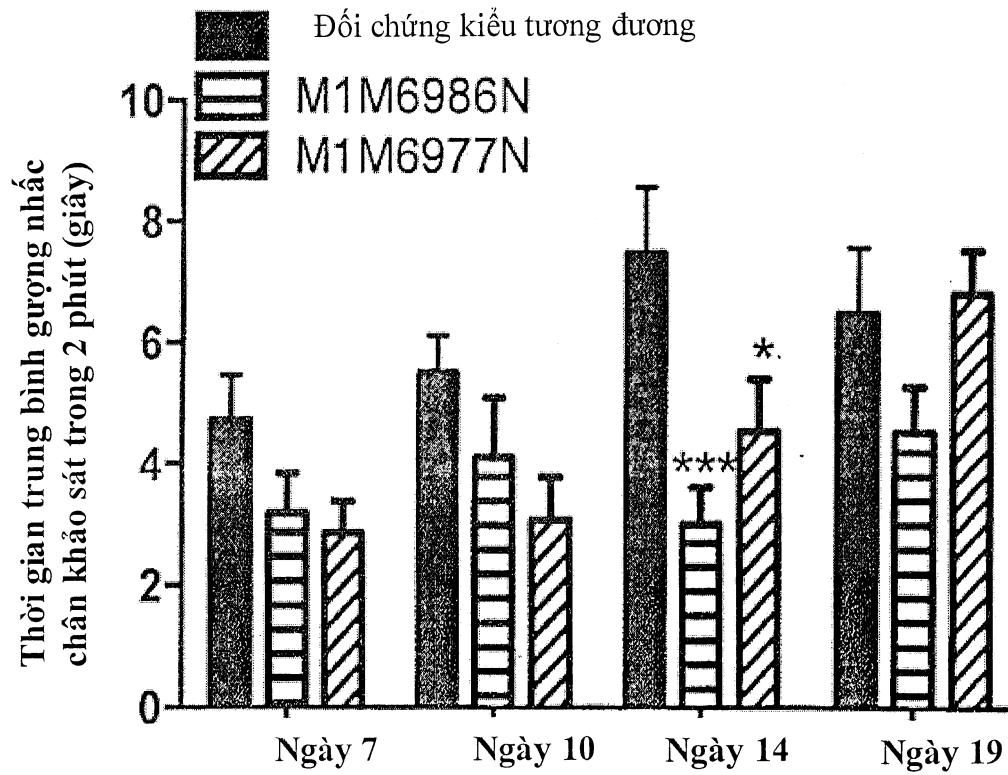


Fig. 7

Loạn cảm đau do tác động vào xúc giác

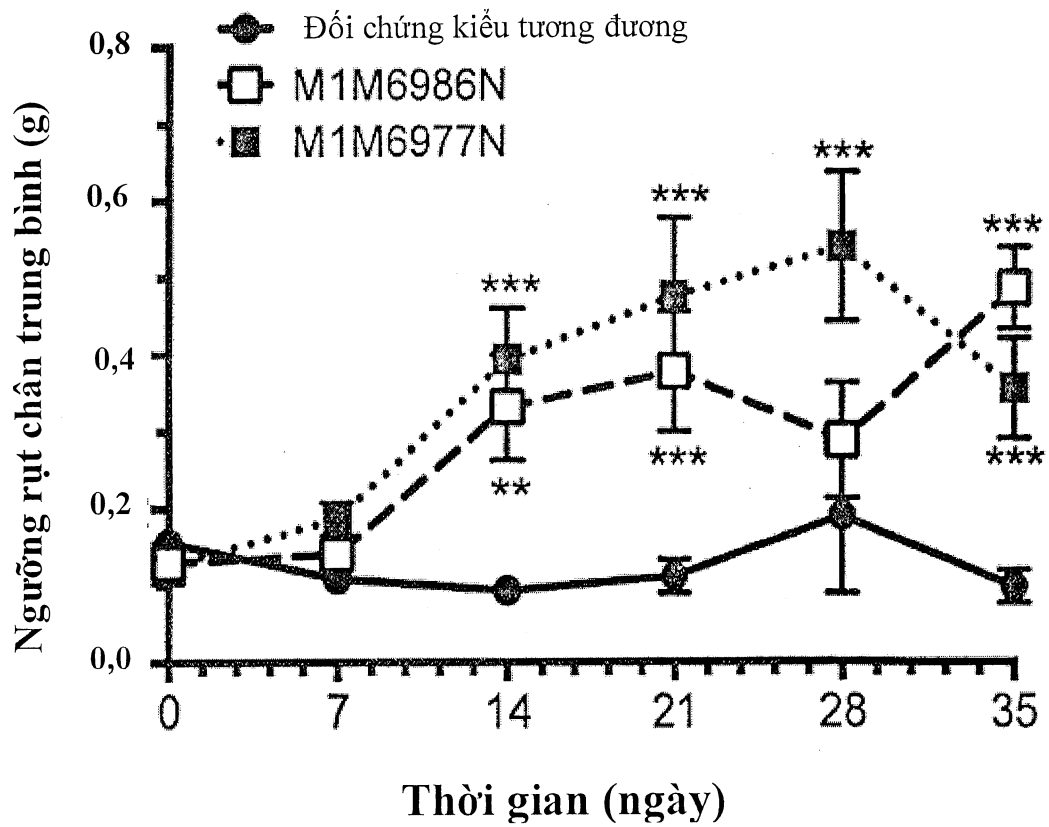


Fig. 8

Fig. 9

Kháng thể	Biotin – GFRα3 người bị bất (nm)	Lượng Kháng thể I bị liên kết (nm)	H4H2236N3	H4H2342P	H4H2296S	H4H2294S	H4H2291S	H4H2357S	H4H2355S	H4H2296S	H4H2243N2	H4H2212N	H4H2352S	H4H2292S	H4H2350P
H4H2236N3	1.07 ± 0.08	2.64 ± 0.18	0.00	-0.01	0.03	0.00	0.06	0.04	0.00	0.02	0.02	1.79	1.91	1.81	1.35
H4H2342P	1.09 ± 0.08	2.69 ± 0.17	0.20	0.06	0.31	0.23	0.45	0.25	0.16	0.28	0.11	1.76	1.72	1.85	1.46
H4H2295S	1.14 ± 0.15	2.83 ± 0.27	0.01	0.01	0.05	0.02	0.20	0.05	0.02	0.07	0.01	1.81	1.85	1.80	1.35
H4H2294S	1.22 ± 0.04	2.91 ± 0.09	0.05	0.01	0.04	0.02	0.12	0.03	0.00	0.04	0.03	1.92	1.99	1.92	1.42
H4H2291S	1.16 ± 0.04	2.89 ± 0.08	0.01	-0.01	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	-0.01	0.00	1.96	2.03	1.94	1.44
H4H2357S	1.15 ± 0.03	2.82 ± 0.07	0.04	-0.01	0.12	0.05	0.18	0.04	0.00	0.06	0.01	1.90	2.00	1.92	1.35
H4H2355S	1.15 ± 0.03	2.73 ± 0.07	0.18	0.06	0.20	0.16	0.31	0.16	0.07	0.18	0.09	1.95	1.97	1.92	1.44
H4H2296S	1.29 ± 0.13	2.88 ± 0.23	0.07	0.03	0.05	0.04	0.18	0.05	0.02	0.07	0.06	1.76	2.01	1.87	1.27
H4H2243N2	1.10 ± 0.08	2.42 ± 0.17	0.30	0.15	0.39	0.29	0.52	0.32	0.24	0.33	0.06	0.22	0.46	1.70	1.20
H4H2212N	1.09 ± 0.08	2.32 ± 0.15	2.14	2.17	2.15	2.12	2.69	2.38	2.05	2.36	0.16	0.05	0.08	1.76	1.36
H4H2352S	1.15 ± 0.03	2.74 ± 0.16	2.15	2.08	2.31	2.25	2.63	2.45	2.12	2.35	0.13	0.05	0.10	0.15	1.43
H4H2292S	1.17 ± 0.04	2.82 ± 0.08	2.24	2.16	2.31	2.31	2.81	2.43	2.07	2.36	1.91	1.78	0.34	0.11	1.53
H4H2350P	1.09 ± 0.07	3.31 ± 0.15	1.98	1.80	2.05	2.00	2.57	2.23	1.77	2.10	1.72	1.57	2.06	1.74	0.25

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI GFR α 3 CỦA NGƯỜI VÀ ĐƯỢC PHÂN CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 8300A-WO

<140>Được phân bổ

<141>Được nộp theo

<150> 61/692,029

<151> 2012-08-22

<160> 411

<170> FastSEQ cho Windows Phiên bản 4.0

<210> 1

<211> 360

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 1

```
gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttaat gattatgccca tgcactgggt ccggcaagct 120
ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagtggga atagtggtaa cataggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctacagatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt atttctgtgc aagagatacc 300
cgtatggcaa ctctgtccctt tgactactgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca 360
```

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 2

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

115

120

<210> 3
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 3
 ggattcacct ttaatgatta tgcc

24

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 4
 Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 5
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 5
 attagttgga atagtggttaa cata

24

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 6
 Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asn Ile
 1 5

<210> 7
 <211> 39
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 7
 gcaagagata cccgtatggc aactcgtccc ttgactac

39

<210> 8
 <211> 13
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 8
 Ala Arg Asp Thr Arg Met Ala Thr Arg Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 9
 <211> 318
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 9
 gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtca gagtattagt aggtgggttg cctggatatca gcagaagcca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgattttg caagttatta ctgccaacag tataatagtt attcaacttt tggccagggg 300
 accaagctgg agatcaaa 318

<210> 10
 <211> 106
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

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

<210> 11
 <211> 18
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 11
cagagtatta gtaggtgg

18

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 12
Gln Ser Ile Ser Arg Trp
1 5

<210> 13
<211> 9
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 13
aaggcgtct

9

<210> 14
<211> 3
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 14
Lys Ala Ser
1

<210> 15
<211> 24
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 15
caacagtata atagttattc aact

24

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 16

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Thr
1 5

<210> 17
<211> 360
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 17
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccagggt 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta gtgggtggcag cacatacaac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ttgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagattct 300
gggacctact ggtactactt tgactactgg ggccaggga tcttggtcac cgtctcctca 360

<210> 18
<211> 120
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 18
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Ser Gly Thr Tyr Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 24
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 19
ggattcacct ttagcagcta tgcc

24

<210> 20
<211> 8
<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 20

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1

5

<210> 21

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 21

attagtggtgta gtggtggcag caca

24

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 22

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr

1

5

<210> 23

<211> 39

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 23

gcgaaagatt ctgggaccta ctggtactac tttgactac

39

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 24

Ala Lys Asp Ser Gly Thr Tyr Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1

5

10

<210> 25

<211> 339

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 25

```

gacatcgtga tgacccagtc tccagaactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
atcaactgca agtccagcca gaatatTTTA tacagctccg acaataagaa ctacttagct 120
tggtaccaga agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccgca 180
gaatccggggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
atcatcagcc tgcaggctga agatgtggca ttatattact gtcatcaata ttatactact 300
cctccgacgt tcggccaagg gaccaaagtg gaaatcaaa 339

```

<210> 26

<211> 113

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 26

```

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

```

<210> 27

<211> 36

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 27

cagaatatTTT tatacagctc cgacaataag aactac

36

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 28

```

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

```

<210> 29
 <211> 9
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 29
 tgggcatct

9

<210> 30
 <211> 3
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 30
 Trp Ala Ser
 1

<210> 31
 <211> 27
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 31
 catcaatatt atactactcc tccgacg

27

<210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 32
 His Gln Tyr Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 33
 <211> 369
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 33
 gaggtgcagt tattggagtc tggggggaac ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agttatgcca tgacctgggt ccgccagggt 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaact attagtggta gtggtaccag cacatattac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagggaca attccagga cacggtgttt 240
 ctacaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgttc gaaaccttct 300
 gcattacgat ttttacattg gtttagctatg gacgtctggg gccaaaggac cctgggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 34
 <211> 123
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

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

<210> 35
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 35
 ggattcacct ttagcagtta tgcc 24

<210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 36
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 37
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 37

attagtggtta gtggtaccag caca

24

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 38

Ile Ser Gly Ser Gly Thr Ser Thr

1

5

<210> 39

<211> 48

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 39

tcgaaacctt ctgcattacg attttttacat tggtagcta tggacgtc

48

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 40

Ser Lys Pro Ser Ala Leu Arg Phe Leu His Trp Leu Ala Met Asp Val

1

5

10

15

<210> 41

<211> 321

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 41

gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ttgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgctc gggcgagtca ggacattagg aattatttag actggtttca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccaatt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcggcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaacag cctgcagcct 240
 gaagattttg taacttatta ctgccagcag tataattctt accctcccac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 42

<211> 107

<212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 42
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Phe Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asp Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Gly Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 43
 <211> 18
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 43
 caggacatta ggaattat

18

<210> 44
 <211> 6
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 44
 Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
 1 5

<210> 45
 <211> 9
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 45
 gctgcatcc

9

<210> 46
 <211> 3
 <212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 46

Ala Ala Ser

1

<210> 47

<211> 27

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 47

cagcagtata attccttacc tccact

27

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 48

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr

1

5

<210> 49

<211> 372

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 49

caggttcaac tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg cttctgggta cacctttacc agctatggta tcctctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgggt acaatggtaa cacaaactat 180
 gcacagaatc tccagggcag agtcaccatg accacagaca cttccacgac cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagatggggg 300
 atagcaactc gtccctacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 50

<211> 124

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 50

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

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

<210> 51
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 51
 ggttacacct ttaccagcta tggc

24

<210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 52
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 53
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 53
 atcagcggtt acaatggtaa caca

24

<210> 54
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 54

Ile Ser Gly Tyr Asn Gly Asn Thr
1 5

<210> 55

<211> 51

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 55

gcgagatggg gtatagcaac tcgtccctac tactactacg gtatggacgt c 51

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 56

Ala Arg Trp Gly Ile Ala Thr Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 57

<211> 321

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 57

gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca ggacattacc aattatttag cctggtttca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctccac tttcgccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 58

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 Ile Thr Asn Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

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

<210> 59
 <211> 18
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 59
 caggacatta ccaattat

18

<210> 60
 <211> 6
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 60
 Gln Asp Ile Thr Asn Tyr
 1 5

<210> 61
 <211> 9
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 61
 gctgcatcc

9

<210> 62
 <211> 3
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 62
 Ala Ala Ser
 1

<210> 63
 <211> 27
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 63

caacagtata atagttaccc tcccact

27

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 64

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr

1

5

<210> 65

<211> 363

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 65

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc cggggggggtc cctgagagtc 60
 tctgtgcag cctctggatt caccttttagc acctctgcc tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggcttgagtg ggtctcaggt attagtggt ttggaggtgg tagcacatac 180
 tacgcagact ccgtgaaggg ccggttcacc atctccagag acaattccaa gaacacgctg 240
 tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggccg tatatttctg tgcgaaattt 300
 tataagtgga attcatatat ttttgatctc tggggccagg ggacaatggt caccgtctct 360
 tca 363

<210> 66

<211> 121

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 66

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

115

120

<210> 67
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 67
 ggattcacct ttagcacctc tgcc

24

<210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 68
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser Ala
 1 5

<210> 69
 <211> 27
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 69
 attagtggta ttggaggtgg tagcaca

27

<210> 70
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 70
 Ile Ser Gly Ile Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 71
 <211> 39
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 71
 gcgaaatttt ataagtggaa ttcatatatt tttgatctc

39

<210> 72
 <211> 13
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 72
 Ala Lys Phe Tyr Lys Trp Asn Ser Tyr Ile Phe Asp Leu
 1 5 10

<210> 73
 <211> 321
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 73
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccagacacc ctatctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagt agcagctact ttgcctggta ccagcagaag 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatgtat agtgcaccca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtggt gtctggggaca gacttctctc tcaccatcag cagattggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtta ttactgtcag cagtatggta ggtcactcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 74
 <211> 107
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 74
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Met Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 75
 <211> 21
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 75

cagagtgtta gtagcagcta c

21

<210> 76

<211> 7

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 76

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr

1

5

<210> 77

<211> 9

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 77

agtgcatcc

9

<210> 78

<211> 3

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 78

Ser Ala Ser

1

<210> 79

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 79

cagcagtatg gtaggtcact cact

24

<210> 80

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 80

Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Leu Thr

1

5

<210> 81

<211> 360

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 81

gaggtgcagc tgttgaggatc tgggggaggc ttggtacagt ctgggggggtc actgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cagctttaac aactatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatatt attagtggta gtggtggtag tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa tacgctgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agtcgaggac acggccgttt tttactgtgc gaaagacaga 300
 tacaactatg gtaccttctt tgactactgg ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca 360

<210> 82

<211> 120

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 82

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

<210> 83

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 83

ggattcagct ttaacaacta tgcc

24

<210> 84
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 84
 Gly Phe Ser Phe Asn Asn Tyr Ala
 1 5

<210> 85
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 85
 attagtggtgta gtggtggttag taca

24

<210> 86
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 86
 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 87
 <211> 39
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 87
 gcgaaagaca gatacaacta tggtagcttc tttgactac

39

<210> 88
 <211> 13
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 88
 Ala Lys Asp Arg Tyr Asn Tyr Gly Thr Phe Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 89
 <211> 339
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 89
 gacatcgatga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctggggcga gagggccacc 60
 atcaactgca aatccagcca gagtggttta tacagctcca acaataagaa ctacttaact 120
 tggtaccgagc agaaaccagg acagcctcct aaattgctca tttactgggc atctaccgg 180
 gaatccggggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300
 cctccgacgt tcggcctagg gaccaaggtg gaaatcaaa 339

<210> 90
 <211> 113
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

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

<210> 91
 <211> 36
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 91
 cagagtgttt tatacagctc caacaataag aactac

36

<210> 92
 <211> 12
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 92

Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 93

<211> 9

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 93

tgggcatct

9

<210> 94

<211> 3

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 94

Trp Ala Ser

1

<210> 95

<211> 27

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 95

cagcaatatt atagtactcc tccgacg

27

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 96

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Pro Thr

1

5

<210> 97

<211> 372

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 97

```

gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggagtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc aactatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attagtggta gtgggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatg tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaacccccg 300
agtagagcag ctcgatactt caactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

```

<210> 98

<211> 124

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 98

```

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

```

<210> 99

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 99

ggattcacct ttagcaacta tgcc

24

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 100

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
1 5

<210> 101
<211> 24
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 101
attagtggtgta gtggtggttag caca

24

<210> 102
<211> 8
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 102
Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 103
<211> 51
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 103
gcgaaacccc cgagtagagc agctcgatac ttcaactacg gtatggacgt c

51

<210> 104
<211> 17
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 104
Ala Lys Pro Pro Ser Arg Ala Ala Arg Tyr Phe Asn Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15
Val

<210> 105
<211> 321
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 105

```

gccatccgga tgacccagtc cccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctggtag cctggatatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttaacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgttcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

```

<210> 106
 <211> 107
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

```

<400> 106
Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
        50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
        65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe
          85           90           95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 107
 <211> 18
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

```

<400> 107
cagggattatta gcagctgg 18

```

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

<220>
 <223>Tổng hợp

```

<400> 108
Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1           5

```

<210> 109
 <211> 9
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 109

gctgcatcc

9

<210> 110

<211> 3

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 110

Ala Ala Ser

1

<210> 111

<211> 27

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 111

caacaggcta acagtttccc gttcact

27

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 112

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr

1

5

<210> 113

<211> 363

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 113

gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccgggcaagg ggctggagtg ggtgtcattt atatgggatg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgac agccgaggac acggctgtat attattgtgc gagaagaggt 300
 atcctaactg gaactaccgc ttttgatatc tggggccaag ggacaatggc caccgtctct 360
 tca 363

<210> 114
 <211> 121
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 114
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Ile Leu Thr Gly Thr Thr Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 115
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 115
 ggattcacct tcagtagcta tggc

24

<210> 116
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 116
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 117
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 117
atatggtatg atggaagtaa taaa

24

<210> 118
<211> 8
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 118
Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 119
<211> 42
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 119
gcgagaagag gtatcctaac tggaactacc gcttttgata tc

42

<210> 120
<211> 14
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 120
Ala Arg Arg Gly Ile Leu Thr Gly Thr Thr Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 121
<211> 321
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 121
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agttatttga attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatccggag tctgatacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag acttacaata cccattcac tttcggcct 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 122
<211> 107
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 122

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

<210> 123

<211> 18

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 123

cagagcatta gcagttat

18

<210> 124

<211> 6

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 124

Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
1				5	

<210> 125

<211> 9

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 125

gctgcatcc

9

<210> 126

<211> 3

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 126

Ala Ala Ser

1

<210> 127

<211> 27

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 127

caacagactt acaatacccc attcact

27

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 128

Gln Gln Thr Tyr Asn Thr Pro Phe Thr

1

5

<210> 129

<211> 363

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 129

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt cagtttcagt gactatgtca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcatct atatggtttg atggaagtaa tgaactctat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240
ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaaaaggga 300
gttttggttag ctacctctgc ttttcataatc tggggccaag ggacaatggg caccgtctct 360
tca 363

<210> 130

<211> 121

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 130

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

1

5

10

15

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

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

```
<210> 131
<211> 24
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Tổng hợp

```
<400> 131
ggattcagtt tcagtgacta tgtc
```

```
<210> 132
<211> 8
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 132
Gly Phe Ser Phe Ser Asp Tyr Val
1 5

```
<210> 133
<211> 24
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Tổng hợp

```
<400> 133
atatggtttg atggaagtaa tgaa
```

```
<210> 134
<211> 8
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Tổng hợp

```
<400> 134
Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu
  1                      5
```

<210> 135
 <211> 42
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 135
 gcgaaaaagg gagttttggg agctacctct gcttttcata tc 42

<210> 136
 <211> 14
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 136
 Ala Lys Lys Gly Val Leu Val Ala Thr Ser Ala Phe His Ile
 1 5 10

<210> 137
 <211> 324
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 137
 gccatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gaacattaac aactatttaa attggtatca tcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaatctcct aatttatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat tacactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg gaaattacta ctgtcaacag agttacagca cttccatgta cacttttggc 300
 caggggacca agctggagat caaa 324

<210> 138
 <211> 108
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 138
 Ala 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 Asn Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65		70		75		80									
Glu	Asp	Phe	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Ser	Met
				85					90					95	
Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 139
 <211> 18
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 139
 cagaacatta acaactat

18

<210> 140
 <211> 6
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 140
 Gln Asn Ile Asn Asn Tyr
 1 5

<210> 141
 <211> 9
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 141
 gctgcatcc

9

<210> 142
 <211> 3
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 142
 Ala Ala Ser
 1

<210> 143
 <211> 30
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 143
caacagagtt acagcacttc catgtacact

30

<210> 144
<211> 10
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 144
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Ser Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 145
<211> 372
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 145
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attagtggta gtggaggtag cacatactac 180
gcagacgccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagca cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtac gaaaccctca 300
tccttatagca gttcgaactt ctattatggt atggacgtct ggggccaagg gtccacggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 146
<211> 124
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 146
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ala Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys His Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Lys Pro Ser Ser Tyr Ser Ser Ser Asn Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Ser Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 147
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 147
 ggattcacct ttagcagcta tgcc

24

<210> 148
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 148
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 149
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 149
 attagtggta gtggaggttag caca

24

<210> 150
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 150
 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 151
 <211> 51
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 151
 acgaaaccct catcttatag cagttcgaac ttctattatg gtatggacgt c

51

<210> 152
 <211> 17

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 152

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

<210> 153

<211> 321

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 153

gacatccagt tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgctc gggcgagtca ggggtattagc agctggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcagcag actaacagtt tccattccc tttcggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 154

<211> 107

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 154

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

<210> 155

<211> 18

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 155
cagggtatta gcagctgg

18

<210> 156
<211> 6
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 156
Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 157
<211> 9
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 157
gctgcatcc

9

<210> 158
<211> 3
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 158
Ala Ala Ser
1

<210> 159
<211> 27
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 159
cagcagacta acagtttccc attccct

27

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 160
Gln Gln Thr Asn Ser Phe Pro Phe Pro

1

5

<210> 161

<211> 372

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 161

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagg ctgggggggtc cctgagactc 60
tctgtgttag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtgtag cacatactcc 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtac gaaaccctca 300
tcttatagca gctcgaactt ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

```

<210> 162

<211> 124

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 162

```

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

```

<210> 163

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 163

ggattcacct ttagcagcta tgcc

24

<210> 164

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 164

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1

5

<210> 165

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 165

attagtggta gtggtaggtag caca

24

<210> 166

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 166

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr

1

5

<210> 167

<211> 51

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 167

acgaaaccct catcttatag cagctcgaac ttctactacg gtatggacgt c

51

<210> 168

<211> 17

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 168

Thr Lys Pro Ser Ser Tyr Ser Ser Ser Asn Phe Tyr Tyr Gly Met Asp

1

5

10

15

Val

<210> 169

<211> 321

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 169

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc ggggtattag agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc taggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag actaacagtc tcccactcac tttcggccct 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321
```

<210> 170

<211> 107

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 170

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

<210> 171

<211> 18

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 171

cagggtatta gcagctgg

18

<210> 172

<211> 6

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 172

```
Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1           5
```

<210> 173
 <211> 9
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 173
 actgcatcc

9

<210> 174
 <211> 3
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 174
 Thr Ala Ser
 1

<210> 175
 <211> 27
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 175
 caacagacta acagtctccc actcact

27

<210> 176
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 176
 Gln Gln Thr Asn Ser Leu Pro Leu Thr
 1 5

<210> 177
 <211> 372
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 177
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagtt attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctacaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgttt attactgtgc gaaaccctca 300
 tottatagca gctcgaactt ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctctt ca 372

<210> 178
 <211> 124
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 178
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Pro Ser Ser Tyr Ser Ser Ser Asn Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 179
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 179
 ggattcacct ttagcagcta tgcc

24

<210> 180
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 180
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 181
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 181

attagtggta gtggtggttag caca

24

<210> 182

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 182

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr

1

5

<210> 183

<211> 51

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 183

gcgaaaccct catcttatag cagctcgaac ttctactacg gtatggacgt c

51

<210> 184

<211> 17

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 184

Ala Lys Pro Ser Ser Tyr Ser Ser Ser Asn Phe Tyr Tyr Gly Met Asp

1

5

10

15

Val

<210> 185

<211> 321

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 185

gacatcgatga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgctc gggcgagtc ggggtattag agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcgaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcaccag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacac actaacagtt tcccattcac ttcgggcct 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 186

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

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 186
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Thr Asn Ser Phe Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 187
 <211> 18
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 187
 cagggtatta gcagctgg

18

<210> 188
 <211> 6
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 188
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 189
 <211> 9
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 189
 gctgcatcc

9

<210> 190
 <211> 3

<212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 190
 Ala Ala Ser
 1

<210> 191
 <211> 27
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 191
 caacacacta acagtttccc attcact

27

<210> 192
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 192
 Gln His Thr Asn Ser Phe Pro Phe Thr
 1 5

<210> 193
 <211> 369
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 193
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggctgag gtgaagaagt ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcttgcaagg cttctggagg caccttcagc cgctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatccctc tctttggtac attaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacgctt accacggacg aatcaacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc ggtattttac 300
 tatggttcgg ggagttatcg caactggttc gacccctggg gccaggggaa cctgggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 194
 <211> 123
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 194

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

<210> 195

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 195

ggaggcacct tcagccgcta tgct

24

<210> 196

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 196

Gly Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Ala

1

5

<210> 197

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 197

atcatccctc tctttggtac atta

24

<210> 198

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 198

Ile Ile Pro Leu Phe Gly Thr Leu
1 5

<210> 199

<211> 48

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 199

gcgggtattttt actatgggttc ggggagttat cgcaactggt tcgacccc

48

<210> 200

<211> 16

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 200

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

<210> 201

<211> 321

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 201

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcatcagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcattccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacca ctgtcaacag agttacagta tcccgatcac cttcggccaa 300
gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 202

<211> 107

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 202

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 Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50		55		60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro				
65		70		75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Ile				
	85		90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys				
	100		105	

<210> 203
 <211> 18
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 203
 cagagcatca gcagctat

18

<210> 204
 <211> 6
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 204
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 205
 <211> 9
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 205
 gctgcatcc

9

<210> 206
 <211> 3
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 206
 Ala Ala Ser
 1

<210> 207
 <211> 27
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 207

caacagagtt acagtatccc gatcacc

27

<210> 208

<211> 9

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 208

Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Ile Thr

1

5

<210> 209

<211> 357

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 209

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc acctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggaatg ggtctcagct attcgtggta atgggtgttaa cacatactac 180
 ggagactcca tgaagggccg ttccaccatc tccagagaca attccaagga cacgctgtat 240
 ttgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaaataaa 300
 tgggagctgc tagtctttga atactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 210

<211> 119

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 210

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

<210> 211
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 211
 ggattcacct ttagcaccta tgcc

24

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

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 212
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala
 1 5

<210> 213
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 213
 attcgtggtgta atggtgttaa caca

24

<210> 214
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 214
 Ile Arg Gly Asn Gly Val Asn Thr
 1 5

<210> 215
 <211> 36
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 215
 gcgaaaaata aatgggagct gctagtcttt gaatac

36

<210> 216

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

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 216
 Ala Lys Asn Lys Trp Glu Leu Leu Val Phe Glu Tyr
 1 5 10

<210> 217
 <211> 318
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 217
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgagtca ggacattagc aattatttag cctggatatca gcagaaacca 120
 gggaaagttc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccat 180
 cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaag tataacagtg cccctccttt cggccctggg 300
 accaaagtgg atatcaaa 318

<210> 218
 <211> 106
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 218
 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 Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Phe Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Pro
 85 90 95
 Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 219
 <211> 18
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 219
caggacatta gcaattat

18

<210> 220
<211> 6
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 220
Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

<210> 221
<211> 9
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 221
gctgcatcc

9

<210> 222
<211> 3
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 222
Ala Ala Ser
1

<210> 223
<211> 24
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 223
caaaagtata acagtgtccc tcct

24

<210> 224
<211> 8
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 224

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Pro

1

5

<210> 225

<211> 363

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 225

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt cagtttcagt gactatgtca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcatct atatggtttg atggaagtaa tgaattctat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240
ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaaaaggga 300
gtggttgtag ctacctctgc ttttgatata tggggccaag ggacaatggg caccgtctct 360
tca

```

<210> 226

<211> 121

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 226

```

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

```

<210> 227

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 227

ggattcagtt tcagtgacta tgtc

24

<210> 228

<211> 8

<212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 228
 Gly Phe Ser Phe Ser Asp Tyr Val
 1 5

<210> 229
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 229
 atatggtttg atggaagtaa tgaa

24

<210> 230
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 230
 Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu
 1 5

<210> 231
 <211> 42
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 231
 gcgaaaaagg gagtggttggt agctacctct gcttttgata tc

42

<210> 232
 <211> 14
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 232
 Ala Lys Lys Gly Val Leu Val Ala Thr Ser Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 233
 <211> 324

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 233

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattaac aactatttaa attggtatca tcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct aatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat tacactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg gaaattacta ctgtcaacag agttacagaa cttccatgta cacttttggc 300
caggggacca aggtggaaat caaa 324

```

<210> 234

<211> 108

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 234

```

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

```

<210> 235

<211> 18

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 235

cagagcatta acaactat

18

<210> 236

<211> 6

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 236

Gln Ser Ile Asn Asn Tyr

1

5

<210> 237
 <211> 9
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 237
 gctgcatcc

9

<210> 238
 <211> 3
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 238
 Ala Ala Ser
 1

<210> 239
 <211> 30
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 239
 caacagagtt acagaacttc catgtacact

30

<210> 240
 <211> 10
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 240
 Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Ser Met Tyr Thr
 1 5 10

<210> 241
 <211> 360
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 241
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacggc ctggcaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat aattatgcc tgcactgggt ccggcaagtt 120
 ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attacttgga atagtgttag cctaggctat 180
 gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgcccagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaataga acagtctgag aactgtggac acggccttgt attactgtgc aaaagatagg 300
 tgggggtggaa gttactactt tgacttcttg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 242

<211> 120

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 242

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

<210> 243

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 243

ggattcacct ttgataatta tgcc

24

<210> 244

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 244

Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asn	Tyr	Ala
1					5		

<210> 245

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 245

attacttgga atagtgttag ccta

24

<210> 246

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 246

Ile Thr Trp Asn Ser Val Ser Leu

1

5

<210> 247

<211> 39

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 247

gcaaaagata ggtgggggtg aagttactac tttgacttc

39

<210> 248

<211> 13

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 248

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

1

5

10

<210> 249

<211> 318

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 249

gacatcgtga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgagtca gggcattagc aattatttag cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagttc ctaaacctcct gatctattct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
 cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa cctgcagcct 240
 gaagattttg caactttttt ctgtcaaaaag tataacagtg cccccacttt cggcgaggagg 300
 accaaggtg agatcaaa 318

<210> 250
 <211> 106
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 250
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Phe Phe Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 251
 <211> 18
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 251
 cagggcatta gcaattat

18

<210> 252
 <211> 6
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 252
 Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
 1 5

<210> 253
 <211> 9
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 253
 tctgcatcc

9

<210> 254

<211> 3
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 254
 Ser Ala Ser
 1

<210> 255
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 255
 caaaagtata acagtgtcccc cact

24

<210> 256
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 256
 Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Thr
 1 5

<210> 257
 <211> 363
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 257
 caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt cagtttcagt gactatgtca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcatct atatggtttg atggaagtaa tgaattctat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaaaaggga 300
 gtgttggttag ctacctctgc ttttgatatc tggggccaag ggacaatggg caccgtctct 360
 tca 363

<210> 258
 <211> 121
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 258

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

<210> 259

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 259

ggatttcagtt tcagtgacta tgtc

24

<210> 260

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 260

Gly Phe Ser Phe Ser Asp Tyr Val

1

5

<210> 261

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 261

atatgggttg atggaagtaa tgaa

24

<210> 262

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 262

Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu

1 5

<210> 263

<211> 42

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 263

gcgaaaaagg gagtgttggt agctacctct gcttttgata tc

42

<210> 264

<211> 14

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 264

Ala Lys Lys Gly Val Leu Val Ala Thr Ser Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 265

<211> 324

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 265

gaaattgtga tgacgcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattaac aactatttaa attggtatca tcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct aatctatgct gcacccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat tacactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg gaaattacta ctgtcaacag agttacagaa cttccatgta cacttttggc 300
 caggggacca aggtggagat caaaa 324

<210> 266

<211> 108

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 266

Glu Ile Val 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 Ser Ile Asn Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

<210> 267
 <211> 18
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 267
 cagagcatta acaactat

18

<210> 268
 <211> 6
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 268
 Gln Ser Ile Asn Asn Tyr
 1 5

<210> 269
 <211> 9
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 269
 gctgcatcc

9

<210> 270
 <211> 3
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 270
 Ala Ala Ser
 1

<210> 271
 <211> 30
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 271

caacagagtt acagaacttc catgtacact

30

<210> 272

<211> 10

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 272

Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Ser Met Tyr Thr

1

5

10

<210> 273

<211> 366

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 273

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt acttactact ggagctggtt ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caaccacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aaactgaggt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agtaggtccg 300
gtgggctggg gatcatgggg gaactttgac tactggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctca 366

<210> 274

<211> 122

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 274

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

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

<210> 275

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 275

gggtggctcca tcagtactta ctac

24

<210> 276

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 276

Gly Gly Ser Ile Ser Thr Tyr Tyr
1 5

<210> 277

<211> 21

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 277

atctattaca gtggggagcac c

21

<210> 278

<211> 7

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 278

Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 279

<211> 48

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 279

gcgagagtag gtccggtggg ctggggatca tgggggaact ttgactac

48

<210> 280
 <211> 16
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 280
 Ala Arg Val Gly Pro Val Gly Trp Gly Ser Trp Gly Asn Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 281
 <211> 321
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 281
 gacatccagt tgacccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggccagtca gggcattagc agttatttag cctggtctca gcaaaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tacaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag cttaatagtt acccgtggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 282
 <211> 107
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 282
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Ser Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 283
 <211> 18
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 283

cagggcatta gcagttat

18

<210> 284

<211> 6

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 284

Gln Gly Ile Ser Ser Tyr

1

5

<210> 285

<211> 9

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 285

gctgcatcc

9

<210> 286

<211> 3

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 286

Ala Ala Ser

1

<210> 287

<211> 27

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 287

caacagctta atagttaccc gtggacg

27

<210> 288

<211> 9

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 288

Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Trp Thr

1

5

<210> 289

<211> 360

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 289

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc aattatggta tcacctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggggtg atcagcgctt acaatggtaa caccggctat 180
 gcacagaaat tccagggcag agtcaccatg accacagaca cttccacgag cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagaggat 300
 tacgattttt ggagggcttt tgatatctgg ggccaaggga caatggtcac cgtctcttca 360

<210> 290

<211> 120

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 290

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

<210> 291

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 291

ggttacacct ttaccaatta tgggt

24

<210> 292

<211> 8

<212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 292
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
 1 5

<210> 293
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 293
 atcagcgctt acaatggtaa cacc

24

<210> 294
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 294
 Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr
 1 5

<210> 295
 <211> 39
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 295
 gcgagagagg attacgattt ttggagggct tttgatatc

39

<210> 296
 <211> 13
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 296
 Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Phe Trp Arg Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 297
 <211> 324
 <212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 297

```

gaaattgtgc tgactcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccggggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcacctact tagcctggct ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac cggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcaa cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtta ttattgtcaa cagtatgctt actcacgta cacttttggc 300
caggggacca agctggagat caaa 324

```

<210> 298

<211> 108

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 298

```

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

```

<210> 299

<211> 21

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 299

cagagtgtta gcagcaccta c

21

<210> 300

<211> 7

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 300

Gln Ser Val Ser Ser Thr Tyr

1

5

<210> 301
 <211> 9
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 301
 ggtgcatcc

9

<210> 302
 <211> 3
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 302
 Gly Ala Ser
 1

<210> 303
 <211> 27
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 303
 caacagtatg cttactcacc gtacact

27

<210> 304
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 304
 Gln Gln Tyr Ala Tyr Ser Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 305
 <211> 363
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 305
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt cagtttcagt gactatgtca tgcactgggt ccgccagggt 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcatct atatggtttg atggaagtaa tgaattctat 180

```
gcagactcgc tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240
ctgcaaataga acagtctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaaaaggga 300
gtgttggttag ctacctctgc ttttgataac tggggccaag ggacaatggc caccgtctct 360
tca 363
```

<210> 306
 <211> 121
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 306
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Lys Gly Val Leu Val Ala Thr Ser Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 307
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 307
 ggattcagtt tcagtgacta tgtc

24

<210> 308
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 308
 Gly Phe Ser Phe Ser Asp Tyr Val
 1 5

<210> 309
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 309

atatggtttg atggaagtaa tgaa

24

<210> 310

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 310

Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu

1

5

<210> 311

<211> 42

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 311

gcgaaaaagg gagtggttggt agctacctct gcttttgata tc

42

<210> 312

<211> 14

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 312

Ala Lys Lys Gly Val Leu Val Ala Thr Ser Ala Phe Asp Ile

1

5

10

<210> 313

<211> 324

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 313

gacatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattaac aactatttaa attggtatca tcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct aatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat tacactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg gaaattacta ctgtcaacag agttacagaa cttccatgta cacttttggc 300
 caggggacca agtggaat caaa 324

<210> 314

<211> 108

<212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 314
 Asp Ile Gln Leu 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 Ser Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Ser Met
 85 90 95
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 315
 <211> 18
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 315
 cagagcatta acaactat

18

<210> 316
 <211> 6
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 316
 Gln Ser Ile Asn Asn Tyr
 1 5

<210> 317
 <211> 9
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 317
 gctgcatcc

9

<210> 318
 <211> 3

<212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 318
 Ala Ala Ser
 1

<210> 319
 <211> 30
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 319
 caacagagtt acagaacttc catgtacact

30

<210> 320
 <211> 10
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 320
 Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Ser Met Tyr Thr
 1 5 10

<210> 321
 <211> 360
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 321
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccagggt 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtg gtggtgataa tacatataac 180
 gcagagtccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa tatgtttgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaacaaag 300
 ttttagcagct cgttgctctt tgactactgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 322
 <211> 120
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 322
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

<210> 323

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 323

ggattcacct ttagcagcta tgcc

24

<210> 324

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 324

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1

5

<210> 325

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 325

attagtggtgta gtggtgataa taca

24

<210> 326

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 326

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr
 1 5

<210> 327

<211> 39

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 327

gcgaaaacaa agtttagcag ctcgttgctc tttgactac

39

<210> 328

<211> 13

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 328

Ala Lys Thr Lys Phe Ser Ser Ser Leu Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 329

<211> 318

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 329

gacatcgatga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtc gagtattagt tgggtggttg cctggatatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtgatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgatatttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attccacttt cggcggaggg 300
 accaagctgg agatcaaaa 318

<210> 330

<211> 106

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 330

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

50						55						60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
65					70					75				80			
Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Ser	Thr		
				85					90					95			
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys								
				100				105									

<210> 331
 <211> 18
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 331
 cagagtatta gttggtgg

18

<210> 332
 <211> 6
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 332
 Gln Ser Ile Ser Trp Trp
 1 5

<210> 333
 <211> 9
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 333
 aaggcgtct

9

<210> 334
 <211> 3
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 334
 Lys Ala Ser
 1

<210> 335
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 335

caacagtata atagttattc cact

24

<210> 336

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 336

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Thr

1

5

<210> 337

<211> 372

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 337

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tctgtgtcag cctctacatt caccttttagc agctatgccca tgacctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggtctggagtg ggtctcaagt attagtggta gtggtgatag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaaaggat 300
 gggcctggga ggtattacgt gaggtacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 338

<211> 124

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 338

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

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

<210> 339

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 339

acattcacct ttagcagcta tgcc

24

<210> 340

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 340

Thr Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1

5

<210> 341

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 341

attagtggtga gtggtgatag caca

24

<210> 342

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 342

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Ser Thr

1

5

<210> 343

<211> 51

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 343

gcgaaaaagg atgggcctgg gaggtattac gtgaggtacg gstatggacgt c

51

<210> 344

<211> 17

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 344

Ala Lys Lys Asp Gly Pro Gly Arg Tyr Tyr Val Arg Tyr Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 345

<211> 321

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 345

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgctc gggcgagtca ggggtattag agctggtag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatact acatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatcc 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ttgtcaacag gctaacagtt tccctctcac tttcggcgga 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 346

<211> 107

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 346

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100 105

<210> 347

<211> 18

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 347

cagggtatta gcagctgg

18

<210> 348

<211> 6

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 348

Gln Gly Ile Ser Ser Trp

1

5

<210> 349

<211> 9

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 349

actacatcc

9

<210> 350

<211> 3

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 350

Thr Thr Ser

1

<210> 351

<211> 27

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 351

caacaggcta acagtttccc tctcact

27

<210> 352

<211> 9

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 352

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 353

<211> 372

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 353

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggaacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgtca tgagctgggt ccgccaggtt 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagtt atcagtggtg gtggtggttag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaccctca 300
tccttatagca gctcgaactt ccactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 354

<211> 124

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 354

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

<210> 355

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 355

ggattcacct ttagcagcta tgtc

<210> 356
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 356
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Val
 1 5

<210> 357
 <211> 24
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 357
 atcagtggta gtggtggttag caca

24

<210> 358
 <211> 8
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 358
 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 359
 <211> 51
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 359
 gcgaaaccct catcttatag cagctcgaac ttccactacg gtatggacgt c

51

<210> 360
 <211> 17
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 360
 Ala Lys Pro Ser Ser Tyr Ser Ser Ser Asn Phe His Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Val

<210> 361
 <211> 321
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 361
 gacatccaga tgacccagtc tccatattcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtc gggtagtag agctggtag cctggtagc gcagaaacca 120
 gggagagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaaaaag actaacagtt tcccattcac tttcggccct 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 362
 <211> 107
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 362
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Tyr Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Thr Asn Ser Phe Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 363
 <211> 18
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 363
 cagggtagta gcagctgg 18

<210> 364
 <211> 6
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 364
Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 365
<211> 9
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 365
gctgcatcc

9

<210> 366
<211> 3
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 366
Ala Ala Ser
1

<210> 367
<211> 27
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 367
caaaagacta acagtttccc attcact

27

<210> 368
<211> 9
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 368
Gln Lys Thr Asn Ser Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 369
<211> 141
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223>Tổng hợp

<400> 369

Ala Gly Gly Pro Gly Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys
 1 5 10 15
 Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His
 20 25 30
 Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg
 35 40 45
 Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala
 50 55 60
 Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys
 65 70 75 80
 Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser
 85 90 95
 Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu
 100 105 110
 Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys
 115 120 125
 Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
 130 135 140

<210> 370

<211> 371

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 370

Asp Pro Leu Pro Thr Glu Ser Arg Leu Met Asn Ser Cys Leu Gln Ala
 1 5 10 15
 Arg Arg Lys Cys Gln Ala Asp Pro Thr Cys Ser Ala Ala Tyr His His
 20 25 30
 Leu Asp Ser Cys Thr Ser Ser Ile Ser Thr Pro Leu Pro Ser Glu Glu
 35 40 45
 Pro Ser Val Pro Ala Asp Cys Leu Glu Ala Ala Gln Gln Leu Arg Asn
 50 55 60
 Ser Ser Leu Ile Gly Cys Met Cys His Arg Arg Met Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Ala Cys Leu Asp Ile Tyr Trp Thr Val His Arg Ala Arg Ser Leu Gly
 85 90 95
 Asn Tyr Glu Leu Asp Val Ser Pro Tyr Glu Asp Thr Val Thr Ser Lys
 100 105 110
 Pro Trp Lys Met Asn Leu Ser Lys Leu Asn Met Leu Lys Pro Asp Ser
 115 120 125
 Asp Leu Cys Leu Lys Phe Ala Met Leu Cys Thr Leu Asn Asp Lys Cys
 130 135 140
 Asp Arg Leu Arg Lys Ala Tyr Gly Glu Ala Cys Ser Gly Pro His Cys
 145 150 155 160
 Gln Arg His Val Cys Leu Arg Gln Leu Leu Thr Phe Phe Glu Lys Ala
 165 170 175
 Ala Glu Pro His Ala Gln Gly Leu Leu Leu Cys Pro Cys Ala Pro Asn
 180 185 190
 Asp Arg Gly Cys Gly Glu Arg Arg Arg Asn Thr Ile Ala Pro Asn Cys
 195 200 205
 Ala Leu Pro Pro Val Ala Pro Asn Cys Leu Glu Leu Arg Arg Leu Cys
 210 215 220
 Phe Ser Asp Pro Leu Cys Arg Ser Arg Leu Val Asp Phe Gln Thr His
 225 230 235 240

Cys His Pro Met Asp Ile Leu Gly Thr Cys Ala Thr Glu Gln Ser Arg
 245 250 255
 Cys Leu Arg Ala Tyr Leu Gly Leu Ile Gly Thr Ala Met Thr Pro Asn
 260 265 270
 Phe Val Ser Asn Val Asn Thr Ser Val Ala Leu Ser Cys Thr Cys Arg
 275 280 285
 Gly Ser Gly Asn Leu Gln Glu Glu Cys Glu Met Leu Glu Gly Phe Phe
 290 295 300
 Ser His Asn Pro Cys Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ala Lys Met Arg Phe
 305 310 315 320
 His Ser Gln Leu Phe Ser Gln Asp Trp Pro His Pro Thr Phe Ala Val
 325 330 335
 Met Ala His Gln Asn Glu Asn Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
 340 345 350
 Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His
 355 360 365
 His His His
 370

<210> 371

<211> 578

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 371

Asp Pro Leu Pro Thr Glu Ser Arg Leu Met Asn Ser Cys Leu Gln Ala
 1 5 10 15
 Arg Arg Lys Cys Gln Ala Asp Pro Thr Cys Ser Ala Ala Tyr His His
 20 25 30
 Leu Asp Ser Cys Thr Ser Ser Ile Ser Thr Pro Leu Pro Ser Glu Glu
 35 40 45
 Pro Ser Val Pro Ala Asp Cys Leu Glu Ala Ala Gln Gln Leu Arg Asn
 50 55 60
 Ser Ser Leu Ile Gly Cys Met Cys His Arg Arg Met Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Ala Cys Leu Asp Ile Tyr Trp Thr Val His Arg Ala Arg Ser Leu Gly
 85 90 95
 Asn Tyr Glu Leu Asp Val Ser Pro Tyr Glu Asp Thr Val Thr Ser Lys
 100 105 110
 Pro Trp Lys Met Asn Leu Ser Lys Leu Asn Met Leu Lys Pro Asp Ser
 115 120 125
 Asp Leu Cys Leu Lys Phe Ala Met Leu Cys Thr Leu Asn Asp Lys Cys
 130 135 140
 Asp Arg Leu Arg Lys Ala Tyr Gly Glu Ala Cys Ser Gly Pro His Cys
 145 150 155 160
 Gln Arg His Val Cys Leu Arg Gln Leu Leu Thr Phe Phe Glu Lys Ala
 165 170 175
 Ala Glu Pro His Ala Gln Gly Leu Leu Leu Cys Pro Cys Ala Pro Asn
 180 185 190
 Asp Arg Gly Cys Gly Glu Arg Arg Arg Asn Thr Ile Ala Pro Asn Cys
 195 200 205
 Ala Leu Pro Pro Val Ala Pro Asn Cys Leu Glu Leu Arg Arg Leu Cys
 210 215 220
 Phe Ser Asp Pro Leu Cys Arg Ser Arg Leu Val Asp Phe Gln Thr His
 225 230 235 240
 Cys His Pro Met Asp Ile Leu Gly Thr Cys Ala Thr Glu Gln Ser Arg

245 250 255
 Cys Leu Arg Ala Tyr Leu Gly Leu Ile Gly Thr Ala Met Thr Pro Asn
 260 265 270
 Phe Val Ser Asn Val Asn Thr Ser Val Ala Leu Ser Cys Thr Cys Arg
 275 280 285
 Gly Ser Gly Asn Leu Gln Glu Glu Cys Glu Met Leu Glu Gly Phe Phe
 290 295 300
 Ser His Asn Pro Cys Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ala Lys Met Arg Phe
 305 310 315 320
 His Ser Gln Leu Phe Ser Gln Asp Trp Pro His Pro Thr Phe Ala Val
 325 330 335
 Met Ala His Gln Asn Glu Asn Pro Ala Val Arg Pro Gln Pro Trp Asp
 340 345 350
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 355 360 365
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 370 375 380
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 385 390 395 400
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 405 410 415
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 420 425 430
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 435 440 445
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 450 455 460
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 465 470 475 480
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 485 490 495
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 500 505 510
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 515 520 525
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 530 535 540
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 545 550 555 560
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 565 570 575
 Gly Lys

<210> 372

<211> 584

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 372

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

50	55	60															
Ser	Ser	Leu	Ile	Gly	Cys	Met	Cys	His	Arg	Arg	Met	Lys	Asn	Gln	Val		
65					70					75					80		
Ala	Cys	Leu	Asp	Ile	Tyr	Trp	Thr	Val	His	Arg	Ala	Arg	Ser	Leu	Gly		
				85					90					95			
Asn	Tyr	Glu	Leu	Asp	Val	Ser	Pro	Tyr	Glu	Asp	Thr	Val	Thr	Ser	Lys		
			100					105					110				
Pro	Trp	Lys	Met	Asn	Leu	Ser	Lys	Leu	Asn	Met	Leu	Lys	Pro	Asp	Ser		
		115					120						125				
Asp	Leu	Cys	Leu	Lys	Phe	Ala	Met	Leu	Cys	Thr	Leu	Asn	Asp	Lys	Cys		
	130					135					140						
Asp	Arg	Leu	Arg	Lys	Ala	Tyr	Gly	Glu	Ala	Cys	Ser	Gly	Pro	His	Cys		
145					150					155					160		
Gln	Arg	His	Val	Cys	Leu	Arg	Gln	Leu	Leu	Thr	Phe	Phe	Glu	Lys	Ala		
			165					170						175			
Ala	Glu	Pro	His	Ala	Gln	Gly	Leu	Leu	Leu	Cys	Pro	Cys	Ala	Pro	Asn		
		180					185						190				
Asp	Arg	Gly	Cys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Asn	Thr	Ile	Ala	Pro	Asn	Cys		
	195					200						205					
Ala	Leu	Pro	Pro	Val	Ala	Pro	Asn	Cys	Leu	Glu	Leu	Arg	Arg	Leu	Cys		
	210					215					220						
Phe	Ser	Asp	Pro	Leu	Cys	Arg	Ser	Arg	Leu	Val	Asp	Phe	Gln	Thr	His		
225				230						235					240		
Cys	His	Pro	Met	Asp	Ile	Leu	Gly	Thr	Cys	Ala	Thr	Glu	Gln	Ser	Arg		
			245					250						255			
Cys	Leu	Arg	Ala	Tyr	Leu	Gly	Leu	Ile	Gly	Thr	Ala	Met	Thr	Pro	Asn		
		260				265							270				
Phe	Val	Ser	Asn	Val	Asn	Thr	Ser	Val	Ala	Leu	Ser	Cys	Thr	Cys	Arg		
	275					280						285					
Gly	Ser	Gly	Asn	Leu	Gln	Glu	Glu	Cys	Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Phe	Phe		
	290				295						300						
Ser	His	Asn	Pro	Cys	Leu	Thr	Glu	Ala	Ile	Ala	Ala	Lys	Met	Arg	Phe		
305				310					315						320		
His	Ser	Gln	Leu	Phe	Ser	Gln	Asp	Trp	Pro	His	Pro	Thr	Phe	Ala	Val		
			325					330						335			
Met	Ala	His	Gln	Asn	Glu	Asn	Pro	Ala	Val	Arg	Pro	Gln	Pro	Trp	Glu		
		340					345						350				
Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala		
	355					360						365					
Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile		
	370				375						380						
Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val		
385				390					395						400		
Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val		
			405					410						415			
Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp		
		420					425						430				
Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln		
	435					440						445					
Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp		
	450				455						460						
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val		
465				470					475						480		
Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr		
			485					490						495			
Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu		
		500					505					510					
Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr		
	515						520					525					

Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr
 530 535 540
 Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr
 545 550 555 560
 Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys
 565 570 575
 Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 580

<210> 373

<211> 371

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 373

Asp Pro Leu Pro Thr Glu Ser Arg Leu Met Asn Ser Cys Leu Gln Ala
 1 5 10 15
 Arg Arg Lys Cys Gln Ala Asp Pro Ile Cys Ser Ala Ala Tyr His His
 20 25 30
 Leu Asp Ser Cys Thr Ser Ser Ile Ser Thr Pro Leu Pro Ser Glu Glu
 35 40 45
 Pro Ser Val Pro Ala Asp Cys Leu Glu Ala Ala Gln Gln Leu Arg Asn
 50 55 60
 Ser Ser Leu Ile Gly Cys Met Cys His Arg Arg Met Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Ala Cys Leu Asp Ile Tyr Trp Thr Val His Arg Ala Arg Ser Leu Gly
 85 90 95
 Asn Tyr Glu Leu Asp Val Ser Pro Tyr Glu Asp Thr Val Thr Ser Lys
 100 105 110
 Pro Trp Lys Met Asn Leu Ser Lys Leu Asn Met Leu Lys Pro Asp Ser
 115 120 125
 Asp Leu Cys Leu Lys Phe Ala Met Leu Cys Thr Leu Asn Asp Lys Cys
 130 135 140
 Asp Arg Leu Arg Lys Ala Tyr Gly Glu Ala Cys Ser Gly Pro His Cys
 145 150 155 160
 Gln Arg His Val Cys Leu Arg Gln Leu Leu Thr Phe Phe Glu Lys Ala
 165 170 175
 Ala Glu Pro His Ala Gln Gly Leu Leu Leu Cys Pro Cys Ala Pro Asn
 180 185 190
 Asp Arg Gly Cys Gly Glu Arg Arg Arg Asn Thr Ile Ala Pro Ser Cys
 195 200 205
 Ala Leu Pro Pro Val Ala Pro Asn Cys Leu Glu Leu Arg Arg Leu Cys
 210 215 220
 Phe Ser Asp Pro Leu Cys Arg Ser Arg Leu Val Asp Phe Gln Thr His
 225 230 235 240
 Cys His Pro Met Asp Ile Leu Gly Thr Cys Ala Thr Glu Gln Ser Arg
 245 250 255
 Cys Leu Arg Ala Tyr Leu Gly Leu Ile Gly Thr Ala Met Thr Pro Asn
 260 265 270
 Phe Val Ser Asn Val Asn Thr Ser Val Ala Leu Ser Cys Thr Cys Arg
 275 280 285
 Gly Ser Gly Asn Leu Gln Glu Glu Cys Glu Gln Leu Glu Gly Phe Phe
 290 295 300
 Ser His Asn Pro Cys Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ala Lys Met Arg Phe
 305 310 315 320
 His Ser Gln Leu Phe Tyr Gln Asp Trp Pro His Pro Thr Phe Ala Val

325 330 335
 Met Ala His Gln Asn Glu Asn Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
 340 345 350
 Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His
 355 360 365
 His His His
 370

<210> 374

<211> 1200

<212>ADN

<213>Người thông tuệ

<400> 374

atggtgcgcc cctgaaccc ggcaccgctg ccgcccgtag tcctgatgtt gctgctgctg 60
 ctgccgccgt cgccgtgccc tctcgagccc ggagaccccc ttcccacaga aagccgactc 120
 atgaacagct gtctccaggc caggaggaag tgccaggctg atcccacctg cagtgtgctg 180
 taccaccacc tggattcctg cacctctagc ataagcacc cactgccctc agaggagcct 240
 tcgggtccctg ctgactgcct ggaggcagca cagcaactca ggaacagctc tctgataggc 300
 tgcatgtgcc accggcgcat gaagaaccag gttgcctgct tggacatcta ttggaccgtt 360
 caccgtgccc gcagccttgg taactatgag ctggatgtct cccctatga agacacagtg 420
 accagcaaac cctggaaaat gaatctcagc aaactgaaca tgctcaaacc agactcagac 480
 ctctgoccca agtttgccat gctgtgtact ctcaatgaca agtgtgaccg gctgcgcaag 540
 gcctacgggg aggcggtgctc cgggccccac tgccagcgcc acgtctgcct caggcagctg 600
 ctcaactttct tcgagaaggc cgccgagccc caccgagcagg gcctgctact gtgcccatgt 660
 gcccccaacg accggggctg cggggagcgc cggcgcaaca ccatcgcccc caactgcgcg 720
 ctgccgcctg tggcccccaa ctgcctggag ctgcggcgcc tctgcttctc cgacccgctt 780
 tgcagatcac gcctggtgga tttccagacc cactgccatc ccatggacat cctaggaact 840
 tgtgcaacag agcagtccag atgtctacga gcataacctg ggctgattgg gactgccatg 900
 acccccaact ttgtcagcaa tgtcaacacc agtgttgct taagctgcac ctgccgaggc 960
 agtggcaacc tgcaggagga gtgtgaaatg ctggaagggt tcttctccca caaccctgc 1020
 ctacaggagg ccattgcagc taagatgcgt tttcacagcc aactcttctc ccaggactgg 1080
 ccacacccta cctttgctgt gatggcacac cagaatgaaa accctgctgt gaggccacag 1140
 ccctgggtgc cctctctttt ctctgcacg cttcccttga ttctgctcct gagcctatgg 1200

<210> 375

<211> 400

<212> PRT

<213>Người thông tuệ

<400> 375

Met Val Arg Pro Leu Asn Pro Arg Pro Leu Pro Pro Val Val Leu Met
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Leu Pro Pro Ser Pro Leu Pro Leu Ala Ala Gly Asp
 20 25 30
 Pro Leu Pro Thr Glu Ser Arg Leu Met Asn Ser Cys Leu Gln Ala Arg
 35 40 45
 Arg Lys Cys Gln Ala Asp Pro Thr Cys Ser Ala Ala Tyr His His Leu
 50 55 60
 Asp Ser Cys Thr Ser Ser Ile Ser Thr Pro Leu Pro Ser Glu Glu Pro
 65 70 75 80
 Ser Val Pro Ala Asp Cys Leu Glu Ala Ala Gln Gln Leu Arg Asn Ser
 85 90 95
 Ser Leu Ile Gly Cys Met Cys His Arg Arg Met Lys Asn Gln Val Ala
 100 105 110
 Cys Leu Asp Ile Tyr Trp Thr Val His Arg Ala Arg Ser Leu Gly Asn
 115 120 125
 Tyr Glu Leu Asp Val Ser Pro Tyr Glu Asp Thr Val Thr Ser Lys Pro
 130 135 140

Trp Lys Met Asn Leu Ser Lys Leu Asn Met Leu Lys Pro Asp Ser Asp
 145 150 155 160
 Leu Cys Leu Lys Phe Ala Met Leu Cys Thr Leu Asn Asp Lys Cys Asp
 165 170 175
 Arg Leu Arg Lys Ala Tyr Gly Glu Ala Cys Ser Gly Pro His Cys Gln
 180 185 190
 Arg His Val Cys Leu Arg Gln Leu Leu Thr Phe Phe Glu Lys Ala Ala
 195 200 205
 Glu Pro His Ala Gln Gly Leu Leu Leu Cys Pro Cys Ala Pro Asn Asp
 210 215 220
 Arg Gly Cys Gly Glu Arg Arg Arg Asn Thr Ile Ala Pro Asn Cys Ala
 225 230 235 240
 Leu Pro Pro Val Ala Pro Asn Cys Leu Glu Leu Arg Arg Leu Cys Phe
 245 250 255
 Ser Asp Pro Leu Cys Arg Ser Arg Leu Val Asp Phe Gln Thr His Cys
 260 265 270
 His Pro Met Asp Ile Leu Gly Thr Cys Ala Thr Glu Gln Ser Arg Cys
 275 280 285
 Leu Arg Ala Tyr Leu Gly Leu Ile Gly Thr Ala Met Thr Pro Asn Phe
 290 295 300
 Val Ser Asn Val Asn Thr Ser Val Ala Leu Ser Cys Thr Cys Arg Gly
 305 310 315 320
 Ser Gly Asn Leu Gln Glu Glu Cys Glu Met Leu Glu Gly Phe Phe Ser
 325 330 335
 His Asn Pro Cys Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ala Lys Met Arg Phe His
 340 345 350
 Ser Gln Leu Phe Ser Gln Asp Trp Pro His Pro Thr Phe Ala Val Met
 355 360 365
 Ala His Gln Asn Glu Asn Pro Ala Val Arg Pro Gln Pro Trp Val Pro
 370 375 380
 Ser Leu Phe Ser Cys Thr Leu Pro Leu Ile Leu Leu Leu Ser Leu Trp
 385 390 395 400

<210> 376

<211> 632

<212> PRT

<213>Người thông tuệ

<400> 376

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

```

Asp Val Cys Asn Arg Arg Lys Cys His Lys Ala Leu Arg Gln Phe Phe
      165                      170                      175
Asp Lys Val Pro Ala Lys His Ser Tyr Gly Met Leu Phe Cys Ser Cys
      180                      185                      190
Arg Asp Ile Ala Cys Thr Glu Arg Arg Arg Gln Thr Ile Val Pro Val
      195                      200                      205
Cys Ser Tyr Glu Glu Arg Glu Lys Pro Asn Cys Leu Asn Leu Gln Asp
      210                      215                      220
Ser Cys Lys Thr Asn Tyr Ile Cys Arg Ser Arg Leu Ala Asp Phe Phe
      225                      230                      235                      240
Thr Asn Cys Gln Pro Glu Ser Arg Ser Val Ser Ser Cys Leu Lys Glu
      245                      250                      255
Asn Tyr Ala Asp Cys Leu Leu Ala Tyr Ser Gly Leu Ile Gly Thr Val
      260                      265                      270
Met Thr Pro Asn Tyr Ile Asp Ser Ser Ser Leu Ser Val Ala Pro Trp
      275                      280                      285
Cys Asp Cys Ser Asn Ser Gly Asn Asp Leu Glu Glu Cys Leu Lys Phe
      290                      295                      300
Leu Asn Phe Phe Lys Asp Asn Thr Cys Leu Lys Asn Ala Ile Gln Ala
      305                      310                      315                      320
Phe Gly Asn Gly Ser Asp Val Thr Val Trp Gln Pro Ala Phe Pro Val
      325                      330                      335
Gln Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala Leu Arg Val Lys Asn Lys
      340                      345                      350
Pro Leu Gly Pro Ala Gly Ser Glu Asn Glu Ile Pro Thr His Val Leu
      355                      360                      365
Pro Pro Cys Ala Asn Leu Gln Ala Gln Lys Leu Lys Ser Asn Val Ser
      370                      375                      380
Gly Asn Thr His Leu Cys Ile Ser Asn Gly Asn Tyr Glu Lys Glu Gly
      385                      390                      395                      400
Leu Gly Ala Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
      405                      410                      415
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
      420                      425                      430
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
      435                      440                      445
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
      450                      455                      460
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
      465                      470                      475                      480
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
      485                      490                      495
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
      500                      505                      510
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
      515                      520                      525
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
      530                      535                      540
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
      545                      550                      555                      560
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
      565                      570                      575
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
      580                      585                      590
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
      595                      600                      605
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
      610                      615                      620
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

```

625

630

<210> 377

<211> 405

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223> GFRalpha3 khi cynomolgus: cADN tiểu não

<400> 377

```

Met Val Arg Pro Pro Ser Pro Arg Pro Leu Pro Pro Val Val Leu Met
 1              5              10              15
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Pro Ser Pro Leu Pro
 20              25              30
Leu Ala Ala Gly Asp Pro Leu Pro Thr Glu Ser Arg Leu Met Asn Ser
 35              40              45
Cys Leu Gln Ala Arg Arg Lys Cys Gln Ala Asp Pro Ile Cys Ser Ala
 50              55              60
Ala Tyr His His Leu Asp Ser Cys Thr Ser Ser Ile Ser Thr Pro Leu
 65              70              75              80
Pro Ser Glu Glu Pro Ser Val Pro Ala Asp Cys Leu Glu Ala Ala Gln
 85              90              95
Gln Leu Arg Asn Ser Ser Leu Ile Gly Cys Met Cys His Arg Arg Met
100             105             110
Lys Asn Gln Val Ala Cys Leu Asp Ile Tyr Trp Thr Val His Arg Ala
115             120             125
Arg Ser Leu Gly Asn Tyr Glu Leu Asp Val Ser Pro Tyr Glu Asp Thr
130             135             140
Val Thr Ser Lys Pro Trp Lys Met Asn Leu Ser Lys Leu Asn Met Leu
145             150             155             160
Lys Pro Asp Ser Asp Leu Cys Leu Lys Phe Ala Met Leu Cys Thr Leu
165             170             175
Asn Asp Lys Cys Asp Arg Leu Arg Lys Ala Tyr Gly Glu Ala Cys Ser
180             185             190
Gly Pro His Cys Gln Arg His Val Cys Leu Arg Gln Leu Leu Thr Phe
195             200             205
Phe Glu Lys Ala Ala Glu Pro His Ala Gln Gly Leu Leu Leu Cys Pro
210             215             220
Cys Ala Pro Asn Asp Arg Gly Cys Gly Glu Arg Arg Arg Asn Thr Ile
225             230             235             240
Ala Pro Ser Cys Ala Leu Pro Pro Val Ala Pro Asn Cys Leu Glu Leu
245             250             255
Arg Arg Leu Cys Phe Ser Asp Pro Leu Cys Arg Ser Arg Leu Val Asp
260             265             270
Phe Gln Thr His Cys His Pro Met Asp Ile Leu Gly Thr Cys Ala Thr
275             280             285
Glu Gln Ser Arg Cys Leu Arg Ala Tyr Leu Gly Leu Ile Gly Thr Ala
290             295             300
Met Thr Pro Asn Phe Val Ser Asn Val Asn Thr Ser Val Ala Leu Ser
305             310             315             320
Cys Thr Cys Arg Gly Ser Gly Asn Leu Gln Glu Glu Cys Glu Gln Leu
325             330             335
Glu Gly Phe Phe Ser His Asn Pro Cys Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ala
340             345             350
Lys Met Arg Phe His Ser Gln Leu Phe Tyr Gln Asp Trp Pro His Pro
355             360             365
Thr Phe Ala Val Met Ala His Gln Asn Glu Asn Arg Ala Leu Arg Ser
370             375             380

```

Lys Pro Trp Ala Pro Ser Leu Phe Ser Cys Thr Leu Pro Leu Ile Leu
 385 390 395 400
 Leu Leu Ser Leu Trp
 405

<210> 378
 <211> 1086
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> RET khi cynomolgus không có trình tự tín hiệu

<400> 378
 Leu Tyr Phe Ser Arg Asp Ala Tyr Trp Glu Lys Leu Tyr Val Asp Gln
 1 5 10 15
 Pro Ala Gly Thr Pro Leu Leu Tyr Val His Ala Leu Arg Asp Ala Pro
 20 25 30
 Glu Glu Val Pro Ser Phe Arg Leu Gly Gln His Leu Tyr Gly Thr Tyr
 35 40 45
 Arg Thr Arg Leu His Glu Asn Asn Trp Ile Cys Ile Gln Glu Asp Thr
 50 55 60
 Gly Leu Leu Tyr Leu Asn Arg Ser Leu Asp Arg Ser Ser Trp Glu Lys
 65 70 75 80
 Leu Ser Gly Arg Asn Arg Gly Phe Pro Leu Leu Thr Val Tyr Leu Lys
 85 90 95
 Val Phe Leu Ser Pro Thr Ser Leu Arg Glu Gly Glu Cys Gln Trp Pro
 100 105 110
 Gly Cys Ala Arg Val Tyr Phe Ser Phe Phe Asn Thr Ser Phe Pro Ala
 115 120 125
 Cys Thr Ser Leu Lys Pro Arg Glu Leu Cys Phe Pro Glu Thr Arg Pro
 130 135 140
 Ser Phe Arg Ile Arg Glu Asn Arg Pro Pro Gly Thr Phe His Gln Phe
 145 150 155 160
 Arg Leu Leu Pro Val Gln Phe Leu Cys Pro Asn Ile Ser Val Ala Tyr
 165 170 175
 Arg Leu Leu Glu Gly Glu Gly Leu Pro Phe Arg Cys Ala Pro Asp Ser
 180 185 190
 Leu Glu Val Ser Thr Arg Trp Ala Leu Asp Arg Glu Gln Arg Glu Lys
 195 200 205
 Tyr Glu Leu Val Ala Val Cys Thr Val His Ala Gly Ala Arg Glu Glu
 210 215 220
 Val Val Met Val Pro Phe Pro Val Thr Val Tyr Asp Glu Asp Asp Ser
 225 230 235 240
 Ala Pro Thr Phe Pro Ala Gly Val Asp Thr Ala Ser Ala Val Val Glu
 245 250 255
 Phe Lys Arg Lys Glu Asp Thr Val Val Ala Thr Leu Arg Val Phe Asp
 260 265 270
 Ala Asp Val Val Pro Ala Ser Gly Glu Leu Val Arg Arg Tyr Thr Ser
 275 280 285
 Thr Leu Leu Pro Gly Asp Thr Trp Thr Gln Gln Thr Phe Arg Val Glu
 290 295 300
 His Trp Pro Asn Glu Thr Ser Val Gln Ala Asn Gly Ser Phe Val Arg
 305 310 315 320
 Ala Thr Val His Asp Tyr Arg Leu Val Leu Asn Arg Asn Leu Ser Ile
 325 330 335
 Ser Glu Asn Arg Thr Met Gln Leu Ala Val Leu Val Asn Asp Ser Asp
 340 345 350

Phe	Gln	Gly	Pro	Gly	Ala	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	His	Phe	Asn	Val	Ser	355	360	365
Val	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	His	Leu	Pro	Ser	Ser	Tyr	Ser	Leu	Ser	Val	370	375	380
Ser	Arg	Arg	Ala	Arg	Arg	Phe	Ala	Gln	Ile	Gly	Lys	Val	Cys	Val	Glu	385	390	395
Asn	Cys	Gln	Ala	Phe	Ser	Gly	Ile	Asn	Val	Gln	Tyr	Glu	Leu	His	Ser	405	410	415
Ser	Gly	Ala	Asn	Cys	Ser	Thr	Leu	Gly	Val	Val	Thr	Ser	Ala	Glu	Asp	420	425	430
Thr	Ser	Gly	Ile	Leu	Phe	Val	Asn	Asp	Thr	Lys	Ala	Leu	Arg	Arg	Pro	435	440	445
Lys	Cys	Ala	Glu	Leu	His	Tyr	Met	Val	Val	Ala	Thr	Asn	His	Gln	Thr	450	455	460
Ser	Arg	Gln	Ala	Gln	Ala	Gln	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Glu	Gly	Leu	Tyr	465	470	475
Val	Ala	Glu	Glu	Ala	Gly	Cys	Pro	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Lys	Arg	485	490	495
Arg	Pro	Glu	Cys	Glu	Glu	Cys	Gly	Gly	Leu	Gly	Ser	Pro	Thr	Gly	Arg	500	505	510
Cys	Glu	Trp	Arg	Gln	Gly	Asp	Gly	Lys	Gly	Ile	Thr	Arg	Asn	Phe	Ser	515	520	525
Thr	Cys	Ser	Pro	Ser	Thr	Lys	Thr	Cys	Pro	Asp	Gly	His	Cys	Asp	Val	530	535	540
Val	Glu	Thr	Gln	Asp	Ile	Asn	Ile	Cys	Pro	Gln	Asp	Cys	Leu	Arg	Gly	545	550	555
Ser	Ile	Val	Gly	Gly	His	Glu	Pro	Gly	Glu	Pro	Arg	Gly	Ile	Lys	Ala	565	570	575
Gly	Tyr	Gly	Thr	Cys	Asn	Cys	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	Lys	Cys	Phe	Cys	580	585	590
Glu	Pro	Glu	Asp	Ile	Gln	Asp	Pro	Leu	Cys	Asp	Glu	Leu	Cys	Arg	Thr	595	600	605
Val	Ile	Ala	Ala	Ala	Val	Leu	Phe	Ser	Phe	Ile	Val	Ser	Val	Leu	Leu	610	615	620
Ser	Ala	Phe	Cys	Ile	His	Arg	Tyr	His	Lys	Phe	Ala	His	Lys	Pro	Pro	625	630	635
Ile	Pro	Ser	Ala	Glu	Met	Thr	Phe	Arg	Arg	Pro	Ala	Gln	Ala	Phe	Pro	645	650	655
Val	Ser	Tyr	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Arg	Arg	Pro	Ser	Leu	Asp	Ser	Met	660	665	670
Glu	Asn	Gln	Val	Ser	Val	Asp	Ala	Phe	Lys	Ile	Pro	Glu	Asp	Pro	Lys	675	680	685
Trp	Glu	Phe	Pro	Arg	Lys	Asn	Leu	Val	Leu	Gly	Lys	Thr	Leu	Gly	Glu	690	695	700
Gly	Glu	Phe	Gly	Lys	Val	Val	Lys	Ala	Thr	Ala	Phe	Arg	Leu	Lys	Gly	705	710	715
Arg	Ala	Gly	Tyr	Thr	Thr	Val	Ala	Val	Lys	Met	Leu	Lys	Glu	Asn	Ala	725	730	735
Ser	Pro	Ser	Glu	Leu	Arg	Asp	Leu	Leu	Ser	Glu	Phe	Asn	Leu	Leu	Lys	740	745	750
Gln	Val	Asn	His	Pro	His	Val	Ile	Lys	Leu	Tyr	Gly	Ala	Cys	Ser	Gln	755	760	765
Asp	Gly	Pro	Leu	Leu	Leu	Ile	Val	Glu	Tyr	Ala	Lys	Tyr	Gly	Ser	Leu	770	775	780
Arg	Gly	Phe	Leu	Arg	Glu	Ser	Arg	Lys	Val	Gly	Pro	Gly	Tyr	Leu	Gly	785	790	795
Ser	Gly	Gly	Ser	Arg	Asn	Ser	Ser	Ser	Leu	Asp	His	Pro	Asp	Glu	Arg	805	810	815
Ala	Leu	Thr	Met	Gly	Asp	Leu	Ile	Ser	Phe	Ala	Trp	Gln	Ile	Ser	Arg			

820						825						830			
Gly	Met	Gln	Tyr	Leu	Ala	Glu	Met	Lys	Leu	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala
835						840						845			
Ala	Arg	Asn	Ile	Leu	Val	Ala	Glu	Gly	Arg	Lys	Met	Lys	Ile	Ser	Asp
850						855						860			
Phe	Gly	Leu	Ser	Arg	Asp	Val	Tyr	Glu	Glu	Asp	Ser	Tyr	Val	Lys	Arg
865	870					875					880				
Ser	Lys	Gly	Arg	Ile	Pro	Val	Lys	Trp	Met	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu	Phe
885						890						895			
Asp	His	Ile	Tyr	Thr	Thr	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Leu
900						905						910			
Leu	Trp	Glu	Ile	Val	Thr	Leu	Gly	Gly	Asn	Pro	Tyr	Pro	Gly	Ile	Pro
915						920						925			
Pro	Glu	Arg	Leu	Phe	Asn	Leu	Leu	Lys	Thr	Gly	His	Arg	Met	Glu	Arg
930						935						940			
Pro	Asp	Asn	Cys	Ser	Glu	Glu	Met	Tyr	Arg	Leu	Met	Leu	Gln	Cys	Trp
945	950					955					960				
Lys	Gln	Glu	Pro	Asp	Lys	Arg	Pro	Val	Phe	Ala	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp
965						970						975			
Leu	Glu	Lys	Met	Met	Val	Lys	Ser	Arg	Asp	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ala	Ala
980						985						990			
Ser	Thr	Pro	Ser	Asp	Ser	Leu	Leu	Tyr	Asp	Asp	Gly	Leu	Ser	Glu	Glu
995						1000						1005			
Glu	Thr	Pro	Leu	Val	Asp	Cys	Asn	Asn	Ala	Pro	Leu	Pro	Arg	Ala	Leu
1010						1015						1020			
Pro	Ser	Thr	Trp	Ile	Glu	Asn	Lys	Leu	Tyr	Gly	Met	Ser	Asp	Pro	Asn
1025	1030					1035					1040				
Trp	Pro	Gly	Glu	Ser	Pro	Val	Pro	Leu	Thr	Arg	Ala	Asp	Gly	Thr	Asn
1045						1050						1055			
Thr	Gly	Phe	Pro	Arg	Tyr	Ala	Asn	Asp	Ser	Val	Tyr	Ala	Asn	Trp	Met
1060						1065						1070			
Leu	Ser	Pro	Ser	Ala	Ala	Lys	Leu	Met	Asp	Thr	Phe	Asp	Ser		
1075						1080						1085			

<210> 379

<211> 371

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$

<223> GFRalpha3-MMH

aa 1-343: N29-N371 chuôt nhất của Ac. số AAH66202.1

aa 344-371: đầu myc-liên kết GG-myc-hexahistidin

<400> 379

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

Pro Trp Lys Met Asn Leu Ser Lys Leu Asn Met Leu Lys Pro Asp Ser
 115 120 125
 Asp Leu Cys Leu Lys Phe Ala Met Leu Cys Thr Leu His Asp Lys Cys
 130 135 140
 Asp Arg Leu Arg Lys Ala Tyr Gly Glu Ala Cys Ser Gly Ile Arg Cys
 145 150 155 160
 Gln Arg His Leu Cys Leu Ala Gln Leu Arg Ser Phe Phe Glu Lys Ala
 165 170 175
 Ala Glu Ser His Ala Gln Gly Leu Leu Leu Cys Pro Cys Ala Pro Glu
 180 185 190
 Asp Ala Gly Cys Gly Glu Arg Arg Arg Asn Thr Ile Ala Pro Ser Cys
 195 200 205
 Ala Leu Pro Ser Val Thr Pro Asn Cys Leu Asp Leu Arg Ser Phe Cys
 210 215 220
 Arg Ala Asp Pro Leu Cys Arg Ser Arg Leu Met Asp Phe Gln Thr His
 225 230 235 240
 Cys His Pro Met Asp Ile Leu Gly Thr Cys Ala Thr Glu Gln Ser Arg
 245 250 255
 Cys Leu Arg Ala Tyr Leu Gly Leu Ile Gly Thr Ala Met Thr Pro Asn
 260 265 270
 Phe Ile Ser Lys Val Asn Thr Thr Val Ala Leu Ser Cys Ser Cys Arg
 275 280 285
 Gly Ser Gly Asn Leu Gln Asp Glu Cys Glu Gln Leu Glu Arg Ser Phe
 290 295 300
 Ser Gln Asn Pro Cys Leu Val Glu Ala Ile Ala Lys Met Arg Phe
 305 310 315 320
 His Arg Gln Leu Phe Ser Gln Asp Trp Ala Asp Ser Thr Phe Ser Val
 325 330 335
 Val Gln Gln Gln Asn Ser Asn Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
 340 345 350
 Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His
 355 360 365
 His His His
 370

<210> 380

<211> 372

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 380

caggttcaac tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg cttctgggta cacctttacc agctatggta tcatctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagcgggt acaatggtaa cacaaactat 180
 acacagaatc tccagggcag agtcaccatg accacagaca cttccacgac cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagatgggggt 300
 atagcaactc gtcctacta ctactacggg atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 381

<211> 124

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 381

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

<210> 382

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 382

ggttacacct ttaccagcta tggc

24

<210> 383

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 383

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 384

<211> 24

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 384

atcagcggtt acaatggtaa caca

24

<210> 385

<211> 8

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 385

Ile Ser Gly Tyr Asn Gly Asn Thr
1 5

<210> 386

<211> 51

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 386

gcgagatggg gtatagcaac tcgtccctac tactactacg gtatggacgt c 51

<210> 387

<211> 17

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 387

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

<210> 388

<211> 321

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 388

gacatccaga tgacccagtc tccatccctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgctc gggcgagtca ggacattacc aattatttag cctggtttca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagtccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctcccac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 389

<211> 107

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 389

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 Ile Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys 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 Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 390

<211> 18

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 390

caggacatta ccaattat

18

<210> 391

<211> 6

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 391

Gln Asp Ile Thr Asn Tyr

1

5

<210> 392

<211> 9

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 392

gctgcatcc

9

<210> 393

<211> 3

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 393

Ala Ala Ser

1

<210> 394
 <211> 27
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 394
 caacagtata atagttaccc tcccact

27

<210> 395
 <211> 9
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 395
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 396
 <211> 369
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 396
 gaggtgcagt tattggagtc tggggggaac ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agttatgcca tgacctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggtctggagtg ggtctcaact attagtggta gtggtaccag cacatattac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagggaca attccaggga cacggtgttt 240
 ctacaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgttc gaaaccttct 300
 gcattaogat ttttacattg gttatgtatg gacgtctggg gccaaaggac cctggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 397
 <211> 123
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 397
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Asn Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Thr Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asp Thr Val Phe
 65 70 75 80

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

<210> 398
<211> 24
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

```
<400> 398
ggattcacct ttagcagtta tgcc
```

```
<210> 399
<211> 8
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 399
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

```
<210> 400
<211> 24
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Tổng hợp

```
<400> 400
attagtggta gtggtaccag caca
```

```
<210> 401
<211> 8
<212> PRT
<213>Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 401
Ile Ser Gly Ser Gly Thr Ser Thr
1 5

```
<210> 402
<211> 48
<212>ADN
<213>Trình tự nhân tạo
```

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 402

tcgaaacctt ctgcattacg atttttacat tggttatgta tggacgtc

48

<210> 403

<211> 16

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 403

Ser	Lys	Pro	Ser	Ala	Leu	Arg	Phe	Leu	His	Trp	Leu	Cys	Met	Asp	Val
1				5					10					15	

<210> 404

<211> 321

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 404

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ttgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca ggacattagg aattatttag actggtttca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccaatt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcggcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaacag cctgcagcct 240
gaagattttg taacttatta ctgccagcag tataattctt accctccac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a                                     321

```

<210> 405

<211> 107

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 405

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

<210> 406

<211> 18
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 406
 caggacatta ggaattat

18

<210> 407
 <211> 6
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 407
 Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
 1 5

<210> 408
 <211> 9
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 408
 gctgcatcc

9

<210> 409
 <211> 3
 <212> PRT
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 409
 Ala Ala Ser
 1

<210> 410
 <211> 27
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Tổng hợp

<400> 410
 cagcagtata attcttacct tccact

27

<210> 411
 <211> 9

<212> PRT

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Tổng hợp

<400> 411

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr

1

5