



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

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

(11)



1-0032922

(51)⁸ C07K 16/28; A61P 25/00; A61P 37/02; (13) B
C07K 16/46; C12P 21/08; C12N 1/19;
C12N 1/21; C12N 15/09; C12N 5/10;
A61K 39/395; C12N 1/15

(21) 1-2017-04732

(22) 27/04/2016

(86) PCT/JP2016/063166 27/04/2016

(87) WO 2016/175236 A1 03/11/2016

(30) 2015-091095 28/04/2015 JP

(45) 25/08/2022 413

(43) 26/03/2018 360A

(73) 1. MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION (JP)

3-2-10, Dosho-machi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-8505 Japan

2. OSAKA UNIVERSITY (JP)

1-1, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871 Japan

3. NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY (JP)

1-33, Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba-shi, Chiba 263-8522 Japan

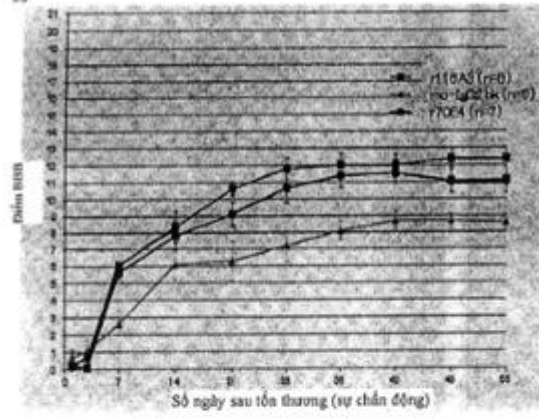
(72) HASHIMOTO, Motonori (JP); YAMASHITA, Toshihide (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

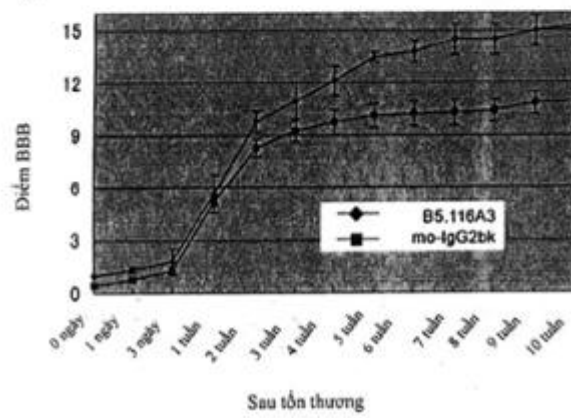
(54) KHÁNG THỂ KHÁNG PHÂN TỬ DẪN HƯỚNG ĐẦY A (RGMA) ĐƯỢC PHÂN LẬP, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến protein liên kết phân tử dẫn hướng đầy a (RGMa) được phân lập mà không ức chế sự liên kết giữa RGMa và neogenin nhưng làm trung hòa hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh của RGMa, phương án ưu tiên của sáng chế đề cập đến kháng thể kháng RGMa theo sáng chế có vùng xác định bổ trợ có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 30-35 hoặc SEQ ID NO: 36-40 trong Danh mục trình tự, và SFG. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất kháng thể kháng RGMa, và dược phẩm chứa kháng thể kháng RGMa.

(A)



(B)



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein liên kết RGMa và phương pháp sản xuất protein này, và dược phẩm chứa protein này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phân tử dẫn hướng đẩy (repulsive guidance molecule - RGM), mà là protein màng cố định GPI với khối lượng phân tử khoảng 33 kDa, được xác định đầu tiên như là phân tử dẫn hướng axon (sợi trục thần kinh) trong hệ thống thị giác (xem, Tài liệu phi sáng chế 1). Họ RGM bao gồm ba thành viên được gọi là RGMa, RGMb và RGMc. Trong số chúng, RGMa được biểu hiện lại sau chấn thương hệ thần kinh trung ương ở người trưởng thành và chuột cũng như ở giai đoạn tiến triển, và việc ức chế RGMa ở chuột đẩy mạnh sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh sau tổn thương tủy sống và thúc đẩy phục hồi chức năng (xem, Tài liệu phi sáng chế 2). Do đó, RGMa được xem là chất ức chế sợi trục thần kinh sau chấn thương hệ thần kinh trung ương.

RGMa còn được thông báo là có tác dụng đối với hệ thống miễn dịch. RGMa được biểu hiện trong tế bào hình cây và tác động trong tế bào T, nhờ đó tăng cường sự bám dính của tế bào T vào ICAM-1 và fibronectin và cảm ứng quá trình sản xuất cytokin (Tài liệu sáng chế 4). Trong mẫu chuột mắc bệnh đa xơ cứng, việc sử dụng kháng thể kháng RGMa ngăn ngừa triệu chứng do viêm não tủy và còn có tác dụng ngăn ngừa sự khởi phát và sự tái phát bệnh. Kháng thể kháng RGMa còn được cho là liên kết với RGMa được biểu hiện trong tế bào hình cây để ức chế sự hoạt hóa tế bào T, nhờ đó tạo ra tác dụng trong bệnh đa xơ cứng.

Cơ chế truyền tín hiệu của RGMa cũng được làm sáng tỏ, và protein neogenin được thông báo làm thụ thể RGMa (Tài liệu sáng chế 3). Neogenin là protein xuyên màng đơn được biểu hiện trong neuron tế bào thần kinh và tế bào T.

RGMa liên kết với neogenin trong màng tế bào để cảm ứng sự hoạt hóa RhoA nội bào và sự bất hoạt Ras, nhờ đó tạo ra tác dụng ức chế sợi sự sinh trưởng nhanh của trục thần kinh. Đồng thời, neogenin còn được xác định là tạo ra sự chết tế bào theo

chương trình trong sự vắng mặt của liên kết RGMa trong não của gà đang trong giai đoạn phát triển (Matsunaga et al., Dev.Growth Differ.46, 481, 2004). Do đó, con đường RGMa/neogenin được cho là có hai tác dụng đối lập trong việc tăng cường sự sống sót của neuron tế bào thần kinh, mà là tác dụng có lợi đối với sự tái tạo dây thần kinh, và tác dụng bất lợi là ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh.

Đối với dược phẩm hướng đích RGM, Tài liệu sáng chế 1 bộc lộ dược phẩm đẩy mạnh sự tái tạo sợi trục thần kinh chứa kháng thể trung hòa kháng RGM làm hoạt chất. Tài liệu sáng chế 2 và 3 bộc lộ dược phẩm trị liệu đối với tổn thương cơ học đối với não và tủy sống, kháng thể kháng RGM mà điều hòa việc liên kết của RGM với thụ thể neogenin của nó. Tài liệu sáng chế 4 bộc lộ việc sử dụng trong y tế của kháng thể kháng RGM như đối với bệnh đa xơ cứng. Tài liệu sáng chế 5 bộc lộ việc sử dụng trong trị liệu của kháng thể kháng RGM đối với bệnh bao gồm bệnh đa xơ cứng, tổn thương não ở động vật có vú, tổn thương tủy sống, chứng ngập máu, bệnh thoái hóa thần kinh và bệnh tâm thần phân liệt. Ngoài ra, Tài liệu sáng chế 6 bộc lộ việc sử dụng trong trị liệu của chất điều biến RGM làm kháng thể kháng RGM đối với tổn thương tủy sống và bệnh đa xơ cứng, và Tài liệu sáng chế 3 bộc lộ việc sử dụng trong trị liệu đối với bệnh đa xơ cứng tiến triển.

Tài liệu đối chứng

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: WO2005/087268

Tài liệu sáng chế 2: Bản dịch đơn quốc tế sang tiếng Nhật số 2010-537655

Tài liệu sáng chế 3: Bản dịch đơn quốc tế sang tiếng Nhật số 2009-510002

Tài liệu sáng chế 4: WO2011/071059

Tài liệu sáng chế 5: Bản dịch đơn quốc tế sang tiếng Nhật số 2011-512806

Tài liệu sáng chế 6: Bản dịch đơn quốc tế sang tiếng Nhật số 2004-525875

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Neuron 5, 735-743 (1990)

Tài liệu phi sáng chế 2: J. Cell Biol. 173, 47-58 (2006)

Tài liệu phi sáng chế 3: Cell Reports 10, 1-12 (2015)

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần được giải quyết

Việc sử dụng trong trị liệu của kháng thể kháng RGMa chống lại bệnh thần kinh và miễn dịch được bộc lộ như được mô tả trên đây, nhưng kháng thể thông thường gặp phải các vấn đề như hoạt tính không đủ, khả năng làm giảm chức năng nội tại của RGMa, và tác dụng phụ. Cụ thể hơn, kháng thể thông thường có thể ức chế sự liên kết giữa RGMa và neogenin, do đó còn ức chế cả tác dụng có lợi như ức chế sự chết tế bào theo chương trình được tạo ra bởi neogenin được liên kết với RGMa.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất protein liên kết RGMa mà không ức chế sự tương tác RGMa/neogenin nhưng làm trung hòa hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh của RGMa.

Cách thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu sâu rộng để giải quyết các vấn đề trên đây. Do đó, các tác giả sáng chế đã thành công trong việc tạo ra protein liên kết RGMa mà không ức chế sự liên kết giữa RGMa và neogenin nhưng làm trung hòa hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh của RGMa, và phát hiện ra rằng protein liên kết RGMa có thể được sử dụng làm thuốc đối với bệnh thần kinh hoặc miễn dịch, do đó đã tạo ra sáng chế.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất:

- [1]. Protein liên kết RGMa được phân lập, mà không ức chế sự liên kết giữa RGMa và neogenin nhưng làm trung hòa hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh của RGMa.
- [2]. Protein liên kết RGMa theo mục [1], mà liên kết với RGMa ở người, chuột và/hoặc chuột nhắt.
- [3]. Protein liên kết RGMa theo mục [1] hoặc [2], mà liên kết với peptit có trình tự EEVVNAVEDWDSQG (SEQ ID NO: 26 trong Danh mục trình tự sau đây), NQQIDFQAFHTNAE (SEQ ID NO: 27 trong Danh mục trình tự), PTAPETFPYET (SEQ ID NO: 28 trong Danh mục trình tự), và/hoặc KLPVEDLYYQA (SEQ ID NO: 29 trong Danh mục trình tự).
- [4]. Protein liên kết RGMa theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3], mà liên

kết với peptit có trình tự SEQ ID NO: 26 và 27 trong Danh mục trình tự.

[5]. Protein liên kết RGMa theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [4], mà liên kết với peptit có trình tự SEQ ID NO: 26, 27 và 28 trong Danh mục trình tự.

[6]. Protein liên kết RGMa theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [4], mà liên kết với peptit có trình tự SEQ ID NO: 26, 27 và 29 trong Danh mục trình tự.

[7]. Protein liên kết RGMa theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [6], trong đó protein liên kết RGMa là kháng thể người, kháng thể được nhân hóa hoặc kháng thể khảm, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

[8]. Phân tử axit nucleic mã hóa mảnh protein của protein liên kết RGMa theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7].

[9]. Vector tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic theo mục [8].

[10]. Tế bào vật chủ chứa vector tái tổ hợp theo mục [9].

[11]. Phương pháp sản xuất protein liên kết RGMa theo mục [1] đến [7], phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ theo mục [10].

[12]. Dược phẩm chứa protein liên kết RGMa theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7].

[13]. Dược phẩm theo mục [12] để sử dụng trong việc ngăn ngừa, điều trị, hoặc phòng ngừa sự tái phát bệnh thần kinh hoặc miễn dịch.

[14]. Dược phẩm theo mục [13], trong đó thần kinh bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh xơ cột bên teo cơ, chấn thương thần kinh cánh tay, tổn thương não (bao gồm chấn thương sọ não), bại não, hội chứng Guillain-Barre, loạn dưỡng chất trắng não, bệnh đa xơ cứng (bao gồm bệnh đa xơ cứng dạng tái phát-thuyên giảm, bệnh đa xơ cứng tiến triển nguyên phát, bệnh đa xơ cứng tiến triển thứ phát), viêm tủy - thị thần kinh, hội chứng sau viêm tủy xám, tật nứt đốt sống, tổn thương tủy sống, teo cơ tủy sống, ung thư xương sống, viêm tủy ngang, sa sút trí tuệ (bao gồm sa sút trí tuệ do lão hóa, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh Alzheimer, sa sút trí tuệ liên quan đến bệnh Alzheimer), bệnh Huntington, rối loạn vận động muộn, chứng hưng cảm, bệnh Parkinson, hội chứng Steele-Richardson, hội chứng Down, nhược cơ, chấn thương thần kinh (bao gồm chấn thương dây thần kinh thị giác), chứng thoái hóa dạng tinh bột trong mạch, xuất huyết não liên quan đến chứng thoái hóa dạng tinh bột, nhồi máu

não, viêm não, trạng thái lú lẫn cấp tính, bệnh tăng nhãn áp, bệnh tâm thần phân liệt và sự thoái hóa lớp sợi thần kinh võng mạc (bao gồm bệnh võng mạc do tiểu đường, bệnh thần kinh võng mạc do thiếu máu cục bộ, tách lớp võng mạc do di truyền, bệnh thần kinh thị giác do thuốc, bệnh loạn dưỡng võng mạc, thoái hóa điểm vàng do lão hóa, bệnh về mắt đặc trưng bởi đầu thần kinh thị giác, bệnh về mắt đặc trưng bởi yếu tố quyết định di truyền đối với sự thoái hóa tế bào nhận kích thích ánh sáng, sự loạn dưỡng tế bào hình nón-hình que di truyền dạng lặn của nhiễm sắc thể thường, rối loạn ở ty lạp thể liên quan đến bệnh lý thần kinh thị giác).

[15]. Được phẩm theo mục [13], trong đó bệnh miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm bệnh đa xơ cứng (bao gồm bệnh đa xơ cứng dạng tái phát-thuyên giảm, bệnh đa xơ cứng tiến triển nguyên phát, bệnh đa xơ cứng tiến triển thứ phát), viêm tủy - thị thần kinh, bệnh vẩy nến, chứng viêm khớp (bao gồm bệnh thấp khớp, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm khớp vẩy nến), hội chứng Guillain-Barre, bệnh thần kinh Behcet, bệnh thiếu máu ác tính, bệnh tiểu đường (phụ thuộc insulin) typ I, bệnh lupus ban đỏ hệ thống (systemic lupus erythematosus - SLE), bệnh viêm ruột (inflammatory bowel disease - IBD), hội chứng Sjogren, hội chứng Goodpasture, bệnh Graves, chứng thiếu máu mất hồng cầu tự miễn dịch, bệnh xuất hiện giảm tiểu cầu tự miễn dịch, bệnh hen suyễn, bệnh phân hoa, bệnh viêm da cơ địa, viêm thận tiểu cầu, nhược cơ, bệnh Hashimoto, và bệnh sarcoid.

[16]. Được phẩm theo mục [13], trong đó bệnh thần kinh hoặc miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm tổn thương tủy sống, chấn thương thần kinh (bao gồm chấn thương dây thần kinh thị giác) và bệnh đa xơ cứng (bao gồm bệnh đa xơ cứng dạng tái phát-thuyên giảm, bệnh đa xơ cứng tiến triển nguyên phát, bệnh đa xơ cứng tiến triển thứ phát).

[17]. Kháng thể kháng RGMa được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, trong đó trình tự axit amin của mỗi trong số các vùng quyết định hỗ trợ chuỗi nhẹ 1 (light chain complementarity determining region 1 - LCDR1), vùng quyết định hỗ trợ chuỗi nhẹ 2 (light chain complementarity determining region 2 - LCDR2), vùng quyết định hỗ trợ chuỗi nhẹ 3 (light chain complementarity determining region 3 - LCDR3), vùng quyết định hỗ trợ chuỗi nặng 1 (heavy chain complementarity determining region 1 - HCDR1), vùng quyết định hỗ trợ chuỗi nặng 2 (heavy chain complementarity determining region 2 - HCDR2) và vùng quyết định hỗ trợ chuỗi nặng 3 (heavy chain complementarity determining region 3 - HCDR3) chứa trình tự

sau đây:

LCDR1:RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 30 trong Danh mục trình tự)

LCDR2:YTSRLHS (SEQ ID NO: 31 trong Danh mục trình tự)

LCDR3:QQLNTLP (SEQ ID NO: 32 trong Danh mục trình tự)

HCDR1:DAWMD (SEQ ID NO: 33 trong Danh mục trình tự)

HCDR2:EIRSKANNHATYYAESVKG (SEQ ID NO: 34 trong Danh mục trình tự) và

HCDR3:RDGAY (SEQ ID NO: 35 trong Danh mục trình tự);

hoặc

LCDR1:RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 36 trong Danh mục trình tự)

LCDR2:KVSNRFS (SEQ ID NO: 37 trong Danh mục trình tự)

LCDR3:SQSTHVP (SEQ ID NO: 38 trong Danh mục trình tự)

HCDR1:TSYYWN (SEQ ID NO: 39 trong Danh mục trình tự)

HCDR2:YISYDGTNNYNPSLKN (SEQ ID NO: 40 trong Danh mục trình tự) và

HCDR3:SFG, và

trong đó trong, mỗi trong số các trình tự CDR, một hoặc một số axit amin có thể được thế, được loại bỏ, và/hoặc được bổ sung.

[18]. Kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo mục [17],

trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự sau đây:

VH:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLEWVAEI
RSKANNHATYYAESVKGRFTISRDDSKSIVYLQMNSLRTEDTALYYCTRRDG
AYWGKGTTVTVSS (SEQ ID NO: 41 trong Danh mục trình tự) hoặc trình tự axit
amin có độ tương đồng là ít nhất 90% với trình tự axit amin này; và

trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự sau đây:

VL:

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRL
HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFASYFCQQLNTPWTFGGGGTKVEME

(SEQ ID NO: 42 trong Danh mục trình tự) hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng là ít nhất 90% với trình tự axit amin này.

[19]. Kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo mục [17] hoặc [18], trong đó kháng thể kháng thể kháng RGMa được nhân hóa.

[20]. Kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ [17] đến [19], trong đó kháng thể kháng RGMa chứa vùng hằng định của IgG ở người.

[21]. Protein liên kết RGMa, mà bổ sung cho kháng thể kháng RGMa theo mục [17] hoặc [18] để liên kết với RGMa.

[22]. Phân tử axit nucleic mã hóa mảnh protein của kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ [17] đến [20].

[23]. Phân tử axit nucleic theo mục [22], trong đó mỗi trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin VH và VL là trình tự nucleotit chứa:

VH:

gaagtgcagctggtggaatctggcggcgactggtgcagcctggcagatccctgagactgtcctgtaccgcctccggcttc
accttctccgacgcctggatggattgggtgcgacaggctcctggcaagggcctggaatgggtggccgagatccgggtccaa
ggccaacaaccacgccacactactacgccgagtctgtgaagggccggttcaccatctcccgggacgactccaagtccatcgt
gtacctgcagatgaactccctgcggaccgaggacaccgccctgtactactgcaccagaagggacggcgccctactggggc
aagggcaccacagtgcagtgctctcc (SEQ ID NO: 43 trong Danh mục trình tự), và

VL:

gacatccagatgacccagtcctccctcctcctgtctgtctccgtggcgacagagtgaccatcacctgtcgggcctccag
gacatctcctcctacactgaactggtatcagcagaagcccggaaggccccaagctgctgatctactacacctcccggtgc
actcggcgctgccctctagattttccggctctggctccggcaccgactttaccctgacctctccagcctgcagcccgagga
cttcgcctcctacttctgtcagcagctgaacaccctgccctggacctttggcggaggcaccaaggtggaaatggaa (SEQ
ID NO: 44 trong Danh mục trình tự).

[24]. Vector tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic theo mục [22] hoặc [23].

[25]. Tế bào vật chủ chứa vector tái tổ hợp theo mục [24].

[26]. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ [17] đến [20], phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ theo mục [25].

[27]. Dược phẩm chứa kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo mục bất kỳ trong số các mục từ [17] đến [20].

[28]. Dược phẩm theo mục [27] để sử dụng trong việc ngăn ngừa, điều trị, hoặc phòng ngừa sự tái phát bệnh thần kinh hoặc miễn dịch.

[29]. Dược phẩm theo mục [28], trong đó thần kinh bệnh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh xơ cột bên teo cơ, chấn thương thần kinh cánh tay, tổn thương não (bao gồm chấn thương sọ não), bại não, hội chứng Guillain-Barre, loạn dưỡng chất trắng não, bệnh đa xơ cứng (bao gồm bệnh đa xơ cứng dạng tái phát-thuyên giảm, bệnh đa xơ cứng tiến triển nguyên phát, bệnh đa xơ cứng tiến triển thứ phát), viêm tủy - thị thần kinh, hội chứng sau viêm tủy xám, tật nứt đốt sống, tổn thương tủy sống, teo cơ tủy sống, ung thư xương sống, viêm tủy ngang, sa sút trí tuệ (bao gồm sa sút trí tuệ do lão hóa, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh Alzheimer, sa sút trí tuệ liên quan đến bệnh Alzheimer), bệnh Huntington, rối loạn vận động muộn, chứng hưng cảm, bệnh Parkinson, hội chứng Steele-Richardson, hội chứng Down, nhược cơ, chấn thương thần kinh (bao gồm chấn thương dây thần kinh thị giác), chứng thoái hóa dạng tinh bột trong mạch, xuất huyết não liên quan đến chứng thoái hóa dạng tinh bột, nhồi máu não, viêm não, trạng thái lú lẫn cấp tính, bệnh tăng nhãn áp, bệnh tâm thần phân liệt và sự thoái hóa lớp sợi thần kinh võng mạc (bao gồm bệnh võng mạc do tiểu đường, bệnh thần kinh võng mạc do thiếu máu cục bộ, tách lớp võng mạc do di truyền, bệnh thần kinh thị giác do thuốc, bệnh loạn dưỡng võng mạc, thoái hóa điểm vàng do lão hóa, bệnh về mắt đặc trưng bởi đầu thần kinh thị giác, bệnh về mắt đặc trưng bởi yếu tố quyết định di truyền đối với sự thoái hóa tế bào nhận kích thích ánh sáng, sự loạn dưỡng tế bào hình nón-hình que di truyền dạng lặn của nhiễm sắc thể thường, rối loạn ở ty lạp thể liên quan đến bệnh lý thần kinh thị giác).

[30]. Dược phẩm theo mục [28], trong đó bệnh miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm bệnh đa xơ cứng (bao gồm bệnh đa xơ cứng dạng tái phát-thuyên giảm, bệnh đa xơ cứng tiến triển nguyên phát, bệnh đa xơ cứng tiến triển thứ phát), viêm tủy - thị thần kinh, bệnh vẩy nến, chứng viêm khớp (bao gồm bệnh thấp khớp, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm khớp vẩy nến), hội chứng Guillain-Barre, bệnh thần kinh Behcet, bệnh thiếu máu ác tính, bệnh tiểu đường (phụ thuộc insulin) typ I, bệnh lupus ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh viêm ruột (IBD), hội chứng Sjogren, hội chứng Goodpasture, bệnh Graves, chứng thiếu máu mắt hồng cầu tự miễn dịch, bệnh xuất hiện giảm tiểu

cầu tự miễn dịch, bệnh hen suyễn, bệnh phấn hoa, bệnh viêm da cơ địa, viêm thận tiểu cầu, nhược cơ, bệnh Hashimoto, và bệnh sarcoid.

[31]. Dược phẩm theo mục [28], trong đó bệnh thần kinh hoặc miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm tổn thương tủy sống, chấn thương thần kinh (bao gồm chấn thương dây thần kinh thị giác) và bệnh đa xơ cứng (bao gồm bệnh đa xơ cứng dạng tái phát-thuyên giảm, bệnh đa xơ cứng tiến triển nguyên phát, bệnh đa xơ cứng tiến triển thứ phát).

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Protein liên kết RGMa theo sáng chế không ức chế sự tương tác giữa RGMa và neogenin, do đó có thể duy trì tác dụng như tác dụng ức chế sự chết tế bào theo chương trình trong neuron tế bào thần kinh và tác dụng tương tự được tạo ra bởi neogenin được liên kết với RGMa, do đó có tác dụng bảo vệ mạnh trong neuron tế bào thần kinh và ít gây ra tác dụng phụ liên quan đến sự thiếu hụt neuron tế bào thần kinh. Ngoài ra, kháng thể được nhân hóa kháng RGMa theo sáng chế là tốt hơn kháng thể thông thường xét về các đặc tính như sự liên kết với RGMa ở người và độ ổn định nhiệt. Do đó, kháng thể này có thể được sử dụng làm thuốc điều trị bệnh thần kinh hoặc miễn dịch mà có hiệu quả trị liệu rất tốt và ít tác dụng phụ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện kết quả của thử nghiệm ức chế sự liên kết RGMa-neogenin bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng kháng RGMa (AF2459), kháng thể của ví dụ so sánh (r5F9), và kháng thể theo sáng chế (r70E4 và 116A3).

Fig.2 thể hiện kết quả của thử nghiệm ức chế sự liên kết RGMa-BMP2 bằng cách sử dụng IgG ở chuột làm đối chứng và kháng thể theo sáng chế (B5.70E4 và B5.116A3).

Fig.3 thể hiện kết quả của thử nghiệm độ ổn định nhiệt đối với kháng thể bằng cách sử dụng kháng thể của ví dụ so sánh (rH5F9), kháng thể khảm theo sáng chế (r116A3C) và kháng thể được nhân hóa theo sáng chế (HE/KA và HA/KC).

Fig.4 thể hiện kết quả của thử nghiệm về sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh bằng cách sử dụng kháng thể theo sáng chế (B5.70E4 (bên trái) và B5.116A3 (bên phải)).

Fig.5 thể hiện kết quả của thử nghiệm về mức độ hiệu quả bằng cách sử dụng

IgG ở chuột làm đối chứng (mo-IgG2bk), và kháng thể theo sáng chế (r70E4 và r116A3) và bằng cách sử dụng mẫu chuột mắc tổn thương tủy sống. Kết quả của thử nghiệm về mức độ hiệu quả trong (A) mẫu ép tủy sống và (B) mẫu cắt đứt một nửa tủy sống được thể hiện.

Fig.6 thể hiện kết quả của thử nghiệm về mức độ hiệu quả đối với kháng thể theo sáng chế (B5.116A3) bằng cách sử dụng mẫu chuột mắc bệnh đa xơ cứng gây ra bởi peptit PLP₁₃₉₋₁₅₁. Phía bên trái thể hiện điểm EAE, phía bên phải thể hiện sự thay đổi về thể trọng, và phần đáy và đỉnh thể hiện kết quả khi kháng thể thử nghiệm được sử dụng lần lượt sau 7 và 10 ngày và sau 18 và 21 ngày.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để tạo thuận lợi cho việc hiểu hơn về sáng chế, các thuật ngữ được sử dụng trong sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn sau đây.

RGMa

RGMa là protein ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh trong hệ thần kinh trung ương và protein RGMa ở người được sinh tổng hợp dưới dạng protein tiền chất chứa 450 axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 trong Danh mục trình tự. Peptit tín hiệu Met 1 đến Pro 47 có mặt ở đầu cuối N (mà chỉ peptit từ gốc methionin thứ nhất đến gốc prolin 47 gốc từ mạch nhánh đầu cuối N, được mô tả theo cách tương tự sau đây) được loại bỏ, liên kết peptit giữa Asp 168 và Pro 169 được phân cắt, và peptit đầu cuối C Arg 423 đến Cys 450 được loại bỏ và đồng thời phần cố định GPI được bổ sung vào nhóm carboxyl đầu cuối C của Gly 422 mà trở thành đầu cuối C. Protein RGMa ở người được biểu hiện trong màng tế bào thông qua phần cố định GPI làm protein trưởng thành trong đó vùng đầu cuối N (Cys 48 đến Asp 168) và vùng đầu cuối C (Pro 169 đến Ala 424) được nối với nhau bằng liên kết disulfua. Protein tiền chất của RGMa của chuột nhất chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2 trong Danh mục trình tự và protein tiền chất của RGMa của chuột chứa trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 3 trong Danh mục trình tự. Do peptit đầu cuối C của chúng được loại bỏ, protein trưởng thành từ đó có cùng trình tự axit amin. Theo sáng chế, RGMa có thể chỉ protein tiền chất, protein trưởng thành hoặc mảnh hoạt tính của nó, hoặc có thể là dẫn xuất hoặc biến thể của nó, miễn là nó tác động thông qua sự liên kết với neogenin như được mô tả sau đây. RGMa có thể là

RGMa ở người hoặc RGMa được tạo ra từ vi sinh vật khác, nhưng RGMa ở người được ưu tiên.

Neogenin

Neogenin được biểu hiện trong, ví dụ, noron tế bào thần kinh trung ương và có chức năng làm một trong các thụ thể RGMa. Như được thể hiện trong SEQ ID NO: 10 trong Danh mục trình tự, protein neogenin ở người chứa 1461 axit amin và được biểu hiện ở dạng protein xuyên màng trưởng thành sau khi loại bỏ peptit tín hiệu Met 1 đến Ala 33. Theo sáng chế, neogenin có thể chỉ protein tiền chất, protein trưởng thành hoặc mảnh liên kết RGMa, hoặc có thể là dẫn xuất hoặc biến thể của nó, miễn là nó liên kết với RGMa. Neogenin có thể là neogenin ở người hoặc neogenin được tạo ra từ vi sinh vật khác, nhưng neogenin ở người được ưu tiên.

Sự trung hòa

Thuật ngữ "sự trung hòa" như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ tác động thông qua đó sự liên kết với đích liên quan và sự ức chế đối với chức năng bất kỳ của đích có thể xảy ra. Nói cách khác, cụm từ "trung hòa hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh của RGMa" nghĩa là protein liên kết RGMa liên kết với RGMa, do đó ức chế hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh của RGMa. Hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh có thể được xác định bởi một hoặc nhiều thử nghiệm in vitro hoặc in vivo đã biết trong lĩnh vực này, và có thể được xác định bởi, ví dụ, thử nghiệm ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh được mô tả trong bản mô tả này.

Được phân lập

Thuật ngữ "được phân lập" như trong protein liên kết RGMa được phân lập nghĩa là được xác định, và được phân tách và/hoặc được thu hồi từ các thành phần ở trạng thái tự nhiên của nó. Các tạp chất trong các chất ở trạng thái tự nhiên mà có thể ảnh hưởng đến việc chuẩn đoán hoặc sử dụng trong trị liệu của kháng thể, bao gồm enzym, hocmon và các chất hòa tan dạng protein hoặc không protein khác. Nói chung, quá trình phân lập protein liên kết RGMa hoặc dạng tương tự có thể được thực hiện bằng ít nhất một bước tinh chế. Protein liên kết RGMa được tinh chế bằng ít nhất một bước tinh chế có thể dùng làm "Protein liên kết RGMa được phân lập".

Protein liên kết RGMa

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "protein liên kết RGMA" chỉ phân tử chứa protein mà liên kết với RGMA. Ví dụ về protein liên kết RGMA bao gồm kháng thể kháng RGMA và mảnh liên kết kháng nguyên của nó; protein khung liên kết RGMA; protein thụ thể RGMA hòa tan như vùng ngoại bào của Neogenin; và protein dung hợp của nó. Thuật ngữ "protein khung liên kết RGMA" chỉ protein mà nhận ra chức năng của việc liên kết với RGMA bằng cách bổ sung các đột biến vào trong vùng Kunitz của chất ức chế serin proteaza, vùng ngoại bào của fibronectin ở người, ankyrin, lipocalin hoặc dạng tương tự. Thuật ngữ "protein dung hợp" chỉ protein liên kết RGMA được liên kết về mặt hóa học hoặc biến đổi gen với phân tử chức năng mà không phải protein liên kết RGMA theo sáng chế như polyme không peptit như polyetylen glycol (PEG), chất phóng xạ, độc tố, hợp chất phân tử lượng thấp, xytokin, yếu tố tăng trưởng (ví dụ, TGF- β , NGF, neurotrophin), albumin, enzym, và kháng thể khác.

Kháng thể người

Thuật ngữ "kháng thể người" chỉ kháng thể trong đó cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được tạo ra từ immunoglobulin (globulin miễn dịch) ở người. Phụ thuộc vào sự khác nhau về vùng hằng định của chuỗi nặng, kháng thể người bao gồm IgG có chuỗi nặng- γ (bao gồm IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4), IgM có chuỗi nặng- μ , IgA có chuỗi nặng- α (bao gồm IgA1 và IgA2), IgD có chuỗi nặng- δ , hoặc IgE có chuỗi nặng- ϵ . Chuỗi nhẹ, về cơ bản, chứa chuỗi κ hoặc chuỗi λ .

Kháng thể được nhân hóa

Thuật ngữ "kháng thể được nhân hóa" chỉ kháng thể chứa vùng biến đổi chứa vùng xác định bổ trợ của kháng thể được tạo ra từ động vật không phải người và vùng khung được tạo ra từ kháng thể người, và vùng hằng định được tạo ra từ kháng thể người.

Kháng thể khảm

Thuật ngữ "kháng thể khảm" chỉ kháng thể trong đó chuỗi nhẹ, chuỗi nặng, hoặc cả hai chứa vùng biến đổi được tạo ra không phải từ người và vùng hằng định được tạo ra từ người.

Kháng thể kháng RGMA

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể kháng RGMa" chỉ phân tử immunoglobulin mà liên kết với RGMa, hoặc phân tử được biến đổi của nó. Phân tử được biến đổi bao gồm kháng thể đa đặc hiệu, kháng thể khảm, kháng thể được nhân hóa, kháng thể được biến đổi về mặt chức năng, và kháng thể liên hợp.

Kháng thể đa đặc hiệu

Thuật ngữ "kháng thể đa đặc hiệu" chỉ kháng thể bất đối xứng chứa hai hoặc nhiều vị trí nhận biết kháng nguyên độc lập có hai hoặc nhiều tính đặc hiệu kháng nguyên khác nhau, bao gồm kháng thể đặc hiệu kép có hai tính đặc hiệu kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu ba trong một có ba tính đặc hiệu kháng nguyên.

Kháng thể được biến đổi về mặt chức năng

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể được biến đổi về mặt chức năng" chỉ kháng thể trong đó chức năng khác với chức năng liên kết kháng nguyên của kháng thể, bao gồm chức năng tiêu diệt tế bào, chức năng hoạt hóa bổ thể và chức năng kéo dài thời gian bán thải trong huyết thanh, được biến đổi bằng cách biến đổi chủ yếu chuỗi đường hoặc axit amin của vùng Fc của kháng thể.

Kháng thể liên hợp

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể liên hợp" chỉ kháng thể được liên kết về mặt hóa học hoặc biến đổi gen với phân tử chức năng khác với kháng thể như polyme không peptit như polyetylen glycol (PEG), chất phóng xạ, độc tố, hợp chất phân tử lượng thấp, xytokin, yếu tố tăng trưởng (ví dụ, TGF- β , NGF, neurotrophin), albumin, và enzym.

Mảnh liên kết kháng nguyên

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "mảnh liên kết kháng nguyên" chỉ protein mà chứa một phần của kháng thể và có thể liên kết với kháng nguyên. Ví dụ về mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm F(ab')₂, Fab', Fab, Fv (mảnh biến đổi của kháng thể), Fv chứa liên kết disulfua, kháng thể chuỗi đơn (scFv), và polyme của nó. Ngoài ra, mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm mảnh liên kết kháng nguyên liên hợp được liên kết về mặt hóa học hoặc biến đổi gen với phân tử chức năng khác với kháng thể kháng RGMa theo sáng chế như polyme không peptit như polyetylen glycol (PEG), chất phóng xạ, độc tố, hợp chất phân tử lượng thấp, xytokin,

yếu tố tăng trưởng (ví dụ, TGF- β , NGF, neurotrophin), albumin, enzym, và kháng thể khác.

Vùng xác định hỗ trợ

Thuật ngữ "vùng xác định hỗ trợ (CDR)" chỉ vùng tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên trong vùng biến đổi của phân tử immunoglobulin, mà còn được gọi là vùng siêu biến, và cụ thể là chỉ phần trong đó trình tự axit amin thay đổi đáng kể đối với mỗi phân tử immunoglobulin. Đối với CDR, mỗi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có ba CDR (LCDR1, LCDR2, LCDR3, và HCDR1, HCDR2, HCDR3). Theo sáng chế, CDR của phân tử immunoglobulin được xác định theo hệ đánh số Kabat (Kabat et al., 1987, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, NIH, USA).

Phần trăm (%) độ tương đồng của trình tự axit amin

"Phần trăm (%) độ tương đồng" liên quan đến trình tự polypeptit tham chiếu cụ thể, như vùng biến đổi, được xác định là phần trăm của gốc axit amin trong trình tự có thể chọn mà tương đồng với gốc axit amin của trình tự polypeptit tham chiếu cụ thể, sau khi sắp xếp trình tự và bổ sung phần thiếu sót nếu cần để thu được % độ tương đồng tối đa và giả thiết rằng không có sự thể bảo toàn được xem là một phần của độ tương đồng trình tự. Sự sắp xếp để xác định % độ tương đồng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính có sẵn như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN, hoặc Megalign (DNASTAR). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định được các thông số phù hợp để thực hiện việc sắp xếp trình tự, bao gồm thuật giải bất kỳ cần để thực hiện sự sắp xếp tối đa trên chiều dài hoàn chỉnh của trình tự được so sánh. Tuy nhiên, đối với mục đích trong bản mô tả này, % giá trị độ tương đồng được tạo ra bằng cách sử dụng trình tự chương trình máy tính so sánh BLAST trong bất cập sự sắp xếp.

Trong trường hợp trong đó BLAST được sử dụng để so sánh trình tự axit amin, % độ tương đồng của trình tự axit amin A đã cho đối với trình tự axit amin B đã cho được xác định như sau:

$$100 \text{ lần phân số } X/Y$$

trong đó X là số lượng của gốc axit amin được xác định làm mức tương đồng bởi chương trình sắp xếp trình tự BLAST trong việc sắp xếp A và B của chương trình

này, và trong đó Y là tổng số lượng của gốc axit amin trong B. Cần phải hiểu rằng nếu chiều dài của trình tự axit amin A khác với chiều dài của trình tự axit amin B, thì % độ tương đồng của A so với B sẽ khác với % độ tương đồng của B so với A. Trừ khi được chỉ ra theo cách cụ thể khác, tất cả các % giá trị độ tương đồng trong bản mô tả này được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình máy tính BLAST như được thể hiện trong phần mô tả trên đây.

Cạnh tranh

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "cạnh tranh" với kháng thể kháng RGMa theo sáng chế nghĩa là, như được xác định bằng phổ cộng hưởng plasmon bề mặt (surface plasmon resonance - SPR) được mô tả trong bản mô tả này, sự liên kết giữa kháng thể kháng RGMa theo sáng chế và RGMa bị giảm với mức khác nhau đáng kể do sự có mặt của kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó trên đây.

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Protein liên kết RGMa

Protein liên kết RGMa theo sáng chế là protein liên kết RGMa được phân lập, mà không ức chế sự liên kết giữa RGMa và neogenin nhưng làm trung hòa hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh của RGMa.

Tốt hơn là, protein RGMa là protein RGMa được tạo ra từ động vật có vú.

Ví dụ, protein RGMa ở người bao gồm protein có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1 trong Danh mục trình tự, protein RGMa ở chuột nhắt bao gồm protein có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 2 trong Danh mục trình tự, và protein RGMa ở chuột bao gồm protein có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 3 trong Danh mục trình tự. Polypeptit chứa trình tự axit amin trong đó một hoặc một số (tốt hơn là 1 đến 20, tốt hơn nữa là 1 đến 10, tốt hơn nữa là 1 đến 5) axit amin trong trình tự này được thế, được loại bỏ, được chèn và/hoặc được bổ sung và về cơ bản có cùng hoạt tính như là protein RGMa; hoặc polypeptit chứa trình tự axit amin có 90% hoặc cao hơn (tốt hơn là 95% hoặc cao hơn) độ tương đồng với trình tự axit amin có thể được ưu tiên hơn.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, polypeptit "về cơ bản có cùng hoạt tính như là protein RGMa" bao gồm polypeptit bất kỳ miễn là polypeptit này có tác

dụng ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh.

Sự thế axit amin tốt hơn là sự thế bảo toàn. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "sự thế bảo toàn" nghĩa là sự thay thế gốc axit amin bằng gốc axit amin tương tự về mặt hóa học khác sao cho về cơ bản không làm thay đổi hoạt tính của peptit. Ví dụ, sự thế một gốc kỵ nước bằng gốc kỵ nước khác, sự thế một gốc phân cực bằng gốc phân cực khác có cùng điện tích, và dạng tương tự. Ví dụ về axit amin tương tự về mặt chức năng trong đó có thể thực hiện được sự thế này bao gồm, như axit amin không phân cực (kỵ nước), alanin, valin, isoleuxin, leuxin, prolin, tryptophan, phenylalanin và methionin. Ví dụ về axit amin phân cực (trung tính) bao gồm glyxin, serin, threonin, tyrosin, glutamin, asparagin, và xystein. Ví dụ về axit amin (có tính bazơ) có điện tích dương bao gồm arginin, histidin và lysin. Ví dụ về axit amin (có tính axit) có điện tích âm bao gồm axit aspartic và axit glutamic.

Việc liên kết của protein liên kết RGMa theo sáng chế với RGMa nghĩa là sự liên kết đặc hiệu RGMa. Được ưu tiên hơn là protein liên kết RGMa có hằng số phân ly thấp (Kd) đối với RGMa ở người, ví dụ, 10^{-8} M hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 10^{-9} M hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 10^{-10} M hoặc thấp hơn làm giá trị giới hạn trên, và ví dụ nhưng không chỉ giới hạn ở, 10^{-14} M hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 10^{-13} hoặc cao hơn làm giá trị giới hạn dưới.

Protein RGMa chứa vùng đầu cuối N và vùng đầu cuối C làm protein trưởng thành, nhưng có hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh chỉ với vùng đầu cuối C. Protein liên kết RGMa theo sáng chế tốt hơn là chỉ liên kết với vùng đầu cuối C của RGMa để làm trung hòa hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh. Được ưu tiên hơn là protein liên kết RGMa có hằng số phân ly thấp (Kd) đối với vùng đầu cuối C của RGMa ở người, ví dụ, 10^{-8} M hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 10^{-9} M hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 10^{-10} M hoặc thấp hơn làm giá trị giới hạn trên, và ví dụ nhưng không chỉ giới hạn ở, 10^{-14} M hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 10^{-13} hoặc cao hơn làm giá trị giới hạn dưới.

Protein liên kết RGMa theo sáng chế không ức chế sự liên kết giữa RGMa và neogenin. Trong bản mô tả này, cụm từ "không ức chế sự liên kết giữa RGMa và neogenin" nghĩa là, trong hệ liên kết của RGMa và neogenin được thể hiện trong Ví dụ được mô tả sau đây, thậm chí khi nồng độ của protein liên kết RGMa tăng, sự liên kết giữa RGMa và neogenin về cơ bản không bị giảm. Ví dụ, trong trường hợp trong đó

protein liên kết RGMA được bổ sung vào hệ liên kết của RGMA và neogenin và nồng độ của nó tăng, nếu nồng độ của protein liên kết RGMA có IC50 không nhỏ hơn 10 $\mu\text{g/mL}$, tốt hơn nữa là không nhỏ hơn 50 $\mu\text{g/mL}$, tốt nhất là không nhỏ hơn 100 $\mu\text{g/mL}$, thì có thể cho rằng protein liên kết RGMA này không ức chế sự liên kết giữa RGMA và neogenin.

Neogenin được sử dụng đối với thử nghiệm liên kết với RGMA tốt hơn là neogenin có cùng loại như là RGMA. Nói cách khác, tốt hơn là neogenin ở chuột hoặc người được sử dụng lần lượt cho RGMA ở chuột hoặc người. Ví dụ về neogenin ở người bao gồm protein có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10 trong Danh mục trình tự. Tuy nhiên, miễn là nó có khả năng liên kết với RGMA, protein có trình tự axit amin với 90% hoặc cao hơn (tốt hơn là 95% hoặc cao hơn) độ tương đồng với SEQ ID NO: 10 trong Danh mục trình tự có thể được ưu tiên sử dụng.

Protein liên kết RGMA theo sáng chế làm trung hòa hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh của RGMA. Hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh có thể được đánh giá bằng thử nghiệm về sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh được thể hiện trong Ví dụ được mô tả sau đây. Việc bổ sung RGMA ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh, nhưng việc bổ sung protein liên kết RGMA lại ngăn ngừa việc ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh bởi RGMA. Protein liên kết RGMA theo sáng chế có thể làm trung hòa việc ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh bằng việc bổ sung RGMA bằng 50% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là bằng 80% hoặc cao hơn, và tốt nhất là bằng 90% hoặc cao hơn.

Do trình tự axit amin của protein RGMA thay đổi phụ thuộc vào loài động vật, nên còn có sự khác nhau về trình tự axit amin giữa RGMA ở người được thể hiện bằng trình tự SEQ ID NO: 1 trong Danh mục trình tự, RGMA của chuột nhất được thể hiện bằng trình tự SEQ ID NO: 2 trong Danh mục trình tự, và RGMA của chuột được thể hiện bằng trình tự SEQ ID NO: 3 trong Danh mục trình tự. Do loài gặm nhấm như chuột nhất và chuột thường được sử dụng làm động vật thí nghiệm trong thử nghiệm về dược lý và độ an toàn của chế phẩm chứa protein làm chế phẩm chứa kháng thể, nên protein liên kết RGMA theo sáng chế tốt hơn là liên kết với RGMA của chuột và/hoặc chuột nhất, và được ưu tiên hơn là các protein có Kd thấp đối với RGMA của chuột và/hoặc chuột nhất. Protein liên kết RGMA mà Kd có giá trị giới hạn trên là, ví dụ, 5×10^{-7} M hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 10^{-8} M hoặc thấp hơn, tốt hơn nữa là 10^{-9}

M hoặc thấp hơn, và giá trị giới hạn dưới là, ví dụ nhưng không chỉ giới hạn ở, 10^{-12} M hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 10^{-11} hoặc cao hơn có thể được sử dụng.

Protein liên kết RGMa theo sáng chế tốt hơn là có độ ổn định nhiệt tốt. Độ ổn định nhiệt có thể được đánh giá bằng sự giảm về việc liên kết với RGMa bởi việc xử lý bằng nhiệt, và protein liên kết RGMa theo sáng chế tốt hơn là ổn định thậm chí bởi việc xử lý bằng nhiệt ở 60°C hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là bởi việc xử lý bằng nhiệt ở 65°C hoặc cao hơn, tốt nhất là bởi việc xử lý bằng nhiệt ở 70°C hoặc cao hơn.

Vị trí liên kết khi protein liên kết RGMa theo sáng chế liên kết với RGMa không bị giới hạn một cách cụ thể. Ví dụ, trong RGMa ở người, sự liên kết với một hoặc nhiều peptit sau đây được ưu tiên: EEVVNAVEDWDSQG (SEQ ID NO: 26 trong Danh mục trình tự) (các axit amin 298-311 có SEQ ID NO: 1 trong Danh mục trình tự), NQQIDFQAFHTNAE (SEQ ID NO: 27 trong Danh mục trình tự) (các axit amin 322-335 có SEQ ID NO: 1 trong Danh mục trình tự), PTAPETFPYET (SEQ ID NO: 28 trong Danh mục trình tự) (các axit amin 349-359 có SEQ ID NO: 1 trong Danh mục trình tự), KLPVEDLYYQA (SEQ ID NO: 29 trong Danh mục trình tự) (các axit amin 367-377 có SEQ ID NO: 1 trong Danh mục trình tự). Protein liên kết RGMa theo sáng chế tốt hơn nữa là liên kết với SEQ ID NO: 26 và 27 của danh mục trình tự, tốt hơn nữa là với SEQ ID NO: 26 và 27 của danh mục trình tự và với SEQ ID NO: 28 hoặc 29 của danh mục trình tự.

Ví dụ cụ thể về protein liên kết RGMa bao gồm kháng thể kháng RGMa, protein khung liên kết RGMa, và protein dung hợp của nó.

Kháng thể kháng RGMa

Kháng thể kháng RGMa theo sáng chế bao gồm kháng thể đa dòng hoặc đơn dòng được tạo ra bằng cách sử dụng protein RGMa hoặc mảnh riêng phần của nó (ví dụ, mảnh chứa một hoặc nhiều SEQ ID NO: 26 đến 29 trong Danh mục trình tự trên đây) làm kháng nguyên và tạo miễn dịch cho động vật có vú như chuột nhắt với kháng nguyên này; kháng thể khảm và kháng thể được nhân hóa được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen; kháng thể người được tạo ra bằng cách sử dụng, ví dụ, động vật chuyển gen tạo kháng thể người; và dạng tương tự. Khi kháng thể theo sáng chế được sử dụng làm dược phẩm cho người, thì tốt hơn là sử dụng kháng thể được nhân hóa hoặc kháng thể người xét trên quan điểm về tác dụng phụ.

Kháng nguyên có thể được sử dụng một cách trực tiếp để tạo miễn dịch hoặc có thể được sử dụng ở dạng thể tiếp hợp với protein mang. Để điều chế thể tiếp hợp của kháng nguyên và protein mang, chất ngưng tụ như glutaraldehyt, carbodiimide và maleimide este hoạt tính có thể được sử dụng. Ví dụ về protein mang bao gồm albumin huyết thanh bò, thyroglobulin, hemocyanin, và KLH.

Ví dụ về động vật có vú được tạo miễn dịch bao gồm chuột nhắt, chuột, chuột đồng, chuột lang, thỏ, mèo, chó, lợn, dê, ngựa và trâu, và phương pháp tiêm chủng bao gồm việc sử dụng dưới da, trong cơ hoặc trong bụng. Khi sử dụng, kháng nguyên có thể được sử dụng trong hỗn hợp với tá dược Freund hoàn chỉnh hoặc tá dược Freund chưa hoàn chỉnh, và việc sử dụng thường được thực hiện một lần mỗi 2 đến 5 tuần. Tế bào sản xuất kháng thể được tạo ra từ lá lách hoặc hạch bạch huyết của động vật được tạo miễn dịch được dung hợp với tế bào u tủy và được phân lập làm tế bào lai. Đối với tế bào u tủy, các tế bào được tạo ra từ động vật có vú như chuột, chuột nhắt hoặc người được sử dụng.

Kháng thể đa dòng

Kháng thể đa dòng có thể được tạo ra bằng phương pháp sản xuất thông dụng hiện có. Cụ thể là, kháng thể đa dòng có thể được tạo ra từ huyết thanh được tạo ra từ động vật được tạo miễn dịch, ví dụ, bằng tạo miễn dịch cho động vật có vú như được mô tả trên đây với kháng nguyên như được mô tả trên đây cùng với tá dược Freund nếu cần.

Kháng thể đơn dòng

Kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra như sau. Cụ thể là, kháng nguyên như được mô tả trên đây được sử dụng làm chất tạo miễn dịch, và chất tạo miễn dịch được tiêm hoặc được cấy một hoặc một số lần kết hợp với tá dược Freund, nếu cần, vào động vật có vú như được mô tả trên đây dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, vào trong chân hoặc trong bụng để tạo miễn dịch. Nói chung, việc tạo miễn dịch được thực hiện 1 đến 4 lần mỗi 1 đến 14 ngày từ việc tạo miễn dịch ban đầu, và tế bào sản xuất kháng thể được tạo ra từ động vật có vú được tạo miễn dịch từ khoảng 1 đến 5 ngày sau việc tạo miễn dịch cuối cùng.

Kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này (ví dụ, "Current Protocols

in Molecular Biology" (John Wiley & Sons (1987)), Antibodies: A Laboratory Manual, Ed. Harlow and David Lan, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)).

Quá trình điều chế "tế bào lai" mà tiết kháng thể đơn dòng có thể được thực hiện theo phương pháp của Köhler và Milstein và cộng sự (Nature, 256, 495, 1975) và phương pháp tương tự với nó. Cụ thể là, tế bào lai được tạo ra bằng cách dung hợp tế bào sản xuất kháng thể có trong lá lách hoặc dạng tương tự được tạo ra từ động vật có vú được tạo miễn dịch với tế bào u tủy mà không có khả năng sản xuất thể tự kháng được tạo ra từ động vật có vú, tốt hơn là chuột, chuột nhắt hoặc người.

Ví dụ về tế bào u tủy mà có thể được sử dụng để dung hợp tế bào bao gồm tế bào u tủy được tạo ra từ chuột nhắt P3/X63-AG8.653 (653), P3/NSI/1-Ag4-1 (NS-1), P3/X63-Ag8.U1 (P3U1), SP2/0-Ag14 (Sp2/O, Sp2), PAI, F0 và BW5147, tế bào u tủy được tạo ra từ chuột 210RCY3-Ag.2.3., và tế bào u tủy được tạo ra từ người U-266AR1, GM1500-6TG-A1-2, UC729-6, CEM-AGR, D1R11 và CEM-T15.

Ví dụ về chất hỗ trợ dung hợp bao gồm polyetylen glycol và chất tương tự. Nói chung, tế bào sản xuất kháng thể và tế bào u tủy thường ở tỷ lệ số lượng là khoảng 1: 1 đến 10: 1 được cho phản ứng, bằng cách sử dụng polyetylen glycol (phân tử lượng trung bình: 1000 đến 4000) ở nồng độ khoảng 20 đến 50%, ở nhiệt độ là 20 đến 40°C, tốt hơn là 30 đến 37°C trong khoảng 1 đến 10 phút, nhờ đó quá trình dung hợp tế bào có thể được thực hiện.

Việc sàng lọc dòng tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng có thể được thực hiện bằng cách nuôi cấy tế bào lai, ví dụ, trong vi đĩa và xác định hoạt tính của dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy trong các giếng đối với chất tạo miễn dịch bằng phương pháp hóa miễn dịch như ELISA.

Trong việc sàng lọc tế bào lai sản xuất kháng thể, ngoài thử nghiệm liên kết với protein RGMa, việc xác định liệu kháng thể không ức chế sự liên kết giữa protein RGMa và neogenin và việc xác định liệu kháng thể làm trung hòa chức năng của protein RGMa (hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh) còn được đánh giá. Các phương pháp sàng lọc này giúp chọn lọc được kháng thể kháng RGMa theo sáng chế.

Dòng có thể còn được tạo ra từ giếng chứa tế bào lai sản xuất kháng thể mong muốn bằng cách tạo dòng sử dụng giới hạn pha loãng. Việc chọn và nhân giống của tế

bào lai thường được thực hiện trong môi trường nuôi cấy tế bào động vật chứa 10 đến 20% huyết thanh thai bò được bổ trợ bằng HAT (hypoxanthin, aminopterin và thymidin).

Kháng thể đơn dòng từ tế bào lai có thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy tế bào lai in vitro hoặc phát triển chúng in vivo, ví dụ, trong dịch cổ trướng của động vật có vú như chuột nhắt và chuột và phân lập kháng thể đơn dòng từ dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy thu được hoặc dịch cổ trướng của động vật có vú.

Khi được nuôi cấy in vitro, tế bào lai được phát triển, được duy trì, và được bảo quản theo các điều kiện như đặc tính và phương pháp nuôi cấy đối với dòng tế bào cần được nuôi cấy, và môi trường dinh dưỡng thích hợp đối với việc sản xuất kháng thể đơn dòng trong dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy có thể được sử dụng.

Ví dụ về môi trường bazơ bao gồm môi trường nghèo canxi như môi trường Ham F12, môi trường MCDB 153 hoặc môi trường MEM nghèo canxi và môi trường giàu canxi như môi trường MCDB 104, môi trường MEM, môi trường D-MEM, môi trường RPMI 1640, môi trường ASF 104 hoặc môi trường RD. Môi trường bazơ có thể chứa, ví dụ, huyết thanh, hormone, cytokin và/hoặc các chất vô cơ hoặc hữu cơ tùy theo mục đích.

Kháng thể đơn dòng có thể được phân lập và được tinh chế bằng cách, ví dụ, xử lý dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy hoặc dịch cổ trướng trên đây bằng ammoni sulfat bão hòa, phương pháp kết tinh euglobulin, phương pháp sử dụng axit caproic, phương pháp sử dụng axit caprylic, sắc ký trao đổi ion (như DEAE hoặc DE52) hoặc sắc ký cột ái lực làm cột kháng immunoglobulin hoặc cột sắc ký protein A. Cụ thể hơn, quá trình tinh chế kháng thể đơn dòng có thể được thực hiện bằng bất kỳ phương pháp đã biết làm phương pháp tinh chế immunoglobulin, và có thể được thực hiện dễ dàng bằng phương pháp như tinh cất phân đoạn ammoni sulfat, tinh cất phân đoạn PEG, tinh cất phân đoạn etanol, và sắc ký ái lực bằng cách tận dụng chất trao đổi anion và còn sử dụng thêm protein RGMa.

Kháng thể đơn dòng có thể còn được tạo ra bằng phương pháp biểu lộ trên thực thể khuẩn. Trong phương pháp biểu lộ trên thực thể khuẩn, thực thể khuẩn được chọn từ thư viện kháng thể thực thể khuẩn tùy ý được sàng lọc bằng cách sử dụng chất tạo miễn dịch mong muốn và thực thể khuẩn có khả năng liên kết mong muốn với chất

tạo miễn dịch được chọn. Sau đó, trình tự tương ứng với kháng thể có trong thực thể khuẩn được phân lập hoặc trình tự được xác định và vector biểu hiện chứa phân tử axit nucleic mã hóa vùng liên kết kháng thể hoặc kháng nguyên được tạo cấu trúc trên cơ sở trình tự được phân lập hoặc thông tin trình tự được xác định. Cuối cùng, kháng thể đơn dòng có thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy dòng tế bào được truyền nhiễm với vector biểu hiện này. Thư viện kháng thể người có thể được sử dụng làm thư viện kháng thể thực thể khuẩn để tạo ra kháng thể người có đặc tính liên kết mong muốn.

Đối với protein khung, ví dụ, vùng Kunitz của chất ức chế serin proteaza ở người và vùng ngoại bào của fibronectin ở người được sử dụng, và trình tự của vị trí liên kết đích trong bộ khung có thể được biến đổi để tạo ra protein khung mà liên kết với RGMa (Clifford Mintz et.al BioProcess International, 2013, Vol.11(2), pp40-48).

Protein dung hợp bao gồm protein liên kết RGMa được liên kết về mặt hóa học hoặc biến đổi gen với phân tử chức năng mà không phải protein liên kết RGMa theo sáng chế như polyme không peptit như polyetylen glycol (PEG), chất phóng xạ, độc tố, hợp chất phân tử lượng thấp, xytokin, yếu tố tăng trưởng (ví dụ, TGF- β , NGF, neurotrophin), albumin, enzym, và kháng thể khác.

Khi PEG được liên kết ở dạng phân tử chức năng, PEG có thể được sử dụng có khối lượng phân tử là, nhưng không chỉ giới hạn ở, 2000 đến 100000 Da, tốt hơn nữa là 10000 đến 50,000 Da, mà có thể là mạch thẳng hoặc phân nhánh. Bằng cách sử dụng, ví dụ, nhóm hoạt tính NHS, PEG có thể được liên kết, ví dụ, với nhóm amino đầu cuối N của axit amin của protein liên kết RGMa.

Trong trường hợp sử dụng chất phóng xạ làm phân tử chức năng, ví dụ, ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{64}Cu , ^{99}Tc , ^{77}Lu hoặc ^{211}At được sử dụng. Chất phóng xạ có thể được liên kết trực tiếp với protein liên kết RGMa bởi, ví dụ, phương pháp chloramin-T.

Khi sử dụng độc tố làm phân tử chức năng, ví dụ, độc tố vi khuẩn (ví dụ, diphtheria toxin), phytotoxin (ví dụ, ricin), độc tố phân tử nhỏ (ví dụ, geldanamycin), maytansinoid và calicheamicin được sử dụng.

Khi sử dụng hợp chất phân tử lượng thấp làm phân tử chức năng, ví dụ, daunomycin, doxorubicin, metotrexat, mitomycin, neocarzinostatin, vindesin và thuốc nhuộm huỳnh quang như FITC được sử dụng.

Khi sử dụng enzym làm phân tử chức năng, ví dụ, luciferaza (ví dụ, luciferaza

từ đom đóm và luciferaza từ vi khuẩn; Patent Mỹ số US 4,737,456), malat dehydrogenaza, ureaza, peroxidaza (ví dụ, peroxidaza từ củ cải ngựa (HRPO)), alkaline phosphatasa, β -galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, saccharit oxidaza (ví dụ, glucoza oxidaza, galactosa oxidaza và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza), oxidaza dị vòng (ví dụ, uricaza và xanthin oxidaza), lactoperoxidaza, và microperoxidaza được sử dụng.

Ví dụ về chất tạo liên kết được sử dụng để tạo liên kết hóa học toxin, hợp chất phân tử lượng thấp hoặc enzym bao gồm gốc hóa trị hai (ví dụ, alkylen, arylen, heteroarylen), đơn vị lặp lại của chất tạo liên kết hoặc alkoxy được thể hiện bằng $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ (trong đó R là phần tử thế tùy ý, và n số nguyên dương) (ví dụ, polyetylenoxy, PEG và polymetylenoxy) và alkylamino (ví dụ, polyetylenamino, JeffamineTM) và este và amit của diacid (ví dụ, succinat, succinamid, diglycolat, malonat, và caproamid). Phương pháp biến đổi hóa học liên kết phân tử chức năng là đã biết trong lĩnh vực này (D.J.King., Applications and Engineering of Monoclonal antibodies., 1998, T.J. International Ltd, Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer., 1998, Marcel Dekker Inc; Chari et al., Cancer Res., 1992 Vol 152:127; Liu et al., Proc Natl Acad Sci USA., 1996 Vol 93:8681).

Phương án được ưu tiên về protein liên kết RGMa theo sáng chế kháng thể khảm. Đối với "kháng thể khảm", kháng thể khảm trong đó vùng biến đổi là vùng biến đổi được tạo ra từ immunoglobulin của động vật không phải là người (như chuột, chuột nhắt, chuột đồng hoặc gà) và vùng hằng định là, ví dụ, vùng hằng định của immunoglobulin ở người. Kháng thể khảm có thể được tạo ra, ví dụ, bằng cách tạo miễn dịch cho chuột với kháng nguyên, cắt loại bỏ vùng biến đổi mà liên kết với kháng nguyên từ gen mã hóa kháng thể đơn dòng của chuột, và kết hợp vùng biến đổi với vùng hằng định của kháng thể được tạo ra từ tủy xương người. Vùng hằng định được tạo ra từ immunoglobulin ở người có trình tự axit amin đặc biệt phụ thuộc vào kiểu tương đương (isotyp) như IgG (IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4), IgM, IgA (IgA1 và IgA2), IgD và IgE, nhưng vùng hằng định của kháng thể khảm tái tổ hợp theo sáng chế có thể vùng hằng định của immunoglobulin ở người thuộc kiểu tương đương bất kỳ. Vùng hằng định tốt hơn là vùng hằng định của IgG ở người. Vector biểu hiện có thể được tạo ra bằng cách sử dụng gen của kháng thể khảm mà được tạo ra. Tế bào vật chủ được biến nạp với vector biểu hiện để thu được tế bào biến nạp sản xuất kháng thể

khảm, và sau đó tế bào được biến nạp được nuôi cấy để thu được kháng thể khảm mong muốn từ dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy.

Phương án được ưu tiên khác về protein liên kết RGMa theo sáng chế là kháng thể được nhân hóa. "Kháng thể được nhân hóa" theo sáng chế là kháng thể được tạo ra bằng cách ghép duy nhất trình tự ADN của vị trí liên kết kháng nguyên (CDR; vùng xác định bổ trợ) của kháng thể ở động vật không phải người như chuột vào gen kháng thể người (Ghép CDR). Kháng thể được nhân hóa có thể được tạo ra bằng phương pháp được mô tả trong, ví dụ, Bản dịch đơn quốc tế sang tiếng Nhật số Hei 4-506458 và Patent Nhật số 2912618. Cụ thể hơn, kháng thể được nhân hóa được thiết kế đặc trưng ở chỗ một phần hoặc tất cả các CDR là CDR được tạo ra từ kháng thể đơn dòng của động vật có vú không phải là người (như chuột, chuột nhắt và chuột đồng), mà vùng khung của vùng biến đổi là vùng khung của vùng biến đổi được tạo ra từ immunoglobulin ở người, và vùng hằng định là vùng hằng định được tạo ra từ immunoglobulin ở người.

Kháng thể được nhân hóa theo sáng chế có thể được tạo ra, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp sản xuất sau đây.

Ví dụ, kháng thể tái tổ hợp được nhân hóa được tạo ra từ kháng thể đơn dòng của chuột có thể được tạo ra bằng kỹ thuật biến đổi gen trong bản dịch sang tiếng Nhật của đơn quốc tế số Hei 4-506458 và Sho 62-296890. Cụ thể là, ADN mã hóa phần CDR chuỗi nặng ở chuột và ADN mã hóa phần CDR chuỗi nhẹ ở chuột được phân lập từ tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng của chuột, và gen chuỗi nặng ở người mã hóa toàn bộ vùng khác với CDR của gen chuỗi nặng ở người và chuỗi nhẹ ở người mã hóa toàn bộ vùng khác với CDR của chuỗi nhẹ ở người được phân lập từ gen immunoglobulin ở người.

Gen chuỗi nặng ở người mà được ghép ADN được phân lập mã hóa phần CDR chuỗi nặng ở chuột được bổ sung vào trong vector biểu hiện thích hợp sao cho có thể biểu hiện nó. Tương tự, gen chuỗi nhẹ ở người mà được ghép ADN mã hóa phần CDR chuỗi nhẹ ở chuột được bổ sung vào trong vector biểu hiện thích hợp khác sao cho có thể biểu hiện nó. Theo một phương án khác, gen chuỗi nhẹ và chuỗi nặng ở người mà CDR ở chuột được ghép có thể được bổ sung vào trong cùng vector biểu hiện sao cho có thể biểu hiện nó. Do đó, tế bào vật chủ được biến nạp với vector biểu hiện được tạo ra để thu được tế bào biến nạp sản xuất kháng thể được nhân hóa, và sau đó tế bào

được biến nạp được nuôi cấy để thu được kháng thể mong muốn được nhân hóa từ dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy.

Phương án được ưu tiên khác về protein liên kết RGMa theo sáng chế là kháng thể người. Kháng thể người chỉ kháng thể trong đó tất cả các vùng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng hằng định chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng hằng định chuỗi nhẹ cấu thành immunoglobulin được tạo ra từ gen mã hóa immunoglobulin ở người. Kháng thể người có thể được tạo ra bằng bổ sung gen kháng thể người vào trong chuột nhắt. Kháng thể người có thể được tạo ra theo cách như phương pháp trên đây để điều chế kháng thể kháng thể đa dòng hoặc đơn dòng, cụ thể hơn, ví dụ, bằng cách tạo miễn dịch cho động vật chuyển gen được tạo ra bằng cách kết hợp ít nhất là gen immunoglobulin ở người vào trong vị trí xác định trên gen của động vật có vú khác với người như chuột.

Ví dụ, chuột nhắt chuyển gen mà tạo ra kháng thể người có thể được tạo ra theo phương pháp được mô tả, ví dụ, trong Nature Genetics, Vol.7, p.13-21, 1994; Nature Genetics, Vol.15, p.146-156, 1997; Bản dịch sang tiếng Nhật của đơn quốc tế số Hei 4-504365 và Hei 7-509137; WO 94/25585; Nature, Vol.368, p.856-859, 1994; và Bản dịch đơn quốc tế sang tiếng Nhật số Hei 6-500233. Ví dụ cụ thể về chuột nhắt chuyển gen bao gồm chuột HuMab™ (Medarex, Princeton NJ), chuột KMTM (Kirin Pharma Company, Japan), và chuột KM (FCγRIIb-KO).

Ví dụ cụ thể về kháng thể đơn dòng theo sáng chế bao gồm các kháng thể trong đó CDR trong vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 33 (HCDR 1), 34 (HCDR 2) và 35 (HCDR 3) trong Danh mục trình tự và trong đó CDR trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 30 (LCDR 1), 31 (LCDR 2) và 32 (LCDR 3) trong Danh mục trình tự. Một đến một vài axit amin trong một hoặc nhiều CDR có thể được thể miễn là đặc tính của kháng thể theo sáng chế có khả năng để liên kết với RGMa, không ức chế sự liên kết giữa RGMa và neogenin, và trung hòa hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh của RGMa được duy trì. Một đến một vài nghĩa là, ví dụ, một hoặc hai. Sự thể axit amin tốt hơn là sự thể bảo toàn để duy trì đặc tính theo sáng chế. Việc duy trì đặc tính của kháng thể nghĩa là các đặc tính này được duy trì đến cùng một mức, ví dụ, 80% hoặc cao hơn, tốt hơn là 90% hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là 95% hoặc cao hơn như được so sánh với đặc tính trước khi biến đổi trình tự axit amin CDR. Việc duy trì còn bao gồm việc cải

thiện.

Vùng khác với CDR không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó là trình tự mà có thể duy trì cấu trúc làm kháng thể và tạo ra chức năng của nó, và có thể là trình tự bất kỳ trong số các trình tự được tạo ra từ chuột, người, và động vật có vú khác, trình tự khảm của nó, và trình tự nhân tạo. Trong trường hợp chứa vùng hằng định, trình tự axit amin của vùng hằng định trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là, ví dụ, các trình tự được mô tả trong *Nucleic Acids Research* vol.14, p1779, 1986, *The Journal of Biological Chemistry* vol.257, p1516, 1982 và *Cells* vol.22, p197, 1980.

Ví dụ về kháng thể chuột có các CDR này bao gồm kháng thể trong đó chuỗi nhẹ có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 4 trong Danh mục trình tự và trong đó chuỗi nặng có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 5 trong Danh mục trình tự. Trong trình tự này axit amin, có thể có sự thế, sự loại bỏ, sự bổ sung hoặc sự chèn của một hoặc một số (1 đến 20, 1 đến 10 hoặc 1 đến 5) axit amin miễn là đặc tính của kháng thể của có khả năng để liên kết với RGMa, không ức chế sự liên kết giữa RGMa và neogenin, và trung hòa hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh của RGMa được duy trì. Sự thế, sự loại bỏ hoặc sự bổ sung này có thể được bổ sung vào trong CDR, nhưng nó tốt hơn là được bổ sung vào trong vùng khác với CDR. Sự thế axit amin tốt hơn là sự thế bảo toàn để duy trì đặc tính theo sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể khảm chuột/người trong đó vùng hằng định trong kháng thể chuột trên đây được tạo ra từ người. Ví dụ về kháng thể khảm chuột/người này là kháng thể trong đó chuỗi nhẹ có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8 trong Danh mục trình tự (vùng biến đổi kéo dài từ 1 đến 107) và trong đó chuỗi nặng có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9 trong Danh mục trình tự (vùng biến đổi kéo dài từ 1 đến 116). Trong trình tự axit amin này, có thể có sự thế, sự loại bỏ, sự bổ sung hoặc sự chèn của một hoặc một số (1 đến 20, 1 đến 10 hoặc 1 đến 5) axit amin miễn là đặc tính của kháng thể của có khả năng để liên kết với RGMa, không ức chế sự liên kết giữa RGMa và neogenin, và trung hòa hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh của RGMa được duy trì. Sự thế, sự loại bỏ hoặc sự bổ sung này có thể được bổ sung vào trong CDR, nhưng nó tốt hơn là được bổ sung vào trong vùng khác với CDR. Sự thế axit amin tốt hơn là sự thế bảo toàn để duy trì đặc tính theo sáng chế.

Ngoài ra, sáng chế còn bao gồm, ví dụ, kháng thể được nhân hóa trong đó

vùng khác với CDR được tạo ra từ người. Ví dụ về kháng thể được nhân hóa này là kháng thể trong đó chuỗi nặng có trình tự axit amin là trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 11 đến 18 (vùng biến đổi lên đến gốc 116 trong nhánh đầu cuối N) và trong đó chuỗi nhẹ có trình tự axit amin là trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 19-25 trong Danh mục trình tự (vùng biến đổi kéo dài từ gốc 1 đến 107 trong mạch nhánh đầu cuối N).

Trong trình tự axit amin của kháng thể được nhân hóa (chuỗi nặng: SEQ ID NO: 11-18 trong Danh mục trình tự, chuỗi nhẹ: SEQ ID NO: 19 đến 25 trong Danh mục trình tự), có thể có sự thế, sự loại bỏ, sự bổ sung hoặc sự chèn của một hoặc một số (1 đến 20, 1 đến 10 hoặc 1 đến 5) axit amin miễn là đặc tính của kháng thể của có khả năng để liên kết với RGMa, không ức chế sự liên kết giữa RGMa và neogenin, và trung hòa hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh của RGMa được duy trì. Sự thế, sự loại bỏ hoặc sự bổ sung này có thể được bổ sung vào trong CDR, nhưng nó tốt hơn là được bổ sung vào trong vùng khác với CDR. Sự thế axit amin tốt hơn là sự thế bảo toàn để duy trì đặc tính theo sáng chế.

Trình tự axit amin chuỗi nặng và trình tự axit amin chuỗi nhẹ có thể là dạng kết hợp bất kỳ của chúng, nhưng cụ thể được ưu tiên là kháng thể có chuỗi nặng chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15 trong Danh mục trình tự và chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 19 trong Danh mục trình tự. Trong trình tự axit amin SEQ ID NO: 15 trong Danh mục trình tự, trình tự axit amin tương ứng với vùng biến đổi chuỗi nặng được thể hiện trong SEQ ID NO: 41 trong Danh mục trình tự và trình tự axit amin tương ứng với vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong SEQ ID NO: 42 trong Danh mục trình tự. Do đó, cụ thể được ưu tiên nếu kháng thể theo sáng chế là kháng thể trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 41 trong Danh mục trình tự và trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 42 trong Danh mục trình tự.

Trong trình tự này axit amin, có thể có sự thế, sự loại bỏ, sự bổ sung hoặc sự chèn của một hoặc một số (1 đến 20, 1 đến 10 hoặc 1 đến 5) axit amin miễn là đặc tính của kháng thể của có khả năng để liên kết với RGMa, không ức chế sự liên kết giữa RGMa và neogenin, và trung hòa hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh của RGMa được duy trì. Sự thế, sự loại bỏ hoặc sự bổ sung này có thể được bổ sung vào trong CDR, nhưng nó tốt hơn là được bổ sung vào trong vùng khác với

CDR. Sự thể axit amin tốt hơn là sự thể bảo toàn để duy trì đặc tính theo sáng chế.

Trong trình tự axit amin của kháng thể theo sáng chế chứa sự thể, sự loại bỏ hoặc dạng tương tự trong trình tự axit amin là SEQ ID NO: 41 và/hoặc 42 trong Danh mục trình tự như được mô tả trên đây, vùng biến đổi trình tự axit amin chuỗi nặng có 90% hoặc cao hơn (tốt hơn nữa là 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn) độ tương đồng với SEQ ID NO: 41 của danh mục trình tự, và vùng biến đổi trình tự axit amin chuỗi nhẹ có 90% hoặc cao hơn (tốt hơn nữa là 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn) độ tương đồng với SEQ ID NO: 42 của danh mục trình tự.

Ví dụ cụ thể khác về kháng thể đơn dòng theo sáng chế bao gồm các kháng thể trong đó CDR trong vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 39 (HCDR 1), 40 (HCDR 2) và SFG (HCDR 3) trong Danh mục trình tự và trong đó CDR trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 36 (LCDR 1), 37 (LCDR 2) và 38 (LCDR 3) trong Danh mục trình tự. Một đến một vài axit amin trong một hoặc nhiều CDR có thể được thể miễn là đặc tính của kháng thể theo sáng chế có khả năng để liên kết với RGMa, không ức chế sự liên kết giữa RGMa và neogenin, và trung hòa hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh của RGMa được duy trì.

Một đến một vài nghĩa là, ví dụ, một hoặc hai. Sự thể axit amin tốt hơn là sự thể bảo toàn để duy trì đặc tính theo sáng chế.

Vùng khác với CDR không bị giới hạn một cách cụ thể miễn là nó là trình tự mà có thể duy trì cấu trúc làm kháng thể và tạo ra chức năng của nó, và có thể trình tự bất kỳ trong số các trình tự được tạo ra từ chuột, người, và động vật có vú khác, trình tự khảm của nó, và trình tự nhân tạo. Trong trường hợp chứa vùng hằng định, trình tự axit amin của vùng hằng định trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là, ví dụ, các trình tự được mô tả trong Nucleic Acids Research vol.14, p1779, 1986, The Journal of Biological Chemistry vol.257, p1516, 1982 và Cells vol.22, p197, 1980.

Ví dụ về kháng thể chuột có các CDR này bao gồm kháng thể trong đó chuỗi nhẹ có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 6 trong Danh mục trình tự và trong đó chuỗi nặng có trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7 trong Danh mục trình tự. Trong trình tự này axit amin, có thể có sự thể, sự loại bỏ, sự bổ sung hoặc sự chèn của một hoặc một số (1 đến 20, 1 đến 10 hoặc 1 đến 5) axit amin miễn là đặc tính của kháng thể của nó có

khả năng dễ liên kết với RGMa, không ức chế sự liên kết giữa RGMa và neogenin, và trung hòa hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh của RGMa được duy trì. Sự thể, sự loại bỏ hoặc sự bổ sung này có thể được bổ sung vào trong CDR, nhưng nó tốt hơn là được bổ sung vào trong vùng khác với CDR. Sự thể axit amin tốt hơn là sự thể bảo toàn để duy trì đặc tính theo sáng chế.

Đối với kháng thể chuột trên đây, ví dụ, còn bao gồm kháng thể khảm mà vùng hằng định được tạo ra từ người. Kháng thể được nhân hóa còn bao gồm, ví dụ, trong đó vùng khác với CDR được tạo ra từ người.

Kháng thể kháng RGMa theo sáng chế bao gồm kháng thể đa đặc hiệu, kháng thể được biến đổi về mặt chức năng, và kháng thể liên hợp có CDR chứa trình tự axit amin cụ thể (ví dụ, trình tự axit amin là SEQ ID NO: 30 trong Danh mục trình tự đối với LCDR1, SEQ ID NO: 31 trong Danh mục trình tự đối với LCDR2, SEQ ID NO: 32 trong Danh mục trình tự đối với LCDR3, SEQ ID NO: 33 trong Danh mục trình tự đối với HCDR1, SEQ ID NO: 34 trong Danh mục trình tự đối với HCDR2, và SEQ ID NO: 35 trong Danh mục trình tự đối với HCDR3), hoặc có vùng biến đổi chứa trình tự axit amin cụ thể (ví dụ, trình tự axit amin là SEQ ID NO: 41 trong Danh mục trình tự đối với vùng biến đổi chuỗi nặng, và SEQ ID NO: 42 đối với vùng biến đổi chuỗi nhẹ).

Kháng thể kháng RGMa theo sáng chế có thể còn được liên kết với kháng thể có tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên khác khác với tính đặc hiệu kháng RGMa bằng kỹ thuật biến đổi gen để tạo ra kháng thể đa đặc hiệu như kháng thể đặc hiệu kép. Kỹ thuật biến đổi gen là đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, bằng cách sử dụng kỹ thuật đối với DVD-Ig trong đó vùng biến đổi được nối nối tiếp (Wu et al., Nature Biotechnology 25(11), 1290 (2007)) hoặc kỹ thuật đối với ART-Ig trong đó chuỗi nặng của hai loại liên kết kháng thể với kháng nguyên khác được kết hợp bằng cách biến đổi vùng Fc của kháng thể (Kitazawa et al., Nature Medicine 18(10), 1570(2012), kháng thể đặc hiệu kép mong muốn có thể được tạo ra. Kháng nguyên khác với RGMa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, yếu tố ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh như Nogo, MAG, Omgp, CSPG, Sema 3A và Lingo-1, và phân tử liên quan đến miễn dịch như TNF- α , thụ thể IL-6, CD3, CD20, α 4 integrin, BLys, Thymic Stromal Lymphopoietin, IgE, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-17, IL-23 và IL-25.

Ví dụ về kháng thể được biến đổi về mặt chức năng làm phân tử được biến đổi của kháng thể kháng RGMa theo sáng chế. Kháng thể được biến đổi về mặt chức năng nghĩa là kháng thể trong đó chức năng như chức năng tiêu diệt tế bào, chức năng hoạt hóa bổ thể và chức năng để kéo dài thời gian bán hủy trong máu được biến đổi chủ yếu bằng cách biến đổi vùng Fc hoặc dạng tương tự (Shitara, Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 2009, Vol. 129(1), p3; Ishii et al., Nippon Yakubutsugaku Zasshi (Folia Pharmacologica Japonica), 2010, Vol.136(5), p280; Hashiguchi et al., The Journal of Japanese Biochemical Society, 2010, Vol.82(8), p710).

Kháng thể được biến đổi về mặt chức năng của kháng thể kháng RGMa theo sáng chế được tạo ra bằng phương pháp sau đây. Ví dụ, khi kháng thể kháng RGMa theo sáng chế được tạo ra bằng cách sử dụng, làm tế bào vật chủ, tế bào CHO mà gen $\alpha 1,6$ -fucosyltransferaza (FUT 8) được làm đứt đoạn, kháng thể với lượng của fucoza chuỗi đường giảm và tăng chức năng tiêu diệt tế bào được tạo ra, và khi kháng thể kháng RGMa theo sáng chế được tạo ra bằng cách sử dụng, làm tế bào vật chủ, tế bào CHO vào trong mà gen FUT8 được bổ sung, kháng thể với chức năng tiêu diệt tế bào kém được tạo ra (WO 2005/035586, WO 2002/31140 và WO 00/61739). Chức năng hoạt hóa bổ thể có thể được điều hòa bằng cách biến đổi gốc axit amin trong vùng Fc (Patent Mỹ số: 6737056, 7297775 và 7317091). Việc kéo dài thời gian bán hủy trong máu có thể được thực hiện bằng cách sử dụng biến thể vùng Fc với mức tăng về liên kết với FcRn mà là một trong số các thụ thể Fc (Hashiguchi et al., The Journal of Japanese Biochemical Society, 2010, Vol.82 (8), p710). Các kháng thể được biến đổi về mặt chức năng này có thể được tạo ra bằng kỹ thuật biến đổi gen.

Kháng thể liên hợp được dùng làm, ví dụ, phân tử được biến đổi của kháng thể kháng RGMa theo sáng chế. Ví dụ về kháng thể liên hợp bao gồm kháng thể liên hợp trong đó kháng thể kháng RGMa được liên kết về mặt hóa học hoặc biến đổi gen với phân tử chức năng khác với kháng thể kháng RGMa theo sáng chế như polyme không peptit như polyetylen glycol (PEG), chất phóng xạ, độc tố, hợp chất phân tử lượng thấp, xytokin, yếu tố tăng trưởng (ví dụ, TGF- β , NGF, neurotrophin), albumin, enzym, và kháng thể khác.

Khi PEG được liên kết ở dạng phân tử chức năng, PEG có thể được sử dụng có khối lượng phân tử là, nhưng không chỉ giới hạn ở, 2.000 đến 100.000 Da, tốt hơn nữa là 10.000 đến 50.000 Da, mà có thể là mạch thẳng hoặc phân nhánh. Bằng cách sử

dụng, ví dụ, nhóm hoạt tính NHS, PEG có thể được liên kết, ví dụ, với đầu cuối N amino nhóm của axit amin của kháng thể.

Trong trường hợp sử dụng chất phóng xạ làm phân tử chức năng, ví dụ, ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{64}Cu , ^{99}Tc , ^{77}Lu hoặc ^{211}At được sử dụng. Chất phóng xạ có thể được liên kết trực tiếp với kháng thể bởi, ví dụ, phương pháp chloramin-T.

Khi sử dụng độc tố làm phân tử chức năng, ví dụ, độc tố vi khuẩn (ví dụ, diphtheria toxin), phytotoxin (ví dụ, ricin), độc tố phân tử nhỏ (ví dụ, geldanamycin), maytansinoid và calicheamicin được sử dụng.

Khi sử dụng hợp chất phân tử lượng thấp làm phân tử chức năng, ví dụ, daunomycin, doxorubicin, metotrexat, mitomycin, neocarzinostatin, vindesin và thuốc nhuộm huỳnh quang như FITC được sử dụng.

Khi sử dụng enzym làm phân tử chức năng, ví dụ, luciferaza (ví dụ, luciferaza từ đom đóm và luciferaza từ vi khuẩn; Patent Mỹ số US 4,737,456), malat dehydrogenaza, ureaza, peroxidaza (ví dụ, peroxidaza từ củ cải ngựa (HRPO)), alkaline phosphatase, β -galactosidase, glucoamylase, lysozyme, saccharit oxidase (ví dụ, glucoza oxidase, galactose oxidase và glucoza-6-phosphat dehydrogenase), oxidase dị vòng (ví dụ, uricase và xanthine oxidase), lactoperoxidase, và microperoxidase được sử dụng.

Ví dụ về chất tạo liên kết được sử dụng để tạo liên kết hóa học toxin, hợp chất phân tử lượng thấp hoặc enzym bao gồm gốc hóa trị hai (ví dụ, alkylen, arylen, heteroarylen), đơn vị lặp lại của chất tạo liên kết hoặc alkoxy được thể hiện bằng $-(\text{CR}_2)_n\text{O}(\text{CR}_2)_n-$ (trong đó R là phần tử thể tùy ý, và n số nguyên dương) (ví dụ, polyetylenoxy, PEG và polymetylenoxy) và alkylamino (ví dụ, polyetylenamino, JeffamineTM) và este và amit của diacid (ví dụ, succinat, succinamid, diglycolat, malonat, và caproamid). Phương pháp biến đổi hóa học liên kết phân tử chức năng là đã biết trong lĩnh vực này (D.J.King., Applications and Engineering of Monoclonal antibodies., 1998 T.J. International Ltd, Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer., 1998 Marcel Dekker Inc; Chari et al., Cancer Res., 1992 Vol152:127; Liu et al., Proc Natl Acad Sci USA., 1996 Vol 93:8681).

"Mảnh liên kết kháng nguyên" của kháng thể trong sáng chế nghĩa là vùng riêng phần có đặc tính liên kết kháng nguyên, của kháng thể được mô tả trên đây, bao

gồm, cụ thể hơn, $F(ab')_2$, Fab' , Fab , Fv (mảnh biến đổi của kháng thể), Fv chứa liên kết disulfua, kháng thể chuỗi đơn ($scFv$), và polyme của nó. Mảnh liên kết kháng nguyên còn bao gồm mảnh liên kết kháng nguyên tiếp hợp được liên kết về mặt hóa học hoặc biến đổi gen với phân tử chức năng khác với kháng thể kháng RGMa theo sáng chế như polyme không peptit như polyetylen glycol (PEG), chất phóng xạ, độc tố, hợp chất phân tử lượng thấp, xytokin, yếu tố tăng trưởng (ví dụ, $TGF-\beta$, NGF, neurotrophin), albumin, enzym, và kháng thể khác.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, " $F(ab')_2$ " và " Fab " nghĩa là kháng thể mảnh mà được tạo ra bằng cách xử lý immunoglobulin với pepsin hoặc papain proteaza và được tạo ra bằng phân cắt phần trước và sau liên kết disulfua giữa hai chuỗi nặng trong vùng bản lề. Ví dụ, việc xử lý bằng papain đối với IgG có thể phân cắt phần trước của liên kết disulfua giữa hai chuỗi nặng trong vùng bản lề để tạo ra của hai mảnh kháng thể tương đồng, mỗi mảnh chứa chuỗi nhẹ chứa VL (vùng biến đổi chuỗi nhẹ) và CL (vùng hằng định chuỗi nhẹ) và mảnh chuỗi nặng chứa VH (vùng biến đổi chuỗi nặng) và $CH\gamma 1$ ($\gamma 1$ vùng bên trong vùng hằng định chuỗi nặng) trong đó mảnh chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được liên kết với mỗi khác thông qua liên kết disulfua ở vùng đầu cuối C. Mỗi trong số hai mảnh kháng thể tương đồng được gọi là Fab . Việc xử lý bằng pepsin đối với IgG có thể phân cắt phần sau của liên kết disulfua giữa hai chuỗi nặng trong vùng bản lề để tạo ra mảnh kháng thể lớn hơn một chút so với mảnh ban đầu trong đó hai Fab được liên kết với nhau ở vùng bản lề. Mảnh kháng thể này còn được gọi là $F(ab')_2$.

Mảnh liên kết kháng nguyên tiếp hợp được dùng làm, ví dụ, phân tử được biến đổi của mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể kháng RGMa theo sáng chế. Ví dụ về mảnh liên kết kháng nguyên tiếp hợp bao gồm các kháng thể trong đó vùng riêng phần có đặc tính liên kết kháng nguyên của kháng thể kháng RGMa được liên kết về mặt hóa học hoặc biến đổi gen với phân tử chức năng khác với kháng thể kháng RGMa theo sáng chế như polyme không peptit như polyetylen glycol (PEG), chất phóng xạ, độc tố, hợp chất phân tử lượng thấp, xytokin, yếu tố tăng trưởng (ví dụ, $TGF-\beta$, NGF, neurotrophin), albumin, enzym, và kháng thể khác.

Khi PEG được liên kết ở dạng phân tử chức năng, PEG có thể được sử dụng có khối lượng phân tử là, nhưng không chỉ giới hạn ở 2.000 đến 100.000 Da, tốt hơn nữa là 10.000 đến 50.000 Da, mà có thể là mạch thẳng hoặc phân nhánh. PEG có thể

được liên kết, ví dụ, với đầu cuối N amino nhóm của vùng riêng phần có đặc tính liên kết kháng nguyên của kháng thể kháng RGMa bằng cách sử dụng, ví dụ, nhóm hoạt tính NHS.

Trong trường hợp sử dụng chất phóng xạ làm phân tử chức năng, ví dụ, ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{64}Cu , ^{99}Tc , ^{77}Lu hoặc ^{211}At được sử dụng. Chất phóng xạ có thể được liên kết trực tiếp với vùng riêng phần có đặc tính liên kết kháng nguyên của kháng thể kháng RGMa bởi, ví dụ, phương pháp chloramin-T.

Khi sử dụng độc tố làm phân tử chức năng, ví dụ, độc tố vi khuẩn (ví dụ, diphtheria toxin), phytotoxin (ví dụ, ricin), độc tố phân tử nhỏ (ví dụ, geldanamycin), maytansinoid và calicheamicin được sử dụng.

Khi sử dụng hợp chất phân tử lượng thấp làm phân tử chức năng, ví dụ, daunomycin, doxorubicin, metotrexat, mitomycin, neocarzinostatin, vindesin và thuốc nhuộm huỳnh quang như FITC được sử dụng.

Khi sử dụng enzym làm phân tử chức năng, ví dụ, luciferaza (ví dụ, luciferaza từ đom đóm và luciferaza từ vi khuẩn; Patent Mỹ số US 4,737,456), malat dehydrogenaza, ureaza, peroxidaza (ví dụ, peroxidaza từ củ cải ngựa (HRPO)), alkaline phosphataza, β -galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, sacarit oxidaza (ví dụ, glucoza oxidaza, galactoza oxidaza và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza), oxidaza dị vòng (ví dụ, uricaza và xanthin oxidaza), lactoperoxidaza, và micropoxidaza được sử dụng.

Ví dụ về chất tạo liên kết được sử dụng để tạo liên kết hóa học toxin, hợp chất phân tử lượng thấp hoặc enzym bao gồm gốc hóa trị hai (ví dụ, alkylen, arylen, heteroarylen), đơn vị lặp lại của chất tạo liên kết hoặc alkoxy được thể hiện bằng $(\text{CR}_2)_n\text{O}(\text{CR}_2)_n-$ (trong đó R là phần tử thể tùy ý, và n số nguyên dương) (ví dụ, polyetylenoxy, PEG và polymetylenoxy) và alkylamino (ví dụ, polyetylenamino, JeffamineTM) và este và amit của diacid (ví dụ, succinat, succinamit, diglycolat, malonat, và caproamit). Phương pháp biến đổi hóa học liên kết phân tử chức năng là đã biết trong lĩnh vực này (D.J.King., Applications and Engineering of Monoclonal antibodies., 1998 T.J. International Ltd, Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer., 1998 Marcel Dekker Inc; Chari et al., Cancer Res., 1992 Vol152:127; Liu et al., Proc Natl Acad Sci USA., 1996 Vol 93:8681).

Trong kháng thể kháng RGMa chứa CDR hoặc vùng biến đổi có trình tự axit amin cụ thể theo sáng chế, vùng hằng định tốt hơn là vùng hằng định của IgG ở người (IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4) để duy trì thời gian bán hủy dài hơn trong máu.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng RGMa mà bổ sung cho kháng thể có trình tự axit amin có CDR cụ thể như được mô tả trên đây để liên kết với protein RGMa, và mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Kháng thể mà bổ sung cho kháng thể có trình tự axit amin có CDR cụ thể như được mô tả trên đây để liên kết với protein RGMa bao gồm quyết định kháng nguyên (epitop) trong vùng được chọn từ Glu 298 đến Gly 311, Asn 322 đến Glu 335, Lys 367 đến Ala 377, và Pro 349 đến Thr 359.

Kháng thể có thể được tạo ra (được sàng lọc) hoặc được đánh giá bằng cách cho kháng thể này cùng tồn tại trong hệ liên kết của kháng thể có CDR trình tự như được mô tả trên đây và protein RGMa. Ví dụ, kháng thể có thể được tạo ra bằng việc sàng lọc bằng cách sử dụng phương pháp phổ cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) sau đây.

Protein RGMa ở người được biotin hóa (4 $\mu\text{g/mL}$) làm phối tử được tải trong chip cảm biến được làm bất động bằng avidin để làm bất động protein RGMa ở người tương đương với 1300 đến 1600 RU. Sau đó, kháng thể kháng RGMa tùy ý (15 $\mu\text{g/mL}$) được tải làm chất gắn kết và được liên kết với protein RGMa ở người được làm bất động trong chip cảm biến. Bằng cách thực hiện lặp lại việc này một số lần, trạng thái trong đó kháng thể kháng RGMa tùy ý được liên kết với tất cả các phân tử protein RGMa ở người trong chip cảm biến được tạo ra (trạng thái bão hòa) và mức liên kết trong trạng thái bão hòa (mức liên kết bão hòa 1) được xác định.

Thử nghiệm tương tự được thực hiện với kháng thể kháng RGMa chứa trình tự axit amin có CDR cụ thể theo sáng chế để xác định được mức liên kết trong trạng thái bão hòa (mức liên kết bão hòa 2).

Sau đó, protein RGMa ở người trong chip cảm biến bão hòa với kháng thể kháng RGMa chứa trình tự axit amin có CDR cụ thể theo sáng chế, và sau đó kháng thể kháng RGMa tùy ý (15 $\mu\text{g/mL}$) được tải làm chất gắn kết để nghiên cứu xác định liệu kháng thể kháng RGMa tùy ý còn liên kết với protein RGMa ở người được bão hòa với kháng thể kháng RGMa chứa trình tự axit amin có CDR cụ thể theo sáng chế.

Nếu kháng thể kháng RGMa tùy ý có thể còn liên kết với protein RGMa ở

người được bão hòa bằng kháng thể kháng RGMa chứa trình tự axit amin có CDR cụ thể theo sáng chế đồng thời có mức liên kết bão hòa 1 của kháng thể kháng RGMa tùy ý được xác định trên đây, thì sau đó kháng thể này được đánh giá là "không cạnh tranh". Mặt khác, nếu kháng thể kháng RGMa tùy ý có thể không liên kết với protein RGMa ở người được bão hòa bằng kháng thể kháng RGMa chứa trình tự axit amin có CDR cụ thể theo sáng chế, thì sau đó kháng thể này được đánh giá là "cạnh tranh". Thậm chí nếu kháng thể kháng RGMa tùy ý có thể còn liên kết với protein RGMa ở người được bão hòa bằng kháng thể kháng RGMa chứa trình tự axit amin có CDR cụ thể theo sáng chế, khi lượng liên kết bổ sung không đạt đến mức liên kết bão hòa 1 với mức khác nhau đáng kể, thì sau đó kháng thể này được đánh giá là "cạnh tranh". Mức khác nhau đáng kể được xác định bằng phương pháp thống kê chung (ví dụ, thử nghiệm t-Student), và mức đáng kể được thiết lập đến 5% hoặc thấp hơn.

Kháng thể kháng RGMa mà bổ sung cho kháng thể kháng RGMa chứa trình tự axit amin CDR cụ thể như được mô tả trên đây để liên kết với RGMa có thể là kháng thể được tạo ra từ kháng thể của động vật bất kỳ như chuột, người, chuột nhắt, thỏ, dê, hoặc lạc đà, hoặc có thể là kháng thể khảm hoặc được nhân hóa mà là dạng kết hợp của các kháng thể này, nhưng tốt hơn là kháng thể người, kháng thể khảm, hoặc được nhân hóa.

Phân tử axit nucleic theo sáng chế

Ví dụ về phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm polynucleotit trong đó vùng mã hóa là vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin lần lượt là SEQ ID NO: 33, 34, và 35 trong Danh mục trình tự (trong đó một hoặc một số axit amin có thể được thế, được loại bỏ, được chèn hoặc được bổ sung) và vùng mã hóa là vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin lần lượt là SEQ ID NO: 30, 31, và 32 trong Danh mục trình tự (trong đó một hoặc một số axit amin có thể được thế, được loại bỏ, được chèn hoặc được bổ sung); và polynucleotit trong đó vùng mã hóa là vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin lần lượt là SEQ ID NO: 39, 40, và SFG trong Danh mục trình tự (trong đó một hoặc một số axit amin có thể được thế, được loại bỏ, được chèn hoặc được bổ sung) và vùng mã hóa là vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin lần lượt là SEQ ID NO: 36, 37, và 38 trong Danh mục trình tự (trong đó một hoặc một số axit amin có thể được thế, được loại bỏ, được chèn hoặc được bổ sung).

Ví dụ khác về phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm polynucleotit trong đó vùng mã hóa chuỗi nặng chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 5 trong Danh mục trình tự và vùng mã hóa chuỗi nhẹ chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 4 trong Danh mục trình tự; và polynucleotit trong đó vùng mã hóa chuỗi nặng chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7 trong Danh mục trình tự và vùng mã hóa chuỗi nhẹ chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 6 trong Danh mục trình tự.

Ví dụ khác về phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm polynucleotit trong đó vùng mã hóa chuỗi nặng chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9 trong Danh mục trình tự và vùng mã hóa chuỗi nhẹ chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8 trong Danh mục trình tự.

Ví dụ khác về phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm polynucleotit trong đó vùng mã hóa chuỗi nặng chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin có trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 11 đến 18 trong Danh mục trình tự và vùng mã hóa chuỗi nhẹ chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin có trình tự bất kỳ trong số các trình tự SEQ ID NO: 19 đến 25 trong Danh mục trình tự.

Cụ thể được ưu tiên là ví dụ về phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm polynucleotit trong đó vùng mã hóa chuỗi nặng chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15 trong Danh mục trình tự và vùng mã hóa chuỗi nhẹ chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 19 trong Danh mục trình tự.

Ví dụ khác về phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm polynucleotit trong đó vùng mã hóa là vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 41 trong Danh mục trình tự và vùng mã hóa là vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự bazơ mã hóa trình tự axit amin là SEQ ID NO: 42 trong Danh mục trình tự.

Ví dụ cụ thể về phân tử axit nucleic theo sáng chế bao gồm polynucleotit trong đó vùng mã hóa là vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự bazơ có SEQ ID NO: 43 trong Danh mục trình tự và vùng mã hóa là vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự bazơ có SEQ ID NO: 44 trong Danh mục trình tự.

Phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể là polynucleotit mà lai dưới điều kiện nghiêm ngặt với sợi ADN bổ sung có trình tự bazơ có SEQ ID NO: 43 trong Danh

mục trình tự và polynucleotit mà lai dưới điều kiện nghiêm ngặt với sợi ADN bổ sung có trình tự bazơ có SEQ ID NO: 44 trong Danh mục trình tự miễn là phân tử axit nucleic theo sáng chế mã hóa kháng thể đơn dòng mà có khả năng để liên kết với RGMa, không ức chế sự liên kết giữa RGMa và neogenin, và làm trung hòa hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh của RGMa. Ví dụ về điều kiện nghiêm ngặt bao gồm điều kiện của thực hiện việc lai Southern và rửa ở nồng độ muối tương ứng với 0,1 x SSC, 0,1% SDS ở 68°C.

Phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể mã hóa tất cả các vùng hằng định và vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, và có thể chỉ mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Trình tự bazơ của vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong trường hợp mã hóa tất cả các vùng hằng định và vùng biến đổi tốt hơn là các trình tự được mô tả trong Nucleic Acids Research vol.14, p1779, 1986, The Journal of Biological Chemistry vol.257, p1516, 1982 và Cells vol.22, p197, 1980.

Phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể được tạo ra, ví dụ, bằng phương pháp sau đây. Trước tiên, ARN tổng được tạo ra từ tế bào như tế bào lai bằng cách sử dụng kit tách chiết ARN thương mại, và cADN được tổng hợp với transcriptaza ngược (enzym phiên mã ngược) bằng cách sử dụng đoạn mỗi ngẫu nhiên hoặc dạng tương tự. Sau đó, cADN mã hóa kháng thể được khuếch đại bằng PCR phương pháp bằng cách sử dụng, đối với đoạn mỗi, oligonucleotit có trình tự được bảo toàn lần lượt trong vùng biến đổi của gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể người đã biết. Đối với trình tự mã hóa vùng hằng định, nó có thể được tạo ra bằng cách khuếch đại trình tự đã biết bằng phương pháp PCR. Trình tự bazơ của ADN có thể được xác định bằng phương pháp thông dụng, ví dụ bằng cách kết hợp nó vào trong plasmit để giải trình tự.

Theo một phương án khác, ADN mã hóa kháng thể đơn dòng theo sáng chế có thể còn được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học trình tự của vùng biến đổi hoặc một phần của nó và liên kết nó với trình tự chứa vùng hằng định.

Sáng chế còn đề cập đến vector tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic theo sáng chế và thể biến nạp (tế bào vật chủ) chứa vector tái tổ hợp này. Vector tái tổ hợp có thể vector mà có thể được biểu hiện trong tế bào nhân rải rác như E. coli (*Escherichia coli*) (ví dụ, pBR322, pUC119 hoặc biến thể của nó), và tốt hơn là vector mà có thể được biểu hiện trong tế bào nhân điển hình, và tốt hơn nữa là vector mà có thể được biểu hiện trong tế bào từ động vật có vú. Ví dụ về vector mà có thể được biểu hiện trong tế

bào từ động vật có vú bao gồm vector plasmit như pcADN 3.1 (Invitrogen), pConPlus, pcDM8, pcADN I/Amp, pcADN 3.1, pREP4; và vector virut như pDON-AI ADN (Takara Bio). Vector có thể là một vector chứa trình tự mã hóa chuỗi nặng và trình tự mã hóa chuỗi nhẹ hoặc có thể là hai vector của vector chứa trình tự mã hóa chuỗi nặng và vector chứa trình tự mã hóa chuỗi nhẹ.

Thế biến nạp trong đó vector tái tổ hợp theo sáng chế được bổ sung có thể là tế bào nhân rải rác như *Escherichia coli* hoặc *Bacillus subtilis*, tốt hơn là tế bào nhân điển hình, tốt hơn nữa là tế bào động vật có vú. Ví dụ về động vật có vú tế bào bao gồm tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (tế bào CHO), COS, u tủy, BHK, HeLa, Vero, 293, NS0, Namalwa và YB2/0,

Kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó được tạo ra có thể được tinh chế để đồng nhất. Phương pháp tách và phương pháp tinh chế được sử dụng đối với protein thông thường có thể được sử dụng làm phương pháp tách và quá trình tinh chế kháng thể và dạng tương tự. Phương pháp tách và quá trình tinh chế kháng thể có thể được thực hiện bằng cách kết hợp và chọn một cách thích hợp, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, sắc ký cột như sắc ký ái lực, lọc, lọc siêu âm, gâp kết tủa bằng muối, thẩm tách, điện di trên gel polyacrylamit SDS hoặc tách bằng tập trung điểm đẳng điện (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lan, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Ví dụ về cột được sử dụng đối với sắc ký ái lực bao gồm cột protein A, cột protein G, cột tiếp hợp kháng thể kháng immunoglobulin và cột tiếp hợp kháng nguyên. Ví dụ về cột protein A bao gồm Hyper D, POROS và Sepharosa F. F. (Amersham Biosciences).

Chất phòng ngừa hoặc điều trị bệnh miễn dịch và thần kinh

Protein liên kết RGMa, cụ thể là kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế làm trung hòa hoạt tính ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh của RGMa để đẩy mạnh sự sửa chữa của chức năng neuron tế bào thần kinh và do đó có thể được sử dụng làm chất ngăn ngừa, điều trị, hoặc phòng ngừa sự tái phát của thần kinh bệnh.

Protein liên kết RGMa, cụ thể là kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế còn làm trung hòa sự hoạt hóa tế bào Ta bằng RGMa và do đó có thể được sử dụng làm chất phòng ngừa, điều trị, hoặc phòng ngừa

sự tái phát bệnh của bệnh miễn dịch.

Ví dụ về thần kinh bệnh bao gồm bệnh xơ cột bên teo cơ, chấn thương thần kinh cánh tay, tổn thương não (bao gồm chấn thương sọ não), bại não, hội chứng Guillain-Barre, loạn dưỡng chất trắng não, bệnh đa xơ cứng (bao gồm bệnh đa xơ cứng dạng tái phát-thuyên giảm, bệnh đa xơ cứng tiến triển nguyên phát, bệnh đa xơ cứng tiến triển thứ phát), viêm tủy - thị thần kinh, hội chứng sau viêm tủy xám, tật nứt đốt sống, tổn thương tủy sống, teo cơ tủy sống, ung thư xương sống, viêm tủy ngang, sa sút trí tuệ (bao gồm sa sút trí tuệ do lão hóa, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh Alzheimer, sa sút trí tuệ liên quan đến bệnh Alzheimer), bệnh Huntington, rối loạn vận động muộn, chứng hưng cảm, bệnh Parkinson, hội chứng Steele-Richardson, hội chứng Down, nhược cơ, chấn thương thần kinh (bao gồm chấn thương dây thần kinh thị giác), chứng thoái hóa dạng tinh bột trong mạch, xuất huyết não liên quan đến chứng thoái hóa dạng tinh bột, nhồi máu não, viêm não, trạng thái lú lẫn cấp tính, bệnh tăng nhãn áp, bệnh tâm thần phân liệt và sự thoái hóa lớp sợi thần kinh võng mạc (bao gồm bệnh võng mạc do tiểu đường, bệnh thần kinh võng mạc do thiếu máu cục bộ, tách lớp võng mạc do di truyền, bệnh thần kinh thị giác do thuốc, bệnh loạn dưỡng võng mạc, thoái hóa điểm vàng do lão hóa, bệnh về mắt đặc trưng bởi đầu thần kinh thị giác, bệnh về mắt đặc trưng bởi yếu tố quyết định di truyền đối với sự thoái hóa tế bào nhận kích thích ánh sáng, sự loạn dưỡng tế bào hình nón-hình que di truyền dạng lặn của nhiễm sắc thể thường, rối loạn ở ty lạp thể liên quan đến bệnh lý thần kinh thị giác). Tổn thương tủy sống và chấn thương thần kinh (bao gồm chấn thương dây thần kinh thị giác) được ưu tiên.

Ví dụ về bệnh miễn dịch bao gồm bệnh đa xơ cứng (bao gồm bệnh đa xơ cứng dạng tái phát-thuyên giảm, bệnh đa xơ cứng tiến triển nguyên phát, bệnh đa xơ cứng tiến triển thứ phát), viêm tủy - thị thần kinh, bệnh vẩy nến, chứng viêm khớp (bao gồm bệnh thấp khớp, bệnh viêm xương khớp, bệnh viêm khớp vẩy nến), hội chứng Guillain-Barre, bệnh thần kinh Behcet, bệnh thiếu máu ác tính, đái tháo đường (phụ thuộc insulin) typ I, bệnh lupus ban đỏ hệ thống (SLE), bệnh viêm ruột (IBD), hội chứng Sjogren, hội chứng Goodpasture, bệnh Graves, chứng thiếu máu mất hồng cầu tự miễn dịch, bệnh xuất hiện giảm tiểu cầu tự miễn dịch, bệnh hen suyễn, bệnh phấn hoa, bệnh viêm da cơ địa, viêm thận tiểu cầu, nhược cơ, bệnh Hashimoto, và bệnh sarcoid. Bệnh đa xơ cứng được ưu tiên.

Protein liên kết RGMa, cụ thể là kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có thể được sử dụng làm chất phòng ngừa, điều trị, hoặc phòng ngừa sự tái phát bệnh của thần kinh/bệnh miễn dịch, mà tốt hơn là bao gồm tổn thương tủy sống, chấn thương thần kinh (bao gồm chấn thương dây thần kinh thị giác) và bệnh đa xơ cứng (bao gồm bệnh đa xơ cứng dạng tái phát-thuyên giảm, bệnh đa xơ cứng tiến triển nguyên phát, bệnh đa xơ cứng tiến triển thứ phát).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "điều trị" bao gồm việc điều trị bất kỳ bệnh ở động vật có vú, cụ thể là người, và bao gồm ức chế triệu chứng bệnh, cụ thể là, ức chế sự tiến triển của chúng hoặc loại bỏ bệnh hoặc triệu chứng, và làm thuyên giảm triệu chứng bệnh, cụ thể là, mà gây ra việc làm giảm nhẹ của bệnh hoặc triệu chứng hoặc làm chậm sự phát triển của triệu chứng.

"Phòng ngừa" bao gồm việc ngăn ngừa sự khởi phát của bệnh được mô tả trên đây ở động vật có vú, cụ thể là người.

"Phòng ngừa sự tái phát bệnh" bao gồm việc ngăn ngừa sự tái phát bệnh của bệnh được mô tả trên đây tái phát và làm giảm sự mắc phải bệnh ở động vật có vú, cụ thể là người.

Protein liên kết RGMa (kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) theo sáng chế có thể được sử dụng làm dược phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh thần kinh hoặc miễn dịch.

Dạng sử dụng của protein liên kết RGMa (kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) theo sáng chế không bị giới hạn một cách cụ thể và có thể được sử dụng cho động vật có vú bao gồm người bằng đường bất kỳ của việc sử dụng theo đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, việc sử dụng trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da, trực tràng, qua da, intracerebral, trong cột sống hoặc việc sử dụng cục bộ khác).

Dạng liều để sử dụng theo đường miệng và ngoài đường tiêu hóa và phương pháp bào chế nó là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, và dược phẩm có thể được tạo ra bằng kết hợp kháng thể theo sáng chế với chất mang dược dụng hoặc chất tương tự.

Dạng liều để sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dược phẩm tiêm (ví dụ, tiêm nhỏ giọt, tiêm trong tĩnh mạch, tiêm trong cơ, tiêm dưới da, tiêm trong da, được

phẩm sử dụng trong não, và dược phẩm sử dụng trong cột sống), dược phẩm bôi ngoài da (ví dụ, thuốc mỡ, thuốc đắp, và thuốc xức ngoài da), thuốc đạn, thuốc nhỏ mắt, thuốc mỡ dùng cho mắt, thuốc nhỏ mũi, thuốc nhỏ tai, và liposom. Cụ thể hơn, khi kháng thể theo sáng chế tác dụng trực tiếp trong mô thần kinh trung ương, nó có thể được truyền liên tục bằng cách sử dụng vi bơm y tế mà là bơm thẩm thấu, hoặc được trộn với keo fibrin hoặc dạng tương tự để tạo ra dược phẩm giải phóng kéo dài và sau đó được đặt trong mô bị nhiễm.

Ví dụ, dược phẩm tiêm thường được tạo ra bằng cách hòa tan kháng thể trong nước cất có thể tiêm được và, nếu cần, chất hòa tan, dung dịch đệm, chất điều chỉnh pH, chất đẳng trương, chất làm trơn, chất bảo quản, và chất làm ổn định có thể được bổ sung. Dược phẩm tiêm có thể còn là dược phẩm được làm đông khô được tạo ra trước khi sử dụng.

Dạng liều để sử dụng theo đường miệng bao gồm dạng liều rắn hoặc lỏng, cụ thể hơn, viên nén, viên nén được bao, viên thuốc, thuốc dạng hạt mịn, dạng hạt, bột, viên nang, xirô, nhũ tương, huyền phù, thuốc tiêm và viên ngậm.

Dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa chất có tác dụng trị liệu khác, và nếu cần, thành phần như chất khử trùng, chất chống viêm, vitamin và axit amin có thể được trộn lẫn.

Chất mang dược dụng bao gồm, ví dụ, tá dược, chất làm trơn, chất kết dính và chất gây ra đối với dược phẩm rắn; và dung môi, chất hòa tan, chất phân tán, chất đẳng trương, dung dịch đệm và chất làm trơn đối với dược phẩm lỏng. Nếu cần, chất phụ gia như chất khử trùng, chất chống oxy hóa, chất tạo màu, chất làm ngọt, chất hấp thụ, và chất làm ẩm thông thường có thể được sử dụng một cách thích hợp với lượng thích hợp.

Liều lượng của kháng thể theo sáng chế có thể được xác định trên cơ sở các yếu tố như đường sử dụng, loại bệnh, mức độ của triệu chứng, độ tuổi, giới tính, thể trọng, mức độ nghiêm trọng của bệnh của người bệnh, kết quả dược lý như đặc tính dược động học và độc học, việc xác định liệu hệ phân phối thuốc còn cần phải được sử dụng hay không, và việc xác định liệu kháng thể được sử dụng làm một phần của dạng kết hợp với thuốc khác. Nói chung, 1 đến 5.000 µg/ngày, tốt hơn là 10 đến 2.000 µg/ngày, tốt hơn nữa là 50 đến 2.000 µg/ngày để sử dụng theo đường miệng hoặc 1

đến 5.000 µg/ngày, tốt hơn là 5 đến 2.000 µg/ngày, tốt hơn nữa là 50 đến 2.000 µg/ngày để tiêm có thể được sử dụng cho mỗi người trưởng thành (60 kg thể trọng) trong một hoặc một số liều. Đối với việc sử dụng ngoài đường tiêu hóa đối với toàn bộ thể trọng, 10 đến 100,000 µg/kg, tốt hơn nữa là 100 đến 50,000 µg/kg, và thậm chí tốt hơn nữa là 500 đến 20,000 µg/kg mỗi thể trọng có thể được sử dụng ở khoảng một lần một ngày, một lần một tuần, một lần một tháng, hoặc 1 đến 7 lần một năm. Đối với việc sử dụng cục bộ bằng cách sử dụng bơm thẩm thấu hoặc dạng tương tự, nói chung, việc truyền liên tục với tốc độ là 10 đến 100,000 µg/ngày, tốt hơn nữa là 100 đến 10,000 µg/ngày, tốt hơn nữa là 500 đến 5.000 µg/ngày mỗi người trưởng thành (60 kg thể trọng) có thể được thực hiện.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây thông qua các Ví dụ sau đây, tuy nhiên cần phải hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các Ví dụ này.

Ví dụ 1: Quá trình điều chế protein RGMA ở người (Vùng đầu cuối C)

Tế bào CHO biểu hiện protein RGMA ở người tái tổ hợp trong đó histidin tag được dung hợp với đầu cuối C của Pro 169 đến Gly 422 (mà để chỉ gốc prolin ở vị trí 169 đến gốc glyxin ở vị trí 422 từ mạch nhánh đầu cuối N, sau đây được mô tả theo cách tương tự) của protein RGMA ở người (SEQ ID NO: 1 trong Danh mục trình tự) được tạo ra.

Vùng đầu cuối C của protein RGMA ở người có trong dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy của tế bào CHO được hấp thụ trong cột niken (GE Healthcare, 17-5247-01), và được rửa giải với dung dịch imidazol 100 mM. Bằng cách thẩm tách, dung dịch rửa giải imidazol được thay bằng dung dịch đệm muối phosphat (PBS) và được sử dụng làm chất tạo miễn dịch.

Ví dụ 2: Quá trình điều chế kháng thể đơn dòng ở chuột kháng RGMA ở người

Mười microgam của protein RGMA ở người tái tổ hợp được tạo ra trong Ví dụ 1 được trộn với tá dược Freund hoàn chỉnh (Sigma) để tạo ra nhũ tương, và chuột BALB/c (Charles River Japan) được tạo miễn dịch ở một số vị trí dưới da trên lưng. Sau đó, việc tạo miễn dịch được thực hiện tương tự ở các khoảng thời gian 1 đến 2 tuần với 10 µg của protein RGMA ở người tái tổ hợp được tạo ra vào trong nhũ tương với tá dược Freund chưa hoàn chỉnh (Sigma), và máu được thu gom sau một số lần tạo

miễn dịch. Độ chuẩn kháng thể được xác định bằng ELISA được mô tả sau đây trong đó protein RGMa ở người hoặc chuột nhất được làm bất động. Đối với các đối tượng mà có sự tăng độ chuẩn kháng thể, 10 µg của protein RGMa ở người được sử dụng trong tĩnh mạch để tăng thể, và tế bào lách được thu hồi sau 2 hoặc 3 ngày.

Đối với quá trình dung hợp tế bào, tế bào lá lách và tế bào u tủy của chuột (SP2/0, Dainippon Sumitomo Pharma) với một nửa số lượng tế bào lá lách được trộn và được ly tâm, và polyetylen glycol (Roche Diagnostics) được bổ sung vào phân đoạn kết tủa thu được để thu được tế bào dung hợp. Tế bào sau đó được ly tâm và được rửa hai lần với D-MEM (Invitrogen). Tế bào được phân tán lại trong môi trường GIT (Nippon Dược phẩm) chứa 10% huyết thanh thai bò (Invitrogen), 1% BM condimed (Roche Diagnostics) và HAT (Sigma-Aldrich) và được nuôi cấy trong mỗi giếng của đĩa 96 giếng ở 5×10^4 tế bào u tủy/giếng. Dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu hồi và được sàng lọc đối với tế bào sản xuất kháng thể bằng ELISA được làm bất động bằng protein RGMa ở người của Ví dụ 3.

Tế bào sản xuất kháng thể được tạo ra bằng việc sàng lọc được tạo dòng bằng giới hạn pha loãng phương pháp, và tế bào lai mà sản xuất hai loại kháng thể đơn dòng (B5.116A3 và B5.70E4) được chọn.

Kiểu tương đương của cả hai của kháng thể đơn dòng được xác định bằng cách sử dụng kit phân lớp kháng thể (Mouse MonoAB ID/SP KIT, ZYMED, 93-6550) là IgG2b ở chuột đối với chuỗi nặng và kappa đối với chuỗi nhẹ.

Dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy của tế bào lai được sắc ký ái lực bằng cách sử dụng agarosa trong đó kháng thể kháng IgG ở chuột được làm bất động (Anti-Mouse IgG-Agarose được sản xuất bởi Sigma) để tinh chế kháng thể đơn dòng. Sau kháng thể được liên kết với cột, cột được rửa với PBS. Sau đó kháng thể được rửa giải với 10 mM glyxin hydroclorua (pH là 2,7) và nước rửa giải được trung hòa ngay sau đó. Sau đó, nước rửa giải được trung hòa được thay bằng PBS bằng thiết bị lọc siêu âm.

Ví dụ 3: ELISA trong đó protein RGMa ở người hoặc chuột nhất được làm bất động

Protein RGMa ở người (R&D systems, 2459-RM) hoặc protein RGMa ở chuột (R&D systems, 2458-RG) được tạo ra ở 2 µg/mL với PBS được phân tán trong đĩa 96 giếng ở 50 µL/mỗi giếng, và đĩa được để yên ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau khi

loại bỏ dung dịch, ApplieBlock (Seikagaku Bio-Business, 200150) được pha loãng 5 lần với PBS được phân tán ở 200 μL /mỗi giếng và đĩa được để yên ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ để phong bế sự liên kết không đặc hiệu. Sau rửa ba lần với PBST (PBS chứa 0,05% Tween 20), mẫu (ví dụ, huyết thanh chuột, dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy tế bào lai, dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy biểu hiện kháng thể tái tổ hợp được mô tả sau đây, hoặc kháng thể được tinh chế) được pha loãng theo dãy với PBS được bổ sung ở 50 μL /mỗi giếng, và đĩa được để yên ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, đĩa được rửa ba lần với PBST, và sau đó kháng thể ở cừu kháng IgG ở chuột được đánh dấu bằng peroxidaza (GE Healthcare, NA9310V) được pha loãng với PBS được phân tán ở 50 μL /mỗi giếng, và đĩa được để yên ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau rửa ba lần, kit tạo màu peroxidaza (Sumitomo Bakelite, ML-1130O) được bổ sung và màu được phát triển trong một khoảng thời gian xác định, và độ hấp thụ ở 492 nm được xác định với thiết bị đọc đĩa.

Ví dụ 4: Phân tích quyết định kháng nguyên của kháng thể

Quyết định kháng nguyên mà kháng thể liên kết được xác định bằng phương pháp quét bằng peptit. Tổng của 83 loại peptit được tổng hợp bằng cách dung hợp mạch nhánh đầu cuối N của trình tự axit amin bao gồm 11 gốc liên nhau được thay bằng 3 gốc trong Arg 172 đến Ala 424 của protein RGMa ở người (SEQ ID NO: 1 trong Danh mục trình tự) với trình tự đệm (SGSG) với đầu cuối N được biotin hóa (SEQ ID NO: 46 trong Danh mục trình tự). Sau khi làm bất động peptit trong đĩa được phủ bằng avidin, kháng thể thử nghiệm (B5.116A3 và B5.70E4) được cho phản ứng. Sau đó, kháng thể ở thỏ kháng Ig ở chuột được đánh dấu bằng peroxidaza (Dako, P026002) được cho phản ứng. Sau đó chất nền dung dịch được bổ sung và màu được phát triển trong khoảng thời gian nhất định, độ hấp thụ được xác định với thiết bị đọc đĩa.

Kết quả là, B5.116A3 được liên kết với peptit được tạo ra từ RGMa ở người có Glu 298 đến Gly 311 (hai loại peptit: Glu 298 đến Asp 308 và Val 301 đến Gly 311), Asn 322 đến Glu 335 (hai loại peptit: Asn 322 đến Thr 332 và Ile 325 đến Glu 335), và Lys 367 đến Ala 377; và B5.70E4 được liên kết với peptit được tạo ra từ RGMa ở người có Glu 298 đến Gly 311 (hai loại peptit: Glu 298 đến Asp 308 và Val 301 đến Gly 311), Asn 322 đến Glu 335 (hai loại peptit: Asn 322 đến Thr 332 và Ile 325 đến Glu 335), và Pro 349 đến Thr 359.

Ví dụ 5: Phân tích trình tự và tạo dòng gen kháng thể chuột

ARN tổng được chiết từ tế bào lai mà sản xuất kháng thể đơn dòng của chuột (B5.116A3 hoặc B5.70E4). Bằng cách sử dụng ARN tổng làm khuôn, cADN được tổng hợp bằng phản ứng phiên mã ngược. Bằng cách sử dụng cADN làm khuôn, gen của vùng hằng định và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ, và vùng hằng định và vùng biến đổi của chuỗi nặng được khuếch đại bằng PCR và trình tự ADN được xác định. Sau đó, trên cơ sở trình tự được xác định của vùng hằng định và vùng biến đổi, gen kháng thể có chiều dài hoàn chỉnh được khuếch đại bằng PCR và được tạo dòng. Trình tự axit amin được mã hóa bằng các gen kháng thể này là như sau.

(1) trình tự axit amin chuỗi nhẹ B5.116A3 (SEQ ID NO: 4 trong Danh mục trình tự)

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISSYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRL
HSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQLNTLPWTFGGGTKLEIKR
ADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPYKIDINVKWKIDGSERQNGVLNS
WTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

(2) trình tự axit amin chuỗi nặng B5.116A3 (SEQ ID NO: 5 trong Danh mục trình tự)

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEI
RSKANNHATYYAESVKGRFTISRDDSKRVSYLQMNNLR AEDTGIYYCTRRDG
AYWGQGTLVTVSAAKTTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESTTV
TWNSGSLSSSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTV
DKKLEPSGPISTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISLTPKVT
CVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHGD
WMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLT
CLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKWE
KTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKKTISRSPGK

(3) trình tự axit amin chuỗi nhẹ B5.70E4 (SEQ ID NO: 6 trong Danh mục trình tự)

DVVMQTQTPSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLNHWYLRPGQSPKLLI
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQSTHVPYTFGGGT
KLEIKRADAAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPYKIDINVKWKIDGSERQ
NGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSF
NRNEC

(4) trình tự axit amin chuỗi nặng B5.70E4 (SEQ ID NO: 7 trong Danh mục trình tự)

DVKLQESGPGLVKPSQSLSTCSVTGYSITTSYYWNWIRQFPGNKLEWMGYIS
YDGTNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLRRLNSVTTEDTATYYCAGSFGYSQGT
LVTVSAAKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSL
SSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDDKKLEPSG
PISTINPCPPCKECHKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMLSLTPKVTCTVVVDVSE
DDPDVQISWVNNVEVHTAQQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQDWMSGKEFK
CKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILPPP AEQLSRKDVSLTCLVVGFNPG
DISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSGSGYFIYSKLNMKTSKWEKTDSFSCNV
RHEGLKNYYLKKTISRSPGK

Ví dụ 6: Quá trình điều chế kháng thể chuột tái tổ hợp và kháng thể khảm chuột chuột nhất tái tổ hợp

Tái tổ hợp kháng thể chuột của hai loại kháng thể kháng RGMa B5.116A3 và B5.70E4 được tạo ra từ tế bào lai được tạo ra (sau đây lần lượt được gọi là “r116A3” và “r70E4”).

Ngoài ra, đối với ví dụ so sánh, kháng thể khảm chuột chuột nhất tái tổ hợp (sau đây còn được gọi là “r5F9”) được tạo ra bằng cách dung hợp vùng biến đổi của kháng thể 5F9 ở chuột với vùng hằng định của kháng thể chuột (IgG2bκ) (vùng hằng định chuỗi nhẹ Arg 108 đến Cys 214 có SEQ ID NO: 4 trong Danh mục trình tự, và vùng hằng định chuỗi nặng Ala 117 đến Lys 452 có SEQ ID NO: 5 của danh mục trình tự) theo Tài liệu sáng chế 1 (WO2009/106356).

ADN mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của mỗi trong số kháng thể được chèn vào trong pcADN 3.3 (Life Technologies) để tạo ra vector biểu hiện. Vector biểu hiện được bổ sung vào trong tế bào HEK293F (Life Technologies) bằng cách sử dụng Neofection 293 (ASTEC). Tế bào được nuôi cấy ở 37°C dưới khí quyển khí cacbon dioxid 8% trong 6 ngày, và sau đó dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được thu hồi. Đối với quá trình tinh chế kháng thể tái tổ hợp, dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được đưa lên cột ái lực trong đó protein A hoặc protein G được làm bất động (GE Healthcare), và kháng thể được liên kết với cột được rửa giải với 10 mM glyxin hydroclorua (pH là 2,8). Nước rửa giải được trung hòa ngay sau đó, và sau đó được thay bằng PBS.

Trong trường hợp trong đó độ tinh khiết cần được gia tăng theo mục đích sử dụng, kháng thể được tinh chế với cột protein A được tinh chế với cột Ceramic Hydroxyapatite Type 1 (CHT) (BIORAD). Kháng thể được liên kết với CHT cột được rửa với 10 mM KH_2PO_4 (pH là 6,5) và sau đó được rửa giải với 20 mM KH_2PO_4 (pH là 6,5), 0,5 M NaCl. Các phân đoạn được rửa giải được thu gom và sau đó được thay bằng PBS.

Ví dụ 7: Thử nghiệm liên kết trên tế bào biểu hiện protein RGMa

Vector biểu hiện protein RGMa ở người có chiều dài hoàn chỉnh (Met 1 đến Cys 450 có SEQ ID NO: 1 trong Danh mục trình tự), vùng đầu cuối C của protein RGMa ở người (Pro 169 đến Cys 450 có SEQ ID NO: 1 trong Danh mục trình tự), protein RGMa ở chuột có chiều dài hoàn chỉnh (Met 1 đến Trp 454 có SEQ ID NO: 2 trong Danh mục trình tự), hoặc vùng đầu cuối C của protein RGMa ở chuột (Pro 170 đến Trp 449 có SEQ ID NO: 3 trong Danh mục trình tự) được bổ sung vào trong tế bào CHO hoặc HEK 293 để tạo ra tế bào biểu hiện kháng nguyên.

Trong protein RGMa, peptit đầu cuối C được xử lý trong phản ứng cộng phần cố định GPI. Protein RGMa ở chuột và chuột nhắt được phân cắt ở Ala 427 và peptit đầu cuối C được loại bỏ. Do đó, trình tự axit amin của protein và vùng đầu cuối C có chiều dài hoàn chỉnh được biểu hiện trong tế bào thông qua phần cố định GPI là giống nhau ở chuột và chuột nhắt.

Kháng thể thử nghiệm (r116A3 và r70E4) và r5F9 (Ví dụ so sánh) với nồng độ cuối là 10 $\mu\text{g/mL}$ được cho phản ứng với tế bào biểu hiện kháng nguyên được mô tả trên đây và sau đó tế bào được rửa bằng PBS chứa 0,1% albumin huyết thanh bò và 0,05% NaN_3 . Kháng thể kháng immunoglobulin chuột được đánh dấu bằng FITC (DAKO) được cho phản ứng và tế bào được rửa. Sự phát huỳnh quang được xác định bằng phân tích tế bào theo dòng chảy (FACSCalibur được sản xuất bởi Beckton Dickinson), và đặc tính liên kết của kháng thể thử nghiệm với tế bào biểu hiện kháng nguyên được đánh giá (Bảng 1).

Kết quả là, r116A3 và r70E4 được xác định là liên kết với vùng đầu cuối C của người và protein RGMa ở chuột, không giống r5F9. Protein RGMa có tác dụng ức chế sự sinh trưởng nhanh của trục thần kinh thậm chí chỉ trong vùng đầu cuối C, và r116A3 và r70E4 ức chế cả hai có chiều dài hoàn chỉnh protein RGMa và vùng đầu

cuối C.

Bảng 1: Đánh giá việc liên kết của các kháng thể tái tổ hợp kháng RGMA với tế bào biểu hiện kháng nguyên*

	RGMA ở người có chiều dài hoàn chỉnh	Vùng đầu cuối C của RGMA ở người	RGMA ở chuột nhắt có chiều dài hoàn chỉnh	Vùng đầu cuối C của RGMA ở chuột
r116A3	++	++	++	++
r70E4	++	++	+	++
r5F9	++	-	++	-

*; ++ liên kết mạnh

+ liên kết yếu

- không liên kết

Ví dụ 8: Xác định hằng số phân ly đối với protein RGMA

Ái lực của kháng thể thử nghiệm (r116A3 và r70E4) và r5F9 (Ví dụ so sánh) đối với protein RGMA được xác định bằng phương pháp phổ cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) bằng cách sử dụng Proteon XPR36 (Bio-Rad).

Protein RGMA ở người (R&D Systems, 2459-RM), vùng đầu cuối C của protein RGMA ở người (được tạo ra trong Ví dụ 1) hoặc protein RGMA ở chuột (R&D Systems, 2458-RG) được pha loãng đến 10 µg/mL với 10 mM dung dịch đệm axetat (pH là 4,5) được làm bất động trong chip cảm biến GLC bằng phương pháp liên kết amin. Kháng thể thử nghiệm được pha loãng theo dãy được sử dụng làm chất gắn kết ở tốc độ dòng là 100 µL/phút trong 60 giây để xác định được hằng số phân ly (Giá trị Kd).

Như được thể hiện trong Bảng 2, r116A3 và r70E4 còn được liên kết với vùng đầu cuối C của protein RGMA ở người, nhưng r5F9 không liên kết. R116A3 được liên kết với protein RGMA ở người cao hơn 32 lần so với r5F9 và với protein RGMA ở chuột cao hơn 44 lần so với r5F9.

Bảng 2: Ái lực của kháng RGMa kháng thể đơn dòng

Kháng thể	Hằng số phân ly (Giá trị Kd, nM)		
	RGMa ở người	Vùng đầu cuối C của RGMa ở người	RGMa của chuột nhắt
r116A3	0,0487	0,0568	0,201
r70E4	2,43	1,12	174
r5F9 (Ví dụ so sánh)	1,59	không liên kết	8,98

Ví dụ 9: Thử nghiệm ức chế sự liên kết RGMa-neogenin

Vùng ngoại bào (Ala 34 đến Leu 1105) của protein neogenin ở người tái tổ hợp (SEQ ID NO: 10 trong Danh mục trình tự) được tinh chế. Dòng tế bào CHO biểu hiện vùng ngoại bào protein neogenin ở người được tạo ra. Histidin tag được dung hợp với đầu cuối C. Từ dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy của tế bào CHO, vùng ngoại bào được hấp thụ trong cột niken (GE Healthcare, 17-5247-01), và sau đó được rửa giải với dung dịch imidazol 100 mM. Bằng cách thẩm tách, dung dịch rửa giải imidazol được thay bằng PBS.

Protein RGMa ở người (R&D systems, 2459-RM) được đánh dấu bằng biotin bằng cách sử dụng kit đánh dấu ChromaLink Biotin Labeling Kit (Solulink). Các lượng bằng nhau của protein RGMa ở người được đánh dấu bằng biotin được điều chỉnh đến 2 µg/mL và kháng thể thử nghiệm (r116A3 và r70E4) được pha loãng theo dãy 2 lần được trộn và được cho phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ để tạo ra dung dịch được trộn.

Đồng thời, 50 µL/giếng của vùng ngoại bào protein neogenin ở người được điều chỉnh đến 2 µg/mL với PBS được bổ sung vào đĩa 96 giếng, và đĩa được để yên ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ để tạo ra đĩa được làm bất động neogenin. Sau khi loại bỏ dung dịch, dung dịch 2,5% albumin huyết thanh bò được bổ sung và đĩa bên trái để

yên trong 1 giờ để phong bế sự liên kết không đặc hiệu. Đối với đĩa được làm bất động neogenin, dung dịch được trộn được mô tả trên đây được bổ sung ở 50 μL /giếng, và đĩa được để yên ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, quá trình rửa được thực hiện, và Avidin được đánh dấu bằng peroxidaza (hệ VECTASTAIN ABC được sản xuất bởi Vector Laboratories) được bổ sung, và đĩa được để yên ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Quá trình rửa sau đó được thực hiện, dung dịch chất nền được bổ sung, sự phát triển màu được thực hiện trong khoảng thời gian xác định, và độ hấp thụ được xác định với thiết bị đọc đĩa. Tỷ lệ độ hấp thụ với sự vắng mặt của kháng thể được thiết lập là 1, và sự ức chế liên kết RGMA-neogenin phụ thuộc vào nồng độ bằng kháng thể được đánh giá (Fig.1).

Kết quả là, không giống với kháng thể đa dòng kháng RGMA ở người (R&D Systems, AF2459) và r5F9, r116A3 và r70E4 không ức chế sự liên kết RGMA-neogenin.

Ví dụ 10: Thử nghiệm ức chế sự liên kết RGMA-BMP2

Protein RGMA ở người (R&D systems, 2459-RM) được điều chỉnh đến 2 $\mu\text{g/mL}$ với PBS được bổ sung vào đĩa 96 giếng ở 50 μL /mỗi giếng, và đĩa được để yên ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Dung dịch 2,5% albumin huyết thanh bò được bổ sung và hỗn hợp được để yên trong 1 giờ để phong bế sự liên kết không đặc hiệu, do đó tạo ra đĩa được làm bất động protein RGMA. Kháng thể thử nghiệm (B5.116A3 và B5.70E4) được pha loãng theo dãy đến 0,01 đến 10 $\mu\text{g/mL}$ được bổ sung vào đĩa được làm bất động protein RGMA và đĩa được để yên ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, quá trình rửa được thực hiện, và protein BMP2 ở người (R&D systems, 355-BM) được pha loãng đến 0,5 $\mu\text{g/mL}$ được bổ sung và đĩa bên trái để yên ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.

Kháng thể kháng BMP2 được đánh dấu bằng biotin được cho phản ứng, và còn được bổ sung với Avidin được đánh dấu bằng peroxidaza (hệ VECTASTAIN ABC, được sản xuất bởi Vector Laboratories) và chất nền dung dịch được bổ sung, sự phát triển của màu được thực hiện trong khoảng thời gian xác định, và độ hấp thụ được xác định với thiết bị đọc đĩa (Fig.2).

Kết quả là, cụ thể hơn, kháng thể kháng RGMA (B5.116A3) ức chế kém sự liên kết của RGMA-BMP2 theo cách phụ thuộc vào nồng độ (Độ hấp thụ: 0,45 ở 0,01

$\mu\text{g/mL}$, 0,4 ở 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 0,32 ở 1 $\mu\text{g/mL}$, và 0,1 ở 10 $\mu\text{g/mL}$).

Ví dụ 11: Thiết kế kháng thể được nhân hóa

Việc nhân hóa kháng thể đơn dòng của chuột B5.116A3 được thực hiện bằng cách ghép vùng xác định hỗ trợ (CDR) theo phương pháp Winter et al. được mô tả trong Patent Nhật số 2912618.

Trước tiên, mẫu tương đồng 3D của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể đơn dòng của chuột B5.116A3 được tạo ra và gốc axit amin bên trong vùng khung (FW), được bố trí gần CDR được xác định. FW của kháng thể người trong đó các axit amin này được duy trì ở mức cao nhất có thể được chọn, CDR của kháng thể chuột được ghép trên đó, và do đó kháng thể thiết kế được nhân hóa. Trong trình tự kháng thể được thiết kế được nhân hóa, chuỗi nặng được mô tả là HA (SEQ ID NO: 11 trong Danh mục trình tự) và chuỗi nhẹ được mô tả là KA (SEQ ID NO: 19 trong Danh mục trình tự). Ngoài ra, trình tự kháng thể được nhân hóa được thiết kế bằng cách bổ sung các đột biến vào trong axit amin bên trong FW góp phần làm ổn định cấu trúc của vùng biến đổi (Tổng 8 chuỗi nặng trong khoảng từ HB đến HH bao gồm HV và tổng 7 chuỗi nhẹ trong khoảng từ KB đến KG bao gồm KA).

Bảng 3: Trình tự kháng thể được nhân hóa được thiết kế

Chuỗi nặng		SEQ ID không có trong danh mục trình tự
HA	Trình tự trong đó CDR của kháng thể chuột B5.116A3 được ghép với FW của kháng thể người	11
HB	Trình tự HA với sự thế Ala 81 bằng Val và Lys 89 bằng Arg	12
HC	Trình tự HA với sự thế Ala 81 bằng Val	13
HD	Trình tự HA với sự thế Lys 89 bằng Arg	14
HE	Trình tự HA với sự thế Ala 81 bằng Val, Lys 89 bằng Arg, và Phe 37 bằng Val	15
HF	Trình tự HA với sự thế Leu 95 bằng Val	16
HG	Trình tự HA với sự thế Phe 37 bằng Val	17
HH	Trình tự HA với sự thế Phe 37 bằng Val, và Leu 95 bằng Val	18
Chuỗi nhẹ		
KA	Trình tự trong đó CDR của kháng thể chuột B5.116A3 được ghép với FW của kháng thể người	19
KB	KA trình tự với sự thế Phe 71 bằng Tyr	20
KC	KA trình tự với sự thế Phe 71 bằng Tyr, và Phe 44 bằng Val	21
KD	KA trình tự với sự thế Ser 85 bằng Thr	22
KE	KA trình tự với sự thế Pro 44 bằng Val	23
KF	KA trình tự với sự thế Pro 44 bằng Val, và Ser 85 bằng Thr	24
KG	KA trình tự với sự thế Phe 71 bằng Tyr, Pro 44 bằng Val, và Ser 85 bằng Thr	25

Ví dụ 12: Quá trình điều chế kháng thể khảm tái tổ hợp chuột-người và kháng thể tái tổ hợp được nhân hóa

(1) Kháng thể khảm tái tổ hợp chuột-người kháng RGMa 116A3 (r116A3C) có trình tự axit amin sau đây được tạo ra theo Ví dụ 6.

Chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 8 trong Danh mục trình tự)

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISSYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRL
HSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQQLNTLPWTFGGGKLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC

Chuỗi nặng (SEQ ID NO: 9 trong Danh mục trình tự)

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEI
RSKANNHATYYAESVKGRFTISRDDSKRSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTRRDG
AYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(2) Tổng 20 kháng thể kháng RGMa được nhân hóa chứa các dạng kết hợp sau đây của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được tạo ra theo Ví dụ 6.

Dạng kết hợp của chuỗi nặng/chuỗi nhẹ;

HA/KA, HA/KB, HA/KC, HA/KG, HB/KC, HC/KA, HC/KB, HD/KA, HD/KB,
HD/KC, HD/KD, HE/KA, HF/KA, HF/KF, HF/KG, HG/KD, HG/KH, HH/KA,
HH/KD, HH/KF

(3) Kháng thể tái tổ hợp được nhân hóa kháng RGMa (sau đây còn được gọi là rH5F9) được tạo ra theo Ví dụ 6 (Ví dụ so sánh).

Vùng biến đổi của kháng thể đơn dòng kháng RGMa được nhân hóa h5F9 được mô tả trong Tài liệu sáng chế 1 (WO2009/106356) (trình tự chuỗi nhẹ ID_53 của Tài liệu sáng chế 1, và trình tự chuỗi nặng ID_50 của Tài liệu sáng chế 1) được gắn với vùng hằng định kháng thể người (chuỗi nhẹ Arg 108 đến Cys 214 có SEQ ID NO: 26 trong Danh mục trình tự, và chuỗi nặng Ala 117 đến Lys 446 có SEQ ID NO: 27

trong Danh mục trình tự).

Ví dụ 13: Thử nghiệm độ ổn định nhiệt đối với kháng thể

Các phân ước hai mươi μL của dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy trong đó kháng thể tái tổ hợp được mô tả trong Ví dụ 12 được biểu hiện được thu gom và được xử lý nhiệt trong 10 phút ở 8 điểm nhiệt độ lần lượt là 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 và 75°C, bằng cách sử dụng thiết bị luân nhiệt (Takara bio, TP 600). Dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được pha loãng với PBS sao cho nồng độ cuối của kháng thể là 125 ng/mL. Sau đó, dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy được ELISA trong đó protein RGMA ở người được làm bất động được mô tả trong Ví dụ 3 để đánh giá đặc tính liên kết kháng nguyên của kháng thể (Fig.3).

Kết quả là, kháng thể được nhân hóa chứa dạng kết hợp của chuỗi nặng HE và chuỗi nhẹ KA (sau đây còn được gọi là "rH116A3"), và kháng thể khảm chuột-người (r116A3C) có độ ổn định nhiệt tốt hơn kháng thể được nhân hóa (rH5F9). Sau đây, kháng thể được nhân hóa chứa dạng kết hợp của HE/KA được gọi là rH116A3.

Khi việc xử lý nhiệt không được thực hiện, kháng thể khảm chuột-người (r116A3C) và kháng thể được nhân hóa (rH116A3) có đặc tính liên kết kháng nguyên là tương đương, và không có sự giảm về đặc tính liên kết kháng nguyên liên quan đến việc nhân hóa.

Ví dụ 14: Thiết lập của dòng tế bào CHO ổn định sản xuất kháng thể được nhân hóa kháng RGMA (rH116A3)

Dòng tế bào CHO ổn định sản xuất kháng thể được nhân hóa kháng RGMA (rH116A3) được tạo ra bằng cách sử dụng hệ thống Lonza GS Xceed (Lonza). Vector gen kép pXC chứa trình tự mã hóa chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 44 trong Danh mục trình tự) và trình tự mã hóa chuỗi nặng (SEQ ID NO: 43 trong Danh mục trình tự) của kháng thể được nhân hóa kháng RGMA (rH116A3) được bổ sung vào trong dòng tế bào gốc biến đổi gen CHOK1SV GS, và các tế bào được biến nạp được tạo ra trong điều kiện chọn methionin sulphoximin (MSX). Sau khi tách thành các tế bào đơn bằng phân tích tế bào theo dòng chảy, lượng kháng thể được tạo ra trong dịch nổi bề mặt môi trường nuôi cấy, sự tăng sinh tế bào và các yếu tố tương tự được đánh giá, và dòng tế bào CHO ổn định được tạo ra.

Ví dụ 15: Thử nghiệm tự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh

Tiểu não được cắt từ chuột sơ sinh (P7), được phân tán trong dung dịch trypsin (0,25% dung dịch trypsin trong PBS chứa 0,2% DNaza) và được phân hủy ở 37 °C trong 10 đến 15 phút. Sau đó, môi trường DMEM chứa 10% huyết thanh thai bò được bổ sung và hỗn hợp được ly tâm. Tế bào được phân tán lại trong cùng một môi trường và được ly tâm, và quá trình này được lặp lại hai lần để rửa tế bào. Ngoài ra, huyền phù tế bào này được lọc thông qua thiết bị lọc tế bào 70 µm và được ly tâm, và phân đoạn kết tinh được phân tán lại trong cùng một môi trường. Chất bổ trợ B27 (GIBCO) được bổ sung vào huyền phù tế bào để tạo ra hạt tế bào từ não chuột sơ sinh.

Sau đó, hạt tế bào từ não chuột sơ sinh được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy tế bào và được nuôi cấy ở 37 °C trong 1 ngày.

Protein RGMA tái tổ hợp (R&D systems, 2459-RM) với nồng độ cuối là 2 µg/mL được bổ sung và tế bào được nuôi cấy ở 37 °C trong 2 ngày. Chiều dài sợi trục thần kinh được xác định bằng kính hiển vi. Như được thể hiện trong Fig.4, việc bổ sung RGMA làm thay đổi chiều dài sợi trục thần kinh từ 37 µm đến 26 µm trong thử nghiệm trên hình vẽ bên trái và từ 38 µm đến 27 µm trên hình vẽ bên phải, do đó ức chế sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh. Mặc dù việc chỉ bổ sung duy nhất kháng thể thử nghiệm (B5.116A3 hoặc B5.70E4) ở nồng độ cuối là 10 µg/mL không làm thay đổi chiều dài sợi trục thần kinh, việc bổ sung đồng thời hợp protein RGMA tái tổ và kháng thể thử nghiệm gây ra sự sinh trưởng nhanh của sợi trục thần kinh với cùng một mức độ như mẫu đối chứng (RGMA không được bổ sung), điều này cho thấy tác dụng trung hòa của kháng thể chống lại protein RGMA.

Ví dụ 16: Thử nghiệm về mức độ hiệu quả bằng cách sử dụng mẫu chuột tổn thương tủy sống.

Chuột Wistar (chuột cái, 8 tuần tuổi, khối lượng khoảng 200 g) được gây mê bằng cách cho ngủi halothan (Takeda Pharmaceutical) được cắt bỏ tử cung sau cột sống trước và sau quanh cột sống T9 (T8 đến T10), và tủy sống được mở ra. Trong trường hợp đánh giá bằng cách sử dụng mẫu nén tủy sống, áp lực 200 kdyn được tác động lên tủy sống đã mở bằng cách sử dụng thiết bị nén IH impactor (Precision System).

Ngay sau đó sau sự phá hủy tủy sống như được mô tả trên đây, vi bơm thẩm thấu được nạp bằng 400 µg/mL của kháng thể thử nghiệm (r116A3 hoặc r70E4) hoặc

mẫu đối chứng kháng thể chuột (mo-IgG2bκ) (200 μL thể tích, 0,5 μL/giờ, 14 ngày phân phối) (Alzet, model 2002) được đặt dưới da lưng của chuột. Đầu của ống silicon được nối với đầu ra của vi bơm thẩm thấu được đặt dưới màng cứng ở vị trí của tổn thương tủy sống. Ống này được dính và cố định vào mỏm gai trong mặt bên thấp hơn của vị trí cắt bỏ tử cung sau, cơ và các lớp da được khâu lại, và chuột được nuôi.

Chức năng dây thần kinh vận động của mẫu chuột tổn thương tủy sống được đánh giá bằng cách sử dụng thang điểm Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) (Basso, D.M., Beattie, M.S., & Bresnahan, J.C., A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12, 1-21 (1995)) ở 0, 1, 3 và 7 ngày sau tổn thương, và mỗi tuần sau đó lên đến 8 tuần. Do đó, như được thể hiện trong Fig.5(A), r116A3 hoặc r70E4 nâng cao đáng kể điểm BBB lần lượt sau 4 hoặc 3 tuần sử dụng khi so với kháng thể đối chứng (mo-IgG2bκ) ($p < 0,05$, thử nghiệm t-Student).

Trong trường hợp đánh giá bằng cách sử dụng mẫu cắt đứt một nửa tủy sống, mặt lưng của tủy sống đã mở được cắt đến độ sâu 1,8 mm đến 2,0 mm. Theo cách như trên đây, kháng thể thử nghiệm (B5.116A3) hoặc mẫu đối chứng kháng thể chuột (mo-IgG2bκ) được sử dụng bằng cách sử dụng vi bơm thẩm thấu và được đánh giá bằng cách sử dụng điểm BBB ở 0, 1, 3 và 7 ngày sau tổn thương, và mỗi tuần sau đó lên đến 10 tuần. Như được thể hiện trong Fig.5(B), B5.116A3 nâng cao đáng kể điểm BBB 4 tuần sau sử dụng khi so với kháng thể đối chứng (mo-IgG2bκ) ($p < 0,01$, thử nghiệm t-Student).

Ví dụ 17: Thử nghiệm về mức độ hiệu quả bằng cách sử dụng mẫu chuột với mệnh đa xơ cứng

Peptit PLP₁₃₉₋₁₅₁ (HSLGKWLGHDPKF: SEQ ID NO: 45 trong Danh mục trình tự, Peptide Institute) được hòa tan trong nước muối sinh lý (Otsuka Pharmaceutical Factory) và được trộn với tá dược Freund chưa hoàn chỉnh (Sigma) mà được bổ sung trực khuẩn lao bất hoạt tubercle bacillus H37 Ra (Difco Laboratories) để tạo ra nhũ tương. Chuột SJL/JorllcoCrj (SJL/J) (Charles River Japan) được tạo miễn dịch dưới da trên lưng bằng peptit PLP₁₃₉₋₁₅₁ ở 50 μg/đầu, và sự thay đổi về điểm EAE score và thể trọng được đánh giá (H. Kataoka, K. Sugahara, K. Shimano, K. Teshima, M. Koyama, A. Fukunari và K. Chiba. FTY720, Sphingosine 1-phosphate receptor modulators, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibition of T cell infiltration. *Cellular & Molecular Immunology* 6, 439-448, 2005.) (Fig.6).

Kháng thể thử nghiệm (B5.116A3) được pha loãng trong nước muối sinh lý được sử dụng trong bụng ở 20 mg/kg mỗi ở 7 và 10 ngày hoặc 18 và 21 ngày sau việc tạo miễn dịch với peptit PLP₁₃₉₋₁₅₁.

Kết quả là, như được thể hiện trong Fig.6, khi so với kháng thể đối chứng (mô-IgG2bk), kháng thể đơn dòng kháng RGMA của chuột (B5.116A3) ngăn ngừa sự giảm điểm EAE bằng việc sử dụng trước khi sự khởi phát (phần trên của Fig.6) và có tác dụng ngăn ngừa sự tái phát bệnh bằng việc sử dụng kháng thể sau sự khởi phát (phần dưới của Fig.6).

Ví dụ 18: Thử nghiệm tạo miễn dịch của kháng thể

Tế bào hình cây chưa được biệt hóa trong máu ngoại vi được tạo ra từ 51 người cho khỏe mạnh được làm trưởng thành bằng yếu tố kích thích cụm bạc cầu hạt-bạch cầu đơn nhân (GM-CSF) và quá trình kích thích bằng Interleukin-4. Kháng thể thử nghiệm (rH116A3) ở nồng độ cuối là 50 µg/mL được bổ sung vào tế bào hình cây trưởng thành và tế bào được nuôi cấy trong 4, 5 ngày để kháng thể được hấp thụ vào trong tế bào hình cây. Tế bào T CD4⁺ trong máu ngoại vi (tế bào T trợ giúp) được tạo ra từ cùng một người nhận được trộn với tế bào hình cây, và cùng được nuôi cấy trong một tuần khác, và sau đó sự tăng sinh của tế bào T được xác định bằng phân tích tế bào theo dòng chảy. Bằng cách sử dụng hoạt tính tăng sinh tế bào T của kháng thể thử nghiệm làm chỉ số, nguy cơ tạo miễn dịch ở người được đánh giá. Do đó, sự tăng sinh tế bào T được quan sát trong 4 (7,8%) trong số 51 người cho, và do đó nguy cơ tạo miễn dịch là thấp.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng RGMa được phân lập, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó,

trong đó trình tự axit amin của mỗi trong số vùng quyết định hỗ trợ chuỗi nhẹ 1 (LCDR1), vùng quyết định hỗ trợ chuỗi nhẹ 2 (LCDR2), vùng quyết định hỗ trợ chuỗi nhẹ 3 (LCDR3), vùng quyết định hỗ trợ chuỗi nặng 1 (HCDR1), vùng quyết định hỗ trợ chuỗi nặng 2 (HCDR2) và vùng quyết định hỗ trợ chuỗi nặng 3 (HCDR3) chứa trình tự sau đây:

LCDR1: RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 30 trong Danh mục trình tự),

LCDR2: YTSRLHS (SEQ ID NO: 31 trong Danh mục trình tự),

LCDR3: QQLNTLP (SEQ ID NO: 32 trong Danh mục trình tự),

HCDR1: DAWMD (SEQ ID NO: 33 trong Danh mục trình tự),

HCDR2: EIRSKANNHATYYAESVKG (SEQ ID NO: 34 trong Danh mục trình tự) và

HCDR3: RDGAY (SEQ ID NO: 35 trong Danh mục trình tự);

hoặc

LCDR1: RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 36 trong Danh mục trình tự)

LCDR2: KVSNRFS (SEQ ID NO: 37 trong Danh mục trình tự)

LCDR3: SQSTHVP (SEQ ID NO: 38 trong Danh mục trình tự)

HCDR1: TSYYWN (SEQ ID NO: 39 trong Danh mục trình tự)

HCDR2: YISYDGTTNNYNPSLKN (SEQ ID NO: 40 trong Danh mục trình tự) và

HCDR3: SFG.

2. Kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1,

trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) chứa trình tự sau đây:

VH:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLE
WVAEIRSKANNHATYYAESVKGRFTISRDDSKSIVYLMNSLRTE
DLYYCTRRDGAYWGKGTTVTVSS (SEQ ID NO: 41 trong Danh mục trình

tự) hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng là ít nhất 90% với trình tự axit amin này; và

trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) chứa trình tự sau đây:

VL:

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIY
YTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFASYFCQQLNTLPWTFG
GGTKVEME (SEQ ID NO: 42 trong Danh mục trình tự) hoặc trình tự axit
amin có độ tương đồng là ít nhất 90% với trình tự axit amin này.

3. Kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể kháng RGMa này là kháng thể được nhân hóa.
4. Kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể kháng RGMa chứa vùng hằng định của IgG ở người.
5. Phân tử axit nucleic mã hóa mảnh protein của kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.
6. Phân tử axit nucleic theo điểm 5, trong đó mỗi trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin VH và VL là trình tự nucleotit chứa:

VH:

gaagtgcagctggtggaatctggcggcggactggtgcagcctggcagatccctgagactgtcctgtaccgcct
ccggettccacttctccgacgcctggatggattgggtgcgacaggctcctggcaagggcctggaatgggtggc
cgagatccggtccaaggccaacaaccacgccacctactacgccgagctctgtgaagggccggttcaccatctcc
cgggacgactccaagtccatcgtgtacctgcagatgaactccctgcggaccgaggacaccgcctgtactact
gcaccagaagggacggcgcctactggggcaagggcaccacagtgcagtgactctcc (SEQ ID NO:
43 trong Danh mục trình tự), và

VL:

gacatccagatgaccagtcctccctcctcctgtgtctgtctccgtgggacagagtgaccatcacctgtcgggc
ctcccaggacatctcctcctacctaactggtatcagcagaagcccggaagggcccaagctgctgatctact
acacctcccggtgcactccggcgtgccctctagatttccggctctggctccggcaccgactttaccctgaccat
ctccagcctgcagcccaggacttcgcctcctactctgtcagcagctgaacacctgccctggaccttggcgg
aggcaccaaggtggaaatggaa (SEQ ID NO: 44 trong Danh mục trình tự).

7. Vector tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic theo điểm 5 hoặc 6.
8. Tế bào vật chủ chứa vector tái tổ hợp theo điểm 7.
9. Phương pháp sản xuất kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào vật chủ theo điểm 8.
10. Dược phẩm chứa kháng thể kháng RGMa hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.

FIG. 1

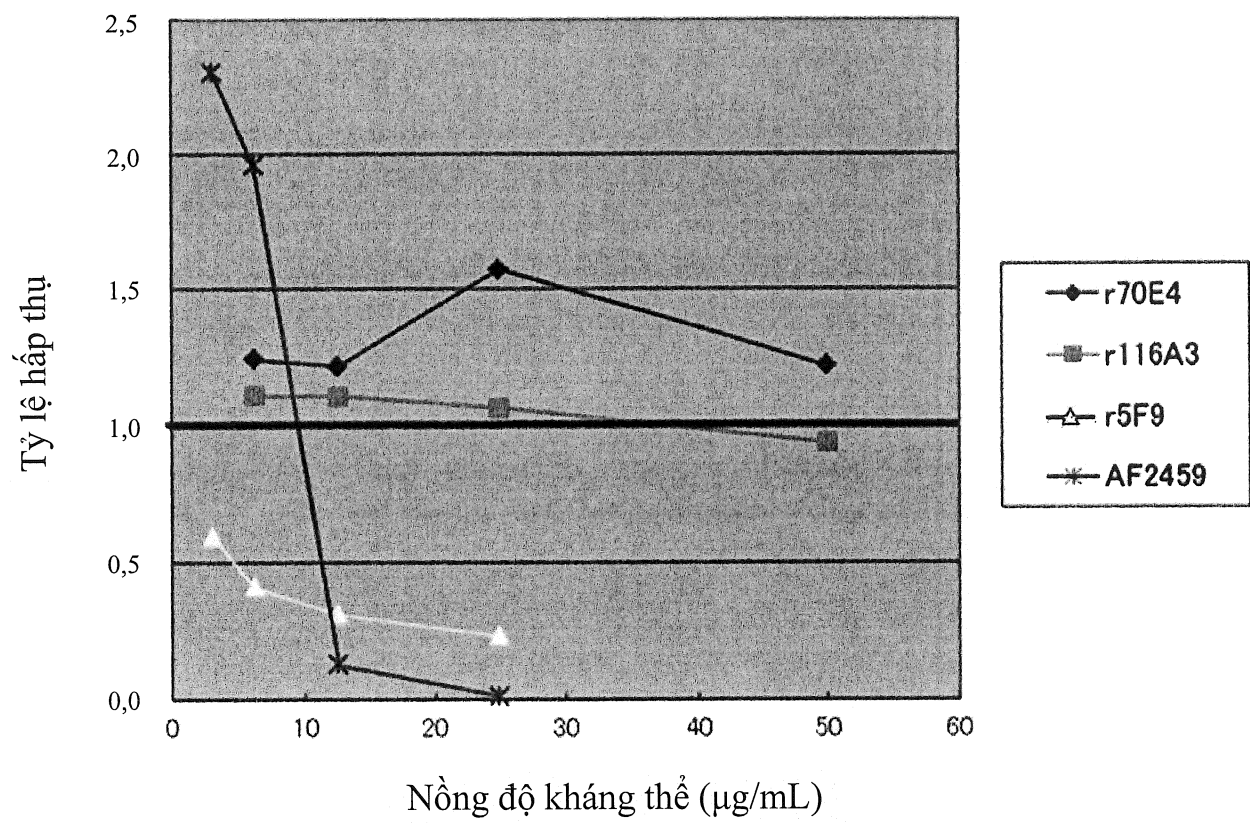


FIG. 2

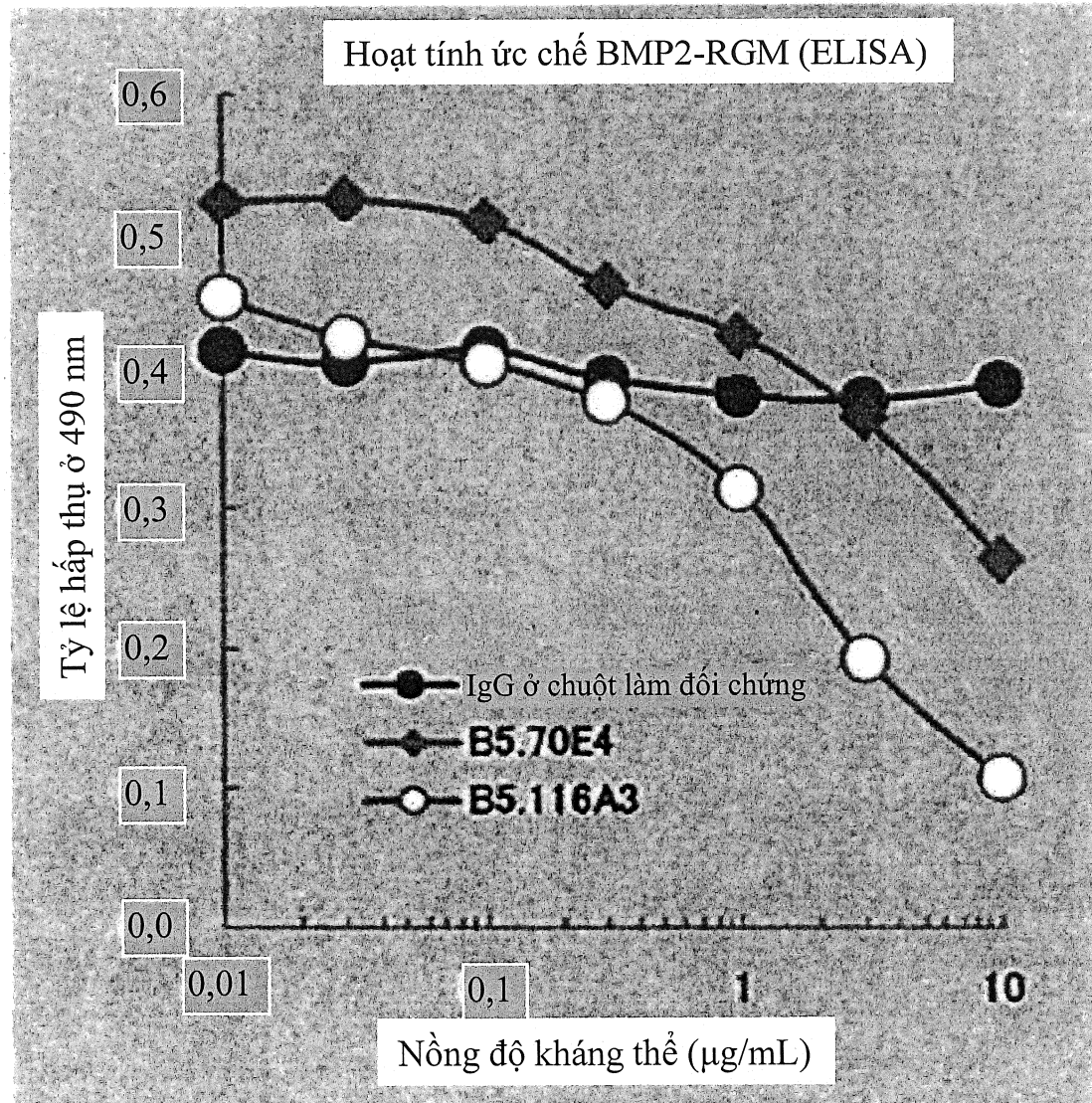


FIG. 3

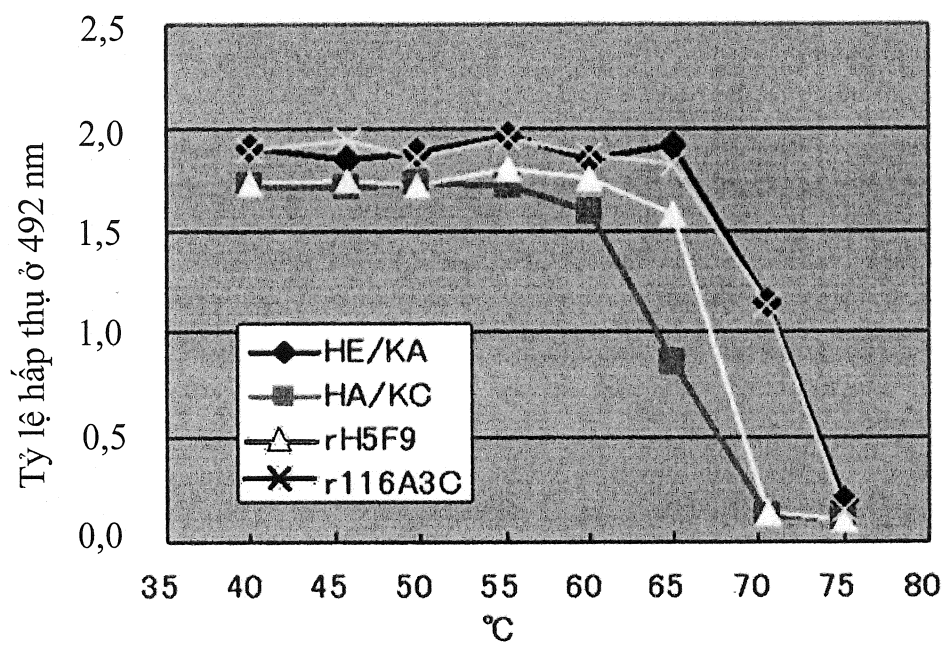


FIG. 4

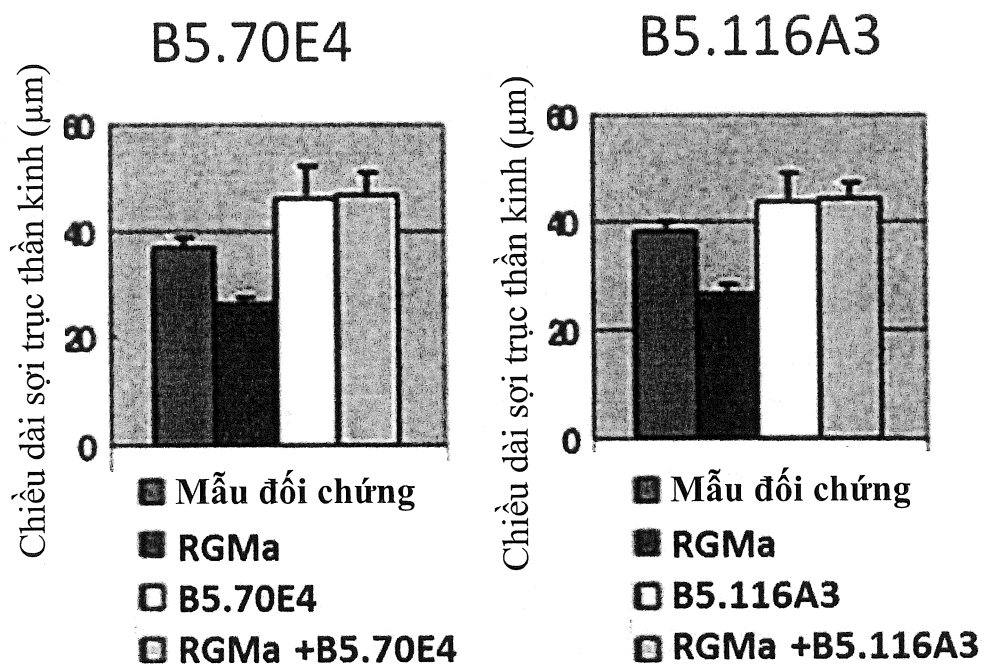
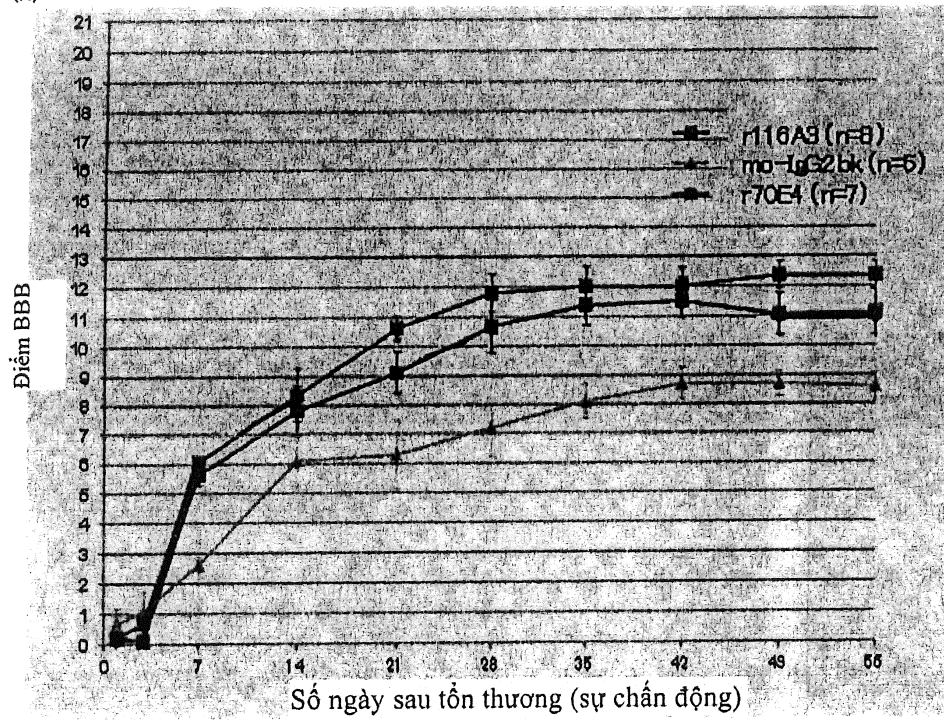


FIG. 5

(A)



(B)

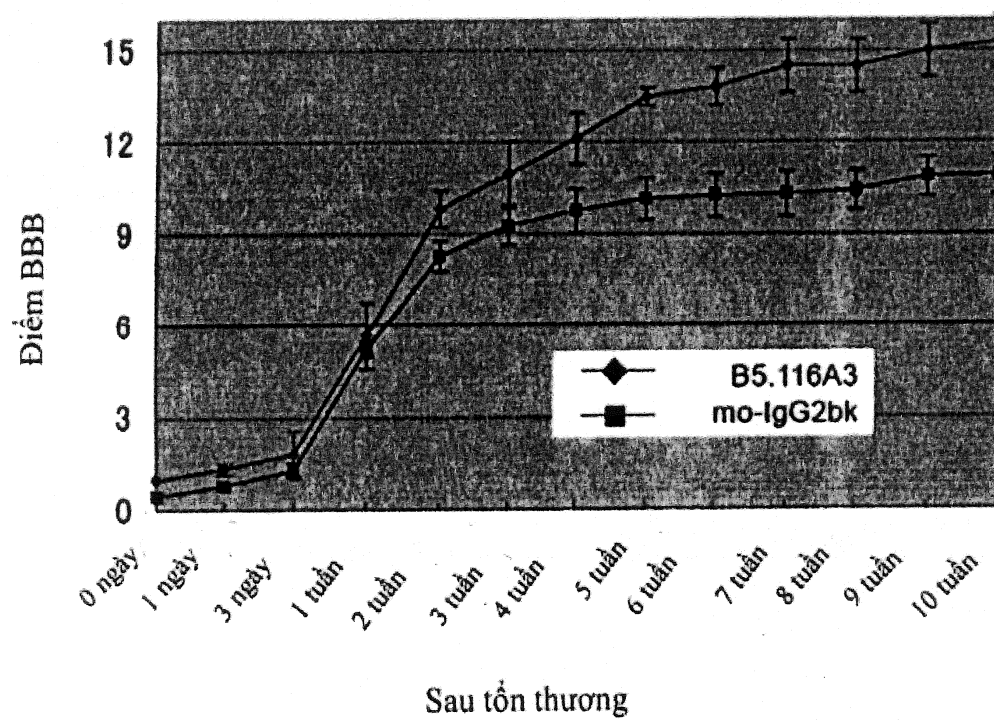
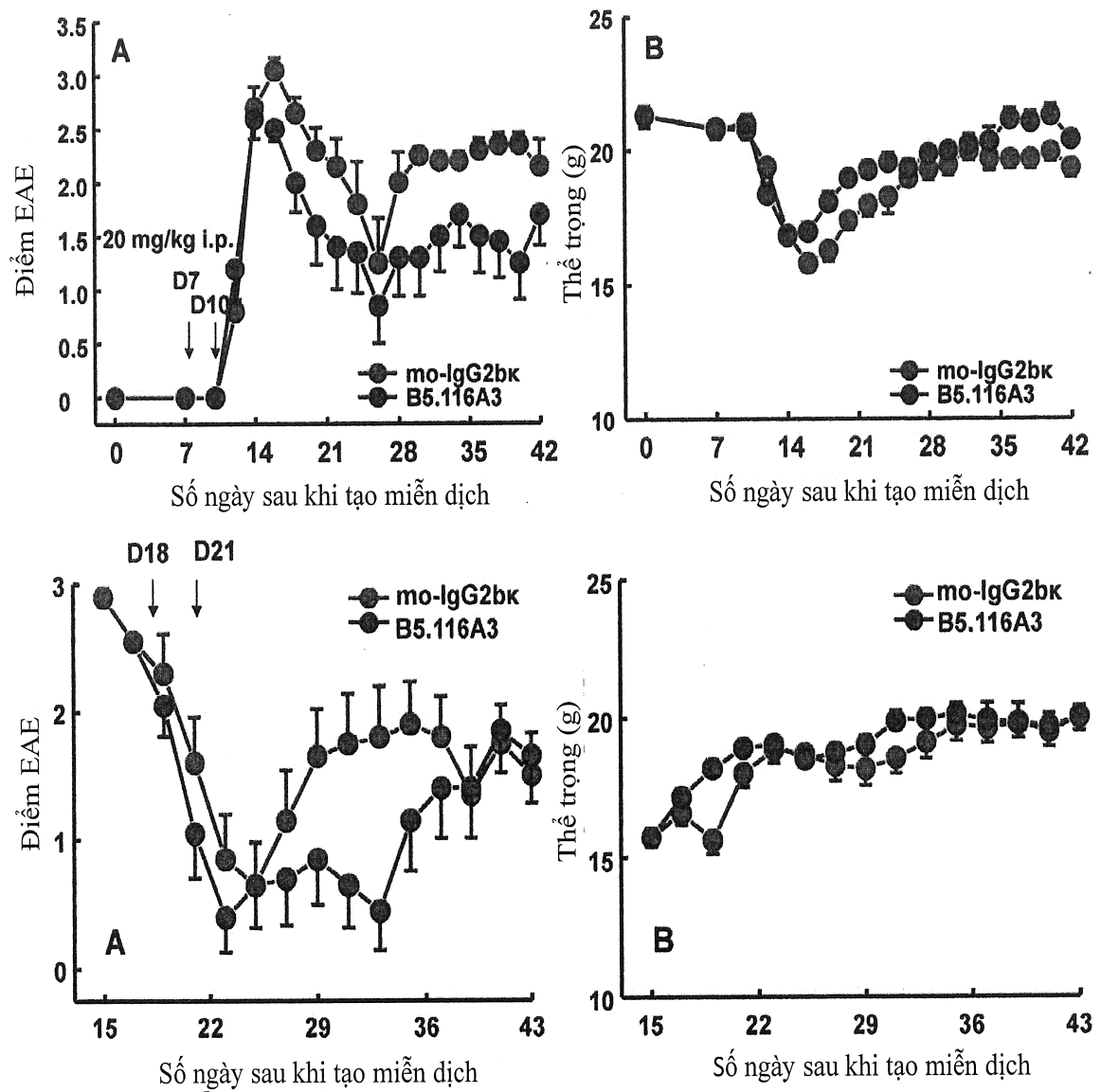


FIG. 6



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation

Osaka University

National University Corporation Chiba University

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG PHÂN TỬ DẪN HƯỚNG ĐẦY A (RGMa) ĐƯỢC PHÂN LẬP, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> A16005-16140

<140> PCT/JP2016/063166

<141> 2016-04-27

<150> JP2015-091095

<151> 2015-04-28

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 450

<212> PRT

<213> Loài người

<400> 1

Met Gln Pro Pro Arg Glu Arg Leu Val Val Thr Gly Arg Ala Gly Trp

1 5 10 15

Met Gly Met Gly Arg Gly Ala Gly Arg Ser Ala Leu Gly Phe Trp Pro

20 25 30

Thr Leu Ala Phe Leu Leu Cys Ser Phe Pro Ala Ala Thr Ser Pro Cys

35 40 45

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

50 55 60

His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Thr Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu Ile

130 135 140

Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Thr Pro Asn Tyr

145 150 155 160

Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr Asp

165 170 175

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

180 185 190

Asn Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser
 195 200 205
 Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln
 210 215 220
 Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro
 225 230 235 240
 Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala
 245 250 255
 Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile
 260 265 270
 Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg
 275 280 285
 Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val
 290 295 300
 Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro
 305 310 315 320
 Leu Asn Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr Asn Ala Glu Gly
 325 330 335
 Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala Pro Thr Ala Pro
 340 345 350
 Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu
 355 360 365
 Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr
 370 375 380
 Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp
 385 390 395 400
 Val Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Tyr Asp Arg
 405 410 415
 Thr Arg Asp Leu Pro Gly Arg Ala Ala Ala Gly Leu Pro Leu Ala Pro
 420 425 430
 Arg Pro Leu Leu Gly Ala Leu Val Pro Leu Leu Ala Leu Leu Pro Val
 435 440 445
 Phe Cys
 450

<210> 2

<211> 454

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 2

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

85 90 95
 Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser
 100 105 110
 Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Val Arg
 115 120 125
 Thr Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu
 130 135 140
 Ile Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Ala Pro Asn
 145 150 155 160
 Tyr Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr
 165 170 175
 Asp His Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp
 180 185 190
 Asn Asn Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly
 195 200 205
 Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe
 210 215 220
 Gln Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu
 225 230 235 240
 Pro Ser Ala Phe Ala Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly
 245 250 255
 Ala Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu
 260 265 270
 Ile Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly
 275 280 285
 Arg Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala
 290 295 300
 Val Glu Asp Arg Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys
 305 310 315 320
 Pro Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe Arg Ala Asn Ala Glu
 325 330 335
 Ser Pro Arg Arg Pro Ala Ala Ala Ser Pro Ser Pro Val Val Pro Glu
 340 345 350
 Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu Pro
 355 360 365
 Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr Thr
 370 375 380
 Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp Gly
 385 390 395 400
 Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Phe Glu Arg Thr
 405 410 415
 Arg Glu Leu Pro Gly Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr
 420 425 430
 Phe Pro Leu Ala Pro Gln Ile Leu Leu Gly Thr Ile Pro Leu Leu Val
 435 440 445
 Leu Leu Pro Val Leu Trp
 450

<210> 3

<211> 449

<212> PRT

<213> Chuột nâu

<400> 3

Met Gln Pro Pro Arg Glu Arg Leu Val Val Thr Gly Arg Ala Gly Trp
 1 5 10 15
 Met Gly Met Gly Arg Gly Ala Gly Arg Ser Ala Leu Gly Leu Trp Pro
 20 25 30
 Thr Leu Ala Phe Leu Leu Cys Ser Phe Pro Ala Ala Ile Ser Pro Cys
 35 40 45
 Lys Ile Leu Lys Cys Asn Ser Glu Phe Trp Ser Ala Thr Ser Ser Gly
 50 55 60
 Ser His Ala Pro Ala Ser Asp Asp Val Pro Glu Phe Cys Ala Ala Leu
 65 70 75 80
 Arg Thr Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly
 85 90 95
 Asp Leu Ala Tyr His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ser
 100 105 110
 Gln His Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser Gln Pro Arg Val Arg
 115 120 125
 Thr Leu Pro Pro Ala Gly Asp Ser Gln Glu Arg Ser Asp Ser Pro Glu
 130 135 140
 Ile Cys His Tyr Glu Lys Ser Phe His Lys His Ser Ala Ala Pro Asn
 145 150 155 160
 Tyr Thr His Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Thr
 165 170 175
 Asp His Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp
 180 185 190
 Asn Asn Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly
 195 200 205
 Ser Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe
 210 215 220
 Gln Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu
 225 230 235 240
 Pro Ser Ala Phe Ala Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly
 245 250 255
 Ala Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu
 260 265 270
 Ile Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly
 275 280 285
 Arg Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala
 290 295 300
 Val Glu Asp Arg Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys
 305 310 315 320
 Pro Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe Arg Ala Asn Ala Glu
 325 330 335
 Ser Pro Arg Arg Pro Ala Ala Ala Ser Pro Ser Pro Val Val Pro Glu
 340 345 350
 Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu Pro
 355 360 365
 Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr Thr
 370 375 380
 Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp Gly

385 390 395 400
 Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Phe Glu Arg Thr
 405 410 415
 Arg Glu Leu Pro Gly Ala Val Ala Ala Ala Phe Pro Leu Ala Pro
 420 425 430
 Glu Met Leu Pro Gly Thr Val Thr Leu Leu Val Leu Leu Pro Leu Phe
 435 440 445
 Trp

<210> 4
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 4
 Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp
 35 40 45
 Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val
 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Leu Asn
 100 105 110
 Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 130 135 140
 Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 165 170 175
 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 195 200 205
 His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 210 215 220
 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230

<210> 5
 <211> 471
 <212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 5

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 85 90 95
 Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 100 105 110
 Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr
 130 135 140
 Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp
 165 170 175
 Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu
 180 185 190
 Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser
 195 200 205
 Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser
 210 215 220
 Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr
 225 230 235 240
 Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys
 260 265 270
 Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn
 290 295 300
 Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu
 340 345 350
 Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg
 355 360 365
 Ala Pro Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg
 370 375 380
 Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp

385 390 395 400
 Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys
 405 410 415
 Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser
 420 425 430
 Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser
 435 440 445
 Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr
 450 455 460
 Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 6

<211> 238

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 6

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Arg Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 130 135 140
 Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
 165 170 175
 Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
 180 185 190
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
 195 200 205
 Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
 210 215 220
 Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235

<210> 7

<211> 466
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 7

Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile
 1 5 10 15
 Met Ser Asp Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
 20 25 30
 Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Asn Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95
 Phe Phe Leu Arg Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Gly Ser Phe Gly Tyr Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 115 120 125
 Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly
 130 135 140
 Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys
 145 150 155 160
 Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln
 195 200 205
 Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp
 210 215 220
 Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro
 225 230 235 240
 Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly
 245 250 255
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
 260 265 270
 Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
 275 280 285
 Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His
 290 295 300
 Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys
 325 330 335
 Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 340 345 350
 Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
 355 360 365
 Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu

370 375 380
 Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp
 385 390 395 400
 Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val
 405 410 415
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys
 420 425 430
 Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His
 435 440 445
 Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro
 450 455 460
 Gly Lys
 465

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

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ kháng thể khảm

<400> 8
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 9

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng kháng thể khảm

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala

20 25 30

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

35 40 45

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Arg Ser

65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Arg Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 10
 <211> 1461
 <212> PRT
 <213> Loài người

<400> 10
 Met Ala Ala Glu Arg Gly Ala Arg Arg Leu Leu Ser Thr Pro Ser Phe
 1 5 10 15
 Trp Leu Tyr Cys Leu Leu Leu Leu Gly Arg Arg Ala Pro Gly Ala Ala
 20 25 30
 Ala Ala Arg Ser Gly Ser Ala Pro Gln Ser Pro Gly Ala Ser Ile Arg
 35 40 45
 Thr Phe Thr Pro Phe Tyr Phe Leu Val Glu Pro Val Asp Thr Leu Ser
 50 55 60
 Val Arg Gly Ser Ser Val Ile Leu Asn Cys Ser Ala Tyr Ser Glu Pro
 65 70 75 80
 Ser Pro Lys Ile Glu Trp Lys Lys Asp Gly Thr Phe Leu Asn Leu Val
 85 90 95
 Ser Asp Asp Arg Arg Gln Leu Leu Pro Asp Gly Ser Leu Phe Ile Ser
 100 105 110
 Asn Val Val His Ser Lys His Asn Lys Pro Asp Glu Gly Tyr Tyr Gln
 115 120 125
 Cys Val Ala Thr Val Glu Ser Leu Gly Thr Ile Ile Ser Arg Thr Ala
 130 135 140
 Lys Leu Ile Val Ala Gly Leu Pro Arg Phe Thr Ser Gln Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Ser Ser Val Tyr Ala Gly Asn Asn Ala Ile Leu Asn Cys Glu Val Asn
 165 170 175
 Ala Asp Leu Val Pro Phe Val Arg Trp Glu Gln Asn Arg Gln Pro Leu
 180 185 190
 Leu Leu Asp Asp Arg Val Ile Lys Leu Pro Ser Gly Met Leu Val Ile
 195 200 205
 Ser Asn Ala Thr Glu Gly Asp Gly Gly Leu Tyr Arg Cys Val Val Glu
 210 215 220
 Ser Gly Gly Pro Pro Lys Tyr Ser Asp Glu Val Glu Leu Lys Val Leu

225 230 235 240
 Pro Asp Pro Glu Val Ile Ser Asp Leu Val Phe Leu Lys Gln Pro Ser
 245 250 255
 Pro Leu Val Arg Val Ile Gly Gln Asp Val Val Leu Pro Cys Val Ala
 260 265 270
 Ser Gly Leu Pro Thr Pro Thr Ile Lys Trp Met Lys Asn Glu Glu Ala
 275 280 285
 Leu Asp Thr Glu Ser Ser Glu Arg Leu Val Leu Leu Ala Gly Gly Ser
 290 295 300
 Leu Glu Ile Ser Asp Val Thr Glu Asp Asp Ala Gly Thr Tyr Phe Cys
 305 310 315 320
 Ile Ala Asp Asn Gly Asn Glu Thr Ile Glu Ala Gln Ala Glu Leu Thr
 325 330 335
 Val Gln Ala Gln Pro Glu Phe Leu Lys Gln Pro Thr Asn Ile Tyr Ala
 340 345 350
 His Glu Ser Met Asp Ile Val Phe Glu Cys Glu Val Thr Gly Lys Pro
 355 360 365
 Thr Pro Thr Val Lys Trp Val Lys Asn Gly Asp Met Val Ile Pro Ser
 370 375 380
 Asp Tyr Phe Lys Ile Val Lys Glu His Asn Leu Gln Val Leu Gly Leu
 385 390 395 400
 Val Lys Ser Asp Glu Gly Phe Tyr Gln Cys Ile Ala Glu Asn Asp Val
 405 410 415
 Gly Asn Ala Gln Ala Gly Ala Gln Leu Ile Ile Leu Glu His Ala Pro
 420 425 430
 Ala Thr Thr Gly Pro Leu Pro Ser Ala Pro Arg Asp Val Val Ala Ser
 435 440 445
 Leu Val Ser Thr Arg Phe Ile Lys Leu Thr Trp Arg Thr Pro Ala Ser
 450 455 460
 Asp Pro His Gly Asp Asn Leu Thr Tyr Ser Val Phe Tyr Thr Lys Glu
 465 470 475 480
 Gly Ile Ala Arg Glu Arg Val Glu Asn Thr Ser His Pro Gly Glu Met
 485 490 495
 Gln Val Thr Ile Gln Asn Leu Met Pro Ala Thr Val Tyr Ile Phe Arg
 500 505 510
 Val Met Ala Gln Asn Lys His Gly Ser Gly Glu Ser Ser Ala Pro Leu
 515 520 525
 Arg Val Glu Thr Gln Pro Glu Val Gln Leu Pro Gly Pro Ala Pro Asn
 530 535 540
 Leu Arg Ala Tyr Ala Ala Ser Pro Thr Ser Ile Thr Val Thr Trp Glu
 545 550 555 560
 Thr Pro Val Ser Gly Asn Gly Glu Ile Gln Asn Tyr Lys Leu Tyr Tyr
 565 570 575
 Met Glu Lys Gly Thr Asp Lys Glu Gln Asp Val Asp Val Ser Ser His
 580 585 590
 Ser Tyr Thr Ile Asn Gly Leu Lys Lys Tyr Thr Glu Tyr Ser Phe Arg
 595 600 605
 Val Val Ala Tyr Asn Lys His Gly Pro Gly Val Ser Thr Pro Asp Val
 610 615 620
 Ala Val Arg Thr Leu Ser Asp Val Pro Ser Ala Ala Pro Gln Asn Leu
 625 630 635 640
 Ser Leu Glu Val Arg Asn Ser Lys Ser Ile Met Ile His Trp Gln Pro

645 650 655
 Pro Ala Pro Ala Thr Gln Asn Gly Gln Ile Thr Gly Tyr Lys Ile Arg
 660 665 670
 Tyr Arg Lys Ala Ser Arg Lys Ser Asp Val Thr Glu Thr Leu Val Ser
 675 680 685
 Gly Thr Gln Leu Ser Gln Leu Ile Glu Gly Leu Asp Arg Gly Thr Glu
 690 695 700
 Tyr Asn Phe Arg Val Ala Ala Leu Thr Ile Asn Gly Thr Gly Pro Ala
 705 710 715 720
 Thr Asp Trp Leu Ser Ala Glu Thr Phe Glu Ser Asp Leu Asp Glu Thr
 725 730 735
 Arg Val Pro Glu Val Pro Ser Ser Leu His Val Arg Pro Leu Val Thr
 740 745 750
 Ser Ile Val Val Ser Trp Thr Pro Pro Glu Asn Gln Asn Ile Val Val
 755 760 765
 Arg Gly Tyr Ala Ile Gly Tyr Gly Ile Gly Ser Pro His Ala Gln Thr
 770 775 780
 Ile Lys Val Asp Tyr Lys Gln Arg Tyr Tyr Thr Ile Glu Asn Leu Asp
 785 790 795 800
 Pro Ser Ser His Tyr Val Ile Thr Leu Lys Ala Phe Asn Asn Val Gly
 805 810 815
 Glu Gly Ile Pro Leu Tyr Glu Ser Ala Val Thr Arg Pro His Thr Asp
 820 825 830
 Thr Ser Glu Val Asp Leu Phe Val Ile Asn Ala Pro Tyr Thr Pro Val
 835 840 845
 Pro Asp Pro Thr Pro Met Met Pro Pro Val Gly Val Gln Ala Ser Ile
 850 855 860
 Leu Ser His Asp Thr Ile Arg Ile Thr Trp Ala Asp Asn Ser Leu Pro
 865 870 875 880
 Lys His Gln Lys Ile Thr Asp Ser Arg Tyr Tyr Thr Val Arg Trp Lys
 885 890 895
 Thr Asn Ile Pro Ala Asn Thr Lys Tyr Lys Asn Ala Asn Ala Thr Thr
 900 905 910
 Leu Ser Tyr Leu Val Thr Gly Leu Lys Pro Asn Thr Leu Tyr Glu Phe
 915 920 925
 Ser Val Met Val Thr Lys Gly Arg Arg Ser Ser Thr Trp Ser Met Thr
 930 935 940
 Ala His Gly Thr Thr Phe Glu Leu Val Pro Thr Ser Pro Pro Lys Asp
 945 950 955 960
 Val Thr Val Val Ser Lys Glu Gly Lys Pro Lys Thr Ile Ile Val Asn
 965 970 975
 Trp Gln Pro Pro Ser Glu Ala Asn Gly Lys Ile Thr Gly Tyr Ile Ile
 980 985 990
 Tyr Tyr Ser Thr Asp Val Asn Ala Glu Ile His Asp Trp Val Ile Glu
 995 1000 1005
 Pro Val Val Gly Asn Arg Leu Thr His Gln Ile Gln Glu Leu Thr
 1010 1015 1020
 Leu Asp Thr Pro Tyr Tyr Phe Lys Ile Gln Ala Arg Asn Ser Lys
 1025 1030 1035
 Gly Met Gly Pro Met Ser Glu Ala Val Gln Phe Arg Thr Pro Lys
 1040 1045 1050
 Ala Asp Ser Ser Asp Lys Met Pro Asn Asp Gln Ala Ser Gly Ser

1055	1060	1065
Gly Gly Lys Gly Ser Arg Leu	Pro Asp Leu Gly Ser	Asp Tyr Lys
1070	1075	1080
Pro Pro Met Ser Gly Ser Asn	Ser Pro His Gly Ser	Pro Thr Ser
1085	1090	1095
Pro Leu Asp Ser Asn Met Leu	Leu Val Ile Ile Val	Ser Val Gly
1100	1105	1110
Val Ile Thr Ile Val Val Val	Val Ile Ile Ala Val	Phe Cys Thr
1115	1120	1125
Arg Arg Thr Thr Ser His Gln	Lys Lys Lys Arg Ala	Ala Cys Lys
1130	1135	1140
Ser Val Asn Gly Ser His Lys	Tyr Lys Gly Asn Ser	Lys Asp Val
1145	1150	1155
Lys Pro Pro Asp Leu Trp Ile	His His Glu Arg Leu	Glu Leu Lys
1160	1165	1170
Pro Ile Asp Lys Ser Pro Asp	Pro Asn Pro Ile Met	Thr Asp Thr
1175	1180	1185
Pro Ile Pro Arg Asn Ser Gln	Asp Ile Thr Pro Val	Asp Asn Ser
1190	1195	1200
Met Asp Ser Asn Ile His Gln	Arg Arg Asn Ser Tyr	Arg Gly His
1205	1210	1215
Glu Ser Glu Asp Ser Met Ser	Thr Leu Ala Gly Arg	Arg Gly Met
1220	1225	1230
Arg Pro Lys Met Met Met Pro	Phe Asp Ser Gln Pro	Pro Gln Pro
1235	1240	1245
Val Ile Ser Ala His Pro Ile	His Ser Leu Asp Asn	Pro His His
1250	1255	1260
His Phe His Ser Ser Ser Leu	Ala Ser Pro Ala Arg	Ser His Leu
1265	1270	1275
Tyr His Pro Gly Ser Pro Trp	Pro Ile Gly Thr Ser	Met Ser Leu
1280	1285	1290
Ser Asp Arg Ala Asn Ser Thr	Glu Ser Val Arg Asn	Thr Pro Ser
1295	1300	1305
Thr Asp Thr Met Pro Ala Ser	Ser Ser Gln Thr Cys	Cys Thr Asp
1310	1315	1320
His Gln Asp Pro Glu Gly Ala	Thr Ser Ser Ser Tyr	Leu Ala Ser
1325	1330	1335
Ser Gln Glu Glu Asp Ser Gly	Gln Ser Leu Pro Thr	Ala His Val
1340	1345	1350
Arg Pro Ser His Pro Leu Lys	Ser Phe Ala Val Pro	Ala Ile Pro
1355	1360	1365
Pro Pro Gly Pro Pro Thr Tyr	Asp Pro Ala Leu Pro	Ser Thr Pro
1370	1375	1380
Leu Leu Ser Gln Gln Ala Leu	Asn His His Ile His	Ser Val Lys
1385	1390	1395
Thr Ala Ser Ile Gly Thr Leu	Gly Arg Ser Arg Pro	Pro Met Pro
1400	1405	1410
Val Val Val Pro Ser Ala Pro	Glu Val Gln Glu Thr	Thr Arg Met
1415	1420	1425
Leu Glu Asp Ser Glu Ser Ser	Tyr Glu Pro Asp Glu	Leu Thr Lys
1430	1435	1440
Glu Met Ala His Leu Glu Gly	Leu Met Lys Asp Leu	Asn Ala Ile

1445 1450 1455
 Thr Thr Ala
 1460

<210> 11
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nặng kháng thể được nhân hóa HA

<400> 11
 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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30
 Trp Met Asp Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Arg Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 12

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng kháng thể được nhân hóa HB

<400> 12

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

180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 13

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng kháng thể được nhân hóa HC

<400> 13

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Arg Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 14

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng kháng thể được nhân hóa HD

<400> 14

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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30
 Trp Met Asp Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Arg Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 15

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng kháng thể được nhân hóa HE

<400> 15

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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30
 Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Arg Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 16

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng kháng thể được nhân hóa HF

<400> 16

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

115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 17

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng kháng thể được nhân hóa HG

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30
 Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Arg Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 18

<211> 446

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng kháng thể được nhân hóa HH

<400> 18

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 Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30
 Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Arg Asp Gly Ala Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 19

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ kháng thể được nhân hóa KA

<400> 19

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His 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 Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Met Glu Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 20

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ kháng thể được nhân hóa KB

<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His 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 Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Met Glu Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 21

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ kháng thể được nhân hóa KC

<400> 21

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His 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 Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Met Glu Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 22

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ kháng thể được nhân hóa KD

<400> 22

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His 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 Phe Cys Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Met Glu Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 23

<211> 214

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ kháng thể được nhân hóa KE

<400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His 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 Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Met Glu Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 24
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Chuỗi nhẹ kháng thể được nhân hóa KF

<400> 24
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His 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 Phe Cys Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Met Glu Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 25
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ kháng thể được nhân hóa KG

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His 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 Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Met Glu Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 26

Glu Glu Val Val Asn Ala Val Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly
 1 5 10

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 27

Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr Asn Ala Glu
 1 5 10

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 28

Pro Thr Ala Pro Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr
 1 5 10

<210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 29

Lys Leu Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala
 1 5 10

<210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 30

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

<210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 31

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
 1 5

<210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 32

Gln Gln Leu Asn Thr Leu Pro
1 5

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 33

Asp Ala Trp Met Asp
1 5

<210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 34

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 35

Arg Asp Gly Ala Tyr
1 5

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 36

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 37

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 38

Ser Gln Ser Thr His Val Pro
 1 5

<210> 39
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 39

Thr Ser Tyr Tyr Trp Asn
 1 5

<210> 40
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà

<400> 40

Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15

<210> 41
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng kháng thể được nhân hóa

<400> 41

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

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ kháng thể được nhân hóa

<400> 42

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

<210> 43

<211> 348

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Gen mã hóa chuỗi nặng kháng thể được nhân hóa

<400> 43

```

gaagtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcagatc cctgagactg    60
tctgtaccg cctccggctt cacctctcc gacgcctgga tggattgggt gcgacaggct    120
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccgag atccggtcca aggccaacaa ccacgccacc    180
tactacgccg agtctgtgaa gggccgggtc accatctccc gggacgactc caagtccatc    240
gtgtacctgc agatgaactc cctgcggacc gaggacaccg ccctgtacta ctgcaccaga    300
agggacggcg cctactgggg caagggcacc acagtgcagc tgcctcc    348

```

<210> 44

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Gen mã hóa chuỗi nhẹ kháng thể được nhân hóa

<400> 44

```

gacatccaga tgaccagtc cccctctcc gtgtctgctt ccgtggcgga cagagtgacc    60
atcacctgtc gggcctccca ggacatctcc tctacctga actggtatca gcagaagccc    120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac acctcccggc tgcactccgg cgtgccctct    180
agattttccg gctctggctc cggcacccgac ttacctga ccatctccag cctgcagccc    240
gaggacttcg cctctactt ctgtcagcag ctgaacaccc tgcctggac ctttggcgga    300
ggcaccaagg tggaaatgga a    321

```

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> PLP139-151

<400> 45

```

His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe
1         5         10

```

<210> 46

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn đệm

<400> 46

```

Ser Gly Ser Gly
1

```