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

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

(11) **1-0033446**

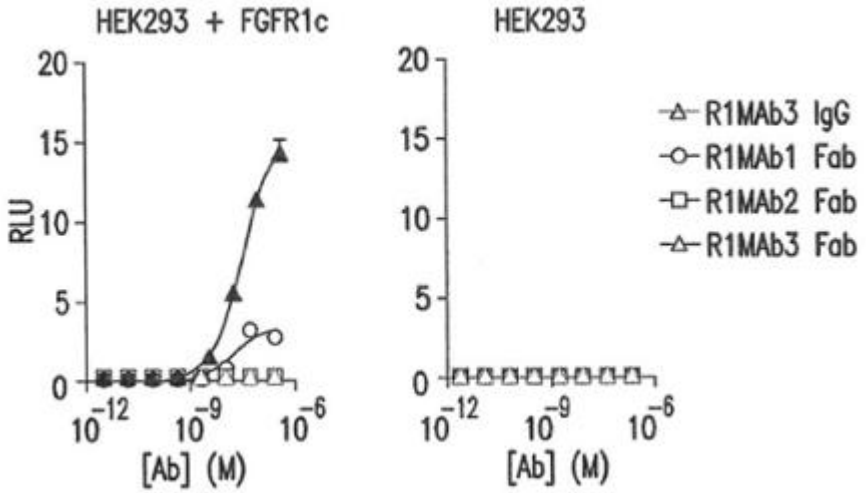
(51)[7] **A61K 39/395**; C07K 16/46; C07K 16/28; C07K 14/71; C07K 16/18

(13) **B**

(21) 1-2016-01837 (22) 23/12/2014
(86) PCT/US2014/072245 23/12/2014 (87) WO 2015/100366 02/07/2015
(30) 61/920,396 23/12/2013 US; 62/081,435 18/11/2014 US
(45) 26/09/2022 414 (43) 25/11/2016 344A
(73) Genentech, Inc. (US)
1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, United States of America
(72) CHEN, Yongmei (US); ERNST, James (US); KIM, Hok Seon (US); SONODA, Junichiro (US); SPIESS, Christoph (DE); STAWICKI, Scott (US); WU, Yan (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP PHÂN LẬP ĐƯỢC LIÊN KẾT VỚI BETA-KLOTHO (KLB) VÀ THỤ THỂ YẾU TỐ TĂNG TRƯỞNG NGUYÊN BÀO SỢI 1C (FGFR1C), VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề xuất kháng thể liên kết KLB và FGFR1, và kháng thể đặc hiệu kép liên kết KLB và FGFR1. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể đặc hiệu kép liên kết với epitop có trên FGFR1 và liên kết với epitop có trên KLB, mà có thể được sử dụng để điều trị các rối loạn chuyển hóa.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết với beta-Klotho (KLB), thụ thể yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 1 (Fibroblast Growth Factor Receptor - FGFR1), hoặc cả hai, và phương pháp sử dụng kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 21 (Fibroblast Growth Factor - FGF21) và chất đồng đẳng gần nhất của nó FGF19 là các thành viên của siêu họ FGF. Quá trình truyền tín hiệu FGF21 cần các dạng đồng chức năng của thụ thể FGF (FGF-receptor - FGFR) và đồng thụ thể liên kết màng Klotho-beta (KLB) (Ogawa et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(18): 7432-37 (2007); US2010/0184665). FGF19 cũng được chỉ ra là truyền tín hiệu qua các dạng đồng chức năng FGFR tạo phức với KLB (Wu et al. *J. Biol. Chem.* 282(40): 29069-29072 (2007)). Trong số 7 dạng đồng chức năng chính của FGFR được mã hóa ở loài động vật có vú (1b, 2b, 3b, 1c, 2c, 3c, và 4), chỉ có ba dạng đồng chức năng, FGFR1c, 2c và 3c, có thể truyền tín hiệu bằng cả FGF19 và FGF21 khi liên kết với đồng thụ thể KLB, được biểu hiện chủ yếu trong gan, mô mỡ, và tụy (Goetz and Mohammadi, *Nature reviews. Molecular Cell Biology* 14, 166-180 (2013)). Trong các thụ thể này, FGFR1c có vẻ đóng vai trò chính trong việc điều chỉnh tác dụng chuyển hóa của FGF21. Không bị ràng buộc bởi một lý thuyết cụ thể nào, FGF21 được tin là hoạt động thông qua việc kích thích quá trình đồng dime của các dạng đồng chức năng FGFR khi có mặt đồng thụ thể liên kết màng KLB. Không giống với phối tử FGF khác, FGF21 có ái lực rất thấp với FGFR đơn lẻ bất kỳ. Tuy nhiên, thông qua việc liên kết với ái lực cao với KLB thông qua vùng đuôi ở đầu tận cùng C giúp cho FGF21 được kết hợp vào phức hệ FGFR/KLB, cho phép FGF21 tương tác với các FGFR dù chỉ với ái lực liên kết FGFR thấp.

FGF21 được xác định là tác nhân protein cải biến bệnh tiềm năng để làm thoái lui béo phì và bệnh đái tháo đường loại 2 trên các mô hình bệnh động vật (Kharitonenkov et al. *J. Clin. Invest.* 115(6): 1627-35 (2005)). FGF21 tái tổ hợp đã được chỉ ra là có tác dụng làm giảm lipit gan, tăng tính nhạy insulin, và làm cho mức kiểm soát đường huyết

ở chuột thiếu tín hiệu leptin (ob/ob hoặc db/db) hoặc chuột được cho ăn khẩu phần có hàm lượng chất béo cao (high-fat diet - HFD) trở về trạng thái bình thường. Tác dụng làm giảm glucoza trong máu và tác dụng cải thiện các yếu tố nguy cơ dẫn tới tim mạch khác nhau cũng đã quan sát thấy ở khỉ redut béo phì và đái tháo đường được điều trị hằng ngày bằng FGF21 tái tổ hợp. Cả FGF21 và FGF19 đều được chỉ ra là có tác dụng hoạt hóa chức năng sinh nhiệt của các mô mỡ dương tính với protein không ghép đôi 1 (uncoupling protein 1 - UCP1) (các mô mỡ màu nâu và màu be; BAT) ở loài động vật gặm nhấm bị bệnh béo phì (Fu et al., *Endocrinology* 145, 2594-2603 (2004); Coskun et al., *Endocrinology* 149, 6018-6027 (2008); Fisher et al., *Genes & Development* 26, 271-281 (2012)).

Mặc dù ứng dụng trong lâm sàng của chất tương tự FGF19 hoặc FGF21 tái tổ hợp hiện nay đang được thử nghiệm để điều trị bệnh chuyển hóa, nhưng việc phát triển chúng để can thiệp việc trị liệu tới nay vẫn là một thách thức. Ví dụ, thời gian bán hủy trong huyết thanh của FGF21, ~2 giờ ở động vật linh trưởng không phải người, thời gian này quá ngắn đối với ứng dụng trong lâm sàng thực hành và lượng protein FGF21 còn lại trong vòng tuần hoàn có thể bị mất hoạt tính nhanh khi phân cắt phân giải protein. Nhiều nỗ lực đã được thực hiện để cải thiện đặc điểm nêu trên qua kỹ thuật protein, nhưng các cải biến này có thể tăng tính sinh miễn dịch và tác dụng bất lợi cụ thể khác liên quan đến việc cảm biến. Một điểm quan trọng khác cần lưu ý là khả năng tạo ra tác dụng bất lợi trong thời gian dài khi điều trị lâu dài bằng FGF21. Ví dụ, đã có báo cáo cho thấy FGF21 gây cảm ứng kháng hocmon sinh trưởng do gan thông qua việc cảm ứng đối với SOCS2, một chất ức chế quá trình truyền tín hiệu thụ thể hocmon sinh trưởng (Inagaki et al., *Cell Metab.* 8: 77-83 (2008)). Ở người, việc kháng hoặc thiếu hụt hocmon sinh trưởng thường đi kèm với khối lượng xương thấp ở trẻ em và người trưởng thành và sự biểu hiện mức gen chuyển FGF21 hoặc khi điều trị ở chuột bằng FGF21 tái tổ hợp hai tuần dẫn đến sụt giảm nghiêm trọng về tỷ trọng chất khoáng trong xương. Cho tới nay vẫn chưa chứng minh được rằng các tác dụng bất lợi của FGF21 đến xương có thể không liên quan đến các tác dụng chuyển hóa có lợi. Ngoài ra, sự sản xuất quá mức chuyển gen của FGF19 có thể dẫn đến việc tạo caxinom tế bào gan thông qua việc hoạt hóa thụ thể FGF (FGF Receptor - FGFR) 4 (Fu et al., *Endocrinology* 145, 2594-2603 (2004); Tomlinson et al., *Endocrinology* 143, 1741-1747 (2002); French et al., *PLoS One* 7, e36713 (2012)).

Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp (Abs) có thể tác động như liệu pháp điều trị mạnh do chúng có thể có tính chọn lọc đích đối với profin dược động học tuyệt vời, và các đặc điểm khác quan trọng đối với một dược chất (Chan and Carter, *Nature reviews. Immunology* 10, 301-316 (2010)). Ví dụ, chất đối kháng kháng thể đặc hiệu cho FGFR1c đã được thông cáo là làm giảm cân nặng ở chuột và khỉ (WO2005/037235) và việc hoạt hóa có chọn lọc thông qua kháng thể chủ vận của FGFR1c là đủ để khởi động lại tính nhạy insulin bằng FGF21 ở chuột đái tháo đường (WO2012/158704; Wu et al. *Science Translational Med.* 3(113): 1-10 (2011)). Kháng thể liên kết với phức hệ KLB/FGFR1c đã được đề xuất là chất hoạt hóa/tác nhân trị liệu (US 7,537,903; WO2011/071783; WO2012/158704). Hai phương pháp thay thế đã được nghiên cứu để hoạt hóa có chọn lọc phức hệ FGFR1c/KLB, như kháng thể kháng KLB ái lực cao tên là mimAb1 (Foltz et al. *Sci. Transl. Med.* 4: 162ra153 (2012)) và polypeptit Avimer C3201 kháng FGFR1/KLB đặc hiệu kép liên kết với albumin huyết thanh ở người (human serum albumin - HSA) (US 8,372,952).

Dựa trên vai trò quan trọng của FGF19 và FGF21 đối với sự chuyển hóa glucoza, trong lĩnh vực kỹ thuật này vẫn còn nhu cầu phát triển phân tử trị liệu và phương pháp điều biến hoạt tính qua trung gian FGF19 hoặc FGF21.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể liên kết với KLB, kháng thể liên kết với FGFR1, và kháng thể đặc hiệu kép liên kết với cả KLB và FGFR1, và phương pháp sử dụng chúng. Sáng chế dựa trên, một phần, phát hiện kháng thể đặc hiệu kép liên kết với cả KLB và FGFR1, mà hoạt hóa có chọn lọc phức hệ thụ thể FGFR1c/KLB và cảm ứng các thay đổi chuyển hóa có lợi hy vọng từ hoạt tính giống FGF21, bao gồm sự giảm cân và cải tiến trong sự chuyển hóa glucoza và chất béo, không có tác động đáng kể lên gan và không có tổn thất về khối lượng xương.

Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể đặc hiệu kép. Ví dụ, và không giới hạn, kháng thể phân lập được theo sáng chế có thể liên kết với cả beta-Klotho (KLB) và Thụ thể yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1 - FGFR1), trong đó kháng thể liên kết với miền đầu tận cùng C của KLB. Ví dụ và không giới hạn, kháng thể phân lập được theo sáng chế liên kết với cả KLB và FGFR1c. Theo một số phương án, kháng thể gắn kết với mảnh KLB bao gồm trình tự axit amin

SSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITAS (SEQ ID NO: 142). Theo một số phương án, kháng thể liên kết với epitop trong mảnh FGFR1 bao gồm trình tự axit amin KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 143) hoặc FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 144).

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế hoạt hóa phức hệ KLB/FGFR1c. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế làm giảm mức glucoza trong máu *in vivo*. Theo một số phương án, kháng thể không tác động đáng kể tỷ trọng xương. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế không có tác động đáng kể lên gan. Theo một số phương án, kháng thể cảm ứng sự phosphoryl hóa ERK và MEK trong gan ở mức thấp hơn đáng kể FGF21 cảm ứng. Theo một số phương án, kháng thể liên kết với KLB có K_d nằm trong khoảng từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với protein FGFR1 có K_d nằm trong khoảng từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể gắn kết với FGFR1c có K_d nằm trong khoảng từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M. Theo một số phương án, kháng thể liên kết với KLB có K_d <10 nM và với FGFR1c có K_d >300 nM. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 có thể chứa nhánh kháng FGFR1 có K_d nằm trong khoảng 10 nM đến khoảng 10 μM.

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế liên kết với epitop có trên KLB. Ví dụ, và không giới hạn, sáng chế đề xuất kháng thể kháng KLB liên kết cùng epitop như kháng thể được thể hiện trong các Fig. 3A và B. Theo một số phương án, kháng thể kháng KLB theo sáng chế liên kết cùng epitop như kháng thể 12A11 hoặc 8C5. Theo một số phương án, kháng thể kháng KLB liên kết với epitop trong miền đầu tận cùng C của KLB. Theo một số phương án, kháng thể kháng KLB gắn kết với mảnh KLB chứa trình tự axit amin SSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITAS (SEQ ID NO: 142).

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 theo sáng chế chứa kháng thể thứ nhất, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ, mà vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm axit amin có trình tự giống ít nhất 95% với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 128, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa axit amin có trình tự giống ít nhất 95% với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 130. Theo một số phương án, kháng thể thứ hai, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, chứa vùng biến đổi của

chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ, mà vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa axit amin có trình tự giống ít nhất 95% với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 132, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa axit amin có trình tự giống ít nhất 95% với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 134.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 theo sáng chế chứa kháng thể thứ nhất, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, chứa vùng chuỗi nặng và vùng chuỗi nhẹ, mà vùng chuỗi nặng chứa axit amin có trình tự giống ít nhất 95% với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 129, và vùng chuỗi nhẹ chứa axit amin có trình tự giống ít nhất 95% với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 131. Theo một số phương án, kháng thể thứ hai, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, chứa vùng chuỗi nặng và vùng chuỗi nhẹ, mà vùng chuỗi nặng chứa axit amin có trình tự giống ít nhất 95% với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 133, và vùng chuỗi nhẹ chứa axit amin có trình tự giống ít nhất 95% với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 135.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể kháng KLB bao gồm: (a) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1-15, (b) HVR-L3 chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 79-93, và (c) HVR-H2 chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 16-31.

Theo một số phương án, kháng thể kháng KLB chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1-15, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 16-31, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 32-47.

Theo một số phương án, kháng thể kháng KLB còn chứa (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 48-62, (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 63-78, và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 79-93.

Theo một số phương án, kháng thể kháng KLB chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 12, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28, (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 44, (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 59, (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 75, và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 90.

Theo một số phương án, kháng thể kháng KLB chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31, (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 47, (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 62, (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 78, và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 93.

Theo một số phương án, kháng thể kháng KLB chứa (a) vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 128 và (b) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 130. Theo một số phương án, kháng thể chứa (a) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 129 và (b) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 131.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng KLB chứa (a) vùng biến đổi của chuỗi nặng có ít nhất 95% trình tự giống với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 128; (b) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có ít nhất 95% trình tự giống với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 130; và (c) vùng biến đổi của chuỗi nặng như ở (a) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ như ở (b).

Sáng chế còn đề xuất kháng thể liên kết với FGFR1, *ví dụ*, FGFR1c. Ví dụ, và không giới hạn, kháng thể theo sáng chế chứa miền khác nhau liên kết với FGFR1. Theo một số phương án, kháng thể gắn kết với mảnh FGFR1 gồm trình tự axit amin KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 143) hoặc FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 144). Theo một số phương án, kháng thể chứa (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 136, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 137, (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 138, (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 139, (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 140, và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 141. Theo một số phương án, kháng thể chứa (a) vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 132 và (b) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 134. Theo một số phương án, kháng thể chứa (a) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 133 và (b) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 135. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế gắn kết với mảnh FGFR1c chứa trình tự axit amin KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 143) hoặc FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 144).

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể đơn dòng. Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể ở người, được làm giống như của người, hoặc khảm. Theo một số phương án, kháng thể đã làm giảm chức năng chất tác động.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất axit nucleic phân lập được mã hóa kháng thể theo sáng chế. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic theo sáng chế. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ theo sáng chế sao cho kháng thể được tạo ra. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm việc thu hồi kháng thể từ tế bào chủ.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế và chất mang dược dụng. Theo một số phương án, dược phẩm chứa tác nhân trị liệu bổ sung.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể theo sáng chế dùng làm thuốc. Theo một số phương án, kháng thể được dùng trong việc điều trị các rối loạn chuyển hóa, *ví dụ*, buồng trứng đa nang (polycystic ovary syndrome - PCOS), hội chứng chuyển hóa (metabolic syndrome - MetS), béo phì, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (non-alcoholic steatohepatitis - NASH), bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (non-alcoholic fatty liver disease - NAFLD), máu nhiễm mỡ, chứng tăng huyết áp, bệnh đái tháo đường loại 2, bệnh đái tháo đường không phải loại 2, bệnh đái tháo đường loại 1, bệnh đái tháo đường tự miễn tiềm ẩn (latent autoimmune diabetes - LAD), và bệnh đái tháo đường phát thời kỳ trưởng thành ở thanh niên (maturity onset diabetes of the young - MODY). Theo một số phương án, kháng thể được dùng trong điều trị bệnh đái tháo đường loại 2. Theo một số phương án, kháng thể được dùng trong điều trị béo phì. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể được dùng trong điều trị hội chứng Bardet-Biedl, hội chứng Prader-Willi, hội chứng Alstrom, hội chứng Cohen, bệnh loạn dưỡng di truyền Albright (giả nhược tuyến cận giáp), hội chứng Carpenter, hội chứng MOMO, hội chứng Rubinstein-Taybi, hội chứng nhiễm sắc thể X dễ tổn thương và hội chứng Börjeson-Forssman-Lehman. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể để hoạt hóa phức hệ thụ thể KLB/FGFR1, *ví dụ*, phức hệ thụ thể KLB/FGFR1c.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng kháng thể, được bộc lộ trong bản mô tả này, trong việc sản xuất thuốc để điều trị các rối loạn chuyển hóa, *ví dụ*, buồng trứng đa nang (polycystic ovary syndrome - PCOS), hội chứng chuyển hóa (metabolic

syndrome - MetS), béo phì, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (non-alcoholic steatohepatitis - NASH), bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (non-alcoholic fatty liver disease - NAFLD), máu nhiễm mỡ, chứng tăng huyết áp, bệnh đái tháo đường loại 2, bệnh đái tháo đường không phải loại 2, bệnh đái tháo đường loại 1, bệnh đái tháo đường tự miễn tiềm ẩn (latent autoimmune diabetes - LAD), và bệnh đái tháo đường phát thời kỳ trưởng thành ở thanh niên (maturity onset diabetes of the young - MODY), và các bệnh lão hóa và liên quan như bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson và ALS. Theo một số phương án, rối loạn chuyển hóa là bệnh đái tháo đường loại 2. Theo một số phương án, rối loạn chuyển hóa là béo phì. Theo một số phương án, sản xuất thuốc để hoạt hóa phức hệ thụ thể KLB/FGFR1c.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cá nhân có bệnh được chọn từ nhóm gồm buồng trứng đa nang (polycystic ovary syndrome - PCOS), hội chứng chuyển hóa (metabolic syndrome - MetS), béo phì, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (non-alcoholic steatohepatitis - NASH), bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (non-alcoholic fatty liver disease - NAFLD), máu nhiễm mỡ, chứng tăng huyết áp, bệnh đái tháo đường loại 2, bệnh đái tháo đường không phải loại 2, bệnh đái tháo đường loại 1, bệnh đái tháo đường tự miễn tiềm ẩn (latent autoimmune diabetes - LAD), và bệnh đái tháo đường phát thời kỳ trưởng thành ở thanh niên (maturity onset diabetes of the young - MODY), và các bệnh lão hóa và liên quan như bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson và ALS, phương pháp bao gồm việc cho cá thể dùng lượng hiệu quả một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế. Theo một số phương án, bệnh là bệnh đái tháo đường, *ví dụ*, bệnh đái tháo đường loại 2. Theo một số phương án, bệnh là béo phì. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cá thể có bệnh và/hoặc rối loạn được chọn từ nhóm gồm hội chứng Bardet-Biedl, hội chứng Prader-Willi, hội chứng Alstrom, hội chứng Cohen, bệnh loạn dưỡng di truyền Albright (giả nhược tuyến cận giáp), hội chứng Carpenter, hội chứng MOMO, hội chứng Rubinstein-Taybi, hội chứng nhiễm sắc thể X dễ tổn thương và hội chứng Börjeson-Forssman-Lehman. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm việc cho cá thể dùng tác nhân trị liệu bổ sung. Theo một số phương án, phương pháp sử dụng một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế không tác động chức năng gan ở cá thể. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp kích thích giảm cân bao gồm cho cá thể dùng lượng hiệu quả một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp hoạt hóa phức hệ thụ thể KLB-FGFR1c ở cá thể bao gồm việc cho cá thể dùng lượng hiệu quả kháng thể theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A thể hiện hoạt tính chủ vận kháng thể kháng FGFR1 và các mảnh kháng thể.

Fig.1B thể hiện kết quả thực nghiệm cạnh tranh liên kết sử dụng kháng thể kháng FGFR1.

Fig.1C thể hiện lượng dư axit amin trong FGFR1 quan trọng để liên kết bằng kháng thể kháng FGFR1 của đối tượng theo sáng chế. Fig.1C bộc lộ SEQ ID NO: 159, 159, 143 và 144, tương ứng, theo thứ tự xuất hiện.

Fig.1D thể hiện kết quả của sự phát sinh đột biến ở điểm chuyên biệt để xác định lượng dư axit amin quan trọng để liên kết bằng kháng thể kháng FGFR1 của đối tượng theo sáng chế.

Fig.1E thể hiện kết quả của sự phát sinh đột biến ở điểm chuyên biệt để xác định lượng dư axit amin quan trọng để liên kết bằng kháng thể kháng FGFR1 của đối tượng theo sáng chế.

Fig.1F thể hiện lượng dư quan trọng để liên kết trên mẫu khoảng nạp FGFR1.

Fig.2A thể hiện ái lực của hai kháng thể kháng FGFR1 cho FGFR1b và FGFR1c.

Fig.2B thể hiện liên kết kháng thể kháng FGFR1 với các FGFR khác nhau.

Fig.2C thể hiện kháng thể kháng FGFR1 hoạt động như chất chủ vận đặc hiệu cho FGFR1 trong GAL-ELK1 (yếu tố phiên mã giống ETS 1) dựa trên thử nghiệm luxiferaza ở tế bào L6.

Fig.2D thể hiện rằng kháng thể kháng FGFR1 hoạt động như chất chủ vận đặc hiệu cho FGFR1 trong GAL-ELK1 dựa trên thử nghiệm luxiferaza ở tế bào HEK293.

Fig.2E thể hiện rằng kháng thể kháng FGFR1 đã chuẩn hóa mức glucoza trong máu khi tiêm vào chuột ob/ob đái tháo đường.

Fig.3A thể hiện các trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ cho 17 kháng thể kháng KLB. Các trình tự CDR L1 là, theo thứ tự, SEQ ID NO: 48-62; các trình tự CDR L2 là,

theo thứ tự, SEQ ID NO: 63-78; và các trình tự CDH L3 là, theo thứ tự, SEQ ID NO: 79-93. Trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ là, theo thứ tự, SEQ ID NO: 111-127.

Fig.3B thể hiện các trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng cho 17 kháng thể kháng KLB. Các trình tự CDR H1 cho kháng thể là, theo thứ tự (11F1-8C5), SEQ ID NO: 1-15; các trình tự CDR H2 là, theo thứ tự, SEQ ID NO: 16-31; các trình tự CDR H3 là, theo thứ tự, SEQ ID NO: 32-47. Các trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng cho kháng thể là, theo thứ tự, SEQ ID NO: 94-110.

Fig.4 thể hiện thay đổi trung bình được quan sát trong biểu đồ FACS ở mức đo 0,8 μg/ml liên kết của các kháng thể kháng KLB khác nhau với 293 tế bào biểu hiện hKLB.

Fig.5 thể hiện liên kết tương đối kháng thể kháng KLB khác nhau với protein hKLB-ECD-HIS.

Fig.6A là biểu đồ biểu thị kháng thể của đối tượng theo sáng chế và mẫu để tạo thành phức hệ Ab đặc hiệu kép KLB/FGFR1c cho tín hiệu kích hoạt.

Fig.6B thể hiện mẫu để tạo thành phức hệ FGFR1c-KLB-FGF21 cho tín hiệu kích hoạt.

Fig.6C thể hiện thử nghiệm luxiferaza GAL-ELK1 về hoạt tính FGF21 và kháng thể đặc hiệu kép (BsAb) 17 sử dụng tế bào HEK293 thiếu FGFR1. Tế bào được gây nhiễm để biểu hiện các thụ thể chỉ thị.

Fig.6D thể hiện phân tích thẩm tách Western của tế bào tạo mỡ chính ở người được xử lý bằng protein chỉ thị (FGF21 (100 nM) hoặc IgG (33 nM)) trong 1 giờ. Mẫu được nhân đôi với mỗi điều trị.

Fig.7A thể hiện cảm ứng bằng kháng thể đặc hiệu kép khác nhau với các nhánh kháng FGFR1 và kháng KLB trong thử nghiệm luxiferaza dựa trên GAL-ELK1. Lưu ý rằng Abs đặc hiệu kép với nhánh R1MAb1 đã bộc lộ hoạt tính độc lập KLB đáng kể, có thể điều này là do hoạt tính chủ vận của R1MAb1 Fab. Không có hoạt tính như thế được quan sát với Abs đặc hiệu kép có nhánh R1MAb2 hoặc R1MAb3.

Fig.7B thể hiện rằng cảm ứng tín hiệu bằng các kháng thể đặc hiệu kép khác nhau với các nhánh kháng FGFR1 và kháng KLB phụ thuộc vào cả FGFR1c và KLB.

Fig.7C thể hiện kháng thể đặc hiệu kép với các nhánh kháng FGFR1 và kháng KLB cảm ứng hoạt tính luxiferaza theo cách phụ thuộc vào liều ở tế bào biểu hiện hFGFR1c và hKLB tái tổ hợp, mà không ở tế bào không có biểu hiện KLB.

Fig.8A là sơ đồ biểu thị ba thể biến dị kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1c. Xanh da trời: người, và đỏ: chuột. Vị trí gần đúng của chuỗi oligosacarit ở N297 trong (1) được chỉ thị bằng ^. Các phiên bản ít tác động ((2) và (3)) thiếu chuỗi oligosacarit do đột biến N297G. Dấu sao ở (2) chỉ thị vị trí gần đúng của đột biến D265A. Hướng của chỗ phình to với lỗ cũng được thể hiện. (1) biểu thị BsAb10; (2) biểu thị BsAb20; và (3) biểu thị BsAb17.

Fig.8B thể hiện thử nghiệm MSD pERK trong tế bào tạo mỡ chính ở người được xử lý bằng BsAb10 và dẫn xuất của nó, IgG hoặc FGF21 đối chứng trong 10 phút. Số liệu biểu thị có nghĩa là ± SEM (N=3). bFKB1 (1) biểu thị BsAb10; bFKB1 (2) biểu thị BsAb20; và bFKB1 (3) biểu thị BsAb17.

Fig.9A thể hiện thử nghiệm luxiferaza GAL-ELK1 trong tế bào nguyên bào cơ L6 ở chuột ratus. Tế bào được đồng chuyển nhiễm với vectơ biểu hiện cho các thụ thể chỉ thị. Tế bào chuyển nhiễm được ủ bằng các nồng độ khác nhau của BsAb10 hoặc đối chứng dương, FGF21, FGF19 hoặc R1MAb1, trong 6 giờ trước khi thử nghiệm luxiferaza.

Fig.9B thể hiện các thử nghiệm luxiferaza GAL-ELK1 tương tự như được thể hiện trên Fig.9A. Tế bào chuyển nhiễm L6 được xử lý bằng hỗn hợp của FGF21 và BsAb17 như chỉ thị. N=4.

Fig.9C thể hiện các thử nghiệm luxiferaza GAL-ELK1 tương tự như được thể hiện trên Fig.9A. Tế bào chuyển nhiễm L6 được xử lý bằng hỗn hợp của FGF21 và BsAb17 như chỉ thị. N=4.

Fig.9D thể hiện liên kết kháng thể kháng FGFR1 và kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1, BsAB9 và BsAb10, với tế bào biểu hiện KLB, FGFR1c hoặc cả hai.

Fig.10A thể hiện liên kết kháng thể đặc hiệu kép với các nhánh kháng FGFR1 và kháng KLB và kháng thể kháng FGFR1 với tế bào biểu hiện FGFR1c, KLB hoặc cả hai.

Fig.10B thể hiện K_d của BsAb10 cho liên kết với tế bào HEK293 biểu hiện hỗn hợp khác nhau của KLB/FGFR1 của người và chuột.

Fig.11 thể hiện phân tích liên kết của BsAb10 hoặc phức hệ BsAb10/KLB tạo sẵn ở 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM với protein dung hợp FGFR1-ECD-Fc được cố định trên con chip. Để tạo ra phức hệ BsAb10/KLB tạo sẵn, BsAb10 và protein KLB-ECD tái tổ hợp được ủ trước với tỷ lệ 1:1. Lưu ý tỷ lệ phân rã chậm với phức hệ BsAb10/KLB hơn với dùng để chỉ BsAb10, mà dùng để chỉ khi FGFR1c, không phải FGFR1b, được bắt lên con chip, biểu thị sự tạo thành phức hệ bậc ba.

Fig.12A là sơ đồ biểu thị thiết kế thực nghiệm TR-FRET.

Fig.12B thể hiện cường độ TR-FRET trên tế bào COS7 biểu hiện protein FGFR1c đã đánh dấu SNAP được đánh dấu có hoặc không có KLB không được đánh dấu ở 15 phút sau khi bổ sung phối tử chỉ thị. BsAb17, FGF21, FGF1 và FGF2 được sử dụng ở 67 nM, 50 nM, 62,5 nM, 12 nM, tương ứng. Số liệu biểu thị cường độ FRET ở 665 nm chia bởi lượng phát xạ dono ở 620 nm (tỷ lệ FRET), và nghĩa là ± SEM của ba thực nghiệm độc lập (N=3). $p<0,05$ (*), $<0,01$ (**), $<0,0001$ (***) với đối chứng PBS.

Fig.13A thể hiện kết quả của thực nghiệm để xác định phần nào của KLB quan trọng để liên kết bằng hai kháng thể kháng KLB. Sơ đồ biểu thị cấu trúc protein KLB được thể hiện ở phía trên. Mỗi thanh biểu thị cấu trúc KLB ở người, KLA ở người, KLB ở thỏ, KLB ở chuột ratus, KLB ở chuột, hoặc khảm như màu được mã hóa. Ở bên phải, liên kết của KLBmAb1 và KLBmAb2 đối chứng dựa trên FACS với tế bào HEK293 tạm thời biểu hiện mỗi cấu trúc được thể hiện. Lưu ý rằng KLBmAb1 không liên kết với KLB ở thỏ, mà thay thế mảnh axit amin 34 (axit amin 805-838) với trình tự ở người tương ứng trao liên kết.

Fig.13B thể hiện trình tự axit amin của mảnh vị trí 857-890 của protein KLB ở người với trình tự tín hiệu (tương ứng với trình tự axit amin ở các vị trí 805-838 của protein KLB không chứa trình tự tín hiệu) và các trình tự tương ứng ở các loài chỉ thị khác nhau. Fig.13B bộc lộ SEQ ID NO: 160-164, tương ứng, theo thứ tự xuất hiện.

Fig.14A thể hiện liên kết của FGF21 và FGF19 với phức hệ BsAb10/KLB bằng SPR. BsAb10 được bắt lên con chip, và protein KLB-ECD và protein FGF (ở 0,2, 0,8, hoặc 2 μM) được tiêm tuần tự.

Fig.14B thể hiện kết quả của thử nghiệm luxiferaza GAL-ELK1 trong tế bào nguyên bào cơ ở chuột ratus L6. Tế bào được đồng chuyển nhiễm với vectơ biểu hiện cho cả FGFR4 và KLB. Tế bào chuyển nhiễm được ủ với nồng độ protein chỉ thị khác nhau trong 6 giờ trước khi thử nghiệm luxiferaza.

Fig.14C thể hiện phương pháp thẩm tách Western được thực hiện để giám sát sự phosphoryl hóa ERK trong tế bào ung thư gan H4IIE. Lưu ý rằng BsAb17 đã không phong bế khả năng FGF19 hoạt hóa phức hệ FGFR4/KLB (Fig.14B), hoặc cảm ứng sự phosphoryl hóa ERK trong tế bào ung thư gan H4IIE (Fig.14C).

Fig.15A thể hiện mức glucoza trong máu (ngày 7), % thay đổi thể trọng (ngày 7) và nạp thực phẩm hằng ngày (ngày 0-3) của chuột C57BL/6 không béo và db/db (n=7) sau một liều tiêm trong màng bụng (i.p.) BsAb17 hoặc IgG đối chứng ở 3 mg/kg (tinh giản) hoặc 5 mg/kg (db/db).

Fig.15B thể hiện thể trọng và mức glucoza trong máu của chuột béo phì do khẩu phần ăn (Diet Induced Obesity - DIO), được tiêm i.p. IgG (BsAb20) chỉ thị ở 3 mg/kg vào ngày 0 và 6 (mũi tên). N=9.

Fig.15C thể hiện kết quả của thử nghiệm dung nạp glucoza với cùng chuột và kháng thể được sử dụng trong 15B vào ngày 14.

Fig.15D thể hiện lượng triglyxerit do gan, và gen đánh dấu huyết thanh ở động vật được thể hiện trong 15B-C vào ngày 17.

Fig.15E thể hiện sự sử dụng glucoza toàn bộ cơ thể, được đo trong nghiệm pháp kìm giữ đẳng đường huyết cường insulin với chuột DIO 5 ngày sau một liều tiêm i.p. IgG (BsAb17) chỉ thị ở 10 mg/kg (N=12). Trục ngang biểu thị mức insulin huyết thanh. Mũi tên chỉ thị hướng các thay đổi từ đáy đến trạng thái đã kích thích insulin. $p<0,05$ (*), $<0,005$ (**), $<0,0001$ (***) với đối chứng.

Fig.15F thể hiện sự sản xuất glucoza nội sinh, được đo trong nghiệm pháp kìm giữ đẳng đường huyết cường insulin với chuột DIO 5 ngày sau một liều tiêm i.p. IgG (BsAb17) chỉ thị ở 10 mg/kg (N=12). Trục ngang biểu thị mức insulin huyết thanh. Mũi tên chỉ thị hướng các thay đổi từ đáy đến trạng thái đã kích thích insulin. $p<0,05$ (*), $<0,005$ (**), $<0,0001$ (***) với đối chứng.

Fig.15G thể hiện sự hấp thụ glucoza ở mô đã kích thích insulin, được đo trong nghiệm pháp kìm giữ đẳng đường huyết cường insulin với chuột DIO 5 ngày sau một liều tiêm i.p. IgG (BsAb17) chỉ thị ở 10 mg/kg (N=12). p<0,05 (*), <0,005 (**), <0,0001 (***) với đối chứng.

Fig.16A thể hiện trình tự axit amin đầu tận cùng N của protein KLB ở chuột (SEQ ID NO: 165), và trình tự axit amin tương ứng được mã hóa bằng alen *Klb* trong chuột KO (SEQ ID NO: 166) được thể hiện. Đột biến nhầm nghĩa trong gen *Klb* dẫn đến khung đọc sau axit amin thứ hai trong alen KO, như được thể hiện bằng chữ đỏ.

Fig.16B thể hiện biểu hiện protein KLB trong mô mỡ trắng mào tinh hoàn ở chuột kiểu dại (+/+) và đẩy ra *KLB* (-/-).

Fig.16C thể hiện rằng KLB quan trọng cho BsAb20 tác động sự chuyển hóa glucoza. Thử nghiệm dung nạp glucoza (glucose tolerance test - GTT) ở chuột DIO nhận bốn liều tiêm hàng tuần BsAb20 hoặc IgG đối chứng ở 3 mpk. GTT được dẫn truyền vào ngày 23, ba ngày sau liều tiêm cuối. Chuột được trên HFD trong 20 tuần trước khi GTT. *p<0,05.

Fig.16D thể hiện tham số huyết thanh ở chuột DIO vào ngày 7 sau khi tiêm i.p. kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 hoặc R1MAb1 ở 50 mg/kg hoặc vật truyền. N=6.

Fig.17 thể hiện lượng FGF23 và phosphorơ vô cơ trong huyết thanh của chuột DIO vào ngày 7 sau khi tiêm i.p. BsAb17 ở 50 mg/kg. N=6. ***p<0,0005.

Fig.18A thể hiện lượng dịch chuyển glucoza trong máu ở động mạch trong thực nghiệm kẹp. Chuột DIO nhận BsAb17 hoặc IgG đối chứng ở 10 mg/kg vào 5 ngày trước thực nghiệm kẹp.

Fig.18B thể hiện thể trọng vào ngày thực nghiệm kẹp.

Fig.18C thể hiện tỷ lệ dịch truyền glucoza trong thực nghiệm kẹp. p<0,05 (*), <0,001 (**) với đối chứng.

Fig.19A thể hiện tiêu hao năng lượng (energy expenditure - EE) (trái) và hệ số hô hấp (respiratory quotient - RQ) (phải) của chuột DIO nhận một liều tiêm i.p. 10 mg/kg IgG trong thời gian chỉ thị ở 21-22°C. N=7.

Fig.19B thể hiện EE (trên) và RQ (dưới) của chuột không béo đã nhận một liều tiêm i.p. 10 mg/kg IgG ở thời gian chỉ thị. Chuột được duy trì ở 21-22°C, sau đó nhiệt độ chuồng được xê dịch đến tính trung hòa nhiệt (29-30°C) vào 6 ngày sau khi tiêm IgG. N=6~7.

Fig.19C thể hiện hấp thụ fludeoxyglucoza (FDG) trong mô ở chuột DIO ở 40 giờ sau một liều tiêm i.p. IgG chỉ thị ở 10 mg/kg. N=8. Chuột được để nhịn đói qua đêm trước khi hấp thụ FDG được đo.

Fig.19D thể hiện phân tích thẩm tách Western ingWAT thu hoạch vào ngày 7 sau một liều tiêm i.p. (BsAb17 hoặc IgG đối chứng ở 10 mg/kg) và cấy sau phẫu thuật bơm thẩm thấu (CL316.243 (0,75 nmol/giờ) hoặc vật truyền).

Fig.19E thể hiện biểu hiện của Ucp1 mRNA trong tế bào tạo mỡ dưới da chính ở người được xử lý bằng protein chỉ thị ở 30 nM trong 48 giờ. N=3.

Fig.19F thể hiện nhiệt độ cơ thể của chuột DIO nhận được 10 mg/kg BsAb17 hoặc IgG đối chứng. N=7~8.

Fig.19G thể hiện profin biểu hiện gen trong iBAT của chuột DIO nhận được một 10 mg/kg IgG và FGF21 b.i.d. ở 2 mg/kg/day hoặc PBS đối chứng trong 5 ngày. Tất cả các gen mà khác đáng kể giữa BsAb17 và đối chứng, hoặc giữa FGF21 và đối chứng được liệt kê.

Fig.19H thể hiện EE (trái) và RQ (phải) của chuột không béo mà nhận một liều tiêm i.p. kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 hoặc IgG đối chứng ở 10 mg/kg và cấy sau phẫu thuật bơm thẩm thấu (CL-316.243 ở 0,5 nmol/giờ hoặc vật truyền) vào ngày 0. Trị số trung bình trong thời gian 24 giờ chỉ thị được thể hiện.

Fig.20A thể hiện lượng VO_2 (trên), VCO_2 (giữa) và số lượng hoạt tính tổng của chuột DIO được mô tả trên Fig.19A. Trị số VO_2 và VCO_2 được chuẩn hóa bằng trị số thể trọng được đo ở các lần đã chỉ thị bằng #. Chuột DIO nhận được 10 mg/kg BsAb17 hoặc IgG đối chứng.

Fig.20B thể hiện lượng VO_2 (trên), VCO_2 (giữa) và số lượng hoạt tính tổng của chuột DIO được mô tả trên Fig.19B. Trị số VO_2 và VCO_2 được chuẩn hóa bằng trị số thể trọng được đo ở các lần đã chỉ thị by #. Chuột DIO nhận được 10 mg/kg BsAb17 hoặc IgG đối chứng.

Fig.21A thể hiện trị số EE trung bình trong nhiệt lượng gián tiếp. Độ lớn trung bình tăng được thể hiện trong sơ đồ. DIO 21°C: Trị số trung bình của EE trong D3-D6 sau khi tiêm IgG ở thực nghiệm được thể hiện trên Fig.19A. Không béo 21°C: Trị số trung bình của EE trong D3-D6 sau khi tiêm IgG ở thực nghiệm được thể hiện trên Fig.19B. Không béo sau khi chuyển đến 30°C: Trị số trung bình của EE trong D6-D9 sau khi tiêm IgG (*tức là*, 3 ngày sau khi chuyển nhiệt độ) ở thực nghiệm được thể hiện trên Fig.19B. DIO 30°C: Trị số trung bình của EE trong D3-D6 sau khi tiêm IgG ở chuột DIO đã quen khí hậu ở tính trung hòa nhiệt.

Fig.21B thể hiện các thay đổi trong EE ở chuột DIO ở tính trung hòa nhiệt. Chuột DIO được quen khí hậu với tính trung hòa nhiệt trong 2 tuần trước khi tiêm một liều i.p. (mũi tên) BsAb17 hoặc IgG đối chứng ở 10 mg/kg. N=3~4.

Fig.21C thể hiện EE và RQ trung bình trong chuột DIO ở nhiệt độ phòng thí nghiệm (21°C) trong D3-5 sau khi cấy sau phẫu thuật của bơm thẩm thấu và tiêm thuốc. Ở D0, chuột được tiêm i.p. BsAb17 hoặc IgG đối chứng ở 10 mg/kg. Nhóm FGF21 cũng nhận được tiêm i.p. 2 mg/kg FGF21 nhanh một liều ở D0. Mỗi con chuột cũng được cấy dưới da bơm thẩm thấu để ngâm chiết FGF21 ở 60 μg/ngày hoặc đối chứng PBS ở D0. N=8~9. ** p<0,005.

Fig.22 mô tả số liệu được thể hiện trên Fig.19F được vẽ sơ đồ lại để thể hiện sự chênh lệch được làm phù hợp về nhiệt độ cơ thể trong quá trình nghiên cứu giữa chuột DIO nhận được 10 mg/kg BsAb17 hoặc IgG đối chứng. Dòng màu đen là chênh lệch ước tính và các dòng màu xanh da trời là khoảng tin cậy 95% theo từng điểm của chênh lệch. IgG được cho dùng ở ngày 13 (mũi tên). N=7~8.

Fig.23 thể hiện sự phosphoryl hóa ERK và MEK cảm ứng BsAb20 và FGF21 đến phạm vi tương tự trong chất béo ở mào tinh hoàn, chất béo ở bẹn, và chất béo màu nâu ở gian vai, và tụy. Các mô được thu hoạch vào 1 giờ (mô mỡ màu trắng ở gan, tụy và mào tinh hoàn (eWAT)) hoặc 2 giờ (iBAT hoặc ingWAT) sau khi tiêm i.p. của chuột C57BL/6 không béo ở 10 mg/kg (BsAb20) hoặc 1 mg/kg (FGF21). Tổng ERK và MEK dùng làm đối chứng nạp.

Fig.24A thể hiện thay đổi thể trọng và mức adiponectin HMW huyết thanh ở chuột DIO (N=6) nhận được một i.p. BsAb17 với liều chỉ thị (mg/kg).

Fig.24B thể hiện thay đổi thể trọng và mức adiponectin HMW huyết thanh ở khỉ cynomolgus (N=3) nhận một liều tiêm i.v. BsAb17 với liều chỉ thị (mg/kg).

Fig.24C thể hiện EE của chuột DIO (trái: wt và phải: KO adipoq) nhận được một liều tiêm i.p. IgG (BsAb17) chỉ thị ở 10 mg/kg (mũi tên). N=5~6.

Fig.24D thể hiện các tham số chuyển hóa khác nhau ở chuột DIO wt (+/+) và KO adipoq (-/-), mà nhận được một liều tiêm i.p. IgG (BsAb17) chỉ thị ở 10 mg/kg. N=6. AUC: Khu vực trong biểu đồ ở GTT hoặc ITT (T=0~2 giờ). p<0,1 (#), <0,05 (*), <0,005 (**) với đối chứng.

Fig.25 thể hiện ARN tổng được chuẩn bị từ chuột đã mô tả trên Fig.19G bằng cách sử dụng qPCR.

Fig.26 thể hiện mức phosphoryl hóa ERK bằng BsAb17 trong các mô chuột. Các mô này được thu hoạch vào 1 giờ sau khi tiêm i.p. chuột không béo C57BL/6 ở 10 mg/kg BsAb17 hoặc IgG đối chứng, và chịu hóa mô miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu với ERK được phospho hóa. Hình ảnh đại diện từ 2 động vật được thể hiện cho mỗi nhóm. (1) Tụy, (2) khu vực não vòng chứa nhân trên chéo (mũi tên), (3) khu vực não vòng chứa vùng nhận cảm hóa học (tập hợp có dạng hình tam giác của tế bào được nhuộm) và đường tâm (mũi tên), và (4) khu vực não vòng chứa gò giữa (mũi tên). Lưu ý rằng tín hiệu cảm ứng BsAb17 rõ ràng trong tế bào tuyến nang tụy, nhưng không trong bất kỳ khu vực não đã kiểm tra.

Fig.27 thể hiện sự chuẩn hóa quá trình phát triển tế bào gan cảm ứng HFD bằng BsAb20. Sự hợp nhất BrdU do gan ở chuột DIO được xử lý bằng BsAb20 (1 hoặc 3 mg/kg/tuần) hoặc IgG đối chứng (3 mg/kg/tuần) trong 8 tuần hoặc chuột không béo đối chứng C57BL/6. * p<0,05 với chuột DIO được xử lý IgG (N=5~8).

Fig.28A là sơ đồ biểu thị thực nghiệm được thể hiện trên Fig.28B. Chuột DIO nhận được BsAb20 (1 hoặc 3 mg/kg/tuần) hoặc IgG đối chứng (1 mg/kg/tuần) trong 6 tuần như chỉ thị. Chuột không béo đối chứng C57BL/6 đã không nhận điều trị.

Fig.28B thể hiện kiểu hình xương sau khi điều trị BsAb20. Xương đùi và xương chày bị cắt ra và chịu phân tích μCT. (N=7~8). Lưu ý rằng không có ảnh hưởng tiêu cực được quan sát trong các tham số xương khác nhau ở sợi xương và xương vỏ não với ngoại lệ có thể của độ dày xương vỏ não, mà đã thể hiện xu hướng giảm dần với điều trị

3 mg/kg/tuần BsAb20 mặc dù ý nghĩa thống kê không đạt được. Vì sự giảm trong độ dày xương vỏ não không có tác dụng với tỷ trọng sợi xương ở chuột hạn chế calo đã được báo cáo (11), tác dụng đã quan sát có thể liên quan đến tổn thất khối lượng. p<0,001 (***), <0,01 (**),<0,05 (*),<0,1 (#), <0,2 ($) với chuột DIO được xử lý bằng IgG đối chứng. N=7~8.

Fig.29 thể hiện mức corticosteron ở chuột sau khi điều trị BsAb17. Mức corticosteron huyết thanh được đo ở thời gian Zeitgeber (Zeitgeber time - ZT)=3 sau phương pháp chết nhân đạo bằng thủ thuật cắt đầu. Chuột không béo đối chứng (control - CTRL) không được điều trị. Lipopolysaccarit (Lipopolysaccharide - LPS) được tiêm i.p. vào chuột không béo ở 1 mg/kg vào 3 giờ trước phương pháp chết nhân đạo (ZT=0) làm đối chứng dương (12). IgG được tiêm i.p. vào chuột DIO ở 5 hoặc 25 mg/kg vào 5 ngày trước phương pháp chết nhân đạo như chỉ thị. Phân tích thống kê chỉ thị được dẫn truyền không có nhóm LPS. N=12.

Fig.30 thể hiện liên kết của các kháng thể đặc hiệu kép khác nhau với các nhánh kháng FGFR1 và kháng KLB với tế bào biểu hiện FGFR1c hoặc FGFR1c và KLB.

Fig.31 thể hiện liên kết của dẫn xuất YW182.5 và YW182.5 với protein FGFR1 bằng ELISA.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để làm rõ và không giới hạn bản mô tả chi tiết sáng chế được chia thành các phần nhỏ sau:

I. Định nghĩa;

II. Kháng thể;

III. Phương pháp sử dụng;

IV. Dược phẩm; và

V. Vật phẩm.

I. Định nghĩa

"Trình tự ở người nhận" cho mục đích trong bản mô tả này là trình tự chứa trình tự axit amin của trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (light chain variable domain - VL) hoặc trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng (heavy chain variable domain - VH) được

dẫn xuất từ trình tự globulin miễn dịch ở người hoặc trình tự liên ứng ở người, như được định nghĩa bên dưới. Trình tự ở người nhận "được dẫn xuất từ" trình tự globulin miễn dịch ở người hoặc trình tự liên ứng ở người có thể chứa trình tự axit amin giống của nó, hoặc nó có thể chứa các thay đổi trình tự axit amin. Theo một số phương án, lượng các thay đổi axit amin là 10 hoặc ít hơn, 9 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 7 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 5 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, 3 hoặc ít hơn, hoặc 2 hoặc ít hơn. Theo một số phương án, trình tự ở người nhận VL giống trong trình tự với trình tự trình tự globulin miễn dịch ở người VL hoặc trình tự trình tự liên ứng ở người.

"Ái lực" dùng để chỉ độ mạnh củtổng tương tác hóa học giữa một vị trí liên kết của phân tử (*ví dụ*, kháng thể) và đối tác liên kết của nó (*ví dụ*, kháng nguyên). Trừ khi được chỉ thị khác, như đã sử dụng trong bản mô tả này, "ái lực liên kết" dùng để chỉ ái lực liên kết thuần mà tương ứng với tương tác 1:1 giữa các thành phần của cặp liên kết (*ví dụ*, kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của phân tử X cho đối tác Y của nó có thể thường được biểu diễn bằng hằng số phân rã (K_d). Ái lực có thể được đo bằng phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực, bao gồm các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Phương án làm ví dụ và minh họa cụ thể cho việc đo ái lực liên kết được mô tả sau đây.

Kháng thể "đã hoàn thiện ái lực" dùng để chỉ kháng thể có một hoặc nhiều thay đổi trong một hoặc nhiều vùng biến thể cao (hypervariable regions - HVRs), so với kháng thể gốc mà không chiếm hữu thay đổi này, thay đổi này thu được từ việc cải tiến về ái lực kháng thể cho kháng nguyên.

"Klotho-beta," "KLB" và "beta-Klotho," như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ beta-Klotho tự nhiên bất kỳ từ nguồn có xương sống bất kỳ, bao gồm động vật có vú như bộ linh trưởng (*ví dụ*, người) và động vật gặm nhấm (*ví dụ*, chuột và chuột ratus), trừ khi có chỉ thị khác. Thuật ngữ bao gồm "có chiều dài đầy đủ," KLB chưa gia công cũng như dạng KLB bất kỳ mà thu được từ quy trình ở tế bào. Thuật ngữ cũng bao gồm thể biến dị tự nhiên của KLB, *ví dụ*, thể biến dị nối hoặc thể biến dị alen. Ví dụ không giới hạn về trình tự axit amin KLB ở người đích là kháng thể theo sáng chế, loại trừ trình tự tín hiệu, như sau:

FSGDGRAIWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSW
KKDGKGPSIWDHFIHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSALDFIGVSFYQFSISW

PRLFPDGIVTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVTLYHWDLPLALQEKYGG
WKNDTIIDIFNDYATYCFQMFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGYGTGMHAPGE
KGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRSE
NTMDIFKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFSVLPIFSEAEKHEM
RGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREALNWIKLEYNNPRILIAE
NGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDEIRVFGYTAWSLLDGFEW
QDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENGFSLKESTPDVQGQFP
CDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRPA
QCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLPTGNLSAVNRQALRYYRC
VVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLGLPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGLC
FQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDRQ
FRPSQRGAVSLSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTGD
YPAAMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMHE
QLAGSRYDSDRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYI
TASGIDDQALEDDRLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEEKSK
PRFGFFTSDFKAKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQK
KPLIFLGCCFFSTLVLLLSIAIFQRQKRRKFWKAKNLQHIPLKKGKRVVS (SEQ ID NO: 145).

Theo một số phương án, protein KLB có thể chứa trình tự tín hiệu đầu tận cùng N có trình tự axit amin
MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAVTG (SEQ ID NO: 157).

Thuật ngữ "miền đầu tận cùng C của KLB" dùng để chỉ miền giống glycosidas đầu tận carboxy của KLB. Ví dụ, miền đầu tận cùng C của protein KLB làm ví dụ được thể hiện trong SEQ ID NO: 145 chứa trình tự axit amin sau:
FPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVWNATGNRLLHRVEGVRLKTRP
AQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLPTGNLSAVNRQALRYYR
CVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLGLPEPLLHADGWLNPSTAEAFQAYAGL
CFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLLVAHALAWRLYDR
QFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFEIAWFAEPLFKTG
DYPAAMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVMH
EQLAGSRYDSDRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIY

ITASGIDDQALEDDRLRKYYLGKYLQEVLKAYLIDKVRIKGYYAFKLAEEKSK PRFGFFTSDFKAKSSIQFYNKVISSRGFPFENSSSR (SEQ ID NO: 155).

Thuật ngữ "kháng thể kháng KLB" và "kháng thể liên kết với KLB" dùng để chỉ kháng thể có khả năng liên kết KLB với ái lực thích hợp sao cho kháng thể hữu ích làm tác nhân chẩn đoán và/hoặc trị liệu trong việc tạo đích KLB. Theo một phương án, phạm vi liên kết kháng thể kháng KLB với protein không phải KLB, không liên quan nhỏ hơn khoảng 10% liên kết kháng thể với KLB như được đo, *ví dụ*, bằng phương pháp miễn dịch dùng đánh dấu phóng xạ (radioimmunoassay - RIA). Theo một số phương án, kháng thể liên kết với KLB có hằng số phân rã (K_d) là ≤ 1μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0,1 nM, ≤ 0,01 nM, hoặc ≤ 0,001 nM (*ví dụ*, 10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, *ví dụ*, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, *ví dụ*, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M). Theo một số phương án, kháng thể kháng KLB liên kết với epitop của KLB được giữ gìn giữa KLB từ các loài khác nhau. Theo một số phương án, kháng thể kháng KLB liên kết với epitop trên KLB trong phần đầu tận C của protein.

Thuật ngữ "Thụ thể yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 1" hoặc "FGFR1," như được sử dụng trong bản mô tả này, chỉ FGFR1 tự nhiên bất kỳ từ nguồn có xương sống bất kỳ, bao gồm động vật có vú như bộ linh trưởng (*ví dụ*, người) và động vật gặm nhấm (*ví dụ*, chuột và chuột ratus), trừ khi có chỉ thị khác. Thuật ngữ bao gồm FGFR1 chưa gia công "có chiều dài đầy đủ," cũng như dạng bất kỳ của FGFR1 thu được từ quy trình trong tế bào. Thuật ngữ cũng bao gồm thể biến dị tự nhiên của FGFR1, *ví dụ*, thể biến dị nối hoặc thể biến dị alen, bao gồm FGFR1c. Ví dụ không giới hạn của axit amin FGFR1c ở người được thể hiện bên dưới:

MWSWKCLLFWAVLVTATLCTARPSPTLPEQAQPWGAPVEVESFLVHP GDLLQLRCRLRDDVQSINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGLY ACVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSSEDDDDDDDSSSEEKETDNTKPNPVAPY WTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGY KVRYATWSIIMDSVVPSDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVVERSPHRPILQA GLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIGPDNLPYVQILK TAGVNTTDKEMEVLHLRNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLSHHSAWLTVLEALEE RPAVMTSPLYLEIIIYCTGAFLISCMVGSVIVYKMKSGTKKSDFHSQMAVHKL AKSIPLRRQVTVSADSSASMNSGVLLVRPSRLSSSGTPMLAGVSEYELPEDPR WELPRDRLVLGKPLGEGCFGQVVLAEAIGLDKDKPNRVTKVAVKMLKSDAT

EKDLSDLISEMEMMKMIGKHKNIINLLGACTQDGPLYVIVEYASKGNLREYLQ ARRPPGLEYCYNPSHNPEEQLSSKDLVSCAYQVARGMEYLASKKCIHRDLAA RNVLVTEDNVMKIADFGLARDIHHIDYYKKTTNGRLPVKWMAPEALFDRIYT HQSDVWSFGVLLWEIFTLGGSPYPGVPVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNELY MMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDLDRIVALTSNQEYLDLSMPLDQYSPSFPD TRSSTCSSGEDSVFSHEPLPEEPCLPRHPAQLANGG LKRR (SEQ ID NO: 146).

Thuật ngữ "kháng thể kháng FGFR1c" dùng để chỉ kháng thể có khả năng liên kết FGFR1c với ái lực thích hợp sao cho kháng thể hữu ích làm tác nhân chẩn đoán và/hoặc trị liệu trong việc tạo đích FGFR1c. Theo một phương án, phạm vi liên kết kháng thể kháng FGFR1c với protein không phải FGFR1c, không liên quan nhỏ hơn khoảng 10% liên kết kháng thể với FGFR1c như được đo, *ví dụ*, bằng phương pháp miễn dịch dùng đánh dấu phóng xạ (radioimmunoassay - RIA). Theo một số phương án, kháng thể gắn kết với FGFR1c có hằng số phân rã (K_d) là $\leq$ 1 M, $\leq$ 100 mM, $\leq$ 10 mM, $\leq$ 1 mM, $\leq$ 100 μM, $\leq$ 10 μM, $\leq$ 1μM, $\leq$ 100 nM, $\leq$ 10 nM, $\leq$ 1 nM, $\leq$ 0,1 nM, $\leq$ 0,01 nM, hoặc $\leq$ 0,001 nM. Theo một số phương án, K_d kháng thể gắn kết với FGFR1c, được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể là 10^{-3} M hoặc nhỏ hơn, hoặc 10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, *ví dụ*, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, *ví dụ*, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M. Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR1c liên kết với epitop của FGFR1c được giữ gìn giữa FGFR1c từ các loài khác nhau.

Thuật ngữ "kháng thể" trong bản mô tả này được sử dụng với nghĩa rộng nhất và bao gồm các cấu trúc kháng thể khác nhau, bao gồm nhưng không giới hạn kháng thể đơn dòng, kháng thể đa clon, kháng thể đa đặc hiệu (*ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép), và các mảnh kháng thể miễn là chúng có hoạt tính liên kết kháng nguyên mong muốn.

"Mảnh kháng thể" dùng để chỉ phân tử khác với kháng thể trơ chứa phần kháng thể trơ mà liên kết kháng nguyên với kháng thể trơ liên kết. Ví dụ của các mảnh kháng thể bao gồm nhưng không giới hạn bởi Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; kháng thể thể đôi; kháng thể tuyến tính; phân tử kháng thể đơn chuỗi (*ví dụ*, scFv); và kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ các mảnh kháng thể.

"Kháng thể cạnh tranh liên kết" với kháng thể tham khảo dùng để chỉ kháng thể phong bế liên kết kháng thể tham khảo với kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh gần 50% hoặc hơn, và ngược lại, kháng thể tham khảo phong bế liên kết kháng thể

với kháng nguyên của nó trong thử nghiệm cạnh tranh gần 50% hoặc hơn. Thử nghiệm cạnh tranh làm ví dụ được mô tả trong "Antibodies," Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY).

Thuật ngữ kháng thể "khảm" dùng để chỉ kháng thể trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc nhẹ được dẫn xuất từ nguồn hoặc loài cụ thể, trong khi phần còn lại của chuỗi nặng và/hoặc nhẹ được dẫn xuất từ nguồn hoặc loài khác.

"Lớp" kháng thể dùng để chỉ loại miền hằng số hoặc vùng cố định được chiếm hữu bởi chuỗi nặng của nó. Có năm lớp kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một số trong chúng có thể còn được chia thành các lớp phụ (kiểu tương đương), *ví dụ*, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, và IgA_2. Miền hằng số chuỗi nặng tương ứng với các lớp khác nhau của globulin miễn dịch tên là α, δ, ε, γ, và μ, tương ứng.

Thuật ngữ "tác nhân độc tế bào" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ chất ức chế hoặc ngăn chức năng tế bào và/hoặc gây chết hoặc phá hủy tế bào. Các tác nhân độc tế bào bao gồm, nhưng không giới hạn bởi, đồng vị phóng xạ (*ví dụ*, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} và đồng vị phóng xạ của Lu); chất điều trị hóa học hoặc dược chất (*ví dụ*, metotrexat, adriamixin, alkaloit vinca (vincristin, vinblastin, etoposit), doxorubixin, melphalan, mitomyxin C, clorambuxil, daunorubixin hoặc tác nhân xen kẽ khác); chất ức chế sinh trưởng; enzym và các mảnh của chúng như enzym gây tan nhân; chất kháng sinh; các độc tố như các độc tố phân tử nhỏ hoặc các độc tố có hoạt tính enzym gốc vi khuẩn, nấm, cây hoặc động vật, bao gồm mảnh và/hoặc thể biến dị của chúng; và các tác nhân kháng khối u hoặc chống ung thư khác nhau được bộc lộ bên dưới.

"Chức năng tác động" dùng để chỉ hoạt tính sinh học đặc trưng vùng Fc kháng thể, mà biến đổi theo kiểu tương đương kháng thể. Ví dụ về chức năng tác động kháng thể bao gồm: liên kết C1q và gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity - CDC); liên kết thụ thể Fc; gây độc qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC); thực bào; sự điều chỉnh xuống của thụ thể bề mặt tế bào (*ví dụ*, thụ thể tế bào B); và kích hoạt tế bào B.

"Lượng hiệu quả" của tác nhân, *ví dụ*, dược phẩm, dùng để chỉ lượng hiệu quả, ở liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết, để thu được kết quả trị liệu hoặc phòng ngừa mong muốn. Ví dụ, và không giới hạn, "lượng hiệu quả" có thể dùng để chỉ lượng

kháng thể, được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể làm dịu, giảm đến tối thiểu và/hoặc ngăn ngừa các triệu chứng của bệnh và/hoặc rối loạn, kéo dài sống sót và/hoặc kéo dài thời gian cho đến khi tái phát bệnh và/hoặc rối loạn.

Thuật ngữ "vùng Fc" trong bản mô tả này được sử dụng để xác định vùng đầu tận C của chuỗi nặng globulin miễn dịch chứa ít nhất một phần của vùng cố định. Thuật ngữ bao gồm vùng Fc trình tự tự nhiên và vùng Fc biến thể. Theo một số phương án, vùng Fc chuỗi nặng IgG ở người kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, lysin đầu tận C (Lys447) của vùng Fc có thể hoặc không thể có. Trừ khi được nêu khác trong bản mô tả này, việc đánh số lượng dư axit amin trong vùng Fc hoặc vùng cố định theo hệ thống đánh số EU, cũng tên là chỉ số EU, như được mô tả trong Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Trình tự" hoặc "FR" dùng để chỉ lượng dư miền khác nhau khác với lượng dư vùng siêu biến (hypervariable region - HVR). FR của miền khác nhau thường gồm bốn miền FR: FR1, FR2, FR3, và FR4. Theo đó, các trình tự HVR và FR thường xuất hiện trong trình tự sau ở VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Thuật ngữ "kháng thể chiều dài đầy đủ," "kháng thể trơ," và "kháng thể tinh khiết" được sử dụng trong bản mô tả này có thể trao đổi qua lại để dùng để chỉ kháng thể có cấu trúc gần như tương tự với cấu trúc kháng thể tự nhiên hoặc có chuỗi nặng chứa vùng Fc như được định nghĩa trong bản mô tả này.

Các thuật ngữ "tế bào của vật chủ", "dòng tế bào của vật chủ", và "dịch nuôi cấy tế bào của vật chủ" được dùng thay thế nhau và liên quan đến các tế bào mà axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, bao gồm thế hệ con của các tế bào này. Các tế bào của vật chủ bao gồm "các thể biến nạp" và "các tế bào đã được biến nạp", mà bao gồm tế bào đã được biến nạp chính và thế hệ con thu được từ đó không liên quan đến số lần cấy chuyển. Thế hệ con có thể là không giống hệt tế bào mẹ về hàm lượng axit nucleic, mà có thể chứa đột biến. Thế hệ con đột biến mà có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc đã chọn được cho ở tế bào đã được biến nạp ban đầu đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

"Kháng thể của người" là kháng thể có trình tự axit amin mà tương ứng với trình tự của kháng thể được tạo ra bởi người hoặc tế bào của người hoặc thu được từ nguồn

không là người mà sử dụng kho các kháng thể của người hoặc trình tự ghi mã kháng thể khác của người. Định nghĩa này về kháng thể của người đặc biệt loại trừ kháng thể được làm giống như kháng thể của người chứa các gốc liên kết kháng nguyên không là của người.

"Trình tự liên ứng của người" là khung mà thể hiện các gốc axit amin thường gặp nhất khi chọn lọc trình tự khung VL hoặc VH của globulin miễn dịch của người. Nói chung, chọn lọc trình tự VL và trình tự VH của globulin miễn dịch của người là từphân nhóm bao gồm các trình tự của miền thay đổi. Nói chung, phân nhómtrình tự là phân nhómnhư trong tài liệu: Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. Theo một số phương án, đối vớiVL, phân nhóm này là phân nhóm kappa I như đã nêu trong tài liệu của Kabat nêu trên. Theo một số phương án, đối vớiVH, phân nhóm này là phân nhóm III như đã nêu trong tài liệu của Kabat nêu trên.

Thuật ngữ kháng thể "đã được làm giống như kháng thể của người" được dùng để chỉ kháng thể khảm chứa các gốc axit amin từ các HVR không là của người và các gốc axit amin từ các FR của người. Theo các phương án nhất định, kháng thể được làm giống như kháng thể của người sẽ chứa hầu như toàn bộ ít nhất một, và thường là hai, miền thay đổi, trong đó toàn bộ hoặc hầu như toàn bộ các HVR (ví dụ, CDR) tương ứng với miền của kháng thể không là của người, và toàn bộ hoặc hầu như các FR tương ứng với các FR của kháng thể của người. Kháng thể được làm giống như kháng thể của người tùy ý có thể bao gồm ít nhất một phần của vùng ổn định củakháng thể thu được từ kháng thể của người. Thuật ngữ kháng thể ở "dạng đã được làm giống như kháng thể của người", ví dụ, kháng thể không là của người, được dùng để chỉ kháng thể mà đã trải qua quá trình làm giống như kháng thể của người.

Thuật ngữ "vùng siêu thay đổi" hoặc "HVR" được dùng trong bản mô tả này để chỉ từng vùng của miền thay đổi của kháng thể mà là siêu biến về trình tự ("các vùng xác định tính bổ trợ" hoặc "CDRs") và/hoặc tạo vòng xác định về mặt cấu trúc ("vòng siêu biến") và/hoặc chứa lượng dư tiếp xúc kháng nguyên ("các tiếp điểm kháng nguyên"). Trừ khi quy định khác, lượng dư HVR và lượng dư khác ở các miền khác nhau (*ví dụ*, lượng dư FR) được đánh số trong bản mô tả này theo Kabat et al., *phía trên*. Nói chung, kháng thể chứa sáu HVR: ba trong VH (H1, H2, H3), và ba trong VL (L1, L2, L3). HVR làm ví dụ trong bản mô tả này bao gồm:

(a) vòng siêu biến ở lượng dư axit amin 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), và 96-101 (H3) (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) CDR ở lượng dư axit amin 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), và 95-102 (H3) (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) tiếp điểm kháng nguyên ở lượng dư axit amin 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), và 93-101 (H3) (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); và

(d) hỗn hợp của (a), (b), và/hoặc (c), bao gồm lượng dư axit amin HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3), và 94-102 (H3).

Theo một số phương án, lượng dư HVR chứa lượng được xác định trên Fig.3A hoặc Fig.3B hoặc ở nơi nào khác trong bản mô tả.

"Thể tiếp hợp miễn dịch" dùng để chỉ kháng thể đã được tiếp hợp với một hoặc nhiều phân tử khác loại, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tác nhân độc đối với tế bào.

"Cá thể" hoặc "đối tượng," như được sử dụng trao đổi qua lại trong bản mô tả này, là động vật có vú. Các động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, động vật đã được thuần hóa (ví dụ, bò cái, cừu, mèo, chó, và ngựa), các động vật linh trưởng (ví dụ, người và các động vật linh trưởng không phải là người như khỉ), thỏ, và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột và chuột ratus). Theo các phương án nhất định, cá thể hoặc đối tượng này là người.

Kháng thể "phân lập được" là kháng thể mà đã được tách ra khỏi thành phần của môi trường tự nhiên của nó. Theo một số phương án, kháng thể được tinh chế đến mứcđộ tinh khiết cao hơn 95% hoặc 99% như xác định được, ví dụ, theo phương pháp điện di (ví dụ, SDS-PAGE, kỹ thuật điện di được thực hiện cùng với việc duy trì građien độ pH giữa các điện cực (IEF), điện di mao quản) hoặc sắc ký (ví dụ, trao đổi ion hoặc sắc ký

lỏng cao áp pha đảo). Tổng quan về các phương pháp đánh giá độ tinh khiết của kháng thể, ví dụ, xem tài liệu: Flatman et al., *J. Chromatogr. B* 848:79-87(2007).

Thuật ngữ axit nucleic "phân lập được" được dùng để chỉ phân tử axit nucleic mà đã được tách ra khỏi thành phần của môi trường tự nhiên của nó. Axit nucleic đã được phân lập là phân tử axit nucleic chứa trong tế bào mà thông thường chứa phân tử axit nucleic, nhưng phân tử axit nucleic có mặt ngoài nhiễm sắc thể hoặc tại vị trí của nhiễm sắc thể màt là khác vị trí nhiễm sắc thể tự nhiên của nó.

Thuật ngữ "axit nucleic phân lập được ghi mã kháng thể" (bao gồm kể đến kháng thể đặc hiệu, *ví dụ*, kháng thể kháng KLB) được dùng để chỉ một hoặc nhiều phân tử axit nucleic ghi mã kháng thể chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (hoặc các đoạn của chúng), bao gồm (các) phân tử axit nucleic trong một vật truyền hoặc vật truyền riêng biệt, và (các) phân tử axit nucleic này có mặt ở một hoặc nhiều vị trí trong tế bào của vật chủ.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" được dùng trong bản mô tả này để chỉ kháng thể thu được từ quần thể bao gồm các kháng thể hầu như đồng nhất, tức là từng kháng thể chứa quần thể là giống hệt nhau và/hoặc liên kết với cùng một biểu vị, trừ các kháng thể biến dị có thể có, ví dụ, chứa các đột biến có trong tự nhiên hoặc sinh ra trong quá trình tạo ra chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến dị này thường có mặt với lượng ít. Trái với các chế phẩm kháng thể đa dòng mà thường chứa các kháng thể khác nhau hướng về các thể xác định (các biểu vị) khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng đều hướng về thể xác định duy nhất trên kháng nguyên. Do đó, tác nhân cải biến "đơn dòng" biểu thị tính chất của kháng thể thu được từ quần thể kháng thể hầu như đồng nhất, và không nên hiểu là cần tạo ra kháng thể theo phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng để được dùng theo sáng chế có thể được tạo ra theo nhiều kỹ thuật, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp dùng tế bào lai, phương pháp dùng ADN tái tổ hợp, phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn, và phương pháp sử dụng động vật chuyển gen chứa toàn bộ hoặc một phần locus của globulin miễn dịch của người, phương pháp này và phương pháp khác làm ví dụ để tạo ra các kháng thể đơn dòng được bộc lộ trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "kháng thể trần" được dùng để chỉ kháng thể mà không được tiếp hợp với gốc khác loại (ví dụ, gốc độc đối với tế bào) hoặc dấu đồng vị phóng xạ. Kháng thể trần có thể có mặt trong dược phẩm.

Thuật ngữ "kháng thể tự nhiên" được dùng để chỉ các phân tử globulin miễn dịch có trong tự nhiên với cấu trúc thay đổi. Ví dụ, các kháng thể IgG tự nhiên là các glycoprotein tetrame khác loại khoảng 150.000 dalton, cấu thành bởi hai chuỗi nhẹ giống hệt nhau và hai chuỗi nặng giống hệt nhau mà liên kết với nhau nhờ liên kết đisulfua. Từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, mỗi chuỗi nặng có vùng thay đổi (VH), còn được gọi miền nặng thay đổi hoặc miền thay đổi của chuỗi nặng, tiếp theo là ba miền ổn định (CH1, CH2, và CH3). Tương tự, từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, mỗi chuỗi nhẹ có vùng thay đổi (VL), còn được gọi miền nhẹ thay đổi hoặc miền thay đổi của chuỗi nhẹ, tiếp theo là miền nhẹ ổn định (CL). Chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được quy cho một trong hai loại, được gọi là kappa (κ) và lamda (λ), trên cơ sở trình tự axit amin của miền ổn định của nó.

Thuật ngữ "tờ in rời lồng vào bao gói," như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ hướng dẫn thường được đưa vào các gói thuốc thành phẩm bán trên thị trường, mà chứa thông tin về chỉ định, cách dùng, liều lượng, đường dùng, phép điều trị kết hợp, chống chỉ định và/hoặc cảnh báo liên quan đến việc sử dụng các thuốc thành phẩm này.

"Mức độ tương tự của trình tự axit amin tính theo phần trăm (%)"liên quan đến trình tự polypeptit quy chiếu được xác định là tỷ lệ phần trăm giữa số lượng gốc axit amin trong trình tự ứng viên mà là giống hệt với các gốc axit amin chứa trong trình tự polypeptit quy chiếu, sau khi duỗi thẳng các trình tự và đưa các khoảng cách, nếu cần, để đạt được mức độ tương tự về trình tự cao nhất tính theo phần trăm, và không xem xét đến thay thế bảo toàn bất kỳ là một phần của tính đồng nhất về trình tự. Việc duỗi thẳng nhằm các mục đích xác định phần trăm mức độ tương tự của trình tự axit amin có thể đạt được theo nhiều cách mà đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính có sẵn cho công chúng sử dụng như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các thông số thích hợp để so sánh trình tự, bao gồm thuật toán bất kỳ cần thiết để duỗi thẳng được tối đa trên toàn bộ chiều dài của các trình tự được so sánh. Tuy nhiên, nhằm các mục đích của sáng chế, trị số về mức độ tương tự của trình tự axit amin tính theo % được tạo ra bằng cách sử dụng phần mềm máy tính để so sánh trình tự ALIGN-2. Phần mềm máy tính ALIGN-2 để so sánh trình tự được tạo ra bởi Genentech, Inc., và mã nguồn đã được nộp cùng với tài liệu dùng cho

người sử dụng tại Cục Bản quyền Mỹ (U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559), khi nó được đăng ký theo Đăng ký Bản quyền Mỹ số TXU510087. Chương trình ALIGN-2 được Genentech, Inc., South San Francisco, California có bán trên thị trường, hoặc có thể được biên tập từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 cần được biên soạn để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, kể cả UNIX V4.0D kỹ thuật số. Tất cả các thông số so sánh trình tự được thiết lập theo chương trình ALIGN-2 và không thay đổi.

Trong các tình huống, khi ALIGN-2 được dùng để đánh giá trình tự axit amin, thì mức độ tương tự trình tự tính theo % giữa trình tự axit amin nhất định A so với, đối với, hoặc theo trình tự axit amin B nhất định (mà theo cách khác, có thể được gọi là trình tự của axit amin A nhất định có hoặc với mức độ giống hệt tương tự trình tự của axit amin tính theo % so với, đối với, hoặc theo trình tự axit amin B nhất định) được tính như sau:

100 lần phân đoạn X/Y

trong đó X là số lượng gốc axit amin được ghi điểm là khớp đồng nhất theo chương trình duỗi thẳng trình tự ALIGN-2 ở chỗ duỗi thẳng A và B theo chương trình đó, và trong đó Y là tổng số gốc axit amin ở B. Có thể thấy rằng khi chiều dài của trình tự axit amin A không bằng chiều dài của trình tự axit amin B,thì mức độ tương tự trình tự axit amin theo % giữa A so với B không bằng mức độ tương tự trình tự axit amin theo % giữa B so với A. Trừ khi có quy định khác,tất cả các trị số mức độ tương tự trình tự axit amin tính theo % được dùng trong bản mô tả này thu được như đã được bộc lộ trong mảnh nêu ngay trên bằng cách sử dụng chương trình phần mềm ALIGN-2.

Thuật ngữ "dược phẩm" được dùng để chỉ chế phẩm ở dạng cho phép hoạt tính sinh học của hoạt chất chứa trong đó là hữu hiệu, và không chứa các thành phần bổ sung mà là độc một cách không chấp nhận được đối với đối tượng dùng chế phẩm này.

Thuật ngữ "chất mang dược dụng" được dùng để chỉ thành phần trong dược phẩm, không là hoạt chất, mà là không độc đối với đối tượng. Chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch đệm, tá dược, chất làm ổn định, hoặc chất bảo quản.

Thuật ngữ "phép điều trị bệnh" (và các biến thể ngữ pháp của chúng như "điều trị bệnh" hoặc "việc điều trị bệnh") được dùng trong bản mô tả này để chỉ sự can thiệp về mặt lâm sàng với cố gắng làm thay đổi tiến trình tự nhiên của cá thể được điều trị, và

có thể được thực hiện để phòng bệnh hoặc trong tiến trình bệnh học lâm sàng. Các tác dụng mong muốn của việc điều trị bệnh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phòng ngừa sự xuất hiện hoặc tái phát của bệnh, làm thuyên giảm các triệu chứng, làm giảm bớt hậu quả trực tiếp hoặc gián tiếp về mặt bệnh lý của bệnh, phòng ngừa di căn, làm giảm tốc độ diễn tiến của bệnh, làm thuyên giảm hoặc làm dịu tình trạng bệnh lý, và làm dịu bớt hoặc cải thiện tiên lượng bệnh. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể được dùng để trì hoãn sự phát triển của bệnh hoặc để làm chậm tiến triển của bệnh.

Thuật ngữ "vùng thay đổi" hoặc "miền biến đổi" để chỉmiền của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể màliên quan đến sự liên kết của kháng thể với kháng nguyên. Các miền thay đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (lần lượt là VH và VL) kháng thể tự nhiên thường có cấu trúc tương tự, trong đó mỗi miền chứa bốn vùng khung bảo toàn (FR) và ba vùng siêu thay đổi (HVR). (ví dụ, xem tài liệu: Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007).) Một miền VH hoặc một miền VL có thể là đủ để mang lại tính đặc hiệu về mặt liên kết đối với kháng nguyên. Hơn thế nữa, các kháng thể mà liên kết kháng nguyên cụ thể có thể phân lập được bằng cách sử dụng miền VH hoặc miền VL từ kháng thể mà liên kết kháng nguyên để sàng lọc thư viện lần lượt bao gồmcác miền VL hoặc các miền VH bổ trợ. Ví dụ, xem tài liệu: Portolano et al., *J. Immunol.*150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

Thuật ngữ "vật truyền" được dùng trong bản mô tả này để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng nhân rộng axit nucleic khác mà nó liên kết vào. Thuật ngữ bao gồm vật truyền này như cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vật truyền đãđược đưa vào hệ gen của tế bào của vật chủ mà nó đã được đưa vào. Một số vật truyền nhất định có khả năng điều khiển sự biểu hiện của các axit nucleic mà liên kết vào một cách linh hoạt. Trong bản mô tả này, các vật truyền đó được gọi là "vật truyền biểu hiện."

II. Kháng thể

Theo một khía cạnh, sáng chế dựa trên, một phần, phát hiện kháng thể đặc hiệu kép gắn kết cả KLB và FGFR1c và hoạt hóa có chọn lọc phức hệ thụ thể FGFR1c/KLB và cảm ứng các thay đổi chuyển hóa có lợi hy vọng từ hoạt tính giống FGF21, bao gồm tổn thất khối lượng, và cải tiến về chuyển hóa glucoza và chất béo, không có tác động đáng kể trên gan và không có tổn thất về khối lượng xương.

Theo một số phương án, kháng thể liên kết với KLB được đề xuất. Sáng chế còn đề xuất kháng thể kháng FGFR1, *ví dụ*, kháng thể kháng FGFR1c. Sáng chế còn đề xuất kháng thể đặc hiệu kép gắn kết với cả KLB và FGFR1 (được nói đến trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1). Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/ kháng FGFR1 theo sáng chế liên kết với cả KLB và FGFR1c. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể không phong bế việc liên kết và/hoặc tương tác của phối tử FGF, *ví dụ*, FGF19 và FGF21, với phức hệ KLB/FGFR1c.

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế không có tác động đáng kể lên gan, *ví dụ*, chức năng gan. Không bị giới hạn bởi lý thuyết cụ thể, kháng thể theo sáng chế không dẫn đến sự kích hoạt phức hệ thụ thể FGFR1c/KLB trong gan. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế không điều biến hoạt tính của phức hệ thụ thể FGFR/KLB trong gan khi so với điều biến của phức hệ thụ thể FGFR/KLB trong gan bằng protein FGF21. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế không dẫn đến sự ức chế phức hệ FGFR4/KLB và/hoặc không dẫn đến độ cao của enzym gan như, nhưng không giới hạn, ALT, AST, ALP và GLDH. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế không có chức năng làm chất chủ vận của phức hệ FGFR2c/KLB và/hoặc phức hệ FGFR3c/KLB trong gan, mà có thể dẫn tới tín hiệu MAPK được hoạt hóa và/hoặc biểu hiện được biến đổi của Spry4 và Dusp6 trong gan. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế không dẫn đến sự kích hoạt tín hiệu MAPK trong gan khi so với sự kích hoạt tín hiệu MAPK bằng protein FGF21. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế không có chức năng làm chất chủ vận của phức hệ FGFR4/KLB trong gan.

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể được làm giống như của người. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế chứa trình tự ở người nhận, *ví dụ*, trình tự globulin miễn dịch ở người hoặc trình tự liên ứng ở người.

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể khảm, được làm giống như của người hoặc ở người. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể là mảnh kháng thể, *ví dụ*, mảnh Fv, Fab, Fab', scFv, kháng thể thể đôi, hoặc $F(ab')_2$. Theo một số phương án, kháng thể là kháng thể chiều dài đầy đủ, *ví dụ*, kháng thể IgG1 trơ, hoặc lớp kháng thể khác hoặc kiểu tương đương như được định nghĩa trong bản mô tả này. Theo một số phương án, kháng thể

theo sáng chế có thể kết hợp bất kỳ đặc tính, đơn hoặc kết hợp, như được mô tả trong các phần 1-7, chi tiết bên dưới.

Kháng thể theo sáng chế hữu dụng, *ví dụ*, cho chẩn đoán hoặc điều trị rối loạn chuyển hóa. Ví dụ không giới hạn về rối loạn chuyển hóa bao gồm buồng trứng đa nang (polycystic ovary syndrome - PCOS), hội chứng chuyển hóa (metabolic syndrome - MetS), béo phì, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (non-alcoholic steatohepatitis - NASH), bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (non-alcoholic fatty liver disease - NAFLD), máu nhiễm mỡ, chứng tăng huyết áp, bệnh đái tháo đường loại 2, bệnh đái tháo đường không phải loại 2, bệnh đái tháo đường loại 1, bệnh đái tháo đường tự miễn tiềm ẩn (latent autoimmune diabetes - LAD), bệnh đái tháo đường phát thời kỳ trưởng thành ở thanh niên (maturity onset diabetes of the young - MODY), và lão hóa và các bệnh liên quan như bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson và ALS.

A. Kháng thể kháng KLB làm ví dụ

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập được liên kết với protein KLB. Theo một số phương án, kháng thể kháng KLB theo sáng chế liên kết với miền đầu tận cùng C của KLB. Theo một số phương án, kháng thể kháng KLB theo sáng chế gắn kết với mảnh KLB chứa trình tự axit amin SSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITAS (SEQ ID NO: 142). Theo một số phương án, kháng thể liên kết với epitop giống như kháng thể kháng KLB, *ví dụ*, 8C5, được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, kháng thể kháng KLB theo sáng chế chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-15, *ví dụ*, 12 hoặc 15; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 16-31, *ví dụ*, 28 hoặc 31; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 32-47, *ví dụ*, 44 hoặc 47; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 48-62, *ví dụ*, 49 hoặc 62; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 63-78, *ví dụ*, 75 hoặc 78; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 79-93, *ví dụ*, 90 hoặc 93.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng KLB chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa SEQ ID NO: 12; (b)

HVR-H2 chứa SEQ ID NO: 28; (c) HVR-H3 chứa SEQ ID NO: 44; (d) HVR-L1 chứa SEQ ID NO: 49; (e) HVR-L2 chứa SEQ ID NO: 75; và (f) HVR-L3 chứa SEQ ID NO: 90. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng KLB chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa SEQ ID NO: 15; (b) HVR-H2 chứa SEQ ID No. 31; (c) HVR-H3 chứa SEQ ID NO: 47; (d) HVR-L1 chứa SEQ ID No. 62; (e) HVR-L2 chứa SEQ ID NO: 78; và (f) HVR-L3 chứa SEQ ID NO: 93.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể kháng KLB chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự giống với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 128. Theo một số phương án, trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất bao gồm thay thế (*ví dụ*, thay thế bảo toàn như được bộc lộ bên dưới), chèn, hoặc xóa tương đối với trình tự tham khảo, mà kháng thể kháng KLB chứa trình tự giữ lại khả năng gắn kết với KLB. Theo một số phương án, tổng 1 đến 10 axit amin đã được thế, được chèn và/hoặc được xóa trong SEQ ID NO: 128. Theo một số phương án, thay thế, chèn, hoặc xóa diễn ra trong các vùng bên ngoài HVR (*tức là*, trong FR). Theo cách khác hoặc bổ sung, kháng thể kháng KLB chứa trình tự VH trong SEQ ID NO: 128, bao gồm biến đổi hậu dịch của trình tự này như được bộc lộ bên dưới. Theo một số phương án, VH chứa một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 31, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 47.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng KLB, trong đó kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự giống với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 130. Theo một số phương án, trình tự VL có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất bao gồm thay thế (*ví dụ*, thay thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa tương đối với trình tự tham khảo, mà kháng thể kháng KLB chứa trình tự giữ lại khả năng gắn kết với KLB. Theo một số phương án, tổng 1 đến 10 axit amin đã được thế, được chèn và/hoặc được xóa trong SEQ ID NO: 130. Theo một số phương án, sự thay thế, chèn, hoặc xóa diễn ra trong các vùng bên ngoài HVR (*tức là*, trong FR). Theo cách khác hoặc bổ sung, kháng thể kháng KLB chứa trình tự VL trong SEQ ID NO: 130, bao gồm hậu dịch biến đổi của trình tự này. Theo một số phương án, VL chứa một,

hai hoặc ba HVR được chọn từ (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 62; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 78; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 93.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể kháng KLB, trong đó kháng thể chứa VH theo bất kỳ phương án được đề xuất ở trên, và VL theo bất kỳ phương án được đề xuất ở trên. Theo một số phương án, kháng thể chứa các trình tự VH và VL trong SEQ ID NO: 128 và SEQ ID NO: 130, tương ứng, bao gồm biến đổi hậu dịch các trình tự này.

Theo một số phương án, kháng thể kháng KLB gắn kết với mảnh KLB chứa trình tự axit amin SSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITAS (SEQ ID NO: 142).

B. Kháng thể kháng FGFR1 làm ví dụ

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể phân lập được liên kết với protein FGFR1. Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR1 theo sáng chế gắn kết với FGFR1c. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FGFR1 chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa SEQ ID NO: 136; (b) HVR-H2 chứa SEQ ID NO: 137; (c) HVR-H3 chứa SEQ ID NO: 138; (d) HVR-L1 chứa SEQ ID NO: 139; (e) HVR-L2 chứa SEQ ID NO: 140; và (f) HVR-L3 chứa SEQ ID NO: 141.

Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR1 theo sáng chế chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự giống với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 132. Theo một số phương án, trình tự VH có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất bao gồm thay thế (*ví dụ*, thay thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa tương đối với trình tự tham khảo, mà kháng thể kháng FGFR1 chứa trình tự giữ lại khả năng gắn kết với FGFR1. Theo một số phương án, tổng 1 đến 10 axit amin đã được thế, được chèn và/hoặc được xóa trong SEQ ID NO: 132. Theo một số phương án, thay thế, chèn, hoặc xóa diễn ra trong các vùng bên ngoài HVR (*tức là*, trong FR). Theo cách khác hoặc bổ sung, kháng thể kháng FGFR1 chứa trình tự VH trong SEQ ID NO: 132, bao gồm biến đổi hậu dịch của trình tự này. Theo một số phương án, VH chứa một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 136,

(b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 137, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 138.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể kháng FGFR1, trong đó kháng thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL) có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% trình tự giống với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 134. Theo một số phương án, trình tự VL có ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đồng nhất bao gồm thay thế (*ví dụ*, thay thế bảo toàn), chèn, hoặc xóa tương đối với tham khảo trình tự, mà kháng thể kháng FGFR1 chứa trình tự giữ lại khả năng gắn kết với FGFR1. Theo một số phương án, tổng 1 đến 10 axit amin đã được thế, được chèn và/hoặc được xóa trong SEQ ID NO: 134. Theo một số phương án, sự thay thế, chèn, hoặc xóa diễn ra trong các vùng bên ngoài HVR (*tức là*, trong FR). Theo cách khác hoặc bổ sung, kháng thể kháng FGFR1 chứa trình tự VL trong SEQ ID NO: 134, bao gồm biến đổi hậu dịch của trình tự này. Theo phương án cụ thể, VL chứa một, hai hoặc ba HVR được chọn từ (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 139; (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 140; và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 141.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng FGFR1 được đề xuất, trong đó kháng thể chứa VH theo bất kỳ phương án được đề xuất ở trên, và VL theo bất kỳ phương án được đề xuất ở trên. Theo một số phương án, kháng thể kháng FGFR1 chứa các trình tự VH và VL trong SEQ ID NO: 132 và SEQ ID NO: 134, tương ứng, bao gồm biến đổi hậu dịch của các trình tự này.

Theo một số phương án, kháng thể FGFR1 theo sáng chế gắn kết với mảnh FGFR1c chứa trình tự axit amin KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 143) hoặc FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 144).

C. Kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 làm ví dụ

Sáng chế còn đề xuất kháng thể đặc hiệu kép gắn kết với cả KLB và FGFR1 (*tức là*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1). Kháng thể đặc hiệu kép có hai tính đặc hiệu gắn kết khác nhau, *xem*, *ví dụ*, Patent Mỹ số 5.922.845 và 5.837.243; Zeilder (1999) J. Immunol. 163:1246-1252; Somasundaram (1999) Hum. *Antibodies* 9:47-54; Keler (1997) *Cancer Res.* 57:4008-4014. Ví dụ, và không giới hạn, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép có một vị trí gắn kết (*ví dụ*, vị trí gắn kết kháng nguyên)

cho epitop thứ nhất có trên KLB và vị trí gắn kết thứ hai cho epitop thứ hai có trên FGFR1. Ví dụ, và không giới hạn, sáng chế đề xuất kháng thể mà một nhánh gắn kết KLB và chứa bất kỳ trình tự kháng thể kháng KLB được mô tả trong bản mô tả này và nhánh thứ hai gắn kết với FGFR1 và chứa bất kỳ trình tự kháng thể kháng FGFR1 được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 theo sáng chế có một vị trí gắn kết cho epitop thứ nhất có trên KLB và vị trí gắn kết thứ hai cho epitop thứ hai có trên FGFR1c.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được bộc lộ trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể điều biến hoạt tính phức hệ KLB/FGFR1c. Ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 có thể có chức năng làm chất chủ vận và hoạt hóa phức hệ KLB/FGFR1c. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 là kháng thể tăng hoạt tính của phức hệ KLB/FGFR1c gần ít nhất 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% hoặc 99,9%. Theo một số phương án, đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 có thể là kháng thể dẫn đến sự phosphoryl hóa đích ở phía dưới phức hệ KLB/FGFR1c, *ví dụ*, MAPK và/hoặc ERK.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được bộc lộ trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể điều biến hoạt tính phức hệ KLB/FGFR1c và không phong bế sự tương tác và/hoặc gắn kết của phối tử FGF tự nhiên, *ví dụ*, FGF19 và FGF21, với phức hệ KLB/FGFR1c. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được bộc lộ trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể không phong bế hoạt tính và/hoặc gắn kết của phối tử FGF tự nhiên với thụ thể FGF không có mặt của KLB. Ví dụ, và không giới hạn, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 theo sáng chế không phong bế sự tương tác của phối tử FGF tự nhiên với phức hệ FGFR1/KLA và/hoặc chỉ FGFR1. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được bộc lộ trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể không phong bế hoạt tính và/hoặc liên kết của phối tử FGF tự nhiên với KLB không có mặt của FGFR1. Ví dụ, và không giới hạn, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 theo sáng chế không phong bế sự tương tác của phối tử FGF tự nhiên với phức hệ FGFR4/KLB, phức hệ FGFR2c/KLB và/hoặc phức hệ FGFR3c/KLB.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1c, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Theo một số phương án, chuỗi nặng chiều dài đầy đủ bao gồm axit amin có trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 129. Theo một số phương án, chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ bao gồm axit amin có trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 131. Theo một số phương án, chuỗi nặng chiều dài đầy đủ bao gồm axit amin có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 129. Theo một số phương án, chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ bao gồm axit amin có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 131.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1c, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm axit amin có trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 128. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm axit amin có trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 130. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nặng bao gồm axit amin có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 128. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ bao gồm axit amin có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 130.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-15, *ví dụ*, 12 hoặc 15; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 16-31, *ví dụ*, 28 hoặc 31; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 32-47, *ví dụ*, 44 hoặc 47; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 48-62, *ví dụ*, 49 hoặc 62; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 63-78, *ví dụ*, 75 hoặc 78; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 79-93, *ví dụ*, 90 hoặc 93.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1c, chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa SEQ ID NO: 12; (b) HVR-H2 chứa SEQ ID NO: 28; (c) HVR-H3 chứa SEQ ID NO: 44; (d) HVR-L1 chứa SEQ ID NO: 49; (e) HVR-L2 chứa SEQ ID NO: 75; và (f) HVR-L3 chứa SEQ ID NO: 90. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng KLB chứa ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa SEQ ID NO: 15; (b) HVR-H2 chứa SEQ ID NO: 31; (c) HVR-H3 chứa SEQ ID NO: 47; (d) HVR-L1 chứa SEQ ID NO: 62; (e) HVR-L2 chứa SEQ ID NO: 78; và (f) HVR-L3 chứa SEQ ID NO: 93.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1c, bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa các miền CDR1, CDR2, và CDR3, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa các miền CDR1, CDR2, và CDR3. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nặng miền CDR1 bao gồm trình tự axit amin có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 1-15. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nặng miền CDR2 bao gồm trình tự axit amin là trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 16-31. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nặng miền CDR3 bao gồm trình tự axit amin có trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO: 32-47. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ miền CDR1 bao gồm trình tự axit amin có trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO: 48-62. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ miền CDR2 bao gồm trình tự axit amin có trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO: 63-78. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ miền CDR3 bao gồm trình tự axit amin có trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với SEQ ID NO: 79-93.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1c, bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa các miền CDR1, CDR2, và CDR3, và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa các miền CDR1, CDR2, và CDR3. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nặng miền CDR1 bao gồm trình tự axit amin có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 1-15. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nặng miền CDR2 bao

gồm trình tự axit amin có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 16-31. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nặng miền CDR3 bao gồm trình tự axit amin có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 32-47. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ miền CDR1 bao gồm trình tự axit amin có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 48-62. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ miền CDR2 bao gồm trình tự axit amin có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 63-78. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ miền CDR3 bao gồm trình tự axit amin có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 79-93.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1c, bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng CDR1 có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 15; vùng biến đổi của chuỗi nặng CDR2 có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 31; vùng biến đổi của chuỗi nặng CDR3 có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 47; vùng biến đổi của chuỗi nhẹ CDR1 có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 62; vùng biến đổi của chuỗi nhẹ CDR2 có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 78; và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ CDR3 có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 93.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 bao gồm kháng thể thứ nhất, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, và bao gồm kháng thể thứ hai, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, mà kháng thể thứ nhất, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với epitop có trên KLB, và kháng thể thứ hai, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, gắn kết với epitop có trên FGFR1, *ví dụ*, FGFR1c. Ví dụ, và không giới hạn, kháng thể thứ nhất, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ; và kháng thể thứ hai, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, có thể chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể thứ nhất, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, bao gồm axit amin có trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 128. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể thứ nhất, hoặc các phàn gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm axit amin có trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 130. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể thứ hai hoặc phần

liên kết kháng nguyên của nó bao gồm axit amin có trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 132. Theo một số phương án, vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể thứ hai, hoặc các phàn gắn kết kháng nguyên của nó, bao gồm axit amin có trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 134.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 gắn kết với epitop giống như kháng thể kháng KLB được đề xuất trong bản mô tả này. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được đề xuất gắn kết với epitop giống như kháng thể kháng KLB chứa trình tự VH của SEQ ID NO: 128 và trình tự VL của SEQ ID NO: 130. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được đề xuất gắn kết với mảnh KLB chứa trình tự axit amin SSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITAS (SEQ ID NO: 142).

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được đề xuất gắn kết với mảnh KLB có trình tự axit amin ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 142.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 liên kết với epitop giống như kháng thể kháng KLB được đề xuất trong bản mô tả này. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được đề xuất liên kết với epitop giống như kháng thể kháng KLB chứa trình tự chuỗi nặng chiều dài đầy đủ của SEQ ID NO: 129 và trình tự chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ của SEQ ID NO: 131.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 liên kết với epitop giống như kháng thể kháng FGFR1 được đề xuất trong bản mô tả này. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được đề xuất liên kết với epitop giống như kháng thể kháng FGFR1 chứa trình tự VH của SEQ ID NO: 132 và trình tự VL của SEQ ID NO: 134. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được đề xuất gắn kết với mảnh FGFR1c chứa trình tự axit amin KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 143) hoặc FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 144).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 liên kết với epitop giống như kháng thể kháng FGFR1 được đề xuất trong bản mô tả này. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được đề xuất liên kết với epitop giống như kháng thể kháng FGFR1 chứa trình tự chuỗi nặng của SEQ ID NO: 133 và trình tự chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 135.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 theo sáng chế gắn kết với mảnh FGFR1c có trình tự axit amin ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 143.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 theo sáng chế gắn kết với mảnh FGFR1c có trình tự axit amin ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 144.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được đề xuất gắn kết với mảnh KLB có trình tự axit amin ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 142, và gắn kết với mảnh FGFR1c có trình tự axit amin ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% giống với trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 143 hoặc 144.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được đề xuất gắn kết với mảnh KLB có trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 142 và gắn kết với mảnh FGFR1c có trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 143 hoặc 144.

1. Ái lực kháng thể

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể có hằng số phân rã (K_d) $\leq$ 1 M, $\leq$ 100 mM, $\leq$ 10 mM, $\leq$ 1 mM, $\leq$ 100 μM, $\leq$ 10 μM, $\leq$ 1μM, $\leq$ 100 nM, $\leq$ 10 nM, $\leq$ 1 nM, $\leq$ 0,1 nM, $\leq$ 0,01 nM, hoặc $\leq$ 0,001 nM. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể có K_d khoảng 10^{-3} hoặc nhỏ hơn, hoặc 10^{-8} M hoặc nhỏ hơn, *ví dụ*, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, *ví dụ*, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 có thể bao gồm nhánh kháng FGFR1 có K_d khoảng 10 nM đến khoảng 10 μM. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 với nhánh FGFR1 có ái lực thấp có thể giảm nhẹ nguy cơ kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 gắn chặt với FGFR1 không có mặt của KLB và ngăn ngừa sự gắn kết và/hoặc kích hoạt FGFR1 bằng phối tử FGF khác như, nhưng không giới hạn, FGF1, FGF2, FGF8 và FGF23. Theo một số phương án, nhánh FGFR1 với ái lực thấp có thể cho phép có mức độ không sạch kháng FGFR1 cao hơn như, nhưng không giới hạn, kháng thể nửa chỗ phình to kháng FGFR1, đime kháng FGFR1 không đồng hóa trị, đime kháng FGFR1 đồng hóa trị và loài khối lượng cao phân tử, không dẫn đến tác dụng phụ đáng kể trong lâm sàng. Ví dụ, theo một số phương án, khoảng 2% loài khối lượng phân tử cao và 1,5% bán kháng thể kháng FGFR1 có thể có mặt trong việc chuẩn bị kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 theo sáng chế không dẫn đến tác dụng sinh học đối nghịch.

Theo một số phương án, K_d có thể được đo bằng thử nghiệm gắn kết kháng nguyên đánh dấu phóng xạ (RIA). Theo một số phương án, RIA có thể được thực hiện với phiên bản Fab của kháng thể quan tâm và kháng nguyên của nó. Ví dụ, và không giới hạn, ái lực gắn kết dung dịch của Fab với kháng nguyên được đo bằng cách làm cân bằng Fab với nồng độ tối thiểu của kháng nguyên được đánh dấu (^{125}I) khi có mặt dãy chuẩn độ của kháng nguyên không được đánh dấu, sau đó bắt kháng nguyên bao quanh tấm được bao kháng thể kháng Fab (xem, *ví dụ*, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Để thiết lập các điều kiện thử nghiệm, tấm đa giếng MICROTITER® (Thermo Scientific) được bao qua đêm bằng 5 μg/ml kháng thể kháng Fab bắt (Cappel Labs) trong 50 mM natri cacbonat (pH 9,6), và tiếp theo được phong bế bằng albumin huyết thanh bò 2% (w/v) trong PBS trong hai đến năm giờ ở nhiệt độ phòng (khoảng 23°C). Trong tấm không thấm nước (Nunc #269620), kháng nguyên 100 pM hoặc 26 pM [^{125}I] được trộn lẫn cùng với việc pha loãng nối tiếp Fab quan tâm (*ví dụ*, nhất quán với định mức của kháng thể kháng VEGF, Fab-12, trong Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). Sau đó Fab quan tâm được ủ qua đêm; tuy nhiên, sự nuôi có thể tiếp tục trong khoảng thời gian dài hơn (*ví dụ*, khoảng 65 giờ) để đảm bảo rằng đạt được trạng thái cân bằng. Sau đó, hỗn hợp được vận chuyển đến tấm bắt giữ để nuôi ở nhiệt độ phòng (*ví dụ*, trong một giờ). Dung dịch sau đó được lấy đi và tấm này được rửa tám

lần bằng polysorbat 20 (TWEEN-20®) 0,1% trong PBS. Khi tấm này đã sấy, 150 µl/giếng chất lấp lánh (MICROSCINT-20™; Packard) được thêm vào, và tấm này được đếm trên máy đếm tia gamma TOPCOUNT™ (Packard) trong mười phút. Nồng độ mỗi Fab nhỏ hơn hoặc bằng 20% gắn kết tối đa được chọn để dùng trong thử nghiệm gắn kết cạnh tranh.

Theo một số phương án, K_d có thể được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt BIACORE®. Ví dụ, và không giới hạn, thử nghiệm sử dụng BIACORE®-2000 hoặc BIACORE®-3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) được thực hiện ở 25°C với chip kháng nguyên cố định CM5 ở ~10 đơn vị đáp ứng (response unit - RU). Theo một số phương án, chip cảm biến sinh học dextran carboxymetyl hóa (CM5, Biacore, Inc.) được hoạt hóa bằng *N*-etyl-*N'*- (3-dimetylaminopropyl)-carbodiimit hydroclorit (EDC) và *N*-hydroxysucxinimit (NHS) theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Kháng nguyên được pha loãng bằng natri axetat10 mM, pH 4,8, đến 5 µg/ml (~0,2 µM) trước khi tiêm ở tốc độ dòng 5 µl/phút để thu được khoảng 10 đơn vị đáp ứng (response unit - RU) của protein cặp đôi. Sau khi tiêm kháng nguyên, etanolamin 1 M được tiêm để phong bế các nhóm chưa phản ứng. Với các phép đo động lực, Fab pha loãng nối tiếp hai lần (0,78 nM đến 500 nM) được tiêm trong PBS với chất hoạt động bề mặt polysorbat 20 (TWEEN-20™) 0,05% (PBST) ở 25°C với tốc độ dòng khoảng 25 µl/phút. Tốc độ kết hợp (k_{on}) và tốc độ phân rã (k_{off}) được tính bằng cách sử dụng mẫu gắn kết Langmuir một với một đơn giản (BIACORE® Evaluation Software phiên bản 3.2) bằng cách làm phù hợp đồng thời biểu đồ cảm ứng kết hợp và phân rã. Hằng số phân rã cân bằng (K_d) có thể được tính là tỷ lệ k_{off}/k_{on}. Xem, *ví dụ*, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Nếu tỷ lệ trên vượt quá 10^6 M^{-1} s^{-1} bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở trên, sau đó tỷ lệ trên có thể được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật làm nguội huỳnh quang đo sự tăng hoặc hạ trong cường độ phát xạ huỳnh quang (kích thích = 295 nm; lượng phát xạ = 340 nm, băng tần 16 nm) ở 25°C của kháng thể kháng lại kháng nguyên 20 nM (dạng Fab) trong PBS, pH 7,2, có nồng độ kháng nguyên tăng lên như được đo trong phổ kế, như quang phổ kế có chặn dòng (Aviv Instruments) hoặc quang phổ kế SLM-AMINCO™ 8000 dãy (ThermoSpectronic) với chậu thủy tinh khuấy.

2. *Mảnh kháng thể*

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế là mảnh kháng thể. Mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn bởi, mảnh Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv, và scFv, và các mảnh khác được mô tả bên dưới. Tổng quan một số mảnh kháng thể, xem Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Tổng quan mảnh scFv, xem, *ví dụ*, Pluckthün, trong *Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); cũng xem WO 93/16185; và Patent Mỹ số 5.571,894 và 5.587.458. Để thảo luận Fab và $F(ab')_2$ mảnh chứa thụ thể thu nhặt lại gắn kết lượng dư epitop và tăng bán tồn *in vivo*, *xem* Patent Mỹ số 5.869.046.

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

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể miền đơn. Kháng thể miền đơn là mảnh kháng thể chứa tất cả hoặc một phần của vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc tất cả hoặc một phần của vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể miền đơn là kháng thể miền đơn ở người (Domantis, Inc., Waltham, MA; xem, *ví dụ*, Patent Mỹ số 6.248.516 B1).

Mảnh kháng thể có thể được tạo ra bằng các phương pháp khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn, phân hủy phân giải protein của kháng thể trơ cũng như sản xuất bằng tế bào chủ tái tổ hợp (*ví dụ*, *E. coli* hoặc thực khuẩn), như được mô tả trong bản mô tả này.

3. *Kháng thể thể khảm và được làm giống như của người*

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể thể khảm. Một số kháng thể thể khảm được mô tả, *ví dụ*, trong Patent Mỹ số 4.816.567; và Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Theo một số phương án, kháng thể thể khảm theo sáng chế chứa vùng thay đổi không phải ở người (*ví dụ*, vùng thay đổi được dẫn xuất từ chuột, chuột ratus, chuột lang, thỏ, hoặc linh trưởng không phải người, như khỉ) và vùng cố định ở người. Theo ví dụ khác, kháng thể thể khảm có thể là kháng

thể "chuyển lớp" trong đó lớp hoặc lớp phụ đã được thay đổi từ lớp của kháng thể gốc. Kháng thể thể khảm chứa mảnh gắn kết kháng nguyên của nó.

Theo một số phương án, kháng thể thể khảm theo sáng chế có thể là kháng thể được làm giống như của người. Điển hình, kháng thể không phải ở người được làm giống như của người để làm giảm tính sinh miễn dịch với người, trong khi giữ tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể không phải ở người gốc. Thông thường, kháng thể được làm giống như của người chứa một hoặc nhiều miền thay đổi trong đó HVR, *ví dụ*, CDR, (hoặc các phần của nó) được dẫn xuất từ kháng thể không phải ở người, và FR (hoặc các phần của nó) được dẫn xuất từ trình tự kháng thể ở người. Kháng thể được làm giống như của người cũng sẽ tùy chọn chứa ít nhất một phần của vùng cố định ở người. Theo một số phương án, một số lượng dư FR trong kháng thể được làm giống như của người được thế với lượng dư tương ứng từ kháng thể không phải ở người (*ví dụ*, kháng thể từ đó lượng dư HVR được dẫn xuất), *ví dụ*, để phục hồi hoặc cải tiến tính đặc hiệu kháng thể hoặc ái lực.

Kháng thể được làm giống như của người và phương pháp sản xuất chúng được bình luận, *ví dụ*, trong Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), và còn được mô tả, *ví dụ*, trong Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); Patent Mỹ số 5. 821.337, 7.527.791, 6.982.321, và 7.087.409; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (mô tả sự ghép vùng xác định tính đặc hiệu (specificity determining region - SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (mô tả "gia công lại bề mặt"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (mô tả "xáo trộn FR"); và Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) và Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (mô tả tiếp cận "sự chọn lọc được dẫn" để xáo trộn FR).

Vùng trình tự ở người có thể được sử dụng để làm tương thích với người bao gồm nhưng không giới hạn: vùng trình tự được chọn sử dụng phương pháp "phù hợp nhất" (xem, *ví dụ*, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); vùng trình tự được dẫn xuất từ trình tự liên ứng của kháng thể ở người của nhóm phụ cụ thể của vùng thay đổi chuỗi nhẹ hoặc nặng (xem, *ví dụ*, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); và Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); vùng trình tự (đột biến thân) trưởng thành ở người hoặc vùng trình tự dòng mầm ở người (xem, *ví dụ*, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); và vùng trình tự được dẫn xuất từ thư viện FR

sàng lọc (xem, *ví dụ*, Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) và Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

4. Kháng thể ở người

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể ở người. Kháng thể ở người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực. Kháng thể ở người thường được mô tả trong van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) và Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Các kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách dùng chất gây miễn dịch cho động vật chuyển gen mà được cải biến để tạo ra các kháng thể nguyên vẹn của người hoặc các kháng thể nguyên vẹn với các vùng thay đổi của người khi phản ứng lúc tiếp nhận liều quyết định kháng nguyên. Động vật này thường chứa toàn bộ hoặc một phần của locus của globulin miễn dịch của người, mà thay các locus globulin miễn dịch nội sinh, hoặc có mặt bên ngoài nhiễm sắc thể hoặc được đưa một cách ngẫu nhiên vào nhiễm sắc thể của động vật. Ở chuột chuyển gen này, các locus globulin miễn dịch nội sinh thường bị làm bất hoạt. Tổng quan về các phương pháp thu các kháng thể của người từ động vật biến đổi gen, xem tài liệu: Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125(2005). Ví dụ, xem cả các patent Mỹ số 6,075,181 và 6,150,584 mô tả công nghệ XENOMOUSE™; patent Mỹ số 5,770,429 mô tả công nghệ HUMAB®; patent Mỹ số 7,041,870 mô tả công nghệ K-M MOUSE®, và công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2007/0061900, mô tả công nghệ VELOCIMOUSE®). Các vùng thay đổi của người từ các kháng thể nguyên vẹn đã được tạo ra bởi động vật này còn có thể được cải biến, ví dụ, bằng cách kết hợp với vùng ổn định khác của người.

Các kháng thể của người cũng có thể được tạo ra theo các phương pháp trên cơ sở tế bào lai. Các dòng tế bào u tủy của người và các dòng tế bào dị u tủy của người-của chuột để sản sinh các kháng thể đơn dòng của người đã được bộc lộ. (ví dụ, xem tài liệu:Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al.,*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); và Boerner et al.,*J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) Các kháng thể của người đã được tạo ra theo công nghệ tế bào lai đối với tế bào B của người cũng đã được bộc lộ trong tài liệu: Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Các phương pháp

khác nữa bao gồm các phương pháp đã được bộc lộ, ví dụ, trong patent Mỹ số 7,189,826 (mô tả cách tạo ra các kháng thể IgM đơn dòng của người từ dòng tế bào lai) và Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (mô tả tế bào lai của người-của người). Công nghệ dùng tế bào lai của người (công nghệ Trioma) cũng đã được bộc lộ trong: Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) và Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Các kháng thể của người còn có thể được tạo ra bằng cách phân lập các trình tự của miền thay đổi của dòng Fv được chọn từ thư viện thể thực khuẩn biểu hiện có nguồn gốc từ người. Sau đó, các trình tự này của miền thay đổi có thể được kết hợp với miền ổn định mong muốn của người. Các kỹ thuật để chọn lọc các kháng thể của người từ các thư viện kháng thể được bộc lộ dưới đây.

5. Kháng thể có nguồn gốc từ thư viện

Kháng thể theo sáng chế có thể phân lập được bằng cách sàng lọc các thư viện tổ hợp đối với các kháng thể có hoạt tính hoặc các hoạt tính mong muốn. Ví dụ, trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết nhiều phương pháp để tạo ra các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn và sàng lọc các thư viện này đối với các kháng thể có đặc tính liên kết mong muốn. Các phương pháp này được xem xét tổng quan, ví dụ, trong tài liệu:Hoogenboom et al.,*Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) và được mô tả một cách chi tiết hơn nữa, ví dụ, trong tài liệu: McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks và Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); và Lee et al., *J. Immunol.Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

Theo các phương pháp nhất định để biểu hiện thể thực khuẩn, kho các gen VH và các gen VL được tách dòng một cách riêng rẽ nhờ phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và được tái tổ hợp một cách ngẫu nhiên trong thư viện thể thực khuẩn, mà sau đó có thể được sàng lọc đối với thể thực khuẩn liên kết kháng nguyên như đã được bộc lộ trong tài liệu: Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Thể thực khuẩn thường

biểu hiện các đoạn kháng thể, như các đoạn Fv chuỗi đơn (scFv) hoặc các đoạn Fab. Các thư viện từ các nguồn đã được miễn dịch tạo ra các kháng thể có ái lực cao với chất gây miễn dịch mà không cần xây dựng các khối tế bào lai. Theo cách khác, kho chứa tự nhiên có thể được tách dòng (ví dụ, từ người) để tạo ra nguồn kháng thể đối với nhiều loại kháng nguyên không cùng loại và kháng nguyên cùng loại mà không gây bất kỳ miễn dịch như đã được bộc lộ trong tài liệu: Griffiths et al., *EMBO J,* 12: 725-734 (1993). Theo một số phương án, các thư viện tự nhiên cũng có thể được tạo ra theo cách tổng hợp bằng cách tách dòng các đoạn gen V chưa được bố trí ra khỏi tế bào gốc, và bằng cách sử dụng các đoạn mồi PCR chứa trình tự ngẫu nhiên để mã hóa vùng CDR3 rất dễ thay đổi và để hoàn thành việc bố trí lại *in vitro*, như đã được bộc lộ trong tài liệu: Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Các công bố patent mô tả thư viện thể thực khuẩn kháng thể của người bao gồm, ví dụ, patent Mỹ số 5,750,373, và công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, và 2009/0002360.

Trong bản mô tả này, các kháng thể hoặc các đoạn kháng thể phân lập được từ các thư viện kháng thể của người được xem là kháng thể của người hoặc đoạn kháng thể của người.

6. Kháng thể đa đặc hiệu

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đa đặc hiệu, ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép. Các kháng thể đa đặc hiệu là các kháng thể đơn dòng mà có tính đặc hiệu liên kết với ít nhất hai epitop khác nhau. Theo các phương án nhất định, một trong số các tính đặc hiệu liên kết là đối với epitop có trên KLB và tính đặc hiệu khác là đối với kháng nguyên khác bất kỳ. Theo một số phương án, một trong số các tính đặc hiệu liên kết là đối với epitop có trên FGFR1 và tính đặc hiệu khác là đối với kháng nguyên khác bất kỳ. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có thể gắn kết epitop trên KLB và có thể gắn kết epitop trên FGFR1. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có thể gắn kết epitop trên KLB và có thể gắn kết epitop trên FGFR1c. Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra ở dạng các kháng thể có chiều dài đầy đủ hoặc các đoạn kháng thể.

Các kỹ thuật để tạo ra các kháng thể đa đặc hiệu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đồng biểu hiện tái tổ hợp hai cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch

có các tính đặc hiệu khác nhau (xem tài liệu: Milstein and Cuello, *Nature*305: 537 (1983)),WO 93/08829, và Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), và kỹ thuật "chỗ phình to-trong-lỗ" (ví dụ, xem patent Mỹ số 5,731,168). Các kháng thể đa đặc hiệu còn có thể được tạo ra bằng cách xử lý các tác dụng lái bằng tĩnh điện để tạo ra các phân tử heterođime Fc của kháng thể (WO 2009/089004A1); liên kết ngang hai hoặc nhiều kháng thể hoặc các đoạn (ví dụ, xem patent Mỹ số 4,676,980, và tài liệu: Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); bằng cách sử dụng khóa kéo leuxin để tạo ra các kháng thể lưỡng đặc hiệu (ví dụ, xem tài liệu: Kostelnyet al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); bằng cách áp dụng công nghệ "nhị thể" để tạo ra các đoạn kháng thể đặc hiệu kép (ví dụ, xem tài liệu: Hollinger et al.,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); và bằng cách sử dụng các đime Fv chuỗi đơn (sFv) (ví dụ, xem tài liệu: Gruber et al.,*J. Immunol.*,152:5368 (1994)); và chuẩn bị các kháng thể tam đặc hiệu như đã được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Tutt et al.*J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Các kháng thể đã được xử lý có ba hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên chức năng, kể cả "các kháng thể Octopus", cũng nằm trong phạm vi của sáng chế (ví dụ, xem US 2006/0025576A1).

7. Biến thể của kháng thể

Sáng chế còn đề xuất biến thể trình tự axit amin của kháng thể được bộc lộ. Ví dụ, việc cải thiện ái lực liên kết và/hoặc các tính chất sinh học khác của kháng thể có thể là điều mong muốn. Các biến thể trình tự axit amin của kháng thể có thể được điều chế theo đưa các cải biến thích hợp vào trình tự nucleotit ghi mã kháng thể, hoặc theo cách tổng hợp peptit. Các cải biến này bao gồm, nhưng không giới hạn, xóa bỏ ra khỏi, và/hoặc cài xen vào và/hoặc thay thế các gốc trong các trình tự axit amin của kháng thể. Tổ hợp bất kỳ bao gồm xóa bỏ, cài xen, và thay thế có thể được tạo ra để có được cấu trúc cuối cùng, với điều kiện kháng thể cuối cùng này, *tức là*, được biến đổi, có các đặc tính mong muốn, ví dụ, liên kết kháng nguyên.

a) <u>Biến thể thay thế, cài xen, và xóa bỏ</u>

Theo một số phương án, các biến thể của kháng thể có thể có một hoặc nhiều thay thế axit amin. Các vị trí quan tâm để đột biến thay thế bao gồm các HVR và các FR. Ví dụ không giới hạn về thay thế bảo toàn được thể hiện trong Bảng 1 dưới tiêu đề "các thay thế được ưu tiên." Ví dụ không giới hạn về Các thay đổi đáng kể hơn được thể

hiện trong Bảng 1 dưới tiêu đề "các thay thế làm ví dụ", và như được mô tả một cách chi tiết hơn dưới đây liên quan đến mạch bên của các nhóm axit amin. Các thay thế axit amin có thể được đưa vào kháng thể đáng quan tâm và các sản phẩm được sàng lọc theo hoạt tính mong muốn, ví dụ, mối liên kết kháng nguyên được duy trì/được cải thiện, tính sinh miễn dịch giảm, hoặc tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity - CDC) hoặc tính gây độc qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC) cải thiện.

Bảng 1

Gốc ban đầu	Các thay thế làm ví dụ	Các thay thế được ưu tiên
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleuxin	Leu
Leu (L)	Norleuxin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala

Gốc ban đầu	Các thay thế làm ví dụ	Các thay thế được ưu tiên
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleuxin	Leu

Các axit amin có thể được nhóm theo các tính chất mạch bên chung:

(1) kỵ nước: Norleuxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) trung tính ưa nước: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) axit: Asp, Glu;

(4) kiềm: His, Lys, Arg;

(5) các gốc mà ảnh hưởng đến định hướng của chuỗi: Gly, Pro;

(6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Theo một số phương án, các thay thế không bảo toàn sẽ gây ra sự trao đổi một thành viên của một nhóm trong số các nhóm này cho nhóm khác.

Theo một số phương án, loại biến thể thay thế bao gồm thay thế một hoặc nhiều gốc của vùng siêu thay đổi của kháng thể gốc, ví dụ, kháng thể được làm giống như kháng thể của người hoặc kháng thể của người. Nói chung, (các) biến thể thu được đã được chọn cho nghiên cứu tiếp sẽ có các cải biến, ví dụ, cải thiện, về một số tính chất sinh học nhất định như, nhưng không giới hạn, ái lực cao hơn, mức độ sinh miễn dịch giảm, so với kháng thể gốc và/hoặc sẽ duy trì ở mức độ đáng kể các tính chất sinh học của kháng thể gốc. Ví dụ không giới hạn về biến thể thay thế là kháng thể thành thục về ái lực, mà có thể được tạo ra một cách thuận tiện, ví dụ, bằng cách áp dụng các kỹ thuật làm thành thục về mặt ái lực trên cơ sở biểu hiện thể thực khuẩn như đã được bộc lộ trong bản mô tả này. Một cách vắn tắt, một hoặc nhiều gốc HVR được gây đột biến và các kháng thể biến dị biểu hiện trên thể thực khuẩn và được sàng lọc theo hoạt tính sinh học cụ thể (ví dụ, ái lực liên kết).

Theo một số phương án, các biến đổi (ví dụ, thay thế) có thể tạo ra ở các HVR, ví dụ, để nâng cao ái lực của kháng thể. Các biến đổi này có thể tạo ra ở "các điểm nóng"

của HVR, tức là các gốc được mã hóa bởi codon mà trải qua đột biến ở tần số cao trong quá trình thành thục sinh dưỡng (ví dụ, xem tài liệu: Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), và/hoặc lượng dư tiếp xúc kháng nguyên, với biến thể thu được VH hoặc VL đang được thử nghiệm về ái lực gắn kết. Quá trình thành thục về ái lực bằng cách dựng và chọn lọc lại từ các thư viện thứ cấp đã được bộc lộ, ví dụ, trong tài liệu: Hoogenboom et al.,*Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). Theo một số phương án thành thục về ái lực, tính đa dạng có thể được đưa vào gen dễ biến đổi đã được chọn để thành thục theo phương pháp bất kỳ trong số nhiều phương pháp (ví dụ, PCR bị sai, di chuyển chuỗi, hoặc gây đột biến theo oligonucleotit). Sau đó, thư viện thứ cấp được tạo ra. Tiếp đó, thư viện này được sàng lọc để xác định biến thể bất kỳ của kháng thể với ái lực mong muốn. Phương pháp khác để đưa tính đa dạng vào bao gồm cácphương pháp hướng đến HVR, trong đó vài gốc HVR (ví dụ, 4 đến 6 gốc mỗi lần) được chọn ngẫu nhiên. Các gốc HVR tham gia vào mối liên kết kháng nguyên có thể được xác định một cách cụ thể, ví dụ, bằng cách sử dụng đột biến quét alanin hoặc mô hình hóa. Cụ thể, CDR-H3 và CDR-L3 thường được hướng đích.

Theo các phương án nhất định, sự thay thế, cài xen, hoặc xóa bỏ có thể xảy ra ở một hoặc nhiều HVR chừng nào các sửa đổi này hầu như không làm giảm khả năng của kháng thể liên kết với kháng nguyên. Ví dụ, các thay đổi mang tính bảo toàn (ví dụ, các thay thế bảo toàn theo sáng chế) mà hầu như không làm giảm ái lực liên kết có thể được tạo ra ở HVR. Các sửa đổi này có thể, ví dụ, là ngoài kháng nguyên tiếp xúc dư trong HVR. Ở các trình tự VH và VL biến dị theo các phương án nhất định nêu trên, các HVR không bị thay đổi, hoặc không chứa nhiều hơn một, hai hoặc ba thay thế axit amin.

Phương pháp hữu dụng để xác định các gốc hoặc các vùng của kháng thể mà có thể là đích của phép gây đột biến được gọi là "đột biến quét alanin" như đã được bộc lộ trong tài liệu: Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Theo phương pháp này, gốc hoặc nhóm gồm các gốc đích (ví dụ, các gốc tích điện như arg, asp, his, lys, và glu) được xác định và thế bằng axit amin không tích điện hoặc axit amin tích điện âm (ví dụ, alanin hoặc polyalanin) để xác định liệu tương tác của kháng thể với kháng nguyên có bị tác động hay không. Việc thế tiếp có thể được đưa vào tại các vị trí axit amin thể hiện tính mẫn cảm về mặt chức năng đối với thay thế ban đầu. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, cấu trúc tinh thể của phức kháng nguyên-kháng thể để xác định các

điểm tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên. Các gốc tiếp xúc này và các gốc bên cạnh có thể được hướng đíchhoặc bị loại bỏ làm ứng viên cho việc thay thế. Các biến thể có thể được sàng lọc để xác định liệu chúng có các tính chất mong muốn hay không.

Các cài xen vào trình tự axit min bao gồm các thể dung hợp đầu tận cùng amin và/hoặc đầu tận cùng carboxyl với chiều dài nằm trong khoảng từ một gốc đến các polypeptit chứa hàng trăm hoặc nhiều gốc, cũng như cài xen nội trình tự một hoặc nhiều gốc axit amin. Các ví dụ về cài xen đầu tận cùng bao gồm kháng thể vớigốc methionyl ở đầu tận cùng N. Các biến thể cài xen khác của phân tử kháng thể bao gồm dung hợp vào đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của kháng thể vào enzym (ví dụ, đối với trị liệu tiền thuốc enzym trực tiếp lên kháng thể (antibody-directed enzyme prodrug therapy - ADEPT) hoặc polypeptit mà kéo dài thời gian bán tồn trong huyết thanh của kháng thể.

b) Biến thể glycosyl hóa

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể được biến đổi để làm tăng hoặc làm giảm mức độ glycosyl hóa kháng thể. Việc bổ sung hoặc xóa bỏ các vị trí glycosyl hóa đối với kháng thể có thể được thực hiện một cách thuận tiện bằng cách làm thay đổi trình tự axit amin sao cho một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa được tạo ra hoặc bị loại bỏ.

Theo một số phương án, nếu kháng thể chứa vùng Fc, thì hyđrat cacbon gắn vào nó có thể bị thay đổi. Các kháng thể tự nhiên được tạo ra bởi tế bào của động vật có vú thường chứa oligosacarit mạch nhánh hai râu mà thường được gắn bởi liên kết N vào Asn297 của miền CH2 của vùng Fc. Ví dụ, xem tài liệu: Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). Oligosacarit có thể bao gồm các hyđrat cacbon khác nhau, ví dụ, manoza, N-axetyl glucosamin (GlcNAc), galactoza, và axit sialic, cũng như fucoza đã được gắn vào GlcNAc ở "thân" của cấu trúc oligosacarit hai râu này. Theo một số phương án, oligosacarit ở kháng thể có thể được cải biến để tạo ra các biến thể của kháng thể với một số tính chất nhất định tốt hơn.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các biến thể của kháng thể có cấu trúc hyđrat cacbon mà không gắn fucoza (trực tiếp hoặc gián tiếp) vào vùng Fc. Ví dụ, lượng fucoza trong kháng thể này có thể nằm trong khoảng từ 1% đến 80%, từ 1% đến 65%, từ 5% đến 65% hoặc từ 20% đến 40% và trị số nằm trong khoảng này.

Theo một số phương án, lượng fucoza có thể được xác định bằng cách tính lượng fucoza trung bình trong mạch đường ở Asn297, so với tổng của tất cả các cấu trúc glyco đã được gắn vào Asn 297 (ví dụ, cấu trúc phức, cấu trúc lai và cấu trúc manoza cao) như đo được nhờ phép đo phổ khối MALDI-TOF, như đã được bộc lộ trong WO 2008/077546 chẳng hạn. Asn297 để chỉ gốc asparagin nằm tại vị trí khoảng 297 trong vùng Fc (đánh số các gốc vùng Fc theo hệ EU); tuy nhiên, Asn297 còn có thể nằm ở khoảng ± 3 axit amin trước hoặc sau vị trí 297, tức là từ vị trí 294 đến vị trí 300, do dao động nhỏ về trình tự ở các kháng thể. Biến thể fucosyl hóa này có thể có chức năng ADCC tốt hơn. Ví dụ, xem công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Các công bố làm ví dụ liên quan đến "đã được khử fucosyl" hoặc "thiếu hụt fucoza" các biến thể của kháng thể bao gồm: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004).

Các kháng thể đã được khử fucosyl có thể được tạo ra trong dòng tế bào bất kỳ thiếu hụt fucosyl hóa protein. Ví dụ không giới hạn về dòng tế bào chứa tế bào CHO Lec13 thiếu hụt fucosyl hóa protein (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); US Pat Appl No US 2003/0157108 A1, Presta, L; và WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, đặc biệt là trong Ví dụ 11), và dòng tế bào bất hoạt, như gen alpha-1,6-fucosyltransferaza, *FUT8,* các tế bào CHO bất hoạt (*ví dụ*, xem tài liệu: Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); và WO2003/085107).

Các biến thể của kháng thể còn được đề xuất với oligosacarit cắt đôi, ví dụ, trong đó oligosacarit hai râu đã được gắn vào vùng Fc của kháng thể được cắt đôi bởi GlcNAc. Các biến thể của kháng thể này có thể có mức độ fucosyl hóa giảm và/hoặc chức năng ADCC tốt hơn. Ví dụ không giới hạn về các biến thể của kháng thể này được bộc lộ, ví dụ, trong công bố đơn quốc tế số WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); patent Mỹ số 6,602,684 (Umana et al.); và US 2005/0123546 (Umana et al.). Các biến thể của kháng thể với ít nhất một gốc galactoza ở oligosacarit đã được gắn vào vùng Fc cũng được đề

xuất. Các biến thể của kháng thể nàycó thể có chức năng CDC tốt hơn. Các biến thể của kháng thể này được bộc lộ, ví dụ, trong công bố đơn quốc tế số WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); và WO 1999/22764 (Raju, S.).

c) Biến thể của vùng Fc

Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều cải biến axit amin có thể được đưa vào vùng Fc của kháng thể theo sáng chế, nhờ đó tạo ra biến thể của vùng Fc. Biến thể của vùng Fc có thể bao gồm trình tự của vùng Fc của người (ví dụ, vùng Fc của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người) chứa cải biến axit amin (ví dụ, thay thế) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất biến thể của kháng thể mà có một vài nhưng không phải tất cả các chức năng của chất tác động, mà khiến nó trở thành ứng viênmong muốn đối với các ứng dụng, trong đó thời gian bán tồn của kháng thể *in vivo*là quan trọng nhưng một số chức năng nhất định của chất tác động (như bổ trợ và ADCC) là không cần thiết hoặc có hại. Các thử nghiệm *in vitro* và/hoặc *in vivo* về độc tính đối với tế bào có thể được thực hiện để xác nhận sự suy giảm/cạn kiệt hoạt tính CDC và/hoặc hoạt tính ADCC. Ví dụ, các thử nghiệm liên kết thụ thể Fc (FcR) có thể được thực hiện để đảm bảo rằng kháng thể không liên kết với FcγR (do đó có khả năng không có hoạt tính ADCC), nhưng vẫn giữ khả năng liên kết với FcRn. Các tế bào nguyên sinh để làm trung gian cho ADCC, các tế bào NK, chỉ biểu hiện Fc(RIII, trong khi bạch cầu đơn nhân to biểu hiện Fc(RI, Fc(RII và Fc(RIII. Sự biểu hiện của FcR ở các tế bào sinh huyết được tổng kết trong Bảng 3 trên trang 464 trong tài liệu: Ravetchand Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử đáng quan tâm được bộc lộ trong patent Mỹ số 5,500,362 (ví dụ, xem tài liệu: Hellstrom, I. et al.*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) và Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (xem tài liệu: Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). Theo cách khác, các phương pháp thử nghiệm không có tính phóng xạ có thể được áp dụng (ví dụ, xem tài liệu: ACTI™ thử nghiệm về độc tính đối với tế bào không có tính phóng xạ để đếm tế bào theo dòng chảy (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; và thử nghiệm về độc tính đối với tế bào không có tính phóng xạ CytoTox 96®(Promega, Madison, WI). Các tế bào tác động hữu dụng cho thử nghiệm

này bao gồm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và các tế bào diệt tự nhiên (NK). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử đáng quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, trong mẫu động vật như đã bộc lộ trong tài liệu: Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Các thử nghiệm liên kết C1q còn có thể được thực hiện để xác nhận rằng kháng thể không có khả năng liên kết C1q và do đó không có hoạt tính CDC. Ví dụ, xem tài liệu: ELISA liên kết C1q và C3ctrong công bố đơn quốc tế số WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá mức độ hoạt hóa bổ thể, thử nghiệm CDC có thể được thực hiện (ví dụ, xem tài liệu: Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol.Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); và Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). Liên kết FcRn và việc xác định thời gian thanh thải/bán tồn *in vivo*cũng có thể được thực hiện bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem tài liệu: Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)). Theo một số phương án, các thay đổi có thể được thực hiện trong vùng Fc mà làm thay đổi (tức là tốt hơn hoặc kém hơn) mức độ liên kết C1q và/hoặc độc tính đối với tế bào phụ thuộc bổ trợ (CDC), ví dụ, như đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 6,194,551, WO 99/51642, và tài liệu: Idusogie et al.*J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Các kháng thể suy giảm chức năng của chất tác động bao gồm các kháng thể có một hoặc nhiều gốc của vùng Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (patent Mỹ số 6,737,056) được thế. Các đột biến Fc này bao gồm Fc đột biến có hai hoặc nhiều vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327 được thế, kể cảđột biến Fcđược gọi là "DANA" có các gốc 265 và 297 đượcthế thành alanin (patent Mỹ số 7,332,581).

Một số biến thể nhất định của kháng thể cóliên kết tốt hơn hoặc kém hơn với FcR được bộc lộ (ví dụ, xem patent Mỹ số 6,737,056; WO 2004/056312, và tài liệu: Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

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

Theo một số phương án, thay đổi được thực hiện trong vùng Fc của kháng thể, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép, được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể tạo ra kháng thể biến thể có thời gian bán tồn dài hơn và mức độ liên kết tốt hơn với thụ thể Fc mới sinh

(FcRn), mà chịu trách nhiệm về sự vận chuyển IgG mẹ đến bào thai (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) và Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), được bộc lộ trong US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Các kháng thể mà chứa chứa vùng Fc có một hoặc nhiều thay thế trong đó, cải thiện liên kết của vùng Fc với FcRn. Các biến thể Fc này bao gồm các biến thể có thay thế ở một hoặc nhiều gốc của vùng Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 hoặc 434, ví dụ, thế gốc 434 của vùng Fc (patent Mỹ số 7,371,826).

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

d) Biến thể của kháng thể đã được xử lý bằng xystein

Theo các phương án nhất định, việc tạo ra các kháng thể đã được xử lý bằng xystein, ví dụ, "thioMAb", trong đó một hoặc nhiều gốc của kháng thể được thế bằng các gốc xystein có thể là điều mong muốn. Theo các phương án cụ thể, các gốc được thếtại các vị trí dễ tiếp xúc của kháng thể. Bằng cách thay thế các gốc bằng xystein, các nhóm thiol có hoạt tính phản ứng nhờ đó nằm ở các vị trí dễ tiếp xúc của kháng thể và có thể được dùng để tiếp hợp kháng thể vào các gốc khác, như các gốc của dược chất hoặc các gốc của dược chất-nhóm liên kết, để tạo ra thể tiếp hợp miễn dịch, như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, một hoặcnhiều gốc bất kỳ dưới đây có thể được thế bằng xystein: V205 (đánh số Kabat) của chuỗi nhẹ; A118 (đánh số theo hệ EU) của chuỗi nặng; và S400 (đánh số theo hệ EU) của chuỗi nặng vùng Fc. Các kháng thể đã được xử lý bằng xystein có thể được tạo ra như đã được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 7,521,541.

e) Chất dẫn xuất của kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế còn có thể được cải biến để chứa các gốc bổ sung không có bản chất protein mà là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và dễ mua được. Các gốc thích hợp để tạo dẫn xuất của kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các polyme hòa tan trong nước. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các polyme hòa tan trong nước bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), các copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymetylxenluloza, đextran, rượu polyvinylic, polyvinyl pyroliđon, poly-1, 3-

điioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme etylen/ anhyđrit maleic, các axit polyamin (homopolyme hoặc copolyme ngẫu nhiên), và đextran hoặc poly(n-vinyl pyroliđon)polyetylen glycol, homopolyme propropylen glycol, co-polyme prolypropylen oxit/etylen oxit, polyol đã được polyoxyetyl hóa (ví dụ, glyxerol), rượu polyvinylic, và hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionalđehyt có thể có các ưu điểm về sản xuất do tính ổn định trong nước của nó. Polyme có thể có phân tử lượng bất kỳ, và có thể là mạch nhánh hoặc mạch không nhánh. Số lượng polyme đã được gắn vào kháng thể có thể thay đổi, và nếu nhiều hơn một polymer được gắn vào, thì chúngcó thể là các phân tử giống nhau hoặc khác nhau. Nói chung, số lượng và/hoặc loại polyme được dùng để tạo chất dẫn xuất có thể được xác định trên cơ sở các yếu tố bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tính chất hoặc chức năng cụ thể của kháng thể cần được cải thiện, liệu dẫn xuất của kháng thể có được dùng trong việc điều trị bệnh trong các điều kiện đã xác định hay không, v.v..

Theo một số phương án, các thể tiếp hợp của kháng thể và gốc không là protein mà có thể được gia nhiệt một cách chọn lọc bằng cách tiếp xúc với phóng xạ được đề xuất. Theo một phương án, gốc không là protein là ống cacbon có kích thước nano (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). Theo một số phương án, phóng xạ có thể có bước sóng bất kỳ, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bước sóng màkhông gây hại cho các tế bào thông thường, mà gia nhiệt gốc không là protein đến nhiệt độ mà ở đó các tế bào gần vớigốc không là protein của kháng thểbị diệt.

D. Phương pháp sản xuất kháng thể

Kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp đã có hoặc đã được biết đến bất kỳ trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, nhưng không giới hạn, các kháng thể có thể được tạo ra bằng cách áp dụng các phương pháp tái tổ hợp và các dược phẩm, ví dụ, như đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 4,816,567. Quy trình chi tiết để tạo kháng thể được mô tả trong Ví dụ thực hiện sáng chế bên dưới.

Sáng chế còn đề xuất axit nucleic phân lập được ghi mã kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này. Ví dụ, axit nucleic phân lập được có thể mã hóa trình tự axit amin chứa VL và/hoặc trình tự axit amin chứa VH của kháng thể, ví dụ, chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể. Theo một số phương án, axit nucleic phân lập được có thể bao gồm trình tự nucleotit ghi mã trình tự axit amin vùng biến đổi của chuỗi nặng có

trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 128, và/hoặc trình tự nucleotit ghi mã trình tự axit amin vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 130.

Theo một số phương án, axit nucleic có thể có trong một hoặc nhiều vectơ, *ví dụ*, vectơ biểu hiện. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vật truyền" để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng di chuyển axit nucleic khác mà nó liên kết vào. Một loại vectơ là "plasmid," dùng để chỉ vòng ADN sợi đôi vòng mà mảnh ADN bổ sung có thể được buộc vào. Loại vectơ khác là vectơ lan truyền, mà mảnh ADN bổ sung có thể được buộc vào hệ gen lan truyền. Một số vật truyền nhất định có khả năng sao chép tự chủ trong tế bào chủ vào nơi mà chúng được đưa vào (*ví dụ*, vectơ vi khuẩn có gốc vi khuẩn sao chép và vectơ động vật có vú thể bổ sung). Các vectơ khác (*ví dụ*, vectơ động vật có vú không phải thể bổ sung) được đưa vào hệ gen của tế bào chủ khi đưa vào tế bào chủ, và nhờ đó được nhân rộng cùng với hệ gen chủ. Hơn thế nữa, một số vectơ, vectơ biểu hiện, có khả năng điều khiển sự biểu hiện của các gen mà chúng có thể thực hiện liên kết. Nói chung, vectơ biểu hiện các tiện ích trong phương pháp ADN tái tổ hợp thường ở dạng plasmid (vectơ). Tuy nhiên, đối tượng được bộc lộ dự định chứa các dạng khác này của vectơ biểu hiện, như vectơ lan truyền (*ví dụ*, retrovirus khiếm khuyết sao chép, adenovirus và virus liên quan đến adeno) dùng chức năng tương đương.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa kháng thể theo sáng chế và/hoặc một hoặc nhiều vectơ bao gồm axit nucleic có thể được đưa vào tế bào chủ. Theo một số phương án, việc đưa axit nucleic vào tế bào có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực bao gồm, nhưng không giới hạn, chuyển nhiễm, xung điện, vi tiêm, lây nhiễm với vectơ lan truyền hoặc thể thực khuẩn chứa trình tự axit nucleic, dung hợp tế bào, sự vận chuyển gen qua trung gian nhiễm sắc thể, sự vận chuyển gen qua trung gian tế bào vi mô, dung hợp gram âm có vách không hoàn chỉnh, v.v. Theo một số phương án, tế bào chủ có thể bao gồm, *ví dụ*, đã được biến nạp với):(1) vật truyền chứa axit nucleic mà nó mã hóa trình tự axit amin chứa VL của kháng thể và trình tự axit amin chứa VH của kháng thể, hoặc (2) vật truyền thứ nhất chứa axit nucleic mà mã hóa trình tự axit amin chứa VL của kháng thể và vật truyền thứ hai chứa axit nucleic mà mã hóa trình tự axit amin chứa VH của kháng thể. Theo một số phương án, tế bào của vật chủ có nhân chuẩn, ví dụ, tế bào buồng trứng của chuột lang Trung Quốc (CHO) hoặc tế bào lympho (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20).

Theo một số phương án, phương pháp sản xuất kháng thể kháng KLB hoặc kháng FGFR1c có thể bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ, trong đó axit nucleic mã hóa kháng thể đã được đưa vào, trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể, và tùy ý thu hồi kháng thể từ tế bào của vật chủ và/ hoặc môi trường nuôi cấy tế bào của vật chủ. Theo một số phương án, kháng thể được thu hồi từ tế bào chủ qua phương pháp sắc ký.

Để sản xuất tái tổ hợp kháng thể theo sáng chế, axit nucleic mã hóa kháng thể, *ví dụ*, như được mô tả ở trên, có thể phân lập được và cài xen vào một hoặc nhiều vectơ để còn tách dòng và/hoặc biểu hiện trong tế bào chủ. Axit nucleic này có thể dễ phân lập được và được giải trình tự bằng cách áp dụng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng mẫu dò oligonucleotit mà có khả năng liên kết một cách đặc hiệu với gen ghi mã các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ của kháng thể).

Các tế bào của vật chủ thích hợp để tách dòng hoặc sự biểu hiện của các vật truyền ghi mã kháng thể bao gồm các tế bào không nhân hoặc các tế bào nhân chuẩn được bộc lộ trong bản mô tả này. Ví dụ, các kháng thể có thể được tạo ra trong vi khuẩn, cụ thể là khi không cần glycosyl hóa và chức năng của chất tác động Fc. Để biểu hiện các đoạn kháng thể và các polypeptit trong vi khuẩn, ví dụ xem các patent Mỹ số 5,648,237, 5,789,199, và 5,840,523. (xem cả tài liệu: Charlton, *Methods in Molecular Biology*, *Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, mô tả sự biểu hiện của các đoạn kháng thể ở*E. coli*.) Sau khi biểu hiện, kháng thể có thể được phân lập từ tế bào vi khuẩn ở dạng bột nhão trong phân đoạn hòa tan và có thể được tinh chế tiếp.

Ngoài sinh vật không có nhân điển hình, các vi sinh vật có nhân chuẩn như nấm mốc hoặc nấm men dạng sợi là các vật chủ tách dòng hoặc biểu hiện thích hợp đối với vật truyền ghi mã kháng thể, bao gồm các chủng nấm mốc và các chủng nấm men mà chu trình glycosyl hóa của chúng "đã được làm giống như của người", dẫn đến việc sản sinh kháng thể với kiểu glycosyl hóa một phần hoặc hoàn toàn của người. Xem tài liệu: Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), và Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006). Các tế bào của vật chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể đã được glycosyl hóa còn có thể thu được từ các sinh vật đa bào (không xương sống và có xương sống). Các ví dụ về các tế bào của động vật không xương sống bao gồm các tế bào của thực vật và các tế bào của côn trùng. Nhiều chủng baculovirut đã được xác định mà có thể được sử

dụng cùng với các tế bào của côn trùng, đặc biệt là để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Các tế bào của vật chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể đã được glycosyl hóa còn có thể thu được từ các sinh vật đa bào (không xương sống và có xương sống). Các ví dụ về các tế bào của động vật không xương sống bao gồm các tế bào của thực vật và các tế bào của côn trùng. Nhiều chủng baculovirut đã được xác định mà có thể được sử dụng cùng với các tế bào của côn trùng, đặc biệt là để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Theo một số phương án, giống cấy tế bào thực vật có thể được dùng làm tế bào chủ. Ví dụ, xem các patent Mỹ số 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, và 6,417,429 (mô tả công nghệ PLANTIBODIES^{TM} để tạo ra các kháng thể ở thực vật chuyển gen).

Theo một số phương án, các tế bào của động vật có xương sống còn có thể được dùng làm vật chủ. Ví dụ, và không giới hạn, các dòng tế bào của động vật có vú mà được làm thích ứng để sinh trưởng trong huyền phù có thể là hữu dụng. Ví dụ không giới hạn về các dòng tế bào hữu dụng của động vật chủ có vú là dòng thận khỉ CV1 đã được biến nạp bởi SV40 (COS-7); dòng thận bào thai người (293 hoặc các tế bào 293 như đã được mô tả, ví dụ, trong: Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); các tế bào thận của chuột đồng sơ sinh (BHK); nguyên bào sinh của chuột (các tế bào TM4 như đã được mô tả, ví dụ, trong: Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); tế bào thận của khỉ (CV1); tế bào thận của khỉ xanh châu Phi (VERO-76); các tế bào ung thư biểu mô cổ tử cung của người (HELA); các tế bào thận của chó (MDCK; các tế bào gan của chuột trâu (BRL 3A); các tế bào phổi của người (W138); các tế bào gan của người (Hep G2); u tuyến vú của chuột (MMT 060562); các tế bào TRI, như đã được mô tả, ví dụ, trong Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); các tế bào MRC 5; và các tế bào FS4. Các dòng tế bào hữu dụng của động vật chủ có vú bao gồm tế bào buồng trứng (CHO) của chuột đồng, bao gồm các tế bào dhfr-CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); và các dòng tế bào u tủy như Y0, NS0 và Sp2/0. Tổng quan về một số dòng tế bào của động vật chủ có vú nhất định thích hợp để sản xuất kháng thể, ví dụ, xem tài liệu: Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, *Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

Theo một số phương án, phương pháp để sản xuất kháng thể đặc hiệu kép và/hoặc đa đặc hiệu bao gồm, nhưng không giới hạn bởi, đồng biểu hiện tái tổ hợp hai cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có các tính đặc hiệu khác nhau (xem tài liệu: Milstein and Cuello, *Nature*305: 537 (1983)), đơn Patent PCT số WO 93/08829, và Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), và kỹ thuật "chỗ phình to-trong-lỗ" (ví dụ, xem patent Mỹ số 5,731,168). Kháng thể đặc hiệu kép còn có thể được tạo ra bằng cách xử lý các tác dụng lái bằng tĩnh điện để tạo ra các phân tử heterođime Fc của kháng thể (WO 2009/089004A1); liên kết ngang hai hoặc nhiều kháng thể hoặc các đoạn (ví dụ, xem patent Mỹ số 4,676,980, và tài liệu: Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); bằng cách sử dụng khóa kéo leuxin để tạo ra các kháng thể lưỡng đặc hiệu (ví dụ, xem tài liệu: Kostelnyet al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); bằng cách áp dụng công nghệ "nhị thể" để tạo ra các đoạn kháng thể đặc hiệu kép (ví dụ, xem tài liệu: Hollinger et al.,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); và bằng cách sử dụng các đime Fv chuỗi đơn (sFv) (ví dụ, xem tài liệu: Gruber et al.,*J. Immunol.*,152:5368 (1994)); và chuẩn bị các kháng thể tam đặc hiệu như đã được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Tutt et al.*J. Immunol*. 147: 60 (1991).

Phân tử đặc hiệu kép và đa đặc hiệu theo sáng chế cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp hóa học (*xem, ví dụ,* Kranz (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 78:5807), phương pháp "polydoma" (*xem, ví dụ,* U.S. Patent 4,474,893), hoặc phương pháp ADN tái tổ hợp. Phân tử đặc hiệu kép và đa đặc hiệu theo sáng chế cũng có thể được chuẩn bị bằng cách tiếp hợp tính đặc hiệu gắn kết thành phần, *ví dụ*, tính đặc hiệu gắn kết epitop thứ nhất và epitop thứ hai, sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực và như được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, và không giới hạn, mỗi tính đặc hiệu gắn kết của phân tử đặc hiệu kép và đa đặc hiệu có thể được tạo một cách riêng rẽ và sau đó đã tiếp hợp với tính đặc hiệu khác. Khi tính đặc hiệu gắn kết là protein hoặc peptit, nhiều tác nhân liên hợp hoặc liên kết ngang có thể được sử dụng để tiếp hợp đồng hóa trị. Ví dụ không giới hạn về tác nhân liên kết ngang bao gồm protein A, carbodiimit, N-succinimidyl-S-acetyl-thioaxetat (SATA), N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP), và sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidometyl) cyclohaxane-1-carboxylat (sulfo-SMCC) (*xem, ví dụ*, Karpovsky (1984) J. *Exp. Med.* 160:1686; Liu (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 82:8648). Các phương pháp khác bao gồm phương pháp được mô tả bởi Paulus (*Behring Ins. Mitt.* (1985) No. 78, 118-132;

Brennan (1985) *Science* 229:81-83), Glennie (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Khi tính đặc hiệu gắn kết là kháng thể (*ví dụ*, hai kháng thể được làm giống như của người), chúng có thể được tiếp hợp nhờ liên kết sulfhydryl của vùng nối vào đầu tận cùng C của hai chuỗi nặng. Theo một số phương án, vùng nối vào có thể được biến đổi để chứa số lẻ lượng dư sulfhydryl, *ví dụ*, một, trước khi tiếp hợp.

Theo một số phương án, cả tính đặc hiệu liên kết của kháng thể đặc hiệu kép có thể được mã hóa trong cùng vectơ và được biểu hiện và lắp trong cùng tế bào chủ. Phương pháp này đặc biệt là hữu dụng khi phân tử đặc hiệu kép và đa đặc hiệu là protein dung hợp MAb x MAb, MAb x Fab, Fab x $F(ab')_2$ hoặc phối tử x Fab. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép theo sáng chế có thể là phân tử chuỗi đơn, như kháng thể đặc hiệu kép chuỗi đơn, phân tử đặc hiệu kép chuỗi đơn chứa một kháng thể chuỗi đơn và thể xác định liên kết, hoặc phân tử đặc hiệu kép chuỗi đơn chứa hai thể xác định liên kết. Phân tử đặc hiệu kép và đa đặc hiệu cũng có thể là phân tử chuỗi đơn hoặc có thể chứa ít nhất hai phân tử chuỗi đơn. Phương pháp chuẩn bị phân tử đặc hiệu kép và đa đặc hiệu được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số 5,260,203; Patent Mỹ số 5,455,030; Patent Mỹ số 4,881,175; Patent Mỹ số 5,132,405; Patent Mỹ số 5,091,513; Patent Mỹ số 5,476,786; Patent Mỹ số 5,013,653; Patent Mỹ số 5,258,498; và Patent Mỹ số 5,482,858. Các kháng thể đã được xử lý có ba hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên chức năng (*ví dụ*, vị trí liên kết epitop) kể cả "các kháng thể Octopus", cũng nằm trong phạm vi của sáng chế (ví dụ, xem US 2006/0025576A1).

Sáng chế còn đề xuất kháng thể đặc hiệu ba, *ví dụ*, ba chức năng. Ví dụ, và không giới hạn, kháng thể đặc hiệu ba theo sáng chế có thể gắn kết với và/hoặc tương tác với epitop có trên KLB, epitop có trên FGFR1, và epitop hoặc kháng nguyên có trên protein thứ ba như, nhưng không giới hạn, PCSK9, GCGR, AdipoR, ZnT8, ApoL1, MSTN, InsR hoặc FABP4.

Theo một số phương án, hệ động vật có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể theo sáng chế. Một hệ động vật để chuẩn bị tế bào lai là hệ chuột. Việc sản xuất tế bào lai ở chuột là quy trình được trang bị đầy đủ. Các quy trình miễn dịch và phương pháp cô lập tế bào lách đã được miễn dịch để dung hợp đã biết trong lĩnh vực. Đối tác dung hợp (*ví dụ*, tế bào u tủy ở chuột) và quy trình dung hợp cũng đã biết (*xem, ví dụ*, Harlow and Lane (1988), Antibodies, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York).

E. Thử nghiệm

Kháng thể theo sáng chế được đề xuất trong bản mô tả này có thể được xác định, được sàng lọc đối với, hoặc được xác định tính chất đối với các tính chất vật lý/hóa học của chúng và/hoặc các hoạt tính sinh học theo các thử nghiệm khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được đề xuất trong bản mô tả này.

1. Thử nghiệm liên kết và các thử nghiệm khác

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể được thử về hoạt tính liên kết với kháng nguyên của nó theo các phương pháp đã biết, như thử nghiệm miễn dịch gắn enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA), phương pháp miễn dịch dùng đánh dấu phóng xạ (radioimmunoassay - RIA), hoặc thử nghiệm thẩm tách Western. Mỗi thử nghiệm này thường phát hiện sự có mặt của phức hệ protein-kháng thể quan tâm cụ thể bằng cách sử dụng chất phản ứng được đánh dấu (*ví dụ*, kháng thể) đặc hiệu cho phức hệ quan tâm. Ví dụ, phức hệ KLB-kháng thể có thể được phát hiện bằng cách sử dụng, *ví dụ*, kháng thể liên kết enzym hoặc mảnh kháng thể mà nhận và liên kết đặc biệt với phức hệ kháng thể-KLB. Theo cách khác, phức hệ có thể được phát hiện bằng cách sử dụng bất kỳ trong số nhiều thử nghiệm miễn dịch khác. Ví dụ, kháng thể có thể được đánh dấu phóng xạ và được sử dụng theo phương pháp miễn dịch dùng đánh dấu phóng xạ (radioimmunoassay - RIA) (*xem, ví dụ*, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, Endocrine Society, March, 1986, mà được kết hợp bằng việc tham khảo trong bản mô tả này). Isotop phóng xạ có thể được phát hiện bằng các phương tiện này như việc sử dụng thiết bị đếm Geiger hoặc thiết bị đếm nhấp nháy hoặc bằng phép tự chụp phóng xạ.

Theo một số phương án, thử nghiệm cạnh tranh có thể được sử dụng để xác định kháng thể cạnh tranh với kháng thể kháng KLB theo sáng chế, *ví dụ*, 12A11 hoặc 8C5, để liên kết với KLB. Theo các phương án nhất định, kháng thể cạnh tranh này liên kết với cùng một biểu vị (ví dụ, biểu vị mạch thẳng hoặc biểu vị cấu hình riêng) mà được liên kết bởi 12A11 hoặc 8C5. Các phương pháp chi tiết làm ví dụ để lập bản đồ biểu vị mà kháng thể liên kết vào đã được bộc lộ trong tài liệu: Morris (1996) "*Epitope Mapping Protocols*", trong *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

Trong ví dụ không giới hạn về thử nghiệm cạnh tranh, KLB được cố định có thể được ủ trong dung dịch chứa kháng thể thứ nhất đã được đánh dấu mà liên kết với KLB (*ví dụ*, 12A11 hoặc 8C5) và kháng thể thứ hai không được đánh dấu mà được thử về khả năng của nó cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để liên kết với KLB. Kháng thể thứ hai có thể có mặt trong dịch nổi chứa tế bào lai. Để làm đối chứng, KLB đã cố định được ủ trong dung dịch chứa kháng thể thứ nhất đã được đánh dấu nhưng không chứa kháng thể thứ hai không được đánh dấu. Sau khi ủ trong các điều kiện cho phép kháng thể thứ nhất liên kết với KLB, lượng kháng thể dư không liên kết được loại bỏ, và lượng chất đánh dấu liên quan đến KLB đã cố định được đo. Nếu lượng chất đánh dấu liên quan đến KLB đã cố định giảm đáng kể trong mẫu thử nghiệm so với mẫu đối chứng, thì điều đó cho thấy rằng kháng thể thứ hai cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để liên kết với KLB. Xem tài liệu: Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Thử nghiệm hoạt tính

Sáng chế đề xuất thử nghiệm để xác định kháng thể kháng KLB của nó có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học có thể bao gồm, *ví dụ*, hoạt hóa phức hệ thụ thể KLB/FGFR1c. Kháng thể có hoạt tính sinh học này *in vivo* và/hoặc *in vitro* cũng được đề xuất. Theo một số phương án, thử nghiệm có thể bao gồm kháng thể liên kết theo sáng chế với tế bào, *ví dụ*, tế bào 293T biểu hiện KLB, và phân tích hoạt tính và/hoặc trạng thái phosphoryl hóa một hoặc nhiều đích ở phía dưới của phức hệ thụ thể KLB-FGFR1c, *ví dụ*, ERK. Theo một số phương án, thử nghiệm có thể bao gồm việc cho đối tượng dùng kháng thể theo sáng chế, *ví dụ*, động vật không phải người, và phân tích tác dụng kháng thể có trên mức glucoza trong đối tượng.

F. Thể tiếp hợp miễn dịch

Sáng chế còn đề xuất thể tiếp hợp miễn dịch chứa kháng thể, được bộc lộ trong bản mô tả này, đã tiếp hợp với một hoặc nhiều tác nhân độc đối với tế bào, như các tác nhân hóa trị liệu hoặc các dược chất, các tác nhân ức chế sự sinh trưởng, các độc tố (ví dụ, các độc tố protein, các độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật, hoặc các đoạn của chúng), hoặc các đồng vị phóng xạ. Ví dụ, kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của đối tượng được bộc lộ có thể được liên kết chức năng (*ví dụ*, bằng liên hợp hóa học, dung hợp di truyền, kết hợp hóa học hoặc khác)

với một hoặc nhiều phân tử liên kết khác, như kháng thể khác, mảnh kháng thể, peptit hoặc ngụy trang liên kết.

Theo một số phương án, thể tiếp hợp miễn dịch là thể tiếp hợp kháng thể-dược chất (antibody-drug conjugate - ADC) trong đó kháng thể được tiếp hợp với một hoặc nhiều dược chất, bao gồm nhưng không giới hạn maytansinoid (*xem* Patent Mỹ số 5.208.020, 5.416.064 và Patent châu Âu EP 0 425 235); auristatin như gốc dược chất monometylauristatin DE và DF (MMAE và MMAF) (*xem* Patent Mỹ số 5.635.483 và 5.780.588, và 7.498.298); dolastatin; calicheamixin hoặc dẫn xuất của chúng (xem Patent Mỹ số 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, và 5.877.296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); và Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); anthraxyclin như daunomyxin hoặc doxorubixin (xem Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); và Patent Mỹ số 6.630.579); metotrexat; vindesin; taxan như doxetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, và ortataxel; trichothecen; và CC1065.

Theo một số phương án, thể tiếp hợp miễn dịch chứa kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này được tiếp hợp với độc tố có hoạt tính enzym hoặc mảnh của nó, bao gồm nhưng không giới hạn chuỗi A bạch hầu, mảnh có hoạt tính không liên kết của độc tố bạch hầu, chuỗi A ngoại độc tố (từ trực khuẩn mủ xanh), chuỗi A rixin, chuỗi A abrin, chuỗi A modecxin, alpha-sarxin, protein Aleurites fordii, protein dianthin, protein Phytolaca americana (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curxin, crotin, chất ức chế sapaonaria officinalis, gelonin, mitogellin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin, và tricothexen.

Theo một số phương án, thể tiếp hợp miễn dịch chứa kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này được tiếp hợp với nguyên tử phóng xạ để tạo thành thể tiếp hợp phóng xạ. Nhiều đồng vị phóng xạ có sẵn để sản xuất thể tiếp hợp phóng xạ. Ví dụ không giới hạn chứa At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} và đồng vị phóng xạ của Lu. Khi thể tiếp hợp phóng xạ được sử dụng để phát hiện, nó có thể bao gồm nguyên tử phóng xạ cho nghiên cứu xạ hình, ví dụ tc99m hoặc I123, hoặc nhãn xoay cho ảnh cộng hưởng từ hạt nhân (nuclear magnetic resonance - NMR) (cũng được biết

là ảnh cộng hưởng từ, mri), như trở lại iot-123, iot-131, indi-111, flo-19, cacbon-13, nitơ-15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắt.

Các thể tiếp hợp của kháng thể và tác nhân độc tế bào có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều tác nhân liên hợp protein có hai nhóm chức như N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidometyl) cyclohexane-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), các chất dẫn xuất có hai nhóm chức của imiđoestes (như đimetyl ađipimiđat HCl), este có hoạt tính phản ứng (như đisucxinimiđyl suberat), alđehyt (như glutaralđehyt), các hợp chất bis-aziđo (như bis (p-azidobenzoyl) hexanđiamin), các chất dẫn xuất của bis-điazoni (như bis-(p-điazonibenzoyl)-etylenđiamin), điisoxyanat (như toluen 2,6-điisoxyanat), và các hợp chất chứa flo có hoạt tính lặp (như 1,5-điflo-2,4-đinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được chuẩn bị như được mô tả trong Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metylđietylen triaminpentaaxetic (MX-DTPA) đã được đánh dấu bằng cacbon-14 là tác nhân chelat hóa làm ví dụ để tiếp hợp nucleotit đã được đánh dấu bằng phóng xạ vào kháng thể. Xem tài liệu: WO94/11026. Nhóm liên kết có thể là "nhóm liên kết dễ phân cắt", tạo điều kiện thuận lợi cho việc giải phóng dược chất độc tế bào trong tế bào. Ví dụ, nhóm liên kết không bền với axit, nhóm liên kết nhạy với peptidaza, các nhóm liên kết nhạy với ánh sáng, nhóm liên kết dimetyl hoặc các nhóm liên kết chứa đisulfua (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); Patent Mỹ số 5.208.020) có thể được sử dụng.

Thể tiếp hợp miễn dịch hoặc ADC trong bản mô tả này rõ ràng dự tính, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thể tiếp hợp này được chuẩn bị với các chất phản ứng liên kết ngang bao gồm, nhưng không giới hạn, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (succinimidyl-(4-vinylsulfone)benzoat) cung cấp trên thị trường (*ví dụ*, từ Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

III. Phương pháp sử dụng

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sử dụng kháng thể được bộc lộ, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1c. Theo một số phương án, phương pháp hướng đến ứng dụng trị liệu của kháng thể theo sáng chế. Theo một số phương án,

phương pháp hướng đến việc sử dụng kháng thể được bộc lộ trong phương pháp chẩn đoán.

A. Phương pháp chẩn đoán và phát hiện

Theo một số phương án, kháng thể bất kỳ được bộc lộ trong bản mô tả này có tính đặc hiệu với KLB, *ví dụ*, kháng thể kháng KLB và/hoặc kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1, được bộc lộ ở trên, có thể hữu dụng để phát hiện sự có mặt của KLB trong mẫu sinh học. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp chẩn đoán và/hoặc phát hiện bệnh sử dụng kháng thể kháng KLB hoặc kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1, được bộc lộ trong bản mô tả này. Thuật ngữ "phát hiện," như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm phát hiện định lượng và/hoặc định tính.

Theo một số phương án không giới hạn, mẫu sinh học bao gồm, nhưng không giới hạn, mẫu trong lâm sàng, một hoặc nhiều tế bào, tế bào trong nuôi cấy, chất nổi trên mặt tế bào, hợp chất dung giải tế bào và mẫu mô. Nguồn mẫu có thể là mô rắn (*ví dụ,* từ bộ phận tươi, đông lạnh và/hoặc bảo quản, mẫu mô, sinh thiết, hoặc chất hút) hoặc tế bào từ cá thể. Theo một số phương án, mẫu sinh học có thể bao gồm một hoặc nhiều tế bào và/hoặc mô từ gan, *ví dụ*, từ gan của đối tượng.

Theo một số phương án, kháng thể kháng KLB dùng trong phương pháp chẩn đoán hoặc phát hiện được đề xuất. Theo khía cạnh khác, phương pháp phát hiện sự có mặt của KLB trong mẫu sinh học được đề xuất. Theo một số phương án, phương pháp chẩn đoán hoặc phát hiện bao gồm việc cho mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể liên kết epitop có trên KLB, như được mô tả trong bản mô tả này, trong các điều kiện cho phép kháng thể liên kết với KLB, và phát hiện liệu phức được tạo ra giữa kháng thể và KLB hay không. Phương pháp này có thể là phương pháp *in vitro* hoặc phương pháp *in vivo*, *ví dụ*, miễn dịch huỳnh quang hoặc thấm tách western. Theo một số phương án, kháng thể kháng KLB được sử dụng để chọn lọc đối tượng phù hợp nhằm điều trị bằng kháng thể kháng KLB, ví dụ, nếu KLB là chất đánh dấu sinh học để chọn lọc bệnh nhân.

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1, dùng trong phương pháp được bộc lộ không có tác động đáng kể lên gan, *ví dụ*, chức năng gan. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế không điều biến hoạt tính của phức hệ thụ thể FGFR/KLB trong gan khi so với điều biến của phức hệ thụ thể FGFR/KLB trong gan bởi protein FGF21. Theo một số phương án,

kháng thể theo sáng chế không dẫn đến sự ức chế của phức hệ FGFR4/KLB và/hoặc không dẫn đến độ cao của enzym gan như, nhưng không giới hạn, ALT, AST, ALP và GLDH. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế không có chức năng làm chất chủ vận của phức hệ FGFR2c/KLB và/hoặc phức hệ FGFR3c/KLB trong gan, có thể dẫn đến tín hiệu MAPK được hoạt hóa và/hoặc biểu hiện được biến đổi của Spry4 và Dusp6 trong gan. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế không dẫn đến sự kích hoạt tín hiệu MAPK trong gan khi so với kích hoạt tín hiệu MAPK bằng protein FGF21. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế không có chức năng làm chất chủ vận của phức hệ FGFR4/KLB trong gan.

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1, dùng trong phương pháp được bộc lộ chứa kháng thể không phong bế liên kết và/hoặc sự tương tác của phối tử FGF, *ví dụ*, FGF19 và FGF21, với phức hệ KLB/FGFR1c. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được bộc lộ trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể điều biến hoạt tính phức hệ KLB/FGFR1c và không phong bế sự tương tác và/hoặc liên kết của phối tử FGF tự nhiên, *ví dụ*, FGF19 và FGF21, với phức hệ KLB/FGFR1c. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được bộc lộ trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể không phong bế liên kết và/hoặc hoạt tính của phối tử FGF tự nhiên với FGF thụ thể không có mặt của KLB. Ví dụ, và không giới hạn, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 theo sáng chế không phong bế sự tương tác của phối tử FGF tự nhiên với phức hệ FGFR1/KLA hoặc chỉ FGFR1. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được bộc lộ trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể không phong bế liên kết và/hoặc hoạt tính của phối tử FGF tự nhiên với KLB không có mặt của FGFR1. Ví dụ, và không giới hạn, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 theo sáng chế không phong bế sự tương tác của phối tử FGF tự nhiên với phức hệ FGFR4/KLB, phức hệ FGFR2c/KLB và/hoặc phức hệ FGFR3c/KLB.

Theo một số phương án, kháng thể kháng KLB, kháng FGFR1c và/hoặc kháng KLB/kháng FGFR1, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép, kháng KLB/kháng FGFR1c dùng trong phương pháp được bộc lộ có thể được đánh dấu. Nhãn bao gồm, nhưng không giới hạn bởi, nhãn hoặc gốc được phát hiện một cách trực tiếp, như huỳnh quang, kỵ màu, mật độ điện tử, chất phát quang hóa học, và chất đánh dấu có hoạt tính phóng xạ, cũng

như các gốc, như các enzym hoặc các phối tử, mà được phát hiện một cách gián tiếp, ví dụ, thông qua phản ứng enzym hoặc tương tác phân tử. Ví dụ không giới hạn về nhãn chứa các đồng vị phóng xạ ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, và ^{131}I, các nhóm huỳnh quang như chelat hoặc floresxein của nguyên tố đất hiếm và các chất dẫn xuất của chúng, rođamin và các chất dẫn xuất của chúng, dansyl, umbelliferon, luxeriferaza, ví dụ, luxiferaza của con đom đóm và luxiferaza của vi khuẩn (patent Mỹ số 4,737,456), luxiferin, 2,3-đihyđrophtalazinđion, peroxiđaza của cây củ cải cay (HRP), phosphataza kiềm, β-galactosiđaza, glucoamylaza, lysozym, sacarit oxiđaza, ví dụ, glucoza oxiđaza, galactoza oxiđaza, và glucoza-6-phosphat đehyđrogenaza,các oxiđaza dị vòng như uricaza và xanthin oxiđaza, liên hợp với enzym mà sử dụng hyđro peroxit để oxy hóa tiền chất nhuộm như HRP, lactoperoxiđaza, hoặc microperoxiđaza, biotin/aviđin, nhãn spin, nhãn thể thực khuẩn, các gốc tự do ổn định, và các chất tương tự.

B. Phương pháp trị liệu

Theo một số phương án, một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh và/hoặc rối loạn ở đối tượng. Ví dụ, nhưng không giới hạn, bệnh có thể là rối loạn chuyển hóa. Ví dụ không giới hạn về rối loạn chuyển hóa bao gồm buồng trứng đa nang (polycystic ovary syndrome - PCOS), hội chứng chuyển hóa (metabolic syndrome - MetS), béo phì, viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (non-alcoholic steatohepatitis - NASH), gan nhiễm mỡ không do rượu bệnh (non-alcoholic fatty liver disease - NAFLD), máu nhiễm mỡ, chứng tăng huyết áp, bệnh đái tháo đường loại 2, bệnh đái tháo đường không phải loại 2, bệnh đái tháo đường loại 1, bệnh đái tháo đường tự miễn tiềm ẩn (latent autoimmune diabetes - LAD) và bệnh đái tháo đường phát thời kỳ trưởng thành ở thanh niên (maturity onset diabetes of the young - MODY). Theo một số phương án, rối loạn chuyển hóa là bệnh đái tháo đường loại 2. Theo một số phương án, rối loạn chuyển hóa là béo phì.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị hội chứng Bardet-Biedl, hội chứng Prader-Willi, hội chứng Alstrom, hội chứng Cohen, bệnh loạn dưỡng di truyền Albright (giả nhược tuyến cận giáp), hội chứng Carpenter, hội chứng MOMO, hội chứng Rubinstein-Taybi, hội chứng nhiễm sắc thể X dễ tổn thương và hội chứng Börjeson-Forssman-Lehman. Theo một số phương án, một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị lão hóa và các bệnh liên quan như bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson và ALS.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị bệnh tim, đột quỵ, đau tim, tăng insulin huyết, áp huyết cao, bệnh động mạch vành, đau nửa đầu hoặc nhức đầu liên quan trực tiếp đến béo phì hoặc chứng tăng huyết áp sọ, suy tim sung huyết, tân sinh, rối loạn lipid máu, thiếu máu, bệnh túi mật, viêm xương khớp, viêm khớp thoái hóa, đĩa thoái hóa, bệnh thoái hóa khớp, thay khớp, bệnh thoái hóa khớp tăng, hen suyễn, viêm phổi lặp lại, chứng sưng màng phổi lặp lại, lặp lại viêm phế quản, hạn chế phổi, trào ngược dạ dày (bệnh trào ngược dạ dày thực quản), lông trên khuôn mặt và cơ thể nhiều (rậm lông), phát ban, nhiễm trùng da mạn tính, ra mồ hôi nhiều, nhiễm nấm âm đạo thường xuyên, không kiểm soát căng thẳng tiết niệu, bất thường kinh nguyệt, rối loạn nội tiết tố, buồng trứng đa nang, vô sinh, ung thư biểu mô (*ví dụ*, vú, ruột kết và ung thư tử cung), ngưng thở khi ngủ, u giả não bộ, bệnh trầm cảm, rối loạn chức năng tâm lý/tình dục, phân biệt chủng tộc và chết sớm.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể dùng trong phương pháp điều trị. Ví dụ, và không giới hạn, sáng chế đề xuất kháng thể, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1, dùng trong phương pháp điều trị đối tượng có rối loạn chuyển hóa, *ví dụ*, PCOS, MetS, béo phì, NASH, NAFLD, máu nhiễm mỡ, chứng tăng huyết áp, bệnh đái tháo đường loại 2, bệnh đái tháo đường không phải loại 2, bệnh đái tháo đường loại 1, LAD, MODY, và lão hóa và các bệnh liên quan như bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson và ALS, bao gồm việc cho cá thể dùng lượng hiệu quả kháng thể, được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/FGFR1, dùng trong phương pháp điều trị đối tượng có bệnh hoặc rối loạn được mô tả ở trên, bao gồm việc cho cá thể dùng lượng hiệu quả kháng thể.

Theo một số phương án, phương pháp có thể còn bao gồm việc cho đối tượng dùng lượng hiệu quả của ít nhất một tác nhân trị liệu bổ sung. Ví dụ không giới hạn về tác nhân trị liệu bổ sung, *ví dụ*, tác nhân trị liệu thứ hai, được mô tả bên dưới.

Theo một số phương án, sáng chế còn đề xuất phương pháp kích thích giảm cân bao gồm việc cho cá thể dùng lượng hiệu quả của một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/FGFR1.

"Cá thể," "bệnh nhân "hoặc "đối tượng," như được sử dụng trao đổi qua lại trong bản mô tả này, dùng để chỉ động vật có vú. Các động vật có vú bao gồm, nhưng không

chỉ giới hạn ở, động vật đã được thuần hóa (ví dụ, bò cái, cừu, mèo, chó, và ngựa), các động vật linh trưởng (ví dụ, người và các động vật linh trưởng không phải là người như khỉ), thỏ, và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột và chuột ratus). Theo các phương án nhất định, cá thể hoặc đối tượng này là người.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1, dùng trong việc hoạt hóa phức hệ đồng thụ thể KLB/FGFR1c, *ví dụ*, ở đối tượng. Ví dụ, và không giới hạn, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 có thể là kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1c. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1, dùng trong phương pháp hoạt hóa phức hệ đồng thụ thể KLB/FGFR1c ở đối tượng. Theo một số phương án, phương pháp bao gồm việc cho đối tượng dùng hữu hiệu kháng thể để hoạt hóa phức hệ thụ thể KLB/FGFR1c.

Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với tác nhân khác trong liệu pháp điều trị. Ví dụ, và không giới hạn, kháng thể theo sáng chế có thể được dùng cùng với ít nhất một tác nhân điều trị bệnh bổ sung. Theo một số phương án, tác nhân trị liệu bổ sung/thứ hai có thể bao gồm tác nhân kháng đái tháo đường, tác nhân kháng béo phì hoặc thuốc để chuyển hóa các điều kiện như, nhưng không giới hạn, thuốc chống tăng huyết áp và statin. Ví dụ không giới hạn về tác nhân trị liệu bổ sung/thứ hai bao gồm metformin, pioglitazon, DPP4i, chất tương tự GLP1, sulfonylure, insulin, chất tương tự Leptin và lorcaserin (*ví dụ*, BELVIQ®).

Sáng chế còn đề xuất sử dụng kháng thể, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1, trong sản xuất hoặc điều chế thuốc. Theo một số phương án, thuốc để điều trị rối loạn chuyển hóa, như được bộc lộ ở trên. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất sử dụng kháng thể trong sản xuất thuốc để điều trị béo phì. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất sử dụng kháng thể trong sản xuất thuốc để điều trị bệnh đái tháo đường loại 2. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm việc cho cá thể dùng lượng hiệu quả của ít nhất một tác nhân trị liệu bổ sung, *ví dụ*, như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, thuốc là để hoạt hóa phức hệ đồng thụ thể KLB/FGFR1c. Theo một số phương án, thuốc có thể được sử dụng trong phương pháp hoạt hóa phức hệ đồng thụ thể KLB/FGFR1c ở cá thể bao gồm việc cho cá thể dùng lượng thuốc hữu hiệu để hoạt hóa phức hệ thụ thể KLB/FGFR1c.

Theo một số phương án, kháng thể dùng trong phương pháp trị liệu được bộc lộ có thể có trong dược phẩm. Theo một số phương án, dược phẩm có thể chứa chất mang dược dụng. Theo một số phương án, dược phẩm có thể chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế.

Bổ sung hoặc theo cách khác, dược phẩm có thể chứa tác nhân trị liệu thứ hai. Khi một hoặc nhiều kháng thể được bộc lộ được áp dụng với tác nhân trị liệu khác, một hoặc nhiều kháng thể và tác nhân trị liệu khác có thể được áp dụng theo thứ tự hoặc đồng thời. Các phép điều trị kết hợp này nêu trên bao gồm việc dùng kết hợp (trong đó hai hoặc nhiều tác nhân điều trị bệnh có trong cùng một dược phẩm hoặc các dược phẩm riêng rẽ), và dùng riêng rẽ, trong trường hợp đó, việc dùng kháng thể theo sáng chế có thể được thực hiện trước khi, đồng thời, và/hoặc sau, việc dùng tác nhân hoặc các tác nhân điều trị bệnh bổ sung. Theo một phương án, việc dùng kháng thể theo sáng chế và việc dùng tác nhân trị liệu bổ sung diễn ra trong khoảng một tháng, hoặc trong khoảng một, hai hoặc ba tuần, hoặc trong khoảng một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu ngày, mỗi cái.

Kháng thể theo sáng chế (và tác nhân trị liệu bổ sung bất kỳ) có thể được áp dụng bằng đường thích hợp bất kỳ, bao gồm ngoài đường tiêu hóa, trong phổi, và trong mũi, và, nếu muốn để điều trị bệnh khu trú, dùng trong vết thương. Cách dùng ngoài đường tiêu hóa bao gồm tiêm bắp, tiêm tĩnh mạch, tiêm động mạch, tiêm trong khoang màng bụng, hoặc tiêm dưới da. Việc dùng liều có thể được thực hiện theo đường thích hợp bất kỳ, ví dụ, đường tiêm, như tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da, phụ thuộc một phần vào liệu việc dùng là ngắn hay trong thời gian dài. Các phác đồ dùng liều khác nhau bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều lần dùng vào các thời điểm khác nhau, tiêm liều cao, và truyền theo nhịp đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Các kháng thể theo sáng chế sẽ được bào chế, định liều, và được dùng qua đường phù hợp với thực tiễn y tế an toàn. Các yếu tố để xem xét trong tình huống này bao gồm rối loạn cụ thể được điều trị, động vật có vú cụ thể được điều trị, tình trạng lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân của rối loạn đó, vị trí phân phối tác nhân, phương pháp dùng, lịch dùng, và các yếu tố khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực y tế đã biết. Kháng thể không nhất thiết cần, nhưng có thể tùy ý, được bào chế với một hoặc nhiều tác nhân hiện được dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn đang quan tâm. Lượng hữu hiệu của các tác nhân khác này phụ thuộc vào lượng kháng thể có mặt trong chế

phẩm, kiểu rối loạn hoặc cách điều trị, và các yếu tố khác nêu trên. Chúng thường được dùng với cùng một liều lượng và qua đường dùng như được bộc lộ trong bản mô tả này, hoặc nằm trong khoảng từ 1% đến 99% liều lượng được bộc lộ trong bản mô tả này, hoặc với liều lượng bất kỳ và qua đường dùng bất kỳ theo kinh nghiệm/được xác định về mặt lâm sàng là thích hợp.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp kháng thể theo sáng chế (khi được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân bổ sung khác điều trị bệnh) sẽ phụ thuộc vào loại bệnh cần được điều trị, loại kháng thể, mức độ nghiêm trọng và tiến triển của bệnh, liệu kháng thể được dùng nhằm mục đích phòng hay nhằm mục đích điều trị bệnh, việc điều trị bệnh trước đó, tiền sử lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng với kháng thể, và suy xét của bác sỹ điều trị. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế có thể được áp dụng trên nền tảng cần thiết. Theo một số phương án, kháng thể có thể được cho bệnh nhân dùng một lần hoặc trên một loạt điều trị. Ví dụ, nhưng không giới hạn, kháng thể và/hoặc dược phẩm bao gồm kháng thể, như được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể được cho đối tượng dùng hai lần mỗi ngày, mỗi ngày một lần, hai ngày một lần, một lần ba ngày, một lần mỗi bốn ngày, một lần mỗi năm ngày, một lần mỗi sáu ngày, mỗi tuần một lần, một lần mỗi hai tuần, một lần ba tuần, mỗi tháng một lần, hai tháng một lần, một lần ba tháng, sáu tháng một lần hoặc một lần mỗi năm.

Theo một số phương án, việc phụ thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng 1 μg/kg đến 15 mg/kg (*ví dụ*, 0,1mg/kg-10mg/kg) kháng thể có thể là liều lượng ban đầu để cho bệnh nhân dùng, ví dụ, bằng một hoặc nhiều lần dùng riêng rẽ, hoặc bằng cách truyền liên tục. Liều lượng hằng ngày thông thường có thể nằm trong khoảng từ 1μg/kg đến 100mg/kg hoặc nhiều hơn, tùy thuộc vào các yếu tố nêu trên. Theo một số phương án, liều hằng ngày có thể cao hơn khoảng 100 mg/kg. Theo một số phương án, liều có thể được điều chỉnh để thu được nồng độ kháng thể huyết tương là 1-1000 μg/ml và theo một số phương pháp 25-300 μg/ml.

Đối với việc dùng lặp lại trong vài ngày hoặc dài hơn, tùy theo tình trạng, việc điều trị bệnh thường có thể cần được duy trì cho đến khi đạt được kết quả mong muốn ngăn chặn các triệu chứng của bệnh. Một liều kháng thể làm ví dụ sẽ nằm trong khoảng từ 0,05mg/kg đến 10mg/kg. Theo một số phương án, một hoặc nhiều liều khoảng 0,5mg/kg, 2,0mg/kg, 4,0mg/kg hoặc 10mg/kg (hoặc kết hợp chúng theo cách bất kỳ) có

thể được cho bệnh nhân dùng. Theo cách khác, kháng thể có thể được áp dụng làm chế phẩm giải phóng từ từ, trong đó trường hợp ít dùng thường xuyên bắt buộc. Liều và tần suất có thể thay đổi dựa trên sự bán tồn kháng thể trong bệnh nhân. Theo một số phương án, liều này có thể được áp dụng theo từng đợt, ví dụ mỗi tuần hoặc ba tuần một lần (ví dụ, sao cho bệnh nhân nhận khoảng hai đến hai mươi, hoặc, ví dụ, khoảng sáu liều kháng thể). Liều ban đầu cao hơn, tiếp theo một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể được dùng.

Theo một số phương án, phương pháp có thể còn bao gồm việc giám sát đối tượng và xác định tác dụng của điều trị. Ví dụ, tiến triển của việc điều trị này có thể được theo dõi một cách dễ dàng theo các kỹ thuật và thử nghiệm thông thường.

IV. Dược phẩm

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể, như được mô tả trong bản mô tả này, với chất mang dược dụng. Theo một số phương án, dược phẩm có thể chứa kết hợp đa (*ví dụ*, hai hoặc nhiều) kháng thể và/hoặc các phần liên kết kháng nguyên của chúng theo sáng chế. Theo một số phương án, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1.

Theo một số phương án, dược phẩm được bộc lộ có thể được điều chế bằng cách kết hợp kháng thể có độ tinh khiết mong muốn này với một hoặc nhiều chất mang dược dụng tùy ý (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), ở dạng chế phẩm đã được sấy khô ở nhiệt độ thấp hoặc dung dịch nước. Ví dụ, nhưng không giới hạn, các chế phẩm chứa kháng thể đã được sấy khô ở nhiệt độ thấp được bộc lộ trong patent Mỹ số 6,267,958. Theo một số phương án, các chế phẩm nước chứa kháng thể có thể bao gồm các chế phẩm đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 6,171,586 và WO2006/044908, các chế phẩm sau bao gồm dung dịch đệm histiđin-axetat. Theo một số phương án, kháng thể có thể có mức độ tinh khiết cao hơn khoảng 80%, cao hơn khoảng 90%, cao hơn khoảng 91%, cao hơn khoảng 92%, cao hơn khoảng 93%, cao hơn khoảng 94%, cao hơn khoảng 95%, cao hơn khoảng 96%, cao hơn khoảng 97%, cao hơn khoảng 98%, cao hơn khoảng 99%, cao hơn khoảng 99,1%, cao hơn khoảng 99,2%, cao hơn khoảng 99,3%, cao hơn khoảng 99,4%, cao hơn khoảng 99,5%, cao hơn khoảng 99,6%, cao hơn khoảng 99,7%, cao hơn khoảng 99,8% hoặc cao hơn khoảng 99,9%.

Chất mang dược dụng thường không độc đối với người nhận ở liều lượng và nồng độ được dùng, và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: các dung dịch đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và methionin; chất bảo quản (như octađexylđimetylbenzyl amoni clorua; hexamethoni clorua; benzalkoni clorua; benzethoni clorua; phenol, butyl hoặc rượu benzylic; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resoxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); các polypeptit có phân tử lượng thấp (khoảng ít hơn 10 gốc); các protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc các globulin miễn dịch; các polyme ưa nước như polyvinylpyrolidon; các axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histiđin, arginin, hoặc lysin; monosacarit, đisacarit, và các hyđrat cacbon khác bao gồm glucoza, manoza, hoặc đextrin; các chất chelat hóa như EDTA; đường như sucroza, manitol, trehaloza hoặc sorbitol; ion trái dấu tạo ra muối như natri; các phức kim loại (ví dụ, phức Zn-protein); và/hoặc chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Các chất mang dược dụng làm ví dụ theo sáng chế còn bao gồm các tác nhân phân tán dược chất trong kẽ như hyaluroniđaza glycoprotein có hoạt tính phản ứng trung hòa (sHASEGP), ví dụ, hyaluroniđaza glycoprotein PH-20 hòa tan của người, như rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Một số sHASEGP nhất định làm ví dụ và phương pháp sử dụng, kể cả rHuPH20, bộc lộ trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2005/0260186 và 2006/0104968. Theo một khía cạnh, sHASEGP được kết hợp với một hoặc nhiều glycosaminoglycanaza bổ sung như chondroitinaza.

Chất mang có thể thích hợp để dùng tiêm tĩnh mạch, tiêm bắp, dưới da, ngoài đường tiêu hóa, tủy sống hay ngoài màng cứng (*ví dụ*, bằng cách tiêm hoặc truyền). Phụ thuộc vào đường dùng, hợp chất có hoạt tính, *tức là*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1, có thể được phủ trong vật liệu để bảo vệ hợp chất khỏi hoạt động của axit và các điều kiện tự nhiên khác có thể bất hoạt hợp chất.

Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được áp dụng trong liệu pháp điều trị kết hợp, *tức là*, kết hợp với các tác nhân khác. Theo một số phương án, dược phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này cũng có thể chứa nhiều hơn một hoạt chất cần thiết cho dấu hiệu cụ thể đang được xử lý, ví dụ, với hoạt tính bổ trợ không tác động bất lợi đến nhau. Theo một số phương án, dược phẩm có thể chứa hoạt chất thứ hai để điều trị bệnh giống như được điều trị bằng trị liệu thứ nhất. Hoạt chất này có một cách thích hợp ở dạng kết hợp với lượng hữu hiệu cho các mục đích sử dụng. Ví dụ, và không giới hạn, chế phẩm

theo sáng chế cũng có thể chứa nhiều hơn một hoạt chất cần thiết cho dấu hiệu cụ thể đang được xử lý, tốt hơn là hoạt chất có hoạt tính bổ trợ mà không tác động bất lợi đến nhau. Ví dụ, có thể mong muốn còn đề xuất trị liệu thứ hai hữu dụng để điều trị bệnh giống nhau. Hoạt chất này có một cách thích hợp ở dạng kết hợp với lượng hữu hiệu cho các mục đích sử dụng.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Đường và/hoặc phương thức dùng thay đổi phụ thuộc vào kết quả mong muốn. Hợp chất có hoạt tính có thể được điều chế với chất mang bảo vệ hợp chất khỏi giải phóng nhanh, chẳng hạn như chế phẩm giải phóng đối chứng, bao gồm cấy ghép, miếng vá qua da, và hệ cung cấp vi bao. Phân huỷ sinh học, polime tương thích sinh học có thể được sử dụng, chẳng hạn như etylen vinyl axetat, polyanhydrit, axit polyglycolic, collagen, polyorthoeste, và axit polylactic. Nhiều phương pháp điều chế chế phẩm này được mô tả bởi ví dụ, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Theo một số phương án, dược phẩm được sản xuất trong các điều kiện thực hành sản xuất tốt (Good Manufacturing Practice - GMP) của cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ.

Chế phẩm giải phóng chậm chứa kháng thể được công bố cũng có thể được điều chế. Các ví dụ thích hợp về chế phẩm giải phóng chậm bao gồm các nền bán thấm bằng polyme rắn kỵ nước chứa kháng thể, mà các nền này ở dạng các vật thể đã được định hình, ví dụ, màng, hoặc vi nang. Theo một số phương án, các thành phần có hoạt tính có thể được bẫy trong vi nang điều chế được, ví dụ, theo kỹ thuật tụ giọt hoặc bằng cách polyme hóa bề mặt, ví dụ, hyđroxymetylxenluloza hoặc vi nang gelatin và vi nang poly-(metylmetaxylat), một cách lần lượt, trong hệ phân phối thuốc keo (ví dụ, các liposom, các vi cầu albumin, vi nhũ tương, hạt nano và viên nang kích cỡ nano) hoặc trong nhũ tương hạt to. Các kỹ thuật này được bộc lộ trong tài liệu: *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Để quản lý kháng thể theo sáng chế bằng một số đường dùng, có thể cần thiết bao phủ hợp chất với, hoặc đồng quản trị hợp chất với, vật liệu để ngăn ngừa nó ngừng hoạt động. Ví dụ, hợp chất có thể được cho đối tượng dùng trong chất mang thích hợp, ví dụ, các liposom, hoặc chất pha loãng. Các chất pha loãng dược dụng bao gồm nước muối và dung dịch đệm nước. Các liposom chứa nhũ tương CGF nước trong dầu trong nước cũng như các liposom thông thường (Strejan et al. (1984) *J. Neuroimmunol.* 7:27).

Chất mang dược dụng chứa dung dịch hoặc thể phân tán nước vô trùng và bột vô trùng cho việc điều chế tức khắc dung dịch hoặc thể phân tán tiêm vô trùng. Việc sử dụng môi trường và tác nhân này cho hoạt chất dược đã được biết trong lĩnh vực. Trừ trong chừng mực môi trường hoặc tác nhân thông thường bất kỳ không tương thích với hoạt chất, ứng dụng của nó trong dược phẩm theo sáng chế là được dự tính đến. Hoạt chất bổ sung cũng có thể được kết hợp vào chế phẩm.

Chế phẩm trị liệu điển hình phải vô trùng, gần như đẳng trương, và ổn định trong các điều kiện sản xuất và lưu trữ. Chế phẩm có thể được bào chế làm dung dịch, vi nhũ tương, liposom, hoặc cấu trúc đặt khác thích hợp với nồng độ dược chất cao. Chất mang có thể là dung môi hay môi trường phân tán chứa, ví dụ, nước, etanol, polyol (ví dụ, glyxerol, propylen glycol, và polyetylen glycol lỏng, và tương tự), và hỗn hợp thích hợp của chúng. Các tính lỏng thích hợp có thể được duy trì, ví dụ, bằng cách sử dụng lớp phủ như lexithin, bằng việc duy trì kích thước hạt cần thiết trong trường hợp phân tán và bằng cách sử dụng chất hoạt động bề mặt. Trong nhiều trường hợp, ưu tiên là chứa tác nhân đẳng trương, ví dụ, đường, rượu đa chức như mannitol, sorbitol, hoặc natri clorua trong chế phẩm. Sự hấp thu kéo dài của chế phẩm tiêm có thể được mang lại bằng cách chứa trong chế phẩm tác nhân làm trễ hấp thụ, ví dụ, muối monostearat và gelatin.

Dung dịch tiêm vô trùng có thể được điều chế bằng cách kết hợp một hoặc nhiều kháng thể được bộc lộ với lượng cần thiết trong dung môi thích hợp với một hoặc kết hợp các thành phần liệt kê ở trên, như yêu cầu, tiếp theo là khử trùng vi lọc, *ví dụ*, bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng. Thông thường, thể phân tán được điều chế bằng cách kết hợp hợp chất có hoạt tính vào chất dẫn vô trùng bao gồm môi trường phân tán kiềm và các thành phần khác cần thiết từ những thành phần liệt kê ở trên. Trong trường hợp bột vô trùng để điều chế dung dịch tiêm vô trùng, phương pháp điều chế được ưu tiên là sấy chân không và đông khô (khô lạnh) tạo ra bột của hoạt chất cộng với thành phần mong muốn bổ sung bất kỳ từ dung dịch đã lọc vô trùng trên đây của nó.

Chế phẩm trị liệu cũng có thể được dùng với thiết bị y tế đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, chế phẩm trị liệu theo sáng chế có thể được dùng với thiết bị tiêm dưới da không cần kim tiêm, như các thiết bị được bộc lộ trong, *ví dụ*, Patent Mỹ số 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824, hoặc 4.596.556. Ví dụ về việc cấy ghép và mô-đun hữu dụng theo sáng chế bao gồm: Patent Mỹ số 4.487.603, bộc lộ bơm vi truyền cấy ghép rót thuốc vào với tốc độ được kiểm soát; Patent Mỹ số 4.486.194,

bộc lộ thiết bị trị liệu để dùng thuốc qua da; Patent Mỹ số 4.447.233, bộc lộ bơm dịch truyền thuốc để cung cấp thuốc với tốc độ dịch truyền chính xác; Patent Mỹ số 4.447.224, bộc lộ thiết bị truyền cấy dòng thay đổi để cung cấp thuốc liên tục; Patent Mỹ số 4.439.196, bộc lộ hệ thống cung cấp thuốc thẩm thấu có khoang nhiều buồng; và Patent Mỹ số 4.475.196, bộc lộ hệ thống cung cấp thuốc thẩm thấu. Nhiều mô cấy, hệ thống cung cấp, và mô-đun như trên khác đã biết.

Với chế phẩm trị liệu, dược phẩm theo sáng chế bao gồm các chế phẩm thích hợp dùng qua đường miệng, mũi, bôi (bao gồm miệng và ngậm dưới lưỡi), trực tràng, âm đạo và/hoặc ngoài đường tiêu hóa. Chế phẩm có thể ở dạng liều đơn vị một cách thuận tiện và có thể được điều chế bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực dược. Lượng kháng thể, có thể kết hợp với vật liệu chất mang để tạo ra dạng liều đơn, thay đổi phụ thuộc vào đối tượng đang được xử lý, và phương pháp dùng cụ thể. Lượng kháng thể có thể kết hợp với vật liệu chất mang để tạo ra dạng liều đơn thường là lượng chế phẩm tạo ra tác dụng trị liệu. Thông thường, trên thang một trăm phần trăm, lượng này nằm trong khoảng 0,01 phần trăm đến khoảng chín mươi chín phần trăm thành phần có hoạt tính, nằm trong khoảng 0,1 phần trăm đến khoảng 70 phần trăm, hoặc nằm trong khoảng 1 phần trăm đến khoảng 30 phần trăm.

Các dạng liều của chế phẩm theo sáng chế dùng tại chỗ hoặc qua da bao gồm bột, thuốc xịt, thuốc mỡ, kem, kem, sữa, gel, dung dịch, mảng và hít. Hợp chất có hoạt tính có thể được trộn lẫn trong các điều kiện vô trùng với chất mang dược dụng, và với chất bảo quản, dung dịch đệm, hoặc chất đẩy bất kỳ mà có thể được yêu cầu.

Các cụm từ "dùng ngoài đường tiêu hóa" và "được áp dụng ngoài đường tiêu hóa" có nghĩa là phương thức dùng khác với dùng đường ruột và bôi, thường là tiêm, và bao gồm, không giới hạn, tiêm và truyền tĩnh mạch, bắp, động mạch, trong vỏ, trong nang, trong hốc mắt, trong tim, trong da, trong màng bụng, qua khí quản, dưới da, dưới cuticun, nội khớp, dưới bao, dưới nhện, trong cột sống, ngoài màng cứng và trong ức.

Các dược phẩm này cũng có thể chứa chất bổ trợ như chất bảo quản, chất thấm ướt, chất nhũ hóa và tác nhân phân phối. Việc ngăn ngừa sự có mặt của vi sinh vật có thể được đảm bảo bởi cả quy trình khử trùng, *phía trên*, và bao gồm các tác nhân kháng vi khuẩn và kháng nấm khác nhau, ví dụ, paraben, clobutanol, axit sorbic phenol, và tương tự. Cũng có thể mong muốn bao gồm tác nhân đẳng trương, như đường, natri

clorua, và tương tự vào chế phẩm. Ngoài ra, sự hấp thu kéo dài của dạng dược phẩm tiêm có thể được mang lại bằng cách bao gồm các tác nhân trì hoãn sự hấp thu như nhôm monostearat và gelatin.

Theo một số phương án, khi kháng thể theo sáng chế được dùng làm dược phẩm, với người và động vật, chúng có thể dùng một mình hoặc là dược phẩm chứa, ví dụ, kháng thể nằm trong khoảng 0,01% đến khoảng 99,5% (hoặc nằm trong khoảng 0,1 đến khoảng 90%), được mô tả trong bản mô tả này, kết hợp với chất mang dược dụng.

V. Vật phẩm

Sáng chế còn đề cập vật phẩm chứa nguyên liệu hữu dụng để điều trị, phòng và/hoặc chẩn đoán các rối loạn nêu trên.

Theo một số phương án, vật phẩm này chứa vật chứa và nhãn hoặc gói tờ in rời lồng vào hoặc kết hợp với vật chứa. Ví dụ không giới hạn về vật chứa thích hợp bao gồm, bình, lọ, bơm tiêm, túi chứa dung dịch để truyền qua đường tĩnh mạch (IV), v.v..Vật chứa có thể được tạo ra từ nhiều loại nguyên liệu như thủy tinh hoặc nhựa. Vật chứa này có thể giữ chế phẩm riêng rẽ hoặc kết hợp với dược phẩm khác có tác dụng điều trị, phòng và/hoặc chẩn đoán rối loạn và có thể có lỗ tiếp xúc vô trùng (ví dụ vật chứa này có thể là túi hoặc lọ đựng dung dịch để dùng qua đường tĩnh mạch có nút xuyên qua được bằng kim tiêm dưới da).

Theo một số phương án, it nhất một hoạt chất trong dược phẩm này là kháng thể theo sáng chế. Nhãn hoặc tờ in rời lồng vào có thể cho thấy rằng dược phẩm này được dùng để điều trị bệnh tình trạng bệnh lý được chọn.

Theo một số phương án, vật phẩm này có thể bao gồm (a) vật chứa thứ nhất với chế phẩm chứa trong đó, trong đó dược phẩm này chứa kháng thể theo sáng chế; và (b) vật chứa thứ hai có chế phẩm chứa trong đó, trong đó dược phẩm này còn chứa tác nhân độc đối với tế bào hoặc tác nhân điều trị khác. Theo một số phương án, vật phẩm có thể còn bao gồm gói cài xen cho thấy rằng các dược phẩm có thể được dùng để điều trị tình trạng bệnh lý cụ thể.

Theo cách khác, hoặc ngoài ra, vật phẩm này có thể còn bao gồm vật chứa bổ sung, *ví dụ*, vật chứa thứ hai hoặc thứ ba, chứa dung dịch đệm dược dụng, như, nhưng không giới hạn, nước kìm hãm vi khuẩn dùng để tiêm (BWFI), nước muối đệm phosphat,

dung dịch Ringer hoặc dung dịch đextroza. Vật phẩm có thể còn chứa các nguyên liệu mong muốn khác dưới góc độ thương mại và dưới góc độ của người sử dụng, bao gồm các dung dịch đệm khác, các chất pha loãng, các dịch lọc, kim tiêm, và bơm tiêm.

Các ví dụ sau chỉ đơn thuần là minh họa sáng chế và không nhằm giới hạn theo bất kỳ cách nào.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Xác định đặc tính của kháng thể chất chủ vận kháng FGFR1

Ba kháng thể có nguồn gốc thực khuẩn thể kháng FGFR1, YW182.2 (cũng được gọi trong bản mô tả này là "R1MAb1"), YW182.3 (cũng được gọi trong bản mô tả này là "R1MAb2"), và YW182.5 (cũng được gọi trong bản mô tả này là "R1MAb3") đã được mô tả trước đây (WO 2012/158704, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn)). Mỗi kháng thể trong số ba kháng thể đóng vai trò là chất chủ vận chọn lọc FGFR1 tiềm năng và đã bộc lộ đặc tính nhạy với insulin ở chuột.

Để hiểu thêm về hoạt tính chủ vận này, khả năng của mảnh Fab của các kháng thể này kích thích FGFR1c được thử nghiệm. Tế bào HEK293 được nuôi cấy trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) + 10% huyết thanh thai nhi bò (FBS), và được gây nhiễm tạm thời với vectơ biểu hiện mã hóa Renilla luxiferaza (pRL-SV40, Promega), FGFR1c, chất hoạt hóa phiên mã (pFA2-Elk1 hoặc pFA2-CREB, Stratagene), và enzym chỉ thị luxiferaza từ đom đóm được thúc đẩy bởi vị trí liên kết GAL4 (pFR-luc, Stratagene), sử dụng chất phản ứng gây nhiễm FUGENE® HD (Roche). Ngày tiếp theo, tế bào đã gây nhiễm được nuôi cấy trong môi trường không có huyết thanh thêm 6-8 giờ và YW182.5 IgG và mỗi kháng thể YW182.2, YW182.3 và YW182.5 được thử nghiệm với nồng độ tăng dần. Hoạt tính luxiferazatrong tế bào được xác định sử dụng Hệ thống Thử nghiệm luxiferaza DUAL-GLO® (Promega) và Máy đọc nhiều nhãn ENVISION® (PerkinElmer). Hoạt tính luxiferaza từ đom đóm được chuẩn hóa với hoạt tính luxiferaza Renilla được đồng biểu hiện. Đáng ngạch nhiên là, YW182.2 Fab, nhưng không phải YW182.3 Fab hoặc YW182.5 Fab, đã bộc lộ hoạt tính kích thích (Fig.1A).

Fig.1B thể hiện thực nghiệm cạnh tranh liên kết được thực hiện để khám phá cơ sở cho sự chênh lệch trong việc kích hoạt FGFR1 bởi YW182.2 Fab và YW182.3 Fab. YW182.2 còn được xác định đặc tính khi so sánh với YW182.3, có ái lực cao, và khi so

sánh với kháng thể kháng FGFR1 ái lực thấp, YW182.5. Cả YW182.2 và YW182.3 cạnh tranh với YW182.5 cho liên kết với FGFR1 miền ngoại tế bào (ECD), thể hiện rằng tất cả 3 kháng thể nhận ra vùng trùng lặp của FGFR1. Tuy nhiên, như được thể hiện trong Fig. 1B, ái lực tương đối của YW182.5 là yếu hơn đáng kể (IC_{50} > 30 lần) so với YW182.2 và YW182.3.

Fig.2A thể hiện ái lực liên kết của kháng thể kháng FGFR1, YW182.2 và YW182.3, với FGFR1b và FGFR1c. Ái lực của kháng thể kháng FGFR1 được xác định để đánh giá liệu sự chênh lệch về ái lực của kháng thể kháng FGFR1 có giải thích sự chênh lệch quan sát được trong hoạt tính kích thích. Ái lực liên kết của các Fab với FGFR1b hoặc FGFR1c sử dụng thiết bị BIACORE® T100 được thực hiện như được mô tả trong Liang et al. *J. Mol. Biol.* 366(3): 815-29 (2007), với các cải biến sau. Kháng thể kháng Fc của người ở chuột đầu tiên được bọc trên chip CM5 dextran carboxymetyl hóa BIAcore sử dụng kết hợp trực tiếp với các nhóm amino tự do theo quy trình được mô tả bởi nhà sản xuất. YW182.2 hoặc YW182.3 sau đó được thu trên chip cảm biến sinh học CM5 để thu được khoảng 200 đơn vị phản ứng (RU). Việc xác định liên kết được thực hiện sử dụng dung dịch đệm hoạt động chứa 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005% chất hoạt động bề mặt P20 (dung dịch đệm HBS-P). Dãy pha loãng 2 lần của protein FGFR1c ECD-His được đưa vào với khoảng 1,5-50 nM trong dung dịch đệm HBS P với tốc độ chảy là 30 µL/phút ở 25°C. Tỷ lệ liên kết (K_{on}, mỗi mol/giây) và tỷ lệ phân ly (K_{off}, mỗi giây) được tính toán sử dụng mô hình liên kết Langmuir một-một đơn giản (Phần mềm đánh giá Biacore phiên bản 3.2). Trạng thái cân bằng hằng số phân ly (K_d, mỗi mol) được tính toàn như tỷ lệ của K_{off} / K_{on}. Như được thể hiện trong Fig. 2A, ái lực của YW182.2 và YW182.3 được quan sát tương tự, thể hiện rằng ái lực có thể không giải thích được sự chênh lệch giữa hoạt tính kích thích của hai kháng thể.

Fig.2B thể hiện khả năng tương tác đặc hiệu của YW182.5 (R1MAb3) với FGFR1. Tương tự YW182.2 và YW182.3, YW182.5 đã thể hiện liên kết đặc hiệu với FGFR1 bằng ELISA (Fig. 2B).

Fig.2C thể hiện hoạt tính kích thích của YW182.5 cho các FGFR khác nhau trong tế bào L6 sử dụng thử nghiệm luxiferaza dựa trên GAL-ELK1 (yếu tố phiên mã 1 tương tự ETS). Đối với thử nghiệm luxiferaza, HEK293T hoặc tế bào L6 của chuột rattus được gây nhiễm tạm thời với vectơ biểu hiện mã hóa thụ thể thích hợp với gen khởi đầu CMV, Renilla luxiferaza (pRL-SV40, Promega), dung hợp chất kích hoạt phiên mã GAL-

ELK1 (pFA2-ELK1, Agilent), và chất chỉ thị luxiferaza của đom đóm được thúc đẩy bởi vị trí liên kết GAL4 (pFR-luc, Agilent), sử dụng Chất phản ứng Gây nhiễm FuGENE HD (Promega). Ngày tiếp theo, tế bào được gây nhiễm được nuôi cấy trong môi trường dựa trên DMEM không có huyết thanh thêm 6-8 giờ chứa phối tử protein thích hợp với nồng độ khác nhau. Hoạt tính luxiferaza trong tế bào được xác định sử dụng Hệ thống Thử nghiệm luxiferaza Dual-Glo (Promega) và Máy đọc nhiều nhãn EnVision (PerkinElmer). Hoạt tính luxiferaza của đom đóm được chuẩn hóa với hoạt tính Renilla luxiferaza được đồng biểu hiện, và được thể hiện như trung bình ± SEM. Tương tự với YW182.2 và YW182.3, YW182.5 hoạt động như chất chủ vận đặc hiệu cho FGFR1 trong tế bào L6 (Fig. 2C).

Hoạt tính kích thích của YW182.5 còn được thử nghiệm trong tế bào HEK293 sử dụng thử nghiệm luxiferaza dựa trên GAL-ELK1được mô tả ở trên. Như được thể hiện trong Fig. 2D, YW182.5 còn hoạt động như chất chủ vận đặc hiệu cho FGFR1c trong thử nghiệm luxiferaza dựa trên GAL-ELK1 trong tế bào HEK293.

Fig.2E thể hiện tác dụng của YW182.5 lên mức glucoza trong máu ở mô hình chuột đái tháo đường. Để xác định mức glucoza trong máu, chuột được mua từ Phòng thí nghiệm Jackson và được duy trì ở cơ sở động vật không có bệnh ở 21°C với chu kỳ 12 giờ sáng/12 giờ tối tiêu chuẩn để tiếp cận với thức ăn (LABDIET® 5010) và nước tự do. Chuột db/db với nền tảng C57BLKS/J là cái và các chuột khác tất cả là đực. Đối với chế độ ăn giàu chất béo, sử dụng khẩu phần ăn giàu carbohydrat, giàu chất béo (Harlan Teklad TD.03584, 58,4 % calo từ chất béo). Mức phosphat và canxi vô cơ huyết thanh được xác định bởi Máy phân tích hóa học COBAS INTEGRA® 400 (Roche). Mức FGF23 huyết thanh được xác định bởi ELISA (Immutopics). Mức glucoza trong máu được xác định bởi máy đo CONTOUR® glucoza (Bayer). Đối với phân tích chất béo ở gan, sử dụng kit định lượng triglyxerit (MBL International). Cholesterol tổng huyết thanh, triglyxerit, β-hydroxybutyrat (Thermo DMA) và axit béo tự do (Roche) được xác định bởi thử nghiệm so màu. ELISA được sử dụng để xác định mức insulin huyết thanh (Crystal Chem), huyết thanh FGF23 (Immutopics), huyết thanh HMW adiponectin của chuột (Alpco) và huyết thanh HMW adiponectin của khỉ (hệ thống R&D). Corticosteron được đo bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (Vanderbilt Hormon Assay & Analytical Services Core). Tất cả chuột được tiêm là khoảng 2-4 tháng tuổi, ngoại trừ chuột thiếu klb, được sử dụng trong thực nghiệm nhất định ở 7-8 tháng tuổi. Theo cách tương tự với

YW182.2 và YW182.3, YW182.5 đã được chuẩn hóa mức glucoza trong máu khi được đưa vào chuột ob/ob đái tháo đường (Fig. 2E).

Ví dụ 2: Xây dựng bản đồ epitop của kháng thể kháng FGFR1

FGFR1 ECD gồm ba miền tương tự Ig được gọi là D1 đến D3. Như được thể hiện trên Fig.1C, hai peptit không trùng lặp (P26: KLHAVPAAKTVKFKCP (SEQ ID NO: 143) và P28: FKPDHRIGGYKVRY (SEQ ID NO: 144) có trong miền D2 của FGFR1 và được xác định trước đây là liên kết với cả YW182.2 và YW182.3 (WO 2012/158704, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Để xác định các gốc trong các peptit này chịu trách nhiện hầu hết cho liên kết kháng thể, protein có chiều dài đầy đủ FGFR1 với các thay thế alanin khác nhau trong vùng epitop được xác định được biểu hiện trong tế bào HEK293 và được thử nghiệm cho liên kết kháng thể bằng thẩm tách western. Như được thể hiện trên Fig.1D, thay thế alanin trong K175, K177, Y205, R208, được loại bỏ liên kết của YW182.2 và YW182.5, mà không tác động lên biểu hiện như được dò bởi miền kháng FGFR1 kháng lại D1 (kháng-D1). Liên kết của YW182.3 được loại bỏ bởi R208A, nhưng không phải bởi các thay thế K175, K177, hoặc Y205.

Khả năng kháng thể hoạt hóa thể đột biến thay thế alanin của FGFR1 *in vivo* được thử nghiệm sử dụng thử nghiệm GAL-ELK1 được mô tả ở trên. Việc hoạt hóa tương quan tốt với đặc tính liên kết của các thể đột biến này với mỗi kháng thể kháng FGFR1 đã được tìm thấy (Fig. 1E). Các kết quả này đề xuất rằng tập hợp các axit amin tương tự trong miền D2 cần cho YW182.2 và YW182.5 liên kết với ái lực dù khác nhau, trong khi tập hợp các axit amin riêng biệt trong cùng vùng là quan trọng với liên kết YW182.3.

Cấu trúc tinh thể của phức hệ 2:2 FGFR ECD/FGF được mô tả trước đó (Plotnikov et al. *Cell* 98(5): 641-50 (1999)). Trong cấu trúc 2:2 homodime FGFR1c ECD/FGF2, một miền D2 tương tác với miền D2 khác, với mỗi liên kết FGF2 với cả hai miền D2 từ hai phía để làm ổn định dime D2 (Fig. 1F). Trong các cấu trúc này, thay thế alanin quan trọng cho liên kết YW182.2 và YW182.5 (K175, K177, Y205, và R208) nằm trong dime D2. Vì YW182.2 Fab hoạt động như chất kích thích, điều này đề xuất rằng YW182.2 Fab có thể liên kết với hai D2 miền đồng thời từ phía mà làm ổn định dime D2, hoạt động chủ yếu như phân tử liên quan tới phối tử FGF. Dựa trên phân tích

thay thế alanin, YW182.5 Fab có thể liên kết tương tự ngoại trừ ái lực thấp hơn nhiều so với YW182.2 Fab.

Ví dụ 3: Phân lập và xác định đặc tính của kháng thể kháng KLB

Chuột Balb/c được chủng ngừa với tế bào HEK293 biểu hiện ổn định protein hFGFR1c và hKLB. Lá lách được thu lại sau 12 tuần và thể lai được tạo ra. Thể lai sinh kháng thể kháng-hKLB được xác định bởi phân tích FACS sử dụng tế bào HEK293 được sử dụng để chủng ngừa. Ngắn gọn là, tế bào 293 biểu hiện chỉ hKLB, chỉ hFGFR1, hoặc cả hai, được nhuộm với phần dịch nổi của thể lai được pha loãng và kháng thể kháng IgG ở chuột của dê được liên hợp với PE (Phòng thí nghiệm Jackson) là dung dịch đệm FACS (0,5% BSA trong PBS). Dung dịch đệm FACS tương tự được sử dụng để rửa tế bào được nhuộm. Tế bào được nhuộm được phân tích bởi FACScan (Becton Dickinson) và phần mềm phân tích FACS FlowJo (Tree Star). cADN mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của IgG được nhân dòng vào vectơ biểu hiện. Tất cả các phân tử kháng thể đơn dòng tái tổ hợp được sinh ra trong tế bào trứng của chuột lang Trung Quốc (CHO) được gây nhiễm tạm thời và được tinh lọc sử dụng sắc ký cột thông thường.

Khoảng 20 thể lai khác nhau sinh kháng thể kháng KLB được xác định. Trình tự chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của CDR của 16 trong số các kháng thể kháng KLB này được thể hiện trong bảng 2 và 3. Trình tự chuỗi nhẹ của 16 trong số các kháng thể kháng KLB này cùng với 8C5 được thể hiện trong Fig. 3A (lần lượt là 11F1, 6D12, 11D4, 8E1, 46C3, 8H7, 21H3, 25F7, 14E6, 14C6, 24A1, 5F8, 6C1, 12A1, 12B8, 14C10 và 8C5; SEQ ID NO: 111-127).

Trình tự chuỗi nặng của16 trong số các kháng thể kháng KLB này cùng với 8C5 được thể hiện trong Fig. 3B (lần lượt là 11F1, 6D12, 11D4, 8E1, 46C3, 8H7, 21H3, 25F7, 14E6, 14C6, 24A1, 5F8, 6C1, 12A1, 12B8, 14C10 và 8C5; SEQ ID NO: 94-110).

Bảng 2. Trình tự CDR H cho kháng thể đơn dòng kháng KLB ở chuột.

Kháng thể	CDR H1	CDR H2	CDR H3
11F1	SYGIS (SEQ ID NO: 1)	TVSSGGRYTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 16)	GGDGYALDY (SEQ ID NO: 32)

6D12	DYYMN (SEQ ID NO: 2)	WIDPENDDTIYDPKFQG (SEQ ID NO: 17)	FTTVFAY (SEQ ID NO: 33)
11D4	NYGVS (SEQ ID NO: 3)	VIWGDGSINYHSALIS (SEQ ID NO: 18)	THDWFDY (SEQ ID NO: 34)
8E1	DTYMN (SEQ ID NO: 4)	RIDPSNGNAKYDPKFQG (SEQ ID NO: 19)	RALGNGYALGY (SEQ ID NO: 35)
46C3	DTYIH (SEQ ID NO: 5)	RIDPANGNTKYDPKFQD (SEQ ID NO: 20)	GTSYSWFAY (SEQ ID NO: 36)
8H7	SYWIH (SEQ ID NO: 6)	EIDPSVSNSNYNQKFKG (SEQ ID NO: 21)	LGVMVYGSSPFWFAY (SEQ ID NO: 37)
21H3	SYWIH (SEQ ID NO: 6)	EIDPSVSNSNYNQKFKG (SEQ ID NO: 21)	LGVMVYGSSPFWFAY (SEQ ID NO: 37)
25F7	DTFTH (SEQ ID NO: 7)	RIDPSNGNTKYDPKFQG (SEQ ID NO: 22)	RALGNGYAMDY (SEQ ID NO: 38)
14E6	EYTMN (SEQ ID NO: 8)	GINPNNGETSYNQKFKG (SEQ ID NO: 23)	KTTNY (SEQ ID NO: 39)
14C6	SYWIE (SEQ ID NO: 9)	EIFPGGGSTIYNENFRD (SEQ ID NO: 24)	RGYYDAAWFDY (SEQ ID NO: 40)
24A1	DYEMH (SEQ ID NO: 10)	AIWPENADSVYNQKFKG (SEQ ID NO: 25)	EGGNY (SEQ ID NO: 41)

5F8	DTYIH (SEQ ID NO: 11)	RIDPANGNTKYDPKFQG (SEQ ID NO: 26)	SGNYGAMDY (SEQ ID NO: 42)
6C1	SYWIE (SEQ ID NO: 9)	EILPGSDSTKYVEKFKV (SEQ ID NO: 27)	GGYHYPGWLVY (SEQ ID NO: 43)
12A11	RYWMS (SEQ ID NO: 12)	EISPDSSTINYTPSLKD (SEQ ID NO: 28)	PSPALDY (SEQ ID NO: 44)
12B8	NYGMN (SEQ ID NO: 13)	WIDTDTGEATYTDDFKG (SEQ ID NO: 29)	EEYGLFGFPY (SEQ ID NO: 45)
14C10	TSAMGIG (SEQ ID NO: 14)	HIWWDDDKRYNPALKS (SEQ ID NO: 30)	IDGIYDGSFYAMDY (SEQ ID NO: 46)
8C5	TYGVH (SEQ ID NO: 15)	VIWSGGSTDYNAAFIS (SEQ ID NO: 31)	DYGSTYVDAIDY (SEQ ID NO: 47)

Bảng 3. Trình tự CDR L cho kháng thể đơn dòng kháng KLB ở chuột.

Kháng thể	CDR L1	CDR L2	CDR L3
11F1	SASQVISNYLN (SEQ ID NO: 48)	FTSSLRS (SEQ ID NO: 63)	QQYSKLPWT (SEQ ID NO: 79)
6D12	SASSSGRYTF (SEQ ID NO: 49)	DTSKLAS (SEQ ID NO: 64)	FQGTGYPLT (SEQ ID NO: 80)
11D4	RASQDISNYFN (SEQ ID NO: 50)	YTSRLQS (SEQ ID NO: 65)	HQVRTLPWT (SEQ ID NO: 81)

8E1	KASDHINNWLA (SEQ ID NO: 51)	GTTNLET (SEQ ID NO: 66)	QQYWNTPFT (SEQ ID NO: 82)
46C3	RSSQNIVHSDGNTYLE (SEQ ID NO: 52)	KVSNRFS (SEQ ID NO: 67)	FQGSHVLT (SEQ ID NO: 83)
8H7	KASQFVSDAVA (SEQ ID NO: 53)	SASYRYT (SEQ ID NO: 68)	QQHYIVPYT (SEQ ID NO: 84)
21H3	KASQFVSDAVA (SEQ ID NO: 53)	SASYRYT (SEQ ID NO: 68)	QQHYIVPYT (SEQ ID NO: 84)
25F7	KASDHINNWLA (SEQ ID NO: 51)	GASNLET (SEQ ID NO: 69)	QQYWNTPFT (SEQ ID NO: 82)
14E6	RASQEISGYLS (SEQ ID NO: 54)	AASTLDS (SEQ ID NO: 70)	LQYGSYPWT (SEQ ID NO: 85)
14C6	SASSSLSSSYLY (SEQ ID NO: 55)	GASNLAS (SEQ ID NO: 71)	HQWSSYPLT (SEQ ID NO: 86)
24A1	KSSQSLLNSGNQKNSLA (SEQ ID NO: 56)	LASTRES (SEQ ID NO: 72)	QQHHSTPYT (SEQ ID NO: 87)
5F8	RASSSVNHMY (SEQ ID NO: 57)	YTSTLAP (SEQ ID NO: 73)	QQFTISPSMYT (SEQ ID NO: 88)
6C1	KASQNVDSYVA (SEQ ID NO: 58)	SASYRFS (SEQ ID NO: 74)	QQYNISPYT (SEQ ID NO: 89)
12A11	RASQSISDYVY (SEQ ID NO: 59)	YASQSIS (SEQ ID NO: 75)	QNGHNFPYT (SEQ ID NO: 90)
12B8	KASEDIYNRLA (SEQ ID NO: 60)	AATSLET (SEQ ID NO: 76)	QQYWSNPLT (SEQ ID NO: 91)

14C10	RASESVDSYGNSFMH (SEQ ID NO: 61)	RASNLES (SEQ ID NO: 77)	QQSNEDYT (SEQ ID NO: 92)
8C5	RASESVESYGNRYMT (SEQ ID NO: 62)	RAANLQS (SEQ ID NO: 78)	QQSNEDPWT (SEQ ID NO: 93)

Hầu hết kháng thể kháng KLB có nguồn từ các thể lai cùng với một kháng thể có nguồn từ thực khuẩn thể (thiết kế Ph#5, thu được bằng cách lọc thực khuẩn thể sử dụng protein hKLB-ECD-HIS tái tổ hợp (Hệ thống R&D) được xếp hạng dựa trên sự thay đổi trung bình được quan sát trong biểu đồ đo FACS với 0,8 μg/ml liên kết của kháng thể với tế bào 293 biểu hiện hKLB (Fig. 4).

Ngoài ra, một số kháng thể được xếp hạng bởi ELISA. Đối với các thực nghiệm này, kháng thể kháng KLB là IgG tái tổ hợp khảm với vùng biến đổi ở chuột và vùng cố định hIgG1 được sử dụng để xác định liên kết với protein hKLB-ECD-HIS. Liên kết tương đối của háng thể được thử nghiệm là tương tự ngoại trừ 14E6, thể hiện liên kết tốt hơn với các điều kiện ELISA so với phân tích FACS (Fig. 5).

Ví dụ 4: Liên kết KLB của kháng thể kháng KLB

Sử dụng ELISA để thử nghiệm cạnh tranh giữa các kháng thể kháng KLB khác nhau. Trong một số thí nghiệm, kháng thể IgG được tinh lọc từ phần dịch nổi của thể lai tương ứng với 6D12, 8C5, và 11F1 được gắn biotin sử dụng kit gắn biotin pha rắn NHS-PEO liên kết EZ (Pierce). Liên kết với protein KLB-ECD-HIS được thử nghiệm sử dụng streptavidin được liên hợp với HRP khi có các nồng độ khác nhau của kháng KLB có nguồn từ thể lai. Trong một số thí nghiệm, liên kết của IgG của người tái tổ hợp với protein KLB-ECD-HIS được thử nghiệm sử dụng HRP liên hợp với kháng IgG của người (Jackson ImmunoResearch Inc.) khi có các nồng độ khác nhau của kháng KLB có nguồn từ thể lai. 11F1, 11D4, 8E1 và 46C3 quan sát được là không cạnh tranh với 6D12 để liên kết (các kháng thể khác không được thử nghiệm với 6D12). Kháng thể kháng KLB 14E6 và 12A11 cạnh tranh cho liên kết với 8C5, nhưng 11D4 và 14C10 thì không (các kháng thể khác không được thử nghiệm với 8C5), và 11D4 cạnh tranh cho liên kết với 11F1, nhưng 6D12, 8E1, và 46C3 (các kháng thể khác không được thử nghiệm với 11F1).

Ví dụ 5: Phản ứng chéo khác loài của kháng thể kháng KLB

Phản ứng chéo khác loài của kháng thể kháng KLB được bộc lộ được phân tích bởi phân tích FACS sử dụng KLB cADN từ chuột, chuột rattus, thỏ, khỉ đuôi dài và khỉ mặt đỏ được nhân dòng vào vectơ biểu hiện của động vật có vú pRK được gây nhiễm tạm thời vào tế bào HEK293T. Trình tự polypeptit của miền ngoại tế bào KLB được biểu hiện như sau:

Chuột:

FSGDGKAIWDKKQYVSPVNPSQLFLYDTFPKNFSWGVGTGAFQVEGS
WKTDGRGPSIWDRYVYSHLRGVNGTDRSTDSYIFLEKDLLALDFLGVSFYQFS
ISWPRLFPNGTVAAVNAQGLRYYRALLDSLVLRNIEPIVTLYHWDLPLTLQEE
YGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAWHGFGTGMH
APGEKGNLTAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGWLSITLGSHWIEP
NRTDNMEDVINCQHSMSSVLGWFANPIHGDGDYPEFMKTGAMIPEFSEAEKE
EVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNVSLNLRQVLNWIKLEYDDPQILI
SENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFDEIRVFGYTAWTLLDGFE
WQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIQDNGFPLKESTPDMKG
RFPCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFTDPHLYVWNVTGNRLLYRVEGVRLKT
RPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWTSILPTGNLSKVNRQVLRYY
RCVVSEGLKLGVFPMVTLYHPTHSHLGLPLPLLSSGGWLNMNTAKAFQDYAE
LCFRELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAHAQVWHLYD
RQYRPVQHGAVSLSLHCDWAEPANPFVDSHWKAAERFLQFEIAWFADPLFKT
GDYPSVMKEYIASKNQRGLSSSVLPRFTAKESRLVKGTVDFYALNHFTTRFVI
HKQLNTNRSVADRDVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGVRKLLAWIRRNYRDRDI
YITANGIDDLALEDDQIRKYYLEKYVQEALKAYLIDKVKIKGYYAFKLTEEKS
KPRFGFFTSDFRAKSSVQFYSKLISSSGLPAENRSPACGQPAEDTDCTICSFLV
(SEQ ID NO: 158).

Chuột Ratus (+N-ter FLAG):

DYKDDDDKLEFSGDGKAIWDKKQYVSPVNPGQLFLYDTFPKNFSWGV
GTGAFQVEGSWKADGRGPSIWDRYVDSHLRGVNSTDRSTDSYVFLEKDLLAL
DFLGVSFYQFSISWPRLFPNGTVAAVNAKGLQYYRALLDSLVLRNIEPIVTLYH
WDLPLTLQEEYGGWKNATMIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVA

WHGFGTGMHAPGEKGNLTAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYDKNFRPHQKGWL
SITLGSHWIEPNRTENMEDVINCQHSMSSVLGWFANPIHGDGDYPEFMKTSSVI
PEFSEAEKEEVRGTADFFAFSFGPNNFRPSNTVVKMGQNVSLNLRQVLNWIKL
EYDNPRILISENGWFTDSYIKTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIKFDEIQVFGYTA
WTLLDGFEWQDAYTTRRGLFYVDFNSEQKERKPKSSAHYYKQIIQDNGFPLQ
ESTPDMKGQFPCDFSWGVTESVLKPEFTVSSPQFTDPHLYVWNVTGNRLLYR
VEGVRLKTRPSQCTDYVSIKKRVEMLAKMKVTHYQFALDWTSILPTGNLSKI
NRQVLRYYRCVVSEGLKLGISPMVTLYHPTHSHLGLPMPLLSSGGWLNTNTA
KAFQDYAGLCFKELGDLVKLWITINEPNRLSDMYNRTSNDTYRAAHNLMIAH
AQVWHLYDRQYRPVQHGAVSLSLHSDWAEPANPYVESHWKAAERFLQFEIA
WFADPLFKTGDYPLAMKEYIASKKQRGLSSSVLPRFTLKESRLVKGTIDFYAL
NHFTTRFVIHKQLNTNCSVADRDVQFLQDITRLSSPSRLAVTPWGMRKLLGWI
RRNYRDMDIYVTANGIDDLALEDDQIRKYYLEKYVQEALKAYLIDKVKIKGY
YAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSVQFYSKLISSSGFSSENRSPACGQPPEDT
ECAICSFLT (SEQ ID NO: 147).

Thỏ (+N-ter FLAG):

DYKDDDDKLDFPGDGRAVWSQNPNLSPVNESQLFLYDTFPKNFFWGV
GTGAFQVEGSWKKDGKGLSVWDHFIATHLNVSSRDGSSDSYIFLEKDLSALDF
LGVSFYQFSISWPRLFPDGTVAVANAKGLQYYNRLLDSLLLRNIEPVVTLYHW
DLPWALQEKYGGWKNETLIDLFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAW
HGYGTGLHAPGEKGNVAAVYTVGHNLLKAHSKVWHNYNRNFRPHQKGWLS
ITLGSHWIEPNRAESIVDILKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEVMTKKLLS
VLPAFSEAEKNEVRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLRQVLNW
IKLEYGNPRILIAENGWFTDSYVQTEDTTAIYMMKNFLNQVLQAIRLDGVRVF
GYTAWSLLDGFEWQDAYNTRRGLFYVDFNSEQRERRPKSSAHYYKQVIGEN
GFTLREATPDLQGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPHLYVWNATGNR
MLHRVEGVRLKTRPAQCTDFITIKKQLEMLARMKVTHFRFALDWASVLPTGN
LSEVNRQALRYYRCVVTEGLKLNISPMVTLYYPTHAHLGLPAPLLHSGGWLD
PSTAKAFRDYAGLCFRELGDLVKLWITINEPNRLSDVYNRTSNDTYQAAHNLL
IAHAIVWHLYDRQYRPSQRGALSLSLHSDWAEPANPYVASHWQAAERFLQFE
IAWFAEPLFKTGDYPVAMREYIASKTRRGLSSSVLPRFSDAERRLVKGAADFY
ALNHFTTRFVMHEQQNGSRYDSDRDVQFLQDITRLASPSRLAVMPWGEGKLL

RWMRNNYGDLDVYITANGIDDQALQNDQLRQYYLEKYVQEALKAYLIDKIKI
KGYYAFKLTEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSIQFYNKLITSNGFPSENGGPRCNQT
QGNPECTVCLLLL (SEQ ID NO: 148).

Khỉ đuôi dài (+N-ter FLAG):

DYKDDDDKLEFSGDGRAVWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGV
GTGALQVEGSWKKDGKGPSIWDHFVHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSAL
DFIGVSFYQFSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYNTLLDSLVLRNIEPIVTLYH
WDLPLALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAW
HGYGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLS
ITLGSHWIEPNRSENTMDILKCQQSMVSVLGWFASPIHGDGDYPEGMKKKLLS
ILPLFSEAEKNEVRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREALNWI
KLEYNNPRILIAENGWFTDSHVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDEIRVFG
YTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENGFS
LKEATPDVQGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPYLYVWNATGNRLL
HRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLPTGNL
SAVNRQALRYYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLGLPEPLLHAGGWLNP
STVEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLLV
AHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFE
IAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTVDFC
ALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLR
WVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDDRLRKYYLEKYLQEVLKAYLIDKVRIK
GYYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSIQFYNKMISSSGFPSENSSSRCSQTQK
NTECTVCLFLA (SEQ ID NO: 149).

Khỉ mặt đỏ (+N-ter FLAG):

DYKDDDDKLEFSGDGRAVWSKNPNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGV
GTGALQVEGSWKKDGKGPSIWDHFVHTHLKNVSSTNGSSDSYIFLEKDLSAL
DFIGVSFYQFSISWPRLFPDGIVTVANAKGLQYYNALLDSLVLRNIEPIVTLYH
WDLPLALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQTFGDRVKYWITIHNPYLVAW
HGYGTGMHAPGEKGNLAAVYTVGHNLIKAHSKVWHNYNTHFRPHQKGWLS
ITLGSHWIEPNRSENTMDILKCQQSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMKKKLL
SILPLFSEAEKNEVRGTADFFAFSFGPNNFKPLNTMAKMGQNVSLNLREALNW

IKLEYNNPQILIAENGWFTDSHVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIRLDEIRVFG
YTAWSLLDGFEWQDAYTIRRGLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENGFS
LKEATPDVQGQFPCDFSWGVTESVLKPESVASSPQFSDPYLYVWNATGNRLL
HRVEGVRLKTRPAQCTDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLPTGNL
SAVNRQALRYYRCVVSEGLKLGISAMVTLYYPTHAHLGLPEPLLHAGGWLNP
STVEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINEPNRLSDIYNRSGNDTYGAAHNLLV
AHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFE
IAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTVDFC
ALNHFTTRFVMHEQLAGSRYDSDRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVRKLLR
WVRRNYGDMDIYITASGIDDQALEDDRLRKYYLEKYLQEVLKAYLIDKVRIK
GYYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSIQFYNKMISSSGFPSENSSSRCSQTQK
NTECTVCLFLV (SEQ ID NO: 150).

Như được thể hiện trong Bảng 4, hầu hết các kháng thể, *ví dụ*, 6D12, 11D4 và 8E1, được thấy có liên kết với KLB từ thỏ, khỉ đuôi dài và khoảng một nửa kháng thể kháng KLB, *ví dụ*, 8C5, 14E6 và 14C6, được thấy có liên kết với KLB chuột và chuột rattus.

Bảng 4. Liên kết của kháng thể kháng KLB ở chuột với KLB từ các loài khác nhau.

Kháng thể kháng KLB	Chuột	Chuột Rattus	Thỏ	Khỉ đuôi dài	Khỉ mặt đỏ
11F1	không	không	không	CÓ	CÓ
6D12	không	không	CÓ	CÓ	CÓ
11D4	không	không	CÓ	CÓ	CÓ
8E1	không	không	CÓ	CÓ	CÓ
46C3	không	không	CÓ	không	không
8H7	Yếu	không	CÓ	CÓ	CÓ
21H3	Yếu	không	CÓ	CÓ	CÓ

25F7	không	không	Yếu	CÓ	CÓ
8C5	CÓ	CÓ	không	CÓ	CÓ
14E6	CÓ	CÓ	CÓ	CÓ	CÓ
14C6	CÓ	CÓ	CÓ	CÓ	CÓ
24A1	CÓ	CÓ	CÓ	CÓ	CÓ
5F8	không	không	CÓ	CÓ	CÓ
6C1	không	không	CÓ	CÓ	CÓ
12A11	Yếu	không	CÓ	CÓ	CÓ
12B8	không	không	CÓ	CÓ	CÓ
14C10	không	không	CÓ	CÓ	CÓ

Ví dụ 6: Xây dựng bản đồ epitop của kháng thể kháng KLB

Để xác định liệu kháng thể kháng KLB không liên kết với miền ngoại tế bào (ECD) của alpha-Klotho của người (hKLA), cấu trúc có trình tự sau được sử dụng:

Trình tự polypeptit được dự đoán được biểu hiện (với FLAG đầu tận cùng C (nội tế bào)):

EPGDGAQTWARFSRPPAPEAAGLFQGTFPDGFLWAVGSAAYQTEGGW
QQHGKGASIWDTFTHHPLAPPGDSRNASLPLGAPSPLQPATGDVASDSYNNVF
RDTEALRELGVTHYRFSISWARVLPNGSAGVPNREGLRYYRRLLERLRELGVQ
PVVTLYHWDLPQRLQDAYGGWANRALADHFRDYAELCFRHFGGQVKYWITI
DNPYVVAWHGYATGRLAPGIRGSPRLGYLVAHNLLLAHAKVWHLYNTSFRP
TQGGQVSIALSSHWINPRRMTDHSIKECQKSLDFVLGWFAKPVFIDGDYPESM
KNNLSSILPDFTESEKKFIKGTADFFALCFGPTLSFQLLDPHMKFRQLESPNLRQ
LLSWIDLEFNHPQIFIVENGWFVSGTTKRDDAKYMYYLKKFIMETLKAIKLDG
VDVIGYTAWSLMDGFEWHRGYSIRRGLFYVDFLSQDKMLLPKSSALFYQKLI

EKNGFPPLPENQPLEGTFPCDFAWGVVDNYIQVDTTLSQFTDLNVYLWDVHH
SKRLIKVDGVVTKKRKSYCVDFAAIQPQIALLQEMHVTHFRFSLDWALILPLG
NQSQVNHTILQYYRCMASELVRVNITPVVALWQPMAPNQGLPRLLARQGAW
ENPYTALAFAEYARLCFQELGHHVKLWITMNEPYTRNMTYSAGHNLLKAHA
LAWHVYNEKFRHAQNGKISIALQADWIEPACPFSQKDKEVAERVLEFDIGWL
AEPIFGSGDYPWVMRDWLNQRNNFLLPYFTEDEKKLIQGTFDFLALSHYTTIL
VDSEKEDPIKYNDYLEVQEMTDITWLNSPSQVAVVPWGLRKVLNWLKFKYG
DLPMYIISNGIDDGLHAEDDQLRVYYMQNYINEALKAHILDGINLCGYFAYSF
NDRTAPRFGLYRYAADQFEPKASMKHYRKIIDSNGFPGPETLERFCPEEFTVCT
ECSFFHTRKSLLAFIAFLFFASIISLSLIFYYSKKGRRSYKLEDYKDDDDK (SEQ ID NO: 151).

Cả KLA và KLB có hai miền giống glycosidaza, một đầu tận cùng N và một đầu tận cùng C. Để xác định vùng KLB được nhận ra bởi kháng thể kháng KLB, hKLB, hKLA và cấu trúc khảm chứa miền giống glycosidaza đầu tận cùng N hKLA và miền giống glycosidaza đầu tận cùng C hKLB được nhân dòng vào vectơ biểu hiện của động vật có vú pCMV-Tag4A (Agilent). Các miền đầu tận cùng N và C của hKLA và hKLB tương ứng với các trình tự lần lượt từ SEQ ID NO: 151 và SEQ ID NO: 145, như được thể hiện trong Bảng 5. Các miền đầu tận cùng N của hKLA và hKLB được chia thành 5 đoạn và các miền đầu tận cùng C được chia thành 5 đoạn dựa trên trình tự tương đồng giữa hai protein.

Bảng 5. Trình tự phụ của KLA và KLB.

Đoạn Polypeptit	Trình tự axit amin
miền giống glycosidaza đầu tận cùng N của KLA	28-469 của SEQ ID NO: 151
miền giống glycosidaza đầu tận cùng C của KLA	486-928 của SEQ ID NO: 151
miền giống glycosidaza đầu tận cùng N của KLB	29-452 của SEQ ID NO: 145

miền giống glycosidaza đầu tận cùng C của KLB	469-923 của SEQ ID NO: 145
Đoạn 1 của KLA ECD	1-94 của SEQ ID NO: 151
Đoạn 2 của KLA ECD	95-201 của SEQ ID NO: 151
Đoạn 3 của KLA ECD	202-329 của SEQ ID NO: 151
Đoạn 4 của KLA ECD	330-442 của SEQ ID NO: 151
Đoạn 5 của KLA ECD	443-472 của SEQ ID NO: 151
Đoạn 6 của KLA ECD	473-529 của SEQ ID NO: 151
Đoạn 7 của KLA ECD	530-613 của SEQ ID NO: 151
Đoạn 8 của KLA ECD	614-729 của SEQ ID NO: 151
Đoạn 9 của KLA ECD	730-831 của SEQ ID NO: 151
Đoạn 10 của KLA ECD	832-944 của SEQ ID NO: 151
Đoạn 1 của KLB ECD	1-77 của SEQ ID NO: 145
Đoạn 2 của KLB ECD	78-184 của SEQ ID NO: 145
Đoạn 3 của KLB ECD	185-313 của SEQ ID NO: 145
Đoạn 4 của KLB ECD	314-425 của SEQ ID NO: 145
Đoạn 5 của KLB ECD	426-455 của SEQ ID NO: 145
Đoạn 6 của KLB ECD	456-514 của SEQ ID NO: 145
Đoạn 7 của KLB ECD	515-598 của SEQ ID NO: 145
Đoạn 8 của KLB ECD	599-722 của SEQ ID NO: 145
Đoạn 9 của KLB ECD	723-829 của SEQ ID NO: 145

Đoạn 10 của KLB ECD	830-992 của SEQ ID NO: 145

Phân tích FACS được thực hiện với kháng thể theo sáng chế và khoảng nửa số kháng thể được quan sát nhận ra đầu tận cùng N miền giống glycosidaza của hKLB, trong khi các kháng thể khác nhận ra đầu tận cùng C miền giống glycosidaza (Bảng 6). Như được thể hiện trong Bảng 6, hai kháng thể nhận ra miền đầu tận cùng N của hKLB bao quanh một phần của miền chứa đoạn 1, trong khi các kháng thể khác chỉ cần đoạn 2-5 cho liên kết.

Bảng 6. Xây dựng bản đồ liên kết của kháng thể kháng KLB của chuột.

Kháng thể kháng KLB	Miền đầu tận cùng N hoặc C-	Đoạn (1-10)
11F1	đầu tận cùng N	1-5
6D12	đầu tận cùng N	1-5
11D4	đầu tận cùng N	2-5
8E1	đầu tận cùng N	2-5
46C3	đầu tận cùng N	2-5
8H7	đầu tận cùng N	2-5
21H3	đầu tận cùng N	2-5
25F7	đầu tận cùng N	2-5
8C5	đầu tận cùng C	5-10
14E6	đầu tận cùng C	5-10
14C6	đầu tận cùng C	5-10
24A1	đầu tận cùng C	5-10

5F8	đầu tận cùng C	5-10
6C1	đầu tận cùng C	5-10
12A11	đầu tận cùng C	5-10
12B8	đầu tận cùng C	5-10
14C10	đầu tận cùng C	5-10

Ví dụ 7: Nhận diện kháng thể đặc hiệu kép hoạt hóa đặc hiệu phức hệ FGFR1c/KLB

Dựa trên khả năng hoạt hóa FGFR1 làm Fab của R1MAb, phân tử gắn kết hợp của R1MAb ái lực thấp hơn với kháng thể kháng KLB ái lực cao hơn được sinh ra để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 (Fig. 6A; WO2012/158704).

Không gắn với lý thuyết cụ thể nào, sự kích hoạt qua trung gian FGF21 được đề xuất hoạt động qua sự lôi kéo của FGF21 đến phức hệ FGFR1c/KLB qua đuôi liên kết KLB đầu tận cùng C, trong khi yếu tố quyết định cho tính đặc hiệucủa FGFR nằm trong vùng đầu tận cùng N, có thể liên kết với FGFR qua tương tác ái lực thấp (*Xem* Fig. 6B) (Yie et al. *FEBS Lett.* 583(1): 19-24 (2009)). Do đó, việc gắn R1MAb1 được làm giảm ái lực với kháng thể kháng KLB ái lực cao như kháng thể đặc hiệu kép có thể tạo ra chất chủ vận FGFR1 phụ thuộc KLB. Không gắn với lý thuyết cụ thể nào, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 chứa nhánh FGFR1 có ái lực thấp có thể giảm nhẹ nguy cơ kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 liên kết chặt chẽ với FGFR1 khi không có KLB và ngăn ngừa việc liên kết và/hoặc kích hoạt FGFR1 bởi các phối tử FGF khác (*ví dụ*, FGF1, FGF2, FGF8 và FGF23). Ngoài ra, nhánh FGFR1 với ái lực thấp có thể cho phép biểu hiện ở mức độ cao hơn của kháng FGFR1 không sạch như, nhưng không giới hạn ở, nửa núm kháng thể kháng FGFR1, đime kháng FGFR1 không cộng hóa trị, đime kháng FGFR1 cộng hóa trị và các loại khối lượng cao phân tử, không dẫn đến các tác dụng phụ nghiêm trọng trong lâm sàng.

Nhìn chung, như được sử dụng trong bản mô tả này, bFKB1, dùng để chỉ kháng thể bất kỳ trong số một vài kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được bộc lộ trong bản mô tả này. Các chi tiết liên quan tới kháng thể đặc hiệu kép kháng

KLB/kháng FGFR1 đặc hiệu được bộc lộ trong các hình vẽ được mô tả dưới đây. Tế bào HEK293 được đồng gây nhiễm với hỗn hợp bốn vectơ biểu hiện mã hóa chuỗi nặng và nhẹ của kháng FGFR1 (YW182.2 (R1MAb1) và YW182.3 (R1MAb2)) và kháng thể kháng KLB được mô tả ở trên. Chuỗi nặng của kháng FGFR1 và kháng KLB lần lượt được gắn nhãn với peptit Flag và Oct-Histidin cao cho IgG heterodime có thể được tinh lọc bởi phương pháp tinh lọc ái lực trình tự từ môi trường có điều chỉnh. IgG heterodime được tinh lọc một phần sau đó được phân tích trong GAL-ELK1 dựa trên thử nghiệm luxiferaza để xác định chất chủ vận phụ thuộc KLB. Để giảm thiểu sự bắt cặp lỗi của chuỗi nặng và nhẹ, kháng FGFR1 được biểu hiện với vùng cố định Fab của người, và kháng KLB được biểu hiện với vùng cố định Fab của chuột. IgG đặc hiệu kép được gắn nhãn được thử nghiệm ban đầu ở dạng thô sử dụng 28 hỗn hợp của 3 kháng R1MAb và 18 kháng thể kháng KLB (Bảng 7).

Fig. 7A thể hiện dữ liệu cảm ứng cho hỗn hợp đặc hiệu kép nhất định của YW182.2 (R1MAb1), YW182.3 (R1MAb2) và YW182.5 (R1MAb3) với 18C5, 12A11 và 14E6 trong thử nghiệm luxiferaza GAL-ELK1. Trong hầu hết các trường hợp, kháng thể đặc hiệu kép được thấy rằng đã hoạt hóa tín hiệu đáng kể tốt hơn trong tế bào được đồng biểu hiện FGFR1c và KLB so với tế bào chỉ được biểu hiện FGFR1c, nhưng không phải KLB.

Dựa trên hoạt tính của các kháng thể này trong các thực nghiệm ban đầu này, 8 đại diện kháng thể kháng KLB (Ph#5, 8C5, 12A11, 14C10, 6D12, 11D4, 6C1 và, như một đối chứng âm, 14E6) được sử dụng để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép không được gắn nhãn với YW182.5 (bằng cách sử dụng kỹ thuật được mô tả núm-lỗtrước đây cho việc xác định đặc tính hơn nữa (ở trên, và, *ví dụ*, Atwell, et al. *FEBS Lett.* 583(1): 19-24 (2009)). Như được thể hiện trong Fig. 8A, kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra với vùng cố định IgG1 của người (kiểu tự nhiên, với chất tác động chức năng (1)) và với vùng cố định IgG1 của người với đột biến N297G để loại bỏ chất tác động chức năng (3), hoặc vùng cố định của chuột với đột biến kép [D265G/N297G] (DANG) để loại bỏ chất tác động chức năng (2).

Bảng 7 bên dưới liệt kê các kháng thể đặc hiệu kép khác nhau được tạo ra sử dụng kỹ thuật núm-trong-lỗ.

Bảng 7. Kháng thể kháng KLB/kháng FGFR1 đặc hiệu kép

BsAb ID số	Nhánh kháng FGFR1	Nền kháng FGFR1	Nhánh kháng KLB	Nền kháng KLB
1	YW182.3	IgG1 của người	Ph#5	IgG1 của người
2	YW182.2	IgG1 của người	Ph#5	IgG1 của người
3	YW182.3	IgG1 của người	14E6	VH/VL Chuột - Khảm IgG1 của người
4	YW182.3	IgG1 của người	8C5 (KLBmAb1)	VH/VL Chuột - Khảm IgG1 của người
5	YW182.5	IgG1 của người	11D4 (KLBmAb5)	VH/VL Chuột - Khảm IgG1 của người
6	YW182.5	IgG1 của người	14C10 (KLBmAb3)	VH/VL Chuột-Khảm IgG1 của người
7	YW182.5	IgG1 của người	6C1 (KLBmAb4)	VH/VL Chuột-Khảm IgG1 của người
8	YW182.5	IgG1 của người	6D12 (KLBmAb6)	VH/VL Chuột-Khảm IgG1 của người
9	YW182.5	IgG1 của người	12A11 (KLBmAb2)	VH/VL Chuột-Khảm IgG1 của người
10	YW182.5	IgG1 của người	8C5 (KLBmAb1)	VH/VL Chuột-Khảm IgG1 của người

11	YW182.5	IgG1 N297G của người	8C5.K4H3.RNL	IgG1 N297G của người
12	YW182.5	IgG1 N297G của người	8C5.K4H3.KNV	IgG1 N297G của người
13	YW182.5	IgG1 N297G của người	8C5.K4H3.M4L.KNV	IgG1 của người
14	YW182.5	IgG1 N297G của người	8C5.K4H3.M4L.KNV	IgG1 N297G của người
15	YW182.5_W33Y	IgG1 N297G của người	8C5.K4H3.M4L.KNV	IgG1 N297G của người
16	YW182.2_W33Y	IgG1 N297G của người	8C5.K4H3.M4L.KNV	IgG1 N297G của người
17	YW182.5_YGDY	IgG1 N297G của người	8C5.K4H3.M4L.KNV	IgG1 N297G của người
18	YW182.2_YA	IgG1 N297G của người	8C5.K4H3.M4L.KNV	IgG1 N297G của người
19	YW182.5	IgG1 N297G của người	8C5_W52Y.K4H3.M4L.KNV	IgG1 N297G của người
20	YW182.5	VH/VL Người - DANG khảm IgG2a ở Chuột	Chuột 8C5	DANG IgG2a ở Chuột

IgG đối chứng kiểu tương đương được sử dụng là kháng cỏ phấn hương (IgG2a của chuột) hoặc kháng Her2 trastuzumab của người (IgG1 của người). Các mảnh Fab được biểu hiện trong *E. coli* và được tinh lọc sử dụng sắc ký cột thông thường. FGF21 tái tổ hợp từ hệ thống R&D (2539-FG/CF) ngoại trừ thử nghiệm liên kết tế bào phối tử phóng xạ, được thực hiện với FGF21 được iot hóa từ Phoenix Pharmaceuticals và FGF21 không được đánh dấu được tạo ra trong nhà. Mỗi hỗn hợp trong các hỗn hợp đặc

hiệu kép (ngoại trừ đối chứng âm) đã thể hiện tín hiệu phụ thuộc vào cả FGFR1c và KLB. Dữ liệu cho hỗn hợp nhất định được thể hiện trong Fig. 7B. Ngoài ra, sự kết hợp của nhánh kháng KLB với nhánh YW182.5 (R1MAb3) đã thể hiện tín hiệu nhiễu thấp trong tế bào được biểu hiện FGFR1c, nhưng không phải KLB.

Như được thể hiện trong Fig. 6C, hoạt tính của kháng thể kháng KLB/kháng-FGFR1c (BsAb17) được thử nghiệm trong tế bào HEK293 thiếu FGFR1 biểu hiện các thụ thể khác nhau. Tế bào HEK293 thiếu FGFR1 được tạo ra sử dụng phương pháp CRISPR-cas9 sử dụng ARN dẫn đường. Kháng thể kháng KLB/kháng FGFR1c được quan sát để kích thích hoạt tính luxiferaza trong tế bào đồng biểu hiện hFGFR1c và hKLB tái tổ hợp (Fig. 6C).

Các kết quả tương tự được quan sát cho các kháng thể kháng KLB/kháng-FGFR1c khác. Như được thể hiện trong Fig. 7C, khi được thử nghiệm trong thử nghiệm luxiferaza dựa trên GAL-ELK1 trong tế bào HEK293 biểu hiện FGFR1c có hoặc không có KLB, nhiều hỗn hợp kháng thể đặc hiệu kép của nhánh kháng FGFR1 và kháng KLB, *ví dụ*, BsAb5, 6, 7, 8, 9, 10, kích thích hoạt tính luxiferaza theo cách phụ thuộc vào liều trong tế bào biểu hiện hFGFR1c và hKLB tái tổ hợp, nhưng không trong tế bào không biểu hiện KLB. Các kết quả này thể hiện rằng các kháng thể đặc hiệu kép này hoạt động như chất chủ vận FGFR phụ thuộc KLB, chỉ như FGF21.

Sự hợp lực của kháng thể kháng KLB/kháng-FGFR1c (BsAb17) với FGF21 cũng được thử nghiệm. Như được thể hiện trong Fig. 9B, sự hợp lực giữa BsAb17 và FGF21 không quan sát thấy khi nồng độ của FGF21 tăng lên dần dần và nồng độ của BsAb17 được giữ nguyên.

Ngoài ra, vì nồng độ của kháng thể kháng KLB/kháng-FGFR1c (BsAb17) tăng lên dần dần và nồng độ của FGF21 được giữ nguyên, nên không quan sát thấy sự hợp lực giữa BsAb17 và FGF21 được quan sát (Fig. 9C).

Ái lực liên kết dung dịch (K_d) của hai kháng thể đặc hiệu kép, BsAb10 và BsAb9, (cùng với hFGF21) với tế bào HEK293 biểu hiện KLB từ người, khỉ đuôi dài và chuột, FGFR1c ở người, hoặc cả hFGFR1c và hKLB được đo bằng thử nghiệm liên kết phối tử được đánh dấu phóng xạ. Đối với thử nghiệm liên kết tế bào phối tử phóng xạ, tế bào HEK293 đồng biểu hiện ổn định KLB và/hoặc FGFR1c được đặt trong đĩa 96 giếng với mật độ là 100000 đến 200000 tế bào mỗi 0,2 mL trong dung dịch đệm liên kết (DMEM

với 1% albumin huyết thanh bò (BSA), 50 mM HEPES, pH 7,2, 0,1% natri azit và 350 mM IgG người). Hỗn hợp phản ứng cạnh tranh của 50 µL chứa FGF21 iot hóa với hàm lượng cố định (Phoenix Pharmaceuticals) hoặc BsAb iot hóa, và FGF21 không được đánh dấu (Genentech) hoặc BsAb không được đánh dấu với hàm lượng được pha loãng theo dãy đựa đưa vào tế bào. Phản ứng cạnh tranh với tế bào được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau 2 giờ nuôi cấy, phản ứng cạnh tranh được vận chuyển tới tấm lọc đa lọc lỗ rất nhỏ và được rửa bốn lần với dung dịch đệm liên kết để tách FGF21 iot hóa hoặc kháng thể tự do từ FGF21 iot hóa hoặc kháng thể đã liên kết. Các phần lọc được đếm trên máy đếm gamma Wallac Wizard 1470 (PerkinElmer Life và Analytical Sciences). Dữ liệu liên kết được đánh giá sử dụng phần mềm New Ligand (Genentech), sử dụng thuật toán làm phù hợp của Munson và Rodbard (Munson và Rodbard *Anal. Biochem.* 107, 220-239 (1980)) để xác định ái lực liên kết.

Như được thể hiện trong Bảng 8, cả hai kháng thể đã bộc lộ một số tương tác tốt với tế bào chỉ biểu hiện KLB (trong mô hình khác loài thống nhất với cái quan sát được trước đó), nhưng cả hai liên kết yếu hơn nhiều với tế bào chỉ biểu hiện hFGFR1c và mạnh hơn nhiều với tế bào biểu hiện cả hKLB và hFGFR1c.

Bảng 8. Liên kết của kháng thể kháng KLB đặc hiệu kép với KLB/FGFR1 từ các loài khác nhau.

FGFR1c	(không)	(không)	(không)	Người	Người
KLB	Người	Chó	Chuột	Người	(không)
BsAb10	6,6 nM	15,4 nM	15,5 nM	2,3 nM	300 nM
BsAb9	9,8 nM	35 nM	n.d.	2,2 nM	300 nM
hFGF21	n.d.	n.d.	n.d.	5,3 nM	n.d.

Fig. 9D thể hiện ái lực của BsAb10 và BsAb9 với tế bào HEK293 biểu hiện ổn định hKLB, hFGFR1c, hoặc cả hai, như được so sánh với kháng thể có hai nhánh liên kết kháng FGFR1tương ứng (YW182.5) sử dụng phân tích FACS. Kết quả tương tự thu được với các chỉ thị ở trên (Fig. 9D).

Các thực nghiệm khác được tiến hành với một kháng thể đặc hiệu kép, BsAb10, có YW182.5 là nhánh kháng FGFR1 và 8C5 là nhánh kháng KLB, và dẫn xuất của BsAb10 (BsAb11-20). Như được thể hiện trong Fig. 6C, thụ thể của chuột được biểu hiện trong tế bào HEK293 và đã thể hiện rằng BsAb17 cũng kích thích hoạt tính luxiferaza trong các tế bào này, xác nhận tương tác khác loài của kháng thể này.

BsAb10 sau đó được thử nghiệm trong tế bào nguyên bào cơ L6 của chuột rattus thiếu KLB và FGFR nội sinh, nhưng được gây nhiễm để biểu hiện hKLB và mỗi loại trong 5 loại đồng dạng hFGFR (Fig. 9A). BsAb10 kích thích hoạt tính luxiferaza chỉ trong tế bào biểu hiện cả FGFR1c và KLB, thể hiện rằng BsAb10 hoạt động như chất chủ vận đặc hiệu với phức hệ FGFR1c/KLB nhưng không phải KLB trong phức hệ với các FGFR khác (Fig. 9A). FGF21 và FGF19 được sử dụng là đối chứngs để chứng minh rằng FGF21 kích thích hoạt tính luxiferaza khi tế bào được biểu hiện kết hợp của KLB và một trong số FGFR1c, 2c, hoặc 3c, và FGF19 kích thích hoạt tính trong tế bào được biểu hiện kết hợp của KLB và FGFR4. FGF21 tái tổ hợp từ hệ thống R&D (2539-FG/CF) ngoại trừ thử nghiệm liên kết tế bào phối tử phóng xạ, được thực hiện với FGF21 iot hóa từ Phoenix Pharmaceuticals và FGF21 không được đánh dấu được tạo ra trong nhà. Các cADN mã hóa miền ngoại tế bào (ECD) của người FGFR1b, 1c, 2b, 2c, 3b, 3c, và 4 được nhân dòng vào vectơ biểu hiện chứa gen khởi đầu cytomegalovirus (CMV) để tạo ra FGFR của người - protein khảm Fc của người hoặc protein FGFR được gắn nhãn His.

Tuy nhiên, như được mô tả ở trên, kháng thể kháng-FGFR1c bố mẹ, R1MAb3 (YW182.5) của BsAb10 có thể, đáng ngạc nhiên là, liên kết với FGFR1b, đồng dạnh của FGFR1 không tương tác với KLB. Ngoài ra, R1MAb3 (YW182.5) và có thể hoạt hóa FGFR1b trong thử nghiệm GAL-ELK1 trong tế bào L6, trái ngược với hoạt tính của BsAb10 (xem Fig. 2C và 2B).

Ngoài ra, sự kết hợp của FGFR1b và KLB không giúp kích hoạt bởi BsAb10 (Fig. 9A). Không gắn với lý thuyết cụ thể, những dữ liệu này đề xuất rằng sự có mặt của phức hệ FGFR1/KLB tạo sẵn là điều kiện cho sự kích hoạt FGFR1 bởi BsAb10 phụ thuộc KLB.

<u>Ví dụ 8: BsAb10, và dẫn xuất của nó, hoạt động như giả phân tử của FGF21</u>

Sự xác định đặc tính khác của BsAb10 và dẫn xuất của nó (BsAb11-20) và FGF21 thể hiện một số tương đồng và khác biệt. Để xác định mức phosphoryl hóa của trung gian tín hiệu MAPK, tế bào được nuôi trong môi trường 2 gốc tiền tế bào tạo mỡ chứa FBS, L-glutamin và GA-1000. Sau khi hòa nhập, tiền tế bào tạo mỡ dưới da (nhận từ Lonza) được biệt hóa trong môi trường sinh trưởng chứa dexametason, indometaxin, và 3-isobutyl-1-metylxantin (IBMX). Với phân tích biểu hiện gen, tế bào được biệt hóa trong 14 ngày, và sau đó còn được nuôi cấy thêm trong 48 giờ với chất chủ vận chỉ thị. Với phân tích tín hiệu MAPK, tế bào được biệt hóa trong 10 ngày, nuôi trong môi trường không có huyết thanh trong 3 giờ, và sau đó còn được nuôi cấy thêm trong 1 giờ với chất chủ vận chỉ thị.

Như được thể hiện trên Fig. 6D, BsAb10, BsAb17, BsAb20, và FGF21 đã thể hiện hoạt tính có thể so sánh để gây ra sự phosphoryl hóa của trung gian tín hiệu MAPK như MEK và ERK trong tế bào tạo mỡ chính của người, thể hiện kiểu tế bào liên quan với hoạt tính chống đái tháo đường của FGF21, như được xác định bởi thẩm tách western. Kháng thể được sử dụng cho phân tích thẩm tách western là từ kỹ thuật tín hiệu tế bào: pFRS2a (T196) (#3864), pMEK1/2 (S217/221) (#9154), pERK1/2 (T202/204) (#4370), ERK1/2 (#4695), HSP90 (#4874), β-Actin (#5125), từ abcam: UCP1 (ab10983), hoặc từ Hệ thống R&D: KLB (AF2619).

Như được thể hiện trong Fig. 8B, sự tăng phosphoryl hóa của ERK, được biểu hiện là số lần thay đổi trong mức pERK, được quan sát trong tế bào tạo mỡ chính của người được xử lý với BsAb10, BsAb17, BsAb20 hoặc FGF21.

Ngoài ra, profin ái lực của BsAb10 giống với FGF21. Khi được thử nghiệm bằng FACS, BsAb10 đã thể hiện liên kết mạnh với tế bào biểu hiện hKLB, liệu FGFR1c có được đồng biểu hiện hay không (Fig. 10A). Đáng ngạc nhiên theo cách nào đó, liên kết rất nhỏ của BsAb10 được quan sát khi tế bào được biểu hiện FGFR1c, nhưng không phải KLB, biểu hiện rằng ái lực đơn hóa trị của nhánh YW182.5 là rất thấp (Fig. 10A).

Như được thể hiện trong Fig. 10B, thử nghiệm phối tử được đánh dấu phóng xạ thể hiện rằng hằng số phân ly (K_d) của BsAb10 với tế bào biểu hiện cả FGFR1c và KLB là 2,3 nM, gần với 5,3 nM được quan sát cho hFGF21 trong cách thử nghiệm tương tự. Các trị số này gần với EC_{50} được quan sát của các phân tử này trong thử nghiệm GAL-ELK1 trong tế bào HEK293 (3,2 nM và 4,7 nM, tương ứng với BsAb10 và FGF21. Khi

tế bào biểu hiện KLB người một mình, hoặc KLB chuột một mình, K_d lần lượt là 6,6 nM và 15,5 nM.

Vì ái lực với FGFR1 là rất thấp, thử nghiệm phối tử được đánh dấu phóng xạ không xác định một cách đáng tin cậy K_d của BsAb10 với tế bào chỉ biểu hiện FGFR1c, nhưng nó được ước tính là > 300 nM, như được thể hiện trong Fig. 3B. Vì lí do tương tự, động học liên kết của BsAb10 với FGFR1 cũng không được xác định một cách đáng tin cậy bởi SPR.

Ngoài ra, sự tương tác giữa FGFR1c-ECD và protein KLB-ECD được làm ổn định bởi BsAb10 như được quan sát trước đó cho FGF21, thống nhất với quan niệm là BsAb10 hoạt động như FGF-21 giả chọn lọc FGFR1c (Fig. 11) (Yie et al., *Chemical Biology; Drug Design* 79, 398-410 (2012)). Tương tác FGFR1/KLB/ BsAb10 được nghiên cứu bằng phép đo bề mặt cộng hưởng plasmon (SPR) trên thiết bị PROTEON™ XPR36 (Bio-Rad Laboratories) ở 25°C. Protein FGFR1-HIS (20µg/ml) ở pH 4,5 được cố định ở mật độ bề mặt (1000 RU) trên chip cảm biến PROTEON™ GLC được kích hoạt sử dụng quy trình kết hợp amin tiêu chuẩn như được mô tả bởi nhà sản xuất. BsAb10 và/hoặc hỗn hợp 1:1 của BsAb10 và KLB-ECD được đưa vào với 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, hoặc 200 nM trong PBS chứa 0,005% v/v TWEEN®-20, 0,3M NaCl (pH7,4) với tốc độ chảy là 80 µl/ phút và biểu đồ cảm biến cho pha kết hợp và pha phân ly được ghi lại. Chất phân tích được đưa vào trong 300 giây và được để cho phân ly trong 600 giây. Dữ liệu được tham khảo với liên điểm, được xử lý, và hằng số phân ly được đo với phần mềm quản lý PROTEON™ (phiên bản 3.0, Bio-Rad). Việc kích hoạt phức hệ FGFR1c/KLB bởi BsAb10 đề xuất sự tạo thành phức hệ bậc ba bởi FGFR1c-ECD, KLB-ECD và BsAb10.

Như được thể hiện trong Fig. 11, BsAb10 tạo phức hệ bậc ba với KLB-ECD tái tổ hợp và FGF21 hoặc FGF19 được quan sát thấy. Sự tương tác của BsAb10/KLB/FGF được nghiên cứu bởi phương pháp đo giao thoa lớp sinh học (BLI) trên thiết bị Octet RED (ForteBio) ở 25°C. BsAb10 (20 µg/ml) ở pH 4,5 được cố định trên đầu của cảm biến sinh học phản ứng amin được hoạt hóa như được mô tả bởi nhà sản xuất. KLB-ECD (20µg/ml) trong PBS chứa 0,005% v/v TWEEN®-20, 0,3M NaCl (pH 7,4) được giữ trên đầu của cùng một cảm biến sinh học và được đo với FGF21 (Hệ thống R&D) ở 0, 0,2, 0,8, hoặc 2 µM trong cùng dung dịch đệm. Dữ liệu định lượng được xử lý với phần mềm nhận dữ liệu (ForteBio).

Fig. 12A thể hiện sơ đồ của thực nghiệm chuyển năng lượng cộng hưởng huỳnh quang trong thời gian vận hành trên bề mặt tế bào (TR-FRET) được thực hiện. Đối với TR-FRET, tế bào COS7 được đồng gây nhiễm để biểu hiện FGFR1 được gắn nhãn SNAP và KLB không được đánh dấu và được gieo cấy trong đĩa 96 giếng màu trắng (Costar) với 100000 tế bào mỗi giếng. Tế bào được gây nhiễm được đánh dấu 24 giờ sau gây nhiễm với 100 nM thể cho liên hợp với benzylguanin SNAP-Lumi4-Tb (Cisbio) và 1 μM thể nhận liên hợp với benzyl-guanin SNAPAlexa647 (NEB) trong 1 giờ ở 37°C, 5% CO_2. Sau ba lần rửa, lượng phát xạ Lumi4-Tb và tín hiệu TR-FRET được ghi nhận lần lượt ở 620 nm và 665 nm, trong 400 μs sau 60 μs làm chậm sau khi kích thích laze ở 343 nm sử dụng máy đọc đĩa Safire2 (Tecan) ở t=0 và t=15 phút sau khi bổ sung phối tử. Lượng phát xạ tín hiệu của Alexa647 được phát hiện ở 682 nm sau khi khích thích ở 640 nm sử dụng cùng máy đọc đĩa. Cường độ FRET sau đó được tính là: (tín hiệu ở 665 nm từ tế bào được đánh dấu với thể cho SNAP và thể nhận SNAP) – (tín hiệu ở 665 nm từ cùng một bể tế bào được gây nhiễm được đánh dấu với thể cho SNAP và SNAP không được đánh dấu).

Như được thể hiện trong Fig. 12B, thực nghiệm TR-FRET được đề xuất rằng cả BsAb17 và FGF21 tăng cường sự dime hóa của FGFR1c-ECD khi KLB cũng có trong tế bào. Kết quả được thể hiện là tỷ lệ FRET: cường độ FRET được chia bởi lượng phát xạ của thể nhận ở 620 nm.

Ngoài ra, BsAb10 liên kết với một nửa của KLB-ECD đầu tận cùng C, trong khi FGF21 và FGF19 được cho là liên kết với cùng một vị trí trên KLB trong một của đầu tận cùng N (Goetz et al. *Mol. Cell. Biol.* 32(10): 1944-54 (2012); Foltz et al. *Sci. Transl. Med.* 4: 162ra153 (2012)), đề xuất rằng epitop của BsAb10 trên KLB nên khác với vị trí liên kết của FGF21 và FGF19. Để xay dựng bản đồ epitop của KLB cho BsAb10, liên kết của 8C5 (nhánh liên kết KLB của BsAb10) với hàng loạt kháng nguyên khảm được biểu hiện trong tế bào HEK293. Mỗi thể khảm được thiết kế bằng cách dung hợp protein KLB của người và protein Klotho alpha của người (KLA) (50% giống với protein KLB người) hoặc KLB thỏ (86% giống với KLB người). Như được tổng hợp trong Fig.13A, 8C5 liên kết miền đầu tận cùng C của KLB, cụ thể là, trong vùng chứa 34 axit amin trong miền đầu tận cùng C của KLB (SSPTRLAVIPWGVRKLLRWVRRNYGDMDIYITAS; SEQ ID NO: 142).

Như được thể hiện trong Fig. 13B, trình tự axit amin của SEQ ID NO: 142 có thể tương ứng với axit amin 857-890 của protein KLB bao gồm trình tự tín hiệu, *ví dụ*, như trình tự 52 axit amin có trình tự được đề cập trong SEQ ID NO: 157, hoặc có thể chỉ axit amin 805-838 của protein KLB không chứa trình tự tín hiệu.

Dù sự tương đồng giữa FGF21 và BsAb10 và dẫn xuất của nó trong hoạt động xuôi dòng, epitop của BsAb10 trên KLB là khác biệt với vị trí liên kết FGF21 và FGF19 (Fig. 14A).

Fig. 14B thể hiện kết quả của thử nghiệm luxiferaza GAL-ELK1 được thực hiện trong tế bào nguyên bào cơ L6 ở chuột rattus được đồng gây nhiễm với FGFR4 và KLB và được xử lý chỉ với FGF19 hoặc kết hợp với kháng thể kháng KLB/kháng-FGFR1c (BsAb17). Như được thể hiện trong Fig. 14B, BsAb17 điều trị sơ bộ cũng không ngăn cản hoạt tính FGF19 trong tế bào L6 biểu hiện FGFR4/phức hệ KLB.

Hơn nữa, và như được thể hiện trong Fig. 14C, BsAb17 điều trị sơ bộ không ngăn cản hoạt tính FGF19 trong tế bào ung thư gan H4IIE biểu hiện FGFR4 và KLB. Khi có mặt BsAb17, FGF19 vẫn có khả năng được hoạt hóa phức hệ FGFR4/KLB để kích thích sự phosphoryl hóa của ERK (Fig. 14C). Các dữ liệu này thể hiện rằng kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 được bộc lộ, *ví dụ*, kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1c, không can thiệp vào sự tương tác của FGF19 hoặc FGF21 với phức hệ KLB/FGFR1c.

<u>Ví dụ 9: BsAb10, và dẫn xuất của nó, hoạt động như giả FGF21 hoạt động dài *in vivo*</u>

Tương tác chéo của BsAb10 và dẫn xuất của nó với phức hệ thụ thể ở chuột như được mô tả ở trên (xem, *ví dụ*, Fig 6C và 10B) cho phép thử nghiệm hoạt tính *in vivo* của nó trong mẫu chuột. Để tránh độc tính tiềm năng từ chức năng tác động IgG, đột biến kép [D265A/N297G] được đưa vào BsAb20 trong vùng Fc loại bỏ liên kết với FcgRs và dụ các tế bào tác động miễn dịch. Ngoài ra, để tránh độc tính tiềm năng từ chức năng tác động IgG, N297G được đưa vào BsAb17 trong vùng Fc loại bỏ liên kết với FcgR và dụ tế bào tác động miễn dịch.

Như được thể hiện trên Fig. 15A, khi i.p. được tiêm vào chuột đái tháo đường db/db với lượng 5 mg/kg, BsAb17 làm giảm mức glucoza trong máu đến phạm vi tương tự mà không ảnh hưởng tới độ nạp thức ăn hoặc khối lượng cơ thể. Chuột không béo

C57BL/6 được xử lý bằng BsAb17 thể hiện lượng glucoza trong máu giảm, nhưng không đạt được sự hạ đường huyết gây độc (Fig. 15A).

Ngoài ra, khi chuột C57BL/6 được cho ăn giàu chất béo (Béo phì do khẩu phần ăn gây ra, DIO) được tiêm BsAb17 với lượng 3 mg/kg vào ngày 0 và 6, quan sát được sự giảm sụt cân và glucoza trong máu đáng kể (Fig. 15B). Đối với nhóm được cho ăn giàu chất béo, khẩu phần ăn giàu chất béo, giàu carbohydrat (Harlan Teklad TD.03584, 58,4 % calo từ chất béo) được sử dụng.

Như được thể hiện trong Fig. 15C, quan sát được sự cải thiện trong sự chịu glucoza là ở chuột C57BL/6 được cho ăn giàu chất béo (Béo phì được kích thích bởi khẩu phần ăn, DIO) được tiêm với BsAb17 ở 3 mg/kg.

Giảm lượng triglyxerit ở gan, insulin huyết thanh, axit béo tự do, triglyxerit và tổng cholesterol cũng được quan sát ở chuột C57BL/6 được cho ăn giàu chất béo (Béo phì được kích thích bởi khẩu phần ăn, DIO) được tiêm với BsAb17 ở 3 mg/kg (Fig. 15D). Kết quả tương tự được quan sát trước đó với nhóm tiêm FGF21.

Thực nghiệm riêng biệt được thực hiện ở chuột *klb* dị hợp tử và chuột thiếu *klb* đồng hợp tử để xác định nếu quan sát được sự cải tiến trong sự chịu glucoza sau khi điều trị với kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng-FGFR1c cần KLB chức năng. Để tạo ra chuột thiếu *klb* (KO), cặp enzym Zinc Finger Nucleaza (ZFN) đặc hiệu Klb thu được từ Sigma-Aldrich và được sử dụng cho vi tiêm tiền nhân theo phương pháp đã thiết lập. Cặp ZFN hướng tới trình tự Klb sau trong hệ gen của chuột (chữ nhỏ ở vị trí cắt), và chuột KO thiếu một sự xóa bỏ bp (g in đậm) gây ra sự chuyển đổi khung: GTTACCGGCTTCtccg**g**aGACGGGAAAGCAATATGG (SEQ ID NO: 156). Fig. 16A thể hiện trình tự axit amin đầu tận cùng N của protein KLB ở chuột và trình tự axit amin tương ứng được mã hóa bởi alen *klb* ở chuột thiếu *klb*.

Fig. 16B thể hiện kết quả của thấm tách Western được thực hiện để xác nhận sự thiếu biểu hiện protein KLB ở chuột thiếu *klb*.

Như được thể hiện trong Fig. 16C, BsAb20 được cải tiến độ chịu glucoza ở chuột *klb* dị hợp tử như được đo bằng thử nghiệm dung nạp glucoza (GTT), nhưng không phải chuột thiếu *klb* đồng hợp tử, biểu thị cải tiến về độ chịu glucoza cần KLB chức năng. Đối với thử nghiệm dung nạp glucoza (GTT), chuột được cho nhịn ăn qua đêm và i.p. được tiêm với dung dịch 2 g/kg glucoza.

Ngoài ra, không giống kháng FGFR1 R1MAb1, thay đổi mức của huyết thanh FGF23 và phospho (Wu et al., *Sci Transl Med* 3, 113ra126 (2011) và Wu et al., *PLoS One* 8, e57322 (2013)), kháng thể đặc hiệu kép kháng KLB/kháng FGFR1 không tác động lên các tham số của huyết thanh, biểu thị sự vắng mặt của hoạt tính kích thích FGFR1 độc lập với KLB (Fig. 16D).

Như được thể hiện trong Fig. 17, BsAb17 không thay đổi huyết thanh FGF23 hoặc mức phospho, là chỉ thị nhạy cảm của FGFR1 độc lập KLB. Hoạt động của insulin trong chuột được xử lý BsAb17 được đo bằng phương pháp kẹp tăng insulin-cố định đường huyết. Ngắn gọn là, chuột được gây mê với isofluran và thường thì động mạch cổ bên trái và tĩnh mạch cổ bên phải được tương ứng chèn ống thông để lấy mẫu và truyền. Các đầu tự do của ống thông được tạo đường trong da tới sau cổ khi các đầu lỏng lẻo của ống thông được gắn với ống làm từ MICRO-RENATAN® (0,033 trong OD). Động vật được bọc riêng biệt sau khi phẫu thuật và thể trọng được ghi lại hằng ngày. Tất cả thực nghiệm chuyển hóa được thực hiện theo thời gian phục hồi sau phẫu thuật 5 ngày và được mô tả trước đó. Chuột tỉnh táo, tự do được đặt trong vật chứa bằng nhựa 1 lít cùng với đi ngủ và nhịn ăn lúc 7:00 sáng (t=-300 phút). Chuột được kết nối ngay với thiết bị xoay bằng thép không gỉ 2 kênh (Phòng thí nghiệm Instech) cho phép truyền tĩnh mạch cổ và lấy mẫu máu của động mạch đồng thời. Chuột không được xử lý và được cho vận động tự do để loại bỏ áp lực. 2 giờ trước khi bắt đầu kẹp 5 μCi thuốc của [3-3H]-D-glucoza được đưa vào tĩnh mạch cổ (t=-120 phút) sau đó được truyền ổn định với tốc độ là 0,05 μCi/phút. Sau giai đoạn trạng thái cân bằng 2 giờ ở t=0 phút (*i.e.*, nhịn ăn 5 giờ) mẫu máu động mạch cơ bản được thu để đo glucoza trong máu, [3-3H]-D-glucoza, tỷ lệ hồng cầu và insulin trong huyết tương. 145 phút của kẹp tăng insulin-đường huyết ổn định (4 mU/kg/phút) được bắt đầu. [3-3H]-D-glucoza được thêm vào dịch truyền glucoza khác nhau được sử dụng để duy trì đường huyết ổn định và dịch truyền ổn định [3-3H]-D-glucoza được dừng lại để hoạt tính đặc hiệu glucoza động mạch kẹp ở mức ổn định. Tế bào hồng cầu từ chuột cho trên nền C57Bl/6J được rửa với và được cấu thành với lượng bằng nhau là 0,9% nước muối có heparin (tỷ lệ hồng cầu ~50%) và được truyền với tốc độ là 4 μl/phút trong thời gian nghiên cứu để thay thế máu được lấy đi trong nghiên cứu. Mẫu máu động mạch được lấy mỗi 10 phút để xác định mức glucoza trong máu. Lúc t=80, 90, 100 và 120 phút, mẫu máu được lấy để xác định [3-3H]-D-glucoza. Lúc t=120 phút, 13 μCi thuốc của 2-deoxy [14C] glucoza ([2-

14C]DG) được sử dung cho ống thông tĩnh mạch cổ. Lúc t=122, 125, 130, 135, và 145 phút máu động mạch was được lấy để xác định máu glucoza, huyết tương [3-3H]-D-glucoza và [2-14C]DG. Nồng độ insulin động mạch được đo ở 100 và 120 phút. Lúc t=145 phút, sau đó chuột được gây mê. Cơ dép, cơ bụng chân, phía bên của cơ rộng bề mặt màu trắng (Quad), gan, tim, mào tinh hoàn và mô mỡ trắng dưới da, mô mỡ màu nâu và não được cắt, đông lạnh ngày bằng nitơ lỏng, và được giữ ở -70°C đến khi phân tích mô trong tương lai. Insulin tương tác miễn dịch được thử nghiệm sử dụng kit thử nghiệm miễn dịch phóng xạ ở chuột rattus Linco (LincoResearch).

Để xác định [3-^{3}H]-D-glucoza, mẫu huyết tương được loại protein với bari hydroxit ($Ba(OH)_2$) và kẽm sulfat ($ZnSO_4$), đã sấy khô, và hoạt tính phóng xạ được xác định sử dụng phương pháp đếm nhấp nháy lỏng. Các mô được cắt được loại protein với axit percloric và sau đó được trung hòa với pH ~7,5. Một phần mẫu được đếm ([2-^{14}C]DG và [2-^{14}C]DG-Gphosphat ([2-^{14}C]DGP) và một phần được xử lý với $Ba(OH)_2$ và $ZnSO_4$ và phần dịch nổi được đếm ([2-^{14}C]DG). Cả [2-^{14}C]DG và [2-^{14}C]DG-phosphat ([2-^{14}C]DGP) mức hoạt tính phóng xạ được xác định sử dụng phương pháp đếm nhấp nháy lỏng. Thông lượng glucoza được đánh giá sử dụng phương trình của giai đoạn không ổn định mà dự đoán thể tích phân phối (130 ml/kg). Sự loại bỏ đặc hiệu mô (K_g) của [2-^{14}C]DG và chỉ số hấp thụ glucoza (R_g) được tính như được mô tả trước đó (Kraegen, E.W. et al., *Am. J. Physiol.* 248, E353-362 (1985)): K_g=[2-^{14}C]$DGP_{mô}$/AUC [2-^{14}C]$DG_{huyết\ tương}$, R_g=K_g x $[glucoza]_{huyết\ tương}$, nơi mà [2-^{14}C]$DGP_{mô}$ là [2-^{14}C]DGP hoạt tính phóng xạ (dpm/g) trong mô, AUC [2-^{14}C]$DG_{huyết\ tương}$ là vùng trong huyết tương [2-^{14}C]DG biểu đồ biến mất (dpm/mL/phút), và $[glucoza]_{huyết\ tương}$ là glucoza trong máu trung bình (µg/µl) trong thời gian thực nghiệm (t=102-125 phút). Dữ liệu được thể hiện là trung bình ± SEM.

Như được thể hiện trong Fig.15E, thể hiện sự sử dụng glucoza của toàn bộ cơ thể được đo, sau đó là một liều đơn BsAb17 là 10 mg/kg, BsAb17 được cải tiến ở tốc độ mà insulin kích thích sự sử dụng glucoza của toàn bộ cơ thể.

Ngoài ra, và như được thể hiện trong Fig.15F, BsAb17 cải tiến ức chế insulin của tốc độ sản xuất glucoza nội sinh sau đó là một liều đơn BsAb17 10 mg/kg. Các kết quả này chỉ ra rằng một liều đơn 10 mg/kg of BsAb17 ở chuột DIO 5 ngày trước phương pháp kẹp làm giảm đáng kể glucoza ở chuột nhịn ăn và nồng độ insulin.

Hấp thụ glucoza ở mô (R_g) vào cuối giai đoạn kích thích insulin thời gian được tăng cường ở tim, cơ xương, mô mỡ trắng (WAT) và mô BAT gian vai (iBAT), biểu thị sự nhạy insulin của toàn bộ cơ thể bởi BsAb17 (Fig.15G).

Lượng dịch chuyển glucoza trong máu động mạch được xác định trong thực nghiệm kẹp. Như được thể hiện trong Fig.18A, lượng dịch chuyển glucoza trong máu động mạch là khác nhau giữa chuột được tiêm BsAb17 so với chuột được tiêm IgG đối chứng trong thực nghiệm kẹp tăng insulin-đường huyết ổn định.

Sự chênh lệch về trọng lượng giữa chuột được tiêm BsAb17 so với chuột được tiêm IgG đối chứng cũng được xác định. Như được thể hiện trong Fig.18B, các thay đổi được quan sát về nồng độ glucoza và insulin không có sự giảm cân rõ ràng.

Tốc độ truyền glucoza giai đoạn ổn định cũng được phân tích sau khi tiêm BsAb17. Như được thể hiện trong Fig.18C, tốc độ truyền glucoza giai đoạn ổn định tăng lên tới 64% sau khi tiêm BsAb17. Các kết quả này chứng minh rằng BsAb17 cải tiến độ nhạy insulin trong toàn bộ cơ thể ở chuột DIO thậm chí trước khi sự giảm cân trở nên rõ ràng.

Các nghiên cứu trước đó về liều thuốc của FGF19 hoặc FGF21 thể hiện tiêu hao năng lượng tăng lên (EE) (Fu et al., *Endocrinology* 145, 2594-2603 (2004); Coskun et al., *Endocrinology* 149, 6018-6027 (2008); Wu et al., *PLoS One* 8, e57322 (2013); Lin et al., Cell Metab 17, 779-789 (2013)), dó đó nó được cho rằng tác dụng tương tự sẽ quan sá t được. Phương trình tiếp theo được sử dụng để tính EE và Hệ số hô hấp (RQ). $EE=VO_2X(3,815+1,232\times RQ)$, trong đó ($RQ=VCO_2/VO_2$). Thực tế là, một khi BsAb17 được tiêm vào chuột DIO hoặc không béo ở nhiệt độ phòng bình thường (21°C) dẫn đến tăng đáng kể tiêu thụ O_2 (VO_2), sự sản xuất CO_2 (VCO_2), và EE mỗi động vật được tiêm không thay đổi đáng kể trong phép đo hoạt tính (Fig. 19A). Đáng ngạc nhiên là, tăng 15-46% quan sát được ở EE không đi kèm với các thay đổi đáng kể trong hệ số hô hấp ($RQ=VCO_2/VO_2$) (Fig.19A).

Sự tăng tương tự trong EE mà không thay đổi RQ được tạo ra bằng cách truyền liên tục FGF21 vào chuột DIO (Fig.21C).

Fig.20A thể hiện lượng VO_2, VCO_2 và tổng lượng hoạt động của chuột DIO được xử lý với một liều BsAb17 ở nhiệt độ phòng bình thường.

Như được thể hiện trong Fig.19B, tăng EE được chấp nhận khi nhiệt độ chuồng được tăng lên tới nhiệt trung hòa (29-30°C), đề xuất rằng việc hoạt hóa chất béo màu nâu kích thích BsAb17 không phụ thuộc vào đầu vào nhiệt thích nghi từ hệ thống thần kinh giao cảm.

Fig.20B thể hiện lượng VO_2, VCO_2 và tổng lượng hoạt động của chuột DIO được xử lý với một liều BsAb17 ở nhiệt độ phòng bình thường sau đó thay đổi nhiệt độ tới nhiệt trung hòa.

Sự tăng EE cũng là bằng chứng khi chuột DIO đã quen khí hậu ở nhiệt độ phòng trung hòa nhiệt (29-30°C) được thử nghiệm trong hai tuần (Fig.21B).

Được tổng hợp trong Fig.21A, thể hiện trị số EE trung bình, các thay đổi trong EE được quan sát ở chuột không béo và DIO ở nhiệt độ phòng bình thường và ở chuột không béo và DIO đã quen khí hậu ở nhiệt độ phòng trung hòa nhiệt.

Ngược lại, truyền liên tục với chất chủ vận thụ thể adreno đặc hiệu β3 CL-316243 kích thích EE tăng cấp tính và giảm RQ như được dự đoán (Fig.19H). Truyền liên tục FGF21 hoặc CL-316243 được thực hiện sử dụng bơm nhỏ thẩm thấu (Alzet 2001) được cấy dưới da. Do đó, EE kích thích BsAb17- và FGF21- là tăng cường, nhưng có vẻ chọn lọc hơn cơ chế kích hoạt BAT khác được mô tả trước đó, như sử dụng giao cảm (norepinephrin hoặc chất chủ vận thụ thể adreno đặc hiệu β3 CL-316243), peptit natri ở tim, hoặc Interleukin-4, kèm theo thúc đẩy oxy hóa chất béo và giảm RQ (Gerhart-Hines et al., Mol. Cell 44, 851-863 (2011); Mattsson et al., *American journal of physiology. Endocrinology và metabolism* 299, E374-383 (2010); Nguyen et al., Nature 480, 104-108 (2011); Birkenfeld et al. Diabetes 57, 3199-3204 (2008); Bordicchia et al., J. Clin. Invest. 122, 1022-1036 (2012); và de Souzaet al., Diabetes 46, 1257-1263 (1997)).

Không gắn với lý thuyết cụ thể, một số dòng bằng chứng được đề xuất vai trò chủ đạo của việc kích hoạt BAT trong hoạt động chuyển hóa của BsAb17. Đầu tiên, như được thể hiện trong Fig.19C, tiêm BsAb17 làm tăng độ nạp đặc hiệu 18F-Fludeoxyglucoza (FDG) vào iBAT.

Hai là, một liều đơn BsAb17 kích thích biểu hiện protein UCP1 ở bẹn WAT (ingWAT), là chỉ thị cho mô mỡ màu nâu (Fig.19D).

Như được thể hiện trong Fig.19E, kích thích biểu hiện UCP1 cũng được quan sát trong tế bào tạo mỡ chính được nuôi cấy được xử lý với FGF21 hoặc BsAb17, biểu thị hoạt động trực tiếp trên tế bào tạo mỡ trưởng thành. Để xác định biểu hiện UCP1, ARN tổng được sử dụng để tổng hợp cADN sử dụng kit tổng hợp SUPERSCRIPT® VILO cADN (ABI). Đối với qPCR, mẫu được chạy với ba bản sao trong thiết bị ViiA 7 Real-Time PCR (hệ thống sinh học ứng dụng). Hệ thống sinh học ứng dụng được thiết kế trước mẫu dò Thử nghiệm Biểu hiện Gen TAQMAN® được sử dụng là UCP1 (Hs01027785_m1). Với mỗi mẫu, lượng dư mARN được chuẩn hóa với lượng phiên mã TBP (Hs00427620_m1) và SDHA (Hs00188166_m1).

Ba là, sử dụng hệ thống từ xa, nhiệt độ cơ thể bên trong tăng được quan sát sau khi tiêm một BsAb17 kéo dài trong ≥26 ngày trước khi quay lại ban đầu dần dần (Fig 19F).

Fig.22 thể hiện sự chênh lệch về nhiệt độ cơ thể được quan sát ở chuột sau khi tiêm một BsAb17 so với chuột được xử lý IgG đối chứng. Nhiệt độ trong cơ thể được theo dõi sử dụng hệ thống điều khiển TA-F10 (Data Sciences International, DSI) được cấy nhờ phẫu thuật vào không gian màng bụng. Sau khi phục hồi sau phẫu thuật, chuột được phân nhóm ngẫu nhiên dựa trên thể trọng và nhiệt độ trong cơ thể. Nhiệt độ trong cơ thể và hoạt động được theo dõi sử dụng Hệ thống từ xa cấy được DSI.

Profin biểu hiện gene được phân tích trong iBAT của chuột DIO nhận tiêm một BsAb17, FGF21 hoặc IgG đối chứng. Như được thể hiện trong Fig.19G, tiêm một BsAb17 kích thích thay đổi biểu hiện gen trong iBAT giống với tiêm FGF21 hai lần hằng ngày.

Cuối cùng, khi tiêm vào chuột C57BL/6, cả FGF21 và BsAb20 kích thích phosphoryl hóa ERK và MEK trong các mô mỡ khác nhau, bao gồm iBAT và ingWAT (Fig.23).

Trong các nghiên cứu trước, adiponectin được đề xuất đóng góp vào hoạt động đầy đủ của FGF21 (Lin et al., Cell Metab 17, 779-789 (2013); Holland et al., Cell Metab 17, 790-797 (2013)). Thực tế là, tiêm một BsAb17 vào chuột DIO làm tăng mức adiponectin khối lượng phân tử cao (HMW) trong huyết thanh, liên quan đến giảm cân (Fig.24A).

Tương tự, tiêm một BsAb17 vào khỉ đuôi dài không béo (Fig. 24B) làm tăng mức adiponectin khối lượng phân tử cao (HMW) trong huyết thanh, liên quan đến giảm cân.

Như được thể hiện trong Fig.24C, sau khi tiêm một BsAb17, adiponectin (Adipoq) chuột KO trên HFD đã bộc lộ phản ứng tăng cường trong EE tăng (tăng 25,3% với tăng 20,9% trong lượng chuột).

Ngoài ra, sau khi tiêm một BsAb17, adiponectin (Adipoq) chuột KO trên HFD đã bộc lộ làm giảm thể trọng và mức triglyxerit ở gan (Fig.24D). Tuy nhiên, phản ứng chịu glucoza, chịu insulin, các thay đổi trong insulin huyết thanh và lipit khác nhau tất cả bằng cách nào đó được cắt trong chuột KO (Fig.24D), thống nhất với ý tưởng là BsAb17 hoạt động như giả FGF21 để điều hòa sự chuyển hóa dinh dưỡng của toàn bộ cơ thể một phần qua adiponectin chức năng. Với việc xác định chịu insulin, chuột được cho nhịn ăn trong 4 giờ, và i.p. được tiêm với 1 U/kg dung dịch insulin người (Humulin R, Eli Lilly và Công ty).

Tính chọn lọc thụ thể tăng cao của BsAb10 (*xem* Fig. 9A) và kiểu hình não thấp được mô tả trước đó của phân tử IgG (Yu et al., *Sci Transl Med* 3, 84ra44 (2011)) dự đoán profin an toàn biến đổi của BsAb10 và dẫn xuất của nó so với FGF21/19. Thống nhất với mức biểu hiện thấp của FGFR1 trong gan, FGF21, nhưng không phải BsAb17, kích thích mARN biểu hiện của gen đích FGFR thông thường Spry4 và Dusp6 trong gan (Fig. 25).

BsAb17 hoặc BsAb20 làm tăng tín hiệu phospho-ERK trong các mô mỡ khác nhau và tế bào tuyến nang tuyến tụy, nhưng không phải ở gan (Fig. 23).

Fig. 26 thể hiện BsAb17 cũng không làm tăng sự phosphoryl hóa ERK trong các khu vực não khác nhau bao gồm các cơ quan quanh não thất, như được xác định bởi hóa mô miễn dịch.

Ngoài ra, điều trị B sAb20 mạn tính cho chuột DIO trong 8 tuần làm giảm lượng BrdU+ tế bào trong gan tới mức của chuột không béo C57BL/6, ngược lại với hy vọng về hoạt tính giống FGF19 (Fig. 27). Với sự đưa vào BrdU ở gan, chuột được tiêm màng bụng với 100 mg/kg BrdU (BD Biosciences) 2 giờ trước phương pháp chết nhân đạo. Nhuộm kháng-BrdU được tiến hành như được mô tả (Nicholes, K., et al. *Am. J. Pathol.* 160, 2295-2307 (2002)) và tế bào gan dương BrdU được đếm bằng cách sử dụng hệ thống phân tích hình ảnh tự động Ariol.

Phân tích xương của chuột được xử lý với kháng thể kháng KLB/kháng-FGFR1c được thực hiện. Fig. 28A thể hiện sơ đồ phân tích biểu thị. Để thực hiện phân tích xương, mẫu xương đùi được ghi hình ảnh bởi SCANCO Medical (Basserdorf, Switzerland) μCT40 hệ thống vi ảnh hoạt động với mức năng lượng ống tia x 70 keV và điện cực 114 microampe. Mảnh hình ảnh gần trục thu được với kích thước điểm ảnh ba chiều đẳng hướng là 12 μm. Phân tích hình thái của sợi xương trong xương đùi được thực hiện với phần mềm đánh giá SCANCO Medical (Basserdorf, Switzerlvà) μCT40. Đường bán tự động được sử dụng để xác định thể tích được quan tâm (VOI), chứa sợi xương lưng bậc hai tới đĩa sinh trưởng gần xương đùi và mở rộng khoảng cách 1,5 mm tới sợi xương chính. Xương vỏ não được loại bỏ bằng cách thay thế đường biên VOI trong đường biên phía trong của xương vỏ não. Trước khi phân đoạn hình ảnh, màng lọc đi qua ít Gaussian ba chiều (3D) được hạn chế được sử dụng để ghi dữ liệu hình ảnh để hạn chế nhiễu (xicma màng lọc=0,5, giá đỡ màng lọc=1). Ngưỡng toàn cầu (0,36 gHA/cm3) được sử dụng để chiết xuất cấu trúc sợi xương "nhị phân" từ VOI. Ngưỡng phân đoạn sợi xương được chọn bởi kiểm tra trực quan phân đoạn thu được từ phân lớp mẫu đại diện. Đặc tính cấu trúc của sợi xương được định lượng bằng phân tích hình thái 3D trực tiếp. Các nghiên cứu trước đó chỉ ra rằng phân tích hình thái sợi xương bằng chụp cắt lớp sử dụng máy vi tính có tương quan tốt với các dự đoán tương tự tạo ra bởi hình thái mô.

Như được thể hiện trong Fig. 28B, điều trị BsAb20 mạn tính chuột DIO trong 6 tuần dẫn đến các thay đổi được mong đợi trong tham số chuyển hóa không có tín hiệu âm bất kỳ trong các tham số xương khác nhau trong sợi xương xương chày và xương vỏ não đùi dựa trên chụp cắt lớp sử dụng máy vi tính.

Như được thể hiện trong Fig. 29, tiêm BsAb17 vào chuột DIO không làm tăng mức corticosteron huyết thanh cao hơn đối chứng. Cân bằng năng lượng dương mạn tính thông thường trong xã hội hiện đại thúc đẩy hiện tượng béo phì và liên quan đến rối loạn chuyển hóa được xác định bởi kháng insulin, tăng insulin, không chịu glucoza, máu nhiễm mỡ, và gan nhiễm mỡ, thường dẫn đến ốm nghiêm trọng như bệnh đái tháo đường typ 2, xơ gan, đột quỵ và bệnh tim. Trong 2009, sự có mặt của BAT dương UCP1 ở người trưởng thành và ý nghĩa về mặt chức năng của chúng trong việc thúc đẩy EE bằng cách phân tán nhiệt được báo cáo, tăng sự quan tâm trong việc kích thích trị liệu và kích hoạt BAT cho điều trị béo phì và bệnh liên quan chuyển hóa (Yoneshiro và Saito, Ann. Med., 1-9 (2014)).

Tuy nhiên, hầu hết các cơ chế hoạt hóa BAT đã biết còn kích thích phân giải mỡ mô mỡ trắng, có thể có tiêu tác động cực lên kết quả tim mạch (Dong et al., *Cell Metab.* 18, 118-129 (2013)). Chú ý rằng, thể cấy BAT làm tăng EE và kích thích giảm cân mà không thay đổi RQ (Stanford et al., J. Clin. Invest. 123, 215-223 (2013)). Theo hướng này, FGF21 và kháng thể kích thích kháng-FGFR1/KLB được mô tả trong bản mô tả này có cách duy nhất để kích thích phản ứng sinh nhiệt chọn lọc trong BAT mà không thay đổi RQ, do đó bắt chước thể cấy BAT, hơn là kích hoạt giao cảm không đặc hiệu. Ngoài ra, dựa trên cái được quan sát ở chuột, nó được xem là kích hoạt qua kháng thể của phức hệ FGFR1c/KLB có thể tạo ra cách an toàn hơn và thuận tiện hơn cho liệu pháp điều trị chống béo phì và chống đái tháo đường, ngược lại với kích hoạt phức hệ FGFR/KLB lớn hơn bởi chất tương tự FGF21 hoặc FGF19.

Ví dụ 10: Kháng thể kháng KLB 8C5 được làm giống như của người

CDR chuỗi nhẹ ở chuột của 8C5 được ghép vào trình tự chuỗi nhẹ Kappa2 và Kappa4 của người. Ngoài ra với thể ghép chính, đột biến điểm cũng được tạo ra trong mỗi thể ghép sao cho vị trí 4 của chuỗi nhẹ được chuyển thành leuxin (được gọi là "M4L"). Phân tích được thực hiện để xác định các đột biến biểu hiện tốt nhất và không thể hiện sự kết tụ đáng kể. Tương tự, CDR chuỗi nặng được ghép vào khung chuỗi nặng IgG1 H1, H2, H3 và H4 của người. Các gốc khác nhau ở mạch chính của chuỗi nặng được gây đột biến như sau: với H1 các thay đổi sau được đưa vào: K71R, N73T và V78A (bố mẹ được gọi là "KNV" và cấu trúc được gọi là "RTA"); với H2 thay đổi sau được đưa vào: N73T (bố mẹ được gọi là "KNV" và cấu trúc được gọi là "KTV"); với H3 các thay đổi sau được đưa vào: K71R và V78L (bố mẹ được gọi là "KNV" và cấu trúc được gọi là "RNL"; và với H4 các thay đổi sau được đưa vào: K71V, N73T, và V78F (bố mẹ được gọi là "KNV" và cấu trúc được gọi là "VTF").

Kháng thể dựa trên tất cả các hỗn hợp bắt cặp của 4 chuỗi nhẹ và 8 chuỗi nặng (cho tổng 32 kháng thể) được tạo ra và mức biểu hiện và ái lực được thử nghiệm. Dựa trên các thực nghiệm này, 8C5 có nguồn từ chuỗi nhẹ K4.M4L và chuỗi nặng H3.KNV đã bộc lộ sự kết hợp tốt nhất mức biểu hiện và ái lực mong muốn.

Các trình tự của các vùng biến đổi 8C5.K4.M4L.H3.KNV và có chiều dài đầy đủ kháng thể như sau:

Vùng biến đổi Chuỗi nặng 8C5.K4.M4L.H3.KNV

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASDFSLTTYGVHWVRQAPGKGLEW LGVIWSGGSTDYNAAFISRLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDY GSTYVDAIDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 128)

Chuỗi nặng đầy đủ 8C5.K4.M4L.H3.KNV

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASDFSLTTYGVHWVRQAPGKGLEW LGVIWSGGSTDYNAAFISRLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDY GSTYVDAIDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 129)

Vùng biến đổi Chuỗi nhẹ 8C5.K4.M4L.H3.KNV

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVESYGNRYMTWYQQKPGQPPK LLIYRAANLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSNEDPWTF GQGTKVEIK (SEQ ID NO: 130)

Chuỗi nhẹ đầy đủ 8C5.K4.M4L.H3.KNV

DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVESYGNRYMTWYQQKPGQPPK LLIYRAANLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSNEDPWTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 131)

Ví dụ 11: Tạo ra kháng thể kháng FGFR1 lai giữa YW182.3 và YW182.5

YW182.5, là nhánh kháng FGFR1 mà không hoạt hóa phức hệ KLB/FGFR1c khi không có nhánh kháng FGFR1, được khám phá là đem lại kết quả tốt khi được kết hợp với 8C5, và có vị trí 33 là tryptophan của chuỗi nặng là nhạy với sự oxy hóa. YW182.2, liên kết epitop giống như YW182.5, cũng có vị trí 33 là tryptophan này của chuỗi nặng. Một số đột biến được đưa vào vị trí này để ngăn ngừa vấn đề này: với YW182.5, W33Y, W33H, W33F và W33L được đưa vào và với YW182.2, W33Y và W33F được đưa vào.

Đáng ngạc nhiên là, đột biến được đưa vào có các tác dụng khác nhau với hai kháng thể. Trong trường hợp YW182.2, quan sát được là đột biến không tác động thích hợp lên ái lực hoặc hoạt tính chủ vận với FGFR1, trong khi với YW182.5, đột biến làm giảm rất nhiều ái lực và hoạt tính chủ vận với FGFR1 (*xem*, ví dụ, Fig. 31). Do đó, thực nghiệm được thực hiện để xác định kháng thể với đột biến W33Y, nhưng với ái lực gần với kháng thể YW182.5 sử dụng hai phương pháp.

Trong một phương pháp, với YW182.2, trình tự chuỗi nặng W33Y alanin quét qua CDR3 được thực hiện, gây đột biến các vị trí 95, 96, 97, 98, 99, 100, 100a và 100b thành alanin. Ái lực của kháng thể thu được được phân tích và các kháng thể giữ được ái lực cao của YW182.2 W33Y bố mẹ được xác định (Bảng 9).

Bảng 9. Ái lực của dẫn xuất YW182.2.

Kháng thể	EC_{50} (nM)
YW182.2_W33Y_96A	2,4
YW182.2_W33Y_97A	5,3
YW182.2_W33Y_100A	5,8
YW182.2_W33Y_98A	8,8
YW182.2_W33Y_GDY	11,1
YW182.5	34,6
YW182.2_W33Y_100aA	55,1
YW182.2_W33Y_95A	221,1
YW182.2_W33Y_99A	316,2
YW182.2_W33Y_100bA	Không được phát hiện

Trong phương pháp thứ hai, các CDR từ kháng thể YW182.2 W33Y (với ái lực rất cao) và kháng thể YW182.5 W33Y (gần như không có liên kết) được trộn-và-bắt

cặp. Kháng thể YW182.2 W33Y và YW182.5 W33Y có các trình tự CDR giống nhau trong chuỗi nhẹ (CDR-L1, RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 139); CDR-L2, SASFLYS (SEQ ID NO: 140); và CDR-L3 QQSYTTPPT (SEQ ID NO: 141) sự khác biệt một axit amin trong CDR-H1 (YW182.2 W33Y CDR-H1, STYIS (SEQ ID NO: 152) và YW182.5 W33Y CDR-H1, SNYIS (SEQ ID NO: 136)); sự khác biệt ba axit amin trong hoặc gần với CDR-H2 (YW182.2 W33Y CDR-H2, EIDPYDGDTYYADSVKG (SEQ ID NO: 137 và YW182.5 W33Y, EIDPYDGATDYADSVKG (SEQ ID NO: 153)); và trình tự rất khác biệt CDR-H3 (YW182.2 W33Y, EHFDAWVHYYVMDY (SEQ ID NO: 154) và YW182.5 W33Y GTDVMDY (SEQ ID NO: 138). Kháng thể với chuỗi nặng dựa trên tất cả các hỗn hợp có thể của CDR chuỗi nặng từ YW182.5 W33Y và YW182.2 W33Y (tám bao gồm the hai kháng thể bố mẹ) được xây dựng và được thử nghiệm. Hầu hết các kháng thể có ái lực tương tự với một kháng thể hoặc kháng thể khác, nhưng, đáng ngạc nhiên là, một hỗn hợp được chứng minh liên kết mà gần giống với kháng thể bố mẹ YW182.5. Kháng thể này có CDR-H1 và CDR-H3 từ YW182.5 W33Y, nhưng CDR-H2 từ YW182.2 W33Y. Kháng thể này được thiết kế như "YW182.5 YGDY" để biểu hiện các thay đổi sau trong trình tự YW182.5: W33Y, A49G, A56D, và D58Y.

Các trình tự của kháng thể YW182.5 YGDY như sau:

Vùng biến đổi chuỗi nặng YW182.5_YGDY

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSNYISWVRQAPGKGLEWV GEIDPYDGDTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATGT DVMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 132).

Chuỗi Nặng đầy đủ YW182.5_YGDY

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSNYISWVRQAPGKGLEWV GEIDPYDGDTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATGT DVMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL

WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 133).

Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ YW182.5_YGDY

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKV EIK (SEQ ID NO: 134).

Chuỗi nhẹ đầy đủ YW182.5_YGDY

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY SASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO: 135)

Ví dụ 12: Thử nghiệm kháng thể đặc hiệu kép với 8C5 được làm giống như của người và biến thể kháng FGFR1

Các hỗn hợp kháng thể đặc hiệu kép khác nhau của 8C5.K4H3.M4L.KNV và các nhánh kháng FGFR1 khác nhau được thử nghiệm trong thử nghiệm luxiferaza dựa trên GAL-ELK1 trong tế bào HEK293 biểu hiện FGFR1c có hoặc không có KLB. Như quan sát được trước đây, mỗi hỗn hợp kháng thể đặc hiệu kép gây ra hoạt tính luxiferaza theo cách phụ thuộc vào liều trong tế bào biểu hiện hFGFR1c và hKLB tái tổ hợp, nhưng không phải trong tế bào không biểu hiện KLB (Fig. 30). Các dữ liệu này xác nhận rằng các biến thể được biến đổi này giữ được ưu điểm của kháng thể bố mẹ, *ví dụ*, BsAb13. Ái lực liên kết của kháng thể kháng KLB/kháng FGFR1 có nhánh 8C5 được làm giống như của người (8C5.K4.M4L.H3.KNV) và nhánh YW182.5_YGDY với phức hệ KLB/FGFR1c của người, khỉ đuôi dài và chuột trên bề mặt của tế bào HEK293 được thể hiện trong bảng 10.

Bảng 10. Ái lực liên kết.

Dòng tế bào	K_d của kháng thể kháng KLB/kháng-FGFR1c (nM)	K_d trung bình (nM)	Độ lệch chuẩn
293huKLB/huR1c	1,87	1,88	0,06

	1,95		
	1,83		
293cynoKLB/cynoR1c	2,54	2,55	0,25
	2,80		
	2,31		
293msKLB/msR1c	4,12	3,92	0,17
	3,85		
	3,80		

Ngoài các phương án khác nhau được mô tả và được yêu cầu bảo hộ, đối tượng được bộc lộ cũng liên quan đến phương án khác có hỗn hợp khác của các đặc tính được bộc lộ và được yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này. Như vậy, các đặc tính cụ thể được thể hiện trong bản mô tả này có thể được kết hợp với mỗi đặc tính khác theo các cách khác trong phạm vi đối tượng được bộc lộ sao cho đối tượng được bộc lộ bao gồm hỗn hợp thích hợp bất kỳ của các đặc tính được bộc lộ trong bản mô tả này. Bản mô tả này về các phương án đặc hiệu của đối tượng được bộc lộ được thể hiện cho các mục đích chứng minh và mô tả. Nó không được dự định để khảo sát hay để hạn chế đối tượng được bộc lộ với các phương án được bộc lộ.

Rõ ràng là với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, các biến đổi và các biến thể khác nhau có thể được tạo ra trong hỗn hợp và phương pháp đối tượng được bộc lộ mà không tách rời khỏi nội dung hoặc phạm vi của đối tượng được bộc lộ. Do đó, đối tượng được bộc lộ được dự định là bao gồm các biến đổi và các biến thể trong phạm vi bộ yêu cầu bảo hộ đính kèm và tương đương của chúng.

Các công bố, bằng sáng chế và đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế khác nhau được nêu trong bản mô tả này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của chúng.

Yêu cầu bảo hộ

1. Kháng thể đặc hiệu kép phân lập được, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, liên kết với beta-Klotho (KLB) và thụ thể yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 1c (Fibroblast Growth Factor Receptor 1c - FGFR1c), trong đó kháng thể đặc hiệu kép hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó chứa:

(a) nhánh thứ nhất chứa:

miền vùng biến đổi của chuỗi nặng CDR1 chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 15, miền vùng biến đổi của chuỗi nặng CDR2 chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 31, miền vùng biến đổi của chuỗi nặng CDR3 chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 47, miền vùng biến đổi của chuỗi nhẹ CDR1 chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 62, miền vùng biến đổi của chuỗi nhẹ CDR2 chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 78, và miền vùng biến đổi của chuỗi nhẹ CDR3 chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 93; và

(b) nhánh thứ hai chứa:

miền vùng biến đổi của chuỗi nặng CDR1 chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 136, miền vùng biến đổi của chuỗi nặng CDR2 chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 137, miền vùng biến đổi của chuỗi nặng CDR3 chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 138, miền vùng biến đổi của chuỗi nhẹ CDR1 chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 139, miền vùng biến đổi của chuỗi nhẹ CDR2 chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 140, và miền vùng biến đổi của chuỗi nhẹ CDR3 chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 141.

2. Kháng thể đặc hiệu kép phân lập được hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể đặc hiệu kép, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, là kháng thể đơn dòng.

3. Kháng thể đặc hiệu kép phân lập được hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể đặc hiệu kép, hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó, là kháng thể ở người, được làm giống như của người, hoặc khảm.

4. Kháng thể đặc hiệu kép phân lập được hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó nhánh thứ nhất chứa: (a) vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 128 và (b) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 130.

5. Kháng thể đặc hiệu kép phân lập được hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó nhánh thứ nhất chứa: (a) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 129 và (b) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 131.

6. Kháng thể đặc hiệu kép phân lập được hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó nhánh thứ hai chứa: (a) vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 132 và (b) vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 134.

7. Kháng thể đặc hiệu kép phân lập được hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó nhánh thứ hai chứa: (a) chuỗi nặng chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 133 và (b) chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin được đề cập trong SEQ ID NO: 135.

8. Axit nucleic phân lập được mã hóa kháng thể đặc hiệu kép hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.

9. Tế bào chủ chứa axit nucleic theo điểm 8.

10. Phương pháp sản xuất kháng thể đặc hiệu kép hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 9 sao cho kháng thể này được tạo ra.

11. Phương pháp theo điểm 10, còn bao gồm việc thu hồi kháng thể từ tế bào chủ.

12. Dược phẩm chứa một hoặc nhiều kháng thể đặc hiệu kép hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 và chất mang dược dụng.

13. Dược phẩm theo điểm 12, còn chứa tác nhân trị liệu bổ sung.

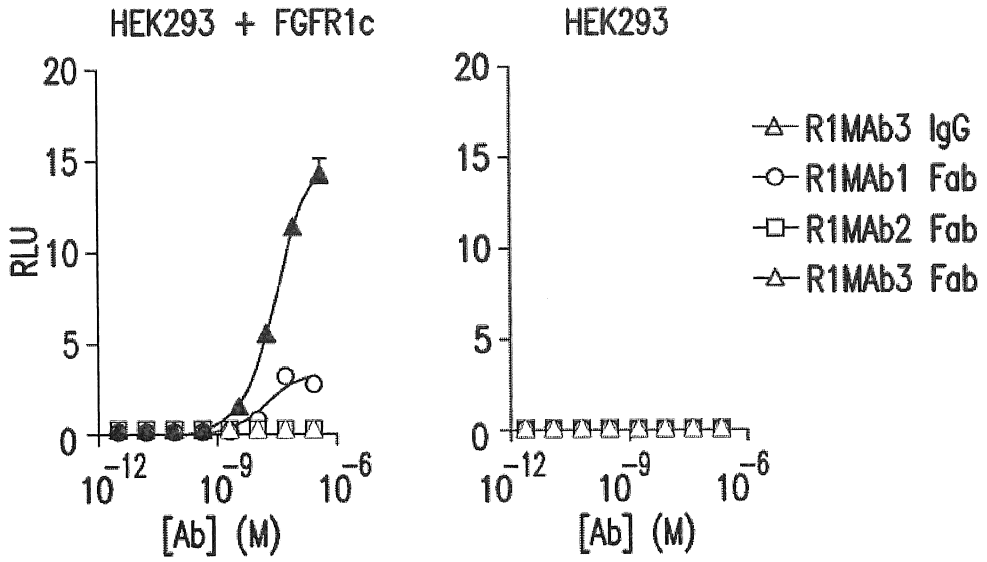


FIG. 1A

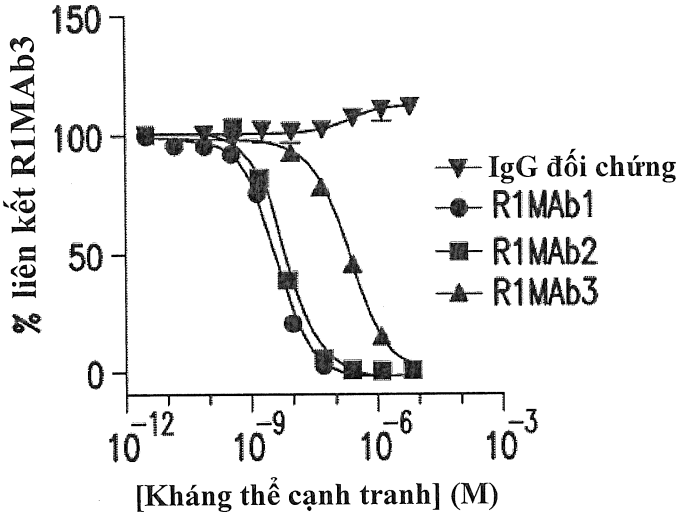


FIG. 1B

```
161        170        180        190        200            212
...MEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKVRYATW...
...MEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGGYKVRYATW...
      KLHAVPAAKTVKFKCP (P26)            FKPDHRIGGYKVRY(P28)
```

FIG. 1C

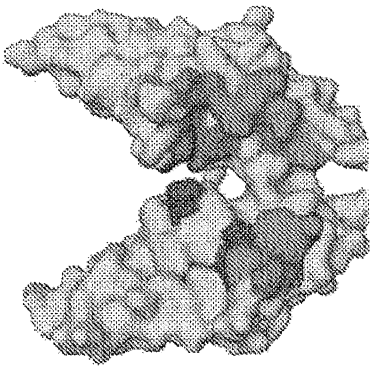


FIG. 1F

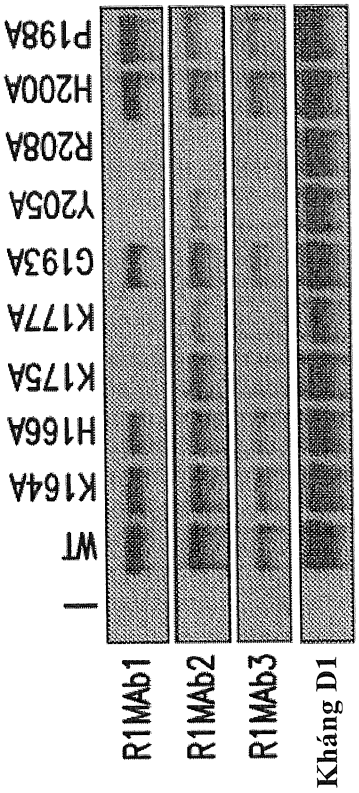


FIG. 1D

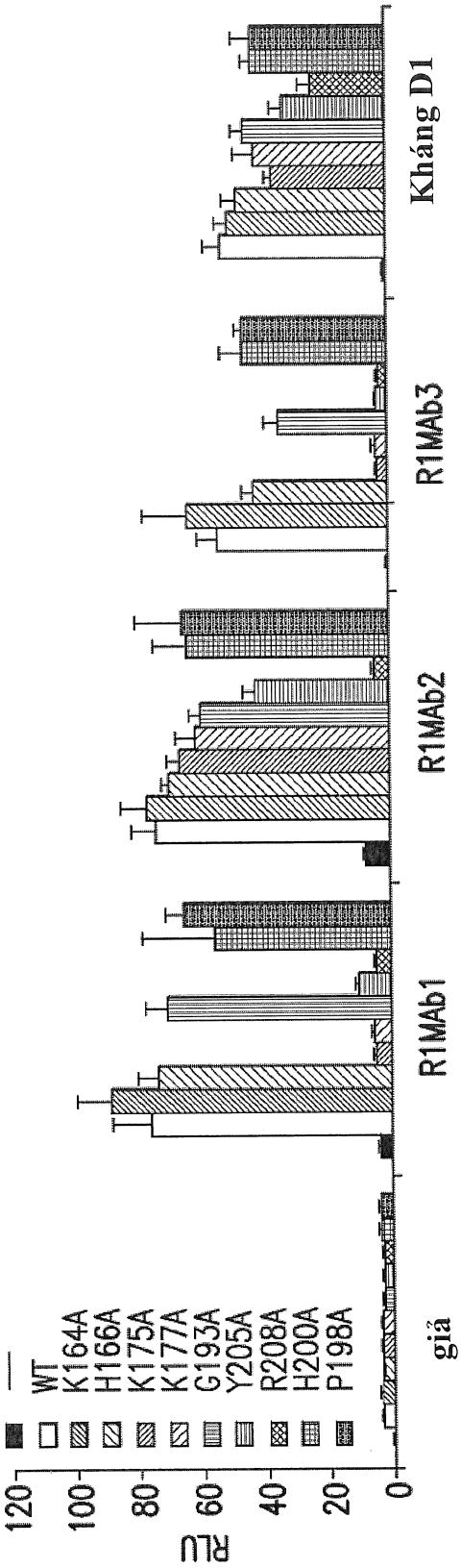


FIG. 1E

		k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)
R1MAb1	FGFR1b	$1,9 \times 10^{6}$	$2,2 \times 10^{-3}$	$11,3 \times 10^{-10}$
	FGFR1c	$4,6 \times 10^{6}$	$3,6 \times 10^{-3}$	$7,8 \times 10^{-10}$
R1MAb2	FGFR1b	$4,5 \times 10^{5}$	$3,7 \times 10^{-4}$	$8,2 \times 10^{-10}$
	FGFR1c	$7,3 \times 10^{5}$	$5,1 \times 10^{-4}$	$7,1 \times 10^{-10}$

FIG. 2A

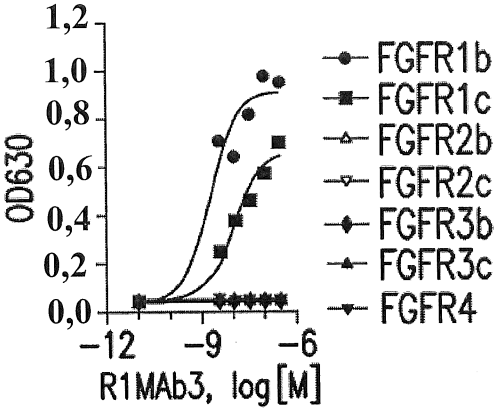


FIG. 2B

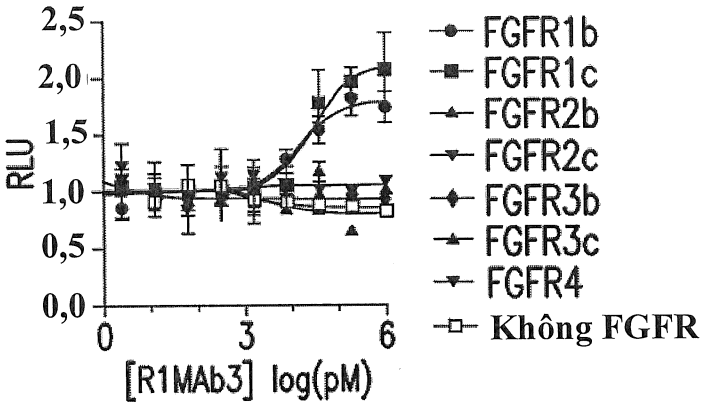


FIG. 2C

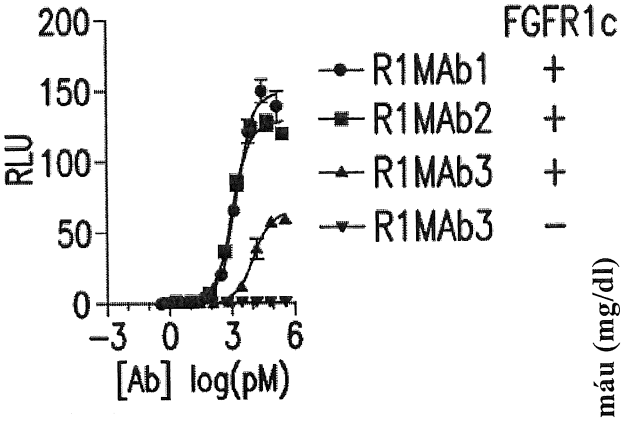


FIG. 2D

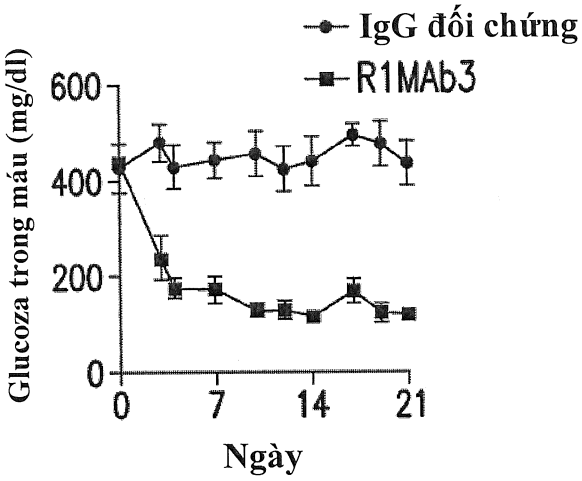


FIG. 2E

Trình tự CDR theo định nghĩa Kabat được gạch dưới

Vùng thay đổi của chuỗi nhẹ

CDR L1 – Tiếp xúc

CDR L1 – Chothia

CDR L1 – Kabat

Số Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34	35	36
11F1	D	I	Q	M	T	Q	T	T	S	S	L	S	A	S	L	G	D	R	V	T	I	I	C	S	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	V	I	S	N	Y	L	N	W	Y
6D12	E	N	V	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	S	P	G	E	K	V	T	M	T	C	S	A	S	.	.	.	.	.	.	.	S	S	G	R	Y	T	F	W	Y
11D4	D	I	Q	M	T	Q	T	P	S	S	L	S	A	S	L	G	D	R	V	T	I	N	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	D	I	S	N	Y	F	N	W	Y
8E1	D	I	Q	M	T	Q	S	S	S	Y	L	S	V	S	L	G	G	S	V	T	I	T	C	K	A	S	D	.	.	.	.	.	.	H	I	N	N	W	L	A	W	Y
46C3	A	V	L	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	N	I	V	H	S	.	D	G	N	T	Y	L	E	W	Y
8H7	D	I	V	M	T	Q	S	Q	K	F	M	S	T	S	V	G	D	R	V	S	I	T	C	K	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	F	V	S	D	A	V	A	W	Y
21H3	D	I	V	M	T	Q	S	Q	K	F	M	S	T	S	V	G	D	R	V	S	I	T	C	K	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	F	V	S	D	A	V	A	W	Y
25F7	D	I	Q	M	T	Q	S	S	S	Y	L	S	V	S	L	G	G	R	V	T	I	T	C	K	A	S	D	.	.	.	.	.	.	H	I	N	N	W	L	A	W	Y
14E6	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	L	G	E	R	V	S	L	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	E	I	S	G	Y	L	S	W	L
14C6	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	S	P	G	E	R	V	T	L	T	C	S	A	S	S	S	.	.	.	.	.	L	S	S	S	Y	L	Y	W	Y
24A1	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	P	M	S	V	G	Q	K	V	T	M	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	S	L	A	W	Y
5F8	E	S	V	L	T	Q	S	P	A	L	M	S	A	S	L	G	E	K	V	T	M	T	C	R	A	S	.	.	.	.	.	.	.	S	S	V	N	H	M	Y	W	Y
6C1	D	I	V	M	T	Q	S	Q	K	F	M	S	T	S	V	G	D	R	V	S	V	T	C	K	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	N	V	D	S	Y	V	A	W	Y
12A11	D	I	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	T	P	G	D	R	V	S	L	S	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	S	I	S	D	Y	V	Y	W	Y
12B8	D	I	Q	M	T	Q	S	S	S	S	F	S	V	S	L	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	E	.	.	.	.	.	.	D	I	Y	N	R	L	A	W	Y
14C10	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	S	E	S	V	D	S	.	.	Y	G	N	S	F	M	H	W	Y
8C5	D	I	V	L	T	Q	S	P	T	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	S	E	S	V	E	S	.	.	Y	G	N	R	Y	M	T	W	Y

FIG. 3A

CDR L2 – Tiếp xúc

CDR L2 – Chothia

CDR L2 – Kabat

Số Kabat	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
11F1	Q	Q	K	P	D	G	T	V	K	L	L	I	Y	F	T	S	S	L	R	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	S	L	T	I	S	N	L
6D12	Q	Q	K	S	N	T	A	P	K	L	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	G	R	F	S	G	S	G	S	G	N	S	Y	S	L	T	I	S	S	M
11D4	Q	Q	K	P	N	G	T	I	K	L	L	I	Y	Y	T	S	R	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	S	L	T	I	S	N	L
8E1	Q	Q	K	P	G	N	A	P	R	L	L	I	Y	G	T	T	N	L	E	T	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	R	D	Y	I	L	S	I	T	S	L
46C3	L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	R	D	F	T	L	K	I	S	R	V
8H7	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	C	S	A	S	Y	R	Y	T	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	F	T	I	S	S	V
21H3	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	C	S	A	S	Y	R	Y	T	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	F	T	I	S	S	V
25F7	Q	Q	K	P	G	N	A	P	R	L	L	I	S	G	A	S	N	L	E	T	G	I	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	K	D	Y	T	L	T	I	T	S	L
14E6	Q	Q	K	P	D	G	T	I	K	R	L	I	Y	A	A	S	T	L	D	S	G	V	P	R	R	F	S	G	S	R	S	G	S	D	Y	S	L	T	I	S	S	L
14C6	Q	Q	K	P	G	S	S	P	K	L	W	I	Y	G	A	S	N	L	A	S	G	V	P	G	R	F	S	G	S	G	S	G	T	S	Y	S	L	T	I	S	S	M
24A1	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	V	Y	L	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	I	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	V
5F8	Q	Q	K	S	D	A	S	P	K	L	W	I	Y	Y	T	S	T	L	A	P	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	N	S	Y	S	L	T	I	S	S	M
6C1	Q	Q	K	A	G	Q	S	P	K	P	L	I	Y	S	A	S	Y	R	F	S	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	N	V
12A11	Q	Q	K	S	H	E	S	P	R	L	L	I	I	Y	A	S	Q	S	I	S	G	I	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	S	D	F	T	L	S	I	N	S	V
12B8	Q	Q	K	P	G	S	A	P	R	L	L	I	S	A	A	T	S	L	E	T	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	K	D	Y	T	L	S	I	T	S	L
14C10	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	R	A	S	N	L	E	S	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	R	T	D	F	T	L	T	I	N	P	V
8C5	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	R	A	A	N	L	Q	S	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G	S	R	T	D	F	T	L	T	I	D	P	V

FIG. 3A tiếp

CDR L3 – Tiếp xúc
CDR L3 – Chothia
CDR L3 – Kabat

Số Kabat	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
11F1	E	P	E	D	V	A	T	Y	F	C	Q	Q	Y	S	K	L	P	.	.	W	T	F	G	G	G	T	K	L	E	L	K
6D12	E	A	E	D	V	A	T	Y	Y	C	F	Q	G	T	G	Y	P			L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K
11D4	E	Q	E	D	K	A	T	Y	F	C	H	Q	V	R	T	L	P	.	.	W	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K
8E1	Q	S	E	D	V	A	S	Y	Y	C	Q	Q	Y	W	N	T	P	.	.	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K
46C3	E	A	G	D	L	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	S	H	V	.			L	T	F	G	A	G	T	R	L	E	L	K
8H7	R	T	E	D	L	A	V	Y	Y	C	Q	Q	H	Y	I	V	P	.	.	Y	T	F	G	G	G	T	T	L	E	I	E
21H3	R	T	E	D	L	A	V	Y	Y	C	Q	Q	H	Y	I	V	P	.	.	Y	T	F	G	G	G	T	T	L	E	I	E
25F7	Q	T	E	D	V	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	W	N	T	P	.	.	F	T	F	G	S	G	T	K	L	E	I	K
14E6	E	S	E	D	F	A	D	Y	Y	C	L	Q	Y	G	S	Y	P	.	.	W	T	F	G	G	G	T	K	L	E	L	K
14C6	E	A	E	D	A	A	S	Y	F	C	H	Q	W	S	S	Y	P			L	T	F	G	S	G	T	K	L	E	L	K
24A1	Q	A	E	D	L	A	D	Y	F	C	Q	Q	H	H	S	T	P	.	.	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	L	K
5F8	E	G	E	D	A	A	T	Y	Y	C	Q	Q	F	T	I	S	P	S	W	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K
6C1	Q	S	E	D	L	A	E	Y	F	C	Q	Q	Y	N	I	S	P	.	.	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K
12A11	E	P	E	D	V	G	V	Y	Y	C	Q	N	G	H	N	F	P	.	.	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K
12B8	Q	T	E	D	V	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	W	S	N	P			L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	I	K
14C10	E	A	D	D	V	A	N	Y	Y	C	Q	Q	S	N	E	D	.	.	.	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K
8C5	E	A	D	D	V	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	N	E	D	P	.	.	W	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K

FIG. 3A tiếp

Vùng thay đổi của chuỗi nặng

CDR H1 – Tiếp xúc

CDR H1 – Kabat

Số Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	35a	35b	36	37	38	39	40
11F1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	P	S	G	F	T	F	S	S	Y	G	I	S	.	.	W	V	R	Q	T
6D12	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	R	P	G	A	L	V	N	L	S	C	K	A	S	G	F	N	I	K	D	Y	Y	M	N	.	.	W	V	K	Q	R
11D4	Q	V	Q	V	K	E	S	G	P	G	L	V	A	P	S	Q	S	L	S	I	T	C	T	V	S	G	F	S	L	T	N	Y	G	V	S	.	.	W	I	R	Q	P
8E1	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	T	A	A	D	F	N	I	K	D	T	Y	M	H	.	.	W	V	K	Q	R
46C3	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	T	A	S	D	F	N	I	I	D	T	Y	I	H	.	.	W	V	K	Q	R
8H7	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	I	V	K	P	G	A	S	V	R	L	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	S	Y	W	I	H	.	.	W	V	K	Q	R
21H3	Q	V	Q	L	Q	Q	P	G	A	E	I	V	K	P	G	A	S	V	R	L	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	S	Y	W	I	H	.	.	W	V	K	Q	R
25F7	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	L	K	P	G	A	S	V	R	L	S	C	T	A	S	G	F	N	I	Q	D	T	F	T	H	.	.	W	V	R	Q	R
14E6	E	V	P	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	G	A	T	V	K	I	S	C	K	P	S	G	D	T	F	T	E	Y	T	M	N	.	.	W	V	R	Q	S
14C6	Q	I	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	M	K	P	G	A	S	V	R	M	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	S	S	Y	W	I	E	.	.	W	V	K	Q	R
24A1	Q	V	Q	L	K	Q	S	G	A	E	L	V	R	P	G	T	S	V	T	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	E	M	H	.	.	W	M	K	Q	T
5F8	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	T	E	L	V	R	P	G	A	S	V	K	L	S	C	T	S	S	D	F	N	I	K	D	T	Y	I	H	.	.	W	V	K	Q	R
6C1	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	D	E	L	M	K	P	G	A	S	V	K	I	S	C	K	V	T	G	N	T	F	S	S	Y	W	I	E	.	.	W	V	K	Q	R
12A11	E	V	K	F	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	V	S	G	I	D	F	S	R	Y	W	M	S	.	.	W	V	R	Q	A
12B8	Q	I	Q	L	V	Q	S	G	P	E	L	K	K	P	G	E	T	A	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	A	F	S	N	Y	G	M	N	.	.	W	V	K	Q	A
14C10	Q	V	T	L	K	E	S	G	P	G	I	L	Q	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	S	F	S	G	F	S	L	S	T	S	A	M	G	I	G	W	I	R	Q	P
8C5	Q	V	Q	L	K	Q	S	G	P	G	L	V	Q	P	S	Q	S	L	S	V	A	C	T	V	S	D	F	S	L	T	T	Y	G	V	H	.	.	W	V	R	Q	S

FIG. 3B

CDR H2 – Tiếp xúc

CDR H2 – Chothia

CDR H2 – Kabat

Số Kabat	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81
11F1	P	E	K	R	L	E	W	V	A	T	V	S	S	G	G	R	Y	T	Y	Y	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	E	N	T	L	Y	L	Q
6D12	P	E	Q	G	L	E	W	T	G	W	I	D	P	E	N	D	D	T	I	Y	D	P	K	F	Q	G	K	A	T	I	T	A	D	T	S	S	N	T	V	Y	L	Q
11D4	P	G	K	G	L	E	W	L	G	V	I	W	.	G	D	G	S	I	N	Y	H	S	A	L	I	S	R	L	T	I	T	K	D	N	S	K	S	Q	V	F	L	K
8E1	P	E	Q	G	L	E	W	I	G	R	I	D	P	S	N	G	N	A	K	Y	D	P	K	F	Q	G	K	A	S	I	T	A	D	S	S	S	N	T	A	Y	L	H
46C3	P	E	Q	G	L	E	W	I	G	R	I	D	P	A	N	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	Q	D	K	A	A	L	T	S	D	T	D	S	N	T	A	Y	L	L
8H7	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	E	I	D	P	S	V	S	N	S	N	Y	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	A	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q
21H3	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	E	I	D	P	S	V	S	N	S	N	Y	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	A	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q
25F7	P	E	Q	G	L	E	W	I	G	R	I	D	P	S	N	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G	K	A	K	I	L	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	L	Q
14E6	H	G	K	S	L	E	W	I	G	G	I	N	P	N	N	G	E	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	F	M	D
14C6	S	G	H	G	L	E	W	I	G	E	I	F	P	G	G	G	S	T	I	Y	N	E	N	F	R	D	K	A	T	F	T	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	M	Q
24A1	P	V	Y	G	L	E	W	I	G	A	I	W	P	E	N	A	D	S	V	Y	N	Q	K	F	K	G	K	V	T	L	T	A	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	D
5F8	P	E	Q	G	L	D	W	L	G	R	I	D	P	A	N	G	N	T	K	Y	D	P	K	F	Q	G	K	A	A	M	T	S	D	T	S	S	N	T	A	Y	L	R
6C1	P	G	H	G	L	E	W	I	G	E	I	L	P	G	S	D	S	T	K	Y	V	E	K	F	K	V	K	A	T	F	T	A	D	T	S	S	N	T	A	Y	M	Q
12A11	P	G	K	G	L	E	W	I	G	E	I	S	P	D	S	S	T	I	N	Y	T	P	S	L	K	D	K	F	V	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q
12B8	P	G	K	D	L	K	W	M	G	W	I	D	T	D	T	G	E	A	T	Y	T	D	D	F	K	G	R	F	V	F	S	L	E	T	S	A	S	T	A	Y	L	Q
14C10	S	G	K	G	L	E	W	L	A	H	I	W	.	W	D	D	D	K	R	Y	N	P	A	L	K	S	R	L	T	I	S	K	D	T	S	R	N	Q	V	F	L	K
8C5	P	G	K	G	L	E	W	L	G	V	I	W	.	S	G	G	S	T	D	Y	N	A	A	F	I	S	R	L	T	I	S	K	D	N	S	K	S	Q	V	F	F	K

FIG. 3B tiếp

CDR H3 – Tiếp xúc

CDR H1 – Tiếp xúc

CDR H3 – Kabat

Số Kabat	82	82a	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
11F1	M	S	S	L	R	S	E	D	T	A	M	Y	Y	C	T	R	G	G	D	G	Y	A	L	.	.	.	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S
6D12	L	T	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	A	F	T	T	V	F	.	.	.	.	.	.	.	.	A	Y	W	G	H	Q	T	M	V	T	V	S	A
11D4	L	N	S	L	E	A	D	D	T	A	T	Y	Y	C	A	K	T	H	D	W	F	.	.	.	.	.	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
8E1	L	S	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	S	R	A	L	G	N	G	Y	A	L	.	.	.	.	G	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S
46C3	F	N	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	S	Y	S	W	F	.	.	.	.	.	.	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	S	V	S	A
8H7	L	S	G	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	V	R	L	G	V	M	V	Y	G	S	S	P	F	W	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
21H3	L	S	G	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	V	R	L	G	V	M	V	Y	G	S	S	P	F	W	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
25F7	L	I	G	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	S	R	A	L	G	N	G	Y	A	M	.	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S
14E6	L	R	I	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	A	R	K	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	Y	W	G	Q	G	T	T	L	I	V	S	S
14C6	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	A	R	R	G	Y	Y	D	A	A	W	F	.	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
24A1	L	R	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	T	R	E	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S
5F8	L	S	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	S	S	G	N	Y	G	A	M	.	.	.	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S
6C1	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	G	G	Y	H	Y	P	G	W	L	.	.	.	.	V	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
12A11	M	S	K	V	R	S	A	D	T	A	L	Y	Y	C	A	R	P	S	P	A	L	.	.	.	.	.	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
12B8	I	N	N	L	K	N	E	D	M	A	T	Y	F	C	A	R	E	E	Y	G	L	F	G	F	.	.	.	.	.	P	Y	W	G	H	G	T	L	V	T	V	S	A
14C10	I	A	S	V	D	T	A	D	T	A	T	Y	F	C	A	R	I	D	G	I	Y	D	G	S	F	Y	A	M	.	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S
8C5	M	N	S	L	Q	T	T	D	T	A	I	Y	Y	C	A	R	D	Y	G	S	T	Y	V	D	A	I	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S

FIG. 3B tiếp

10/43

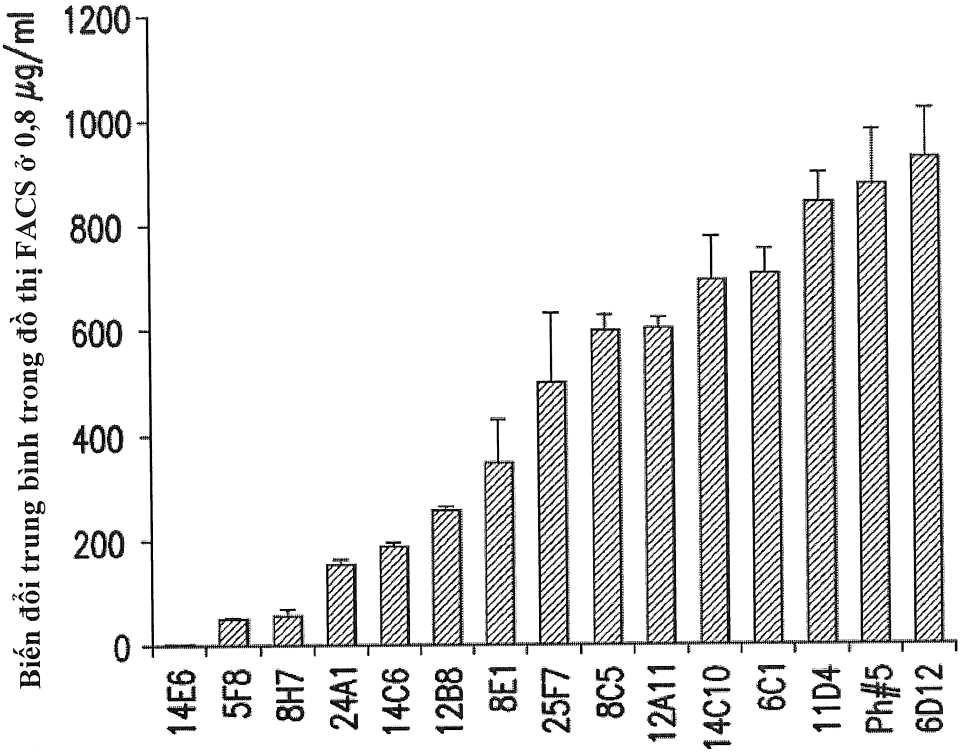


FIG. 4

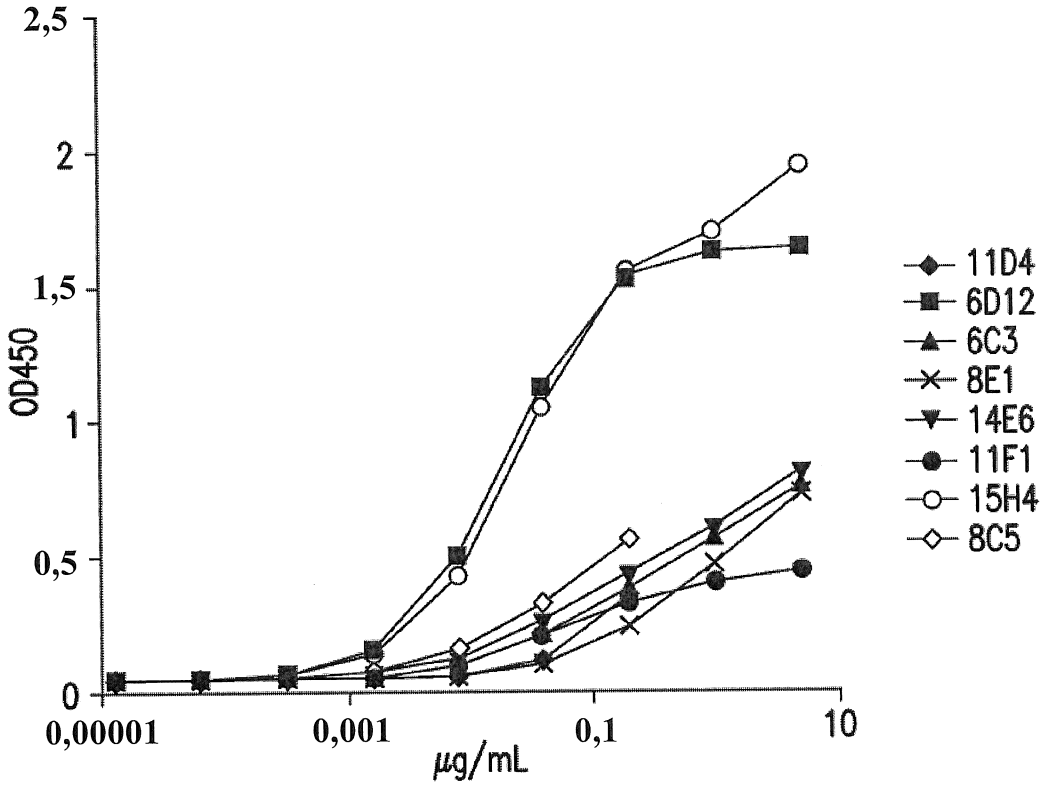


FIG. 5

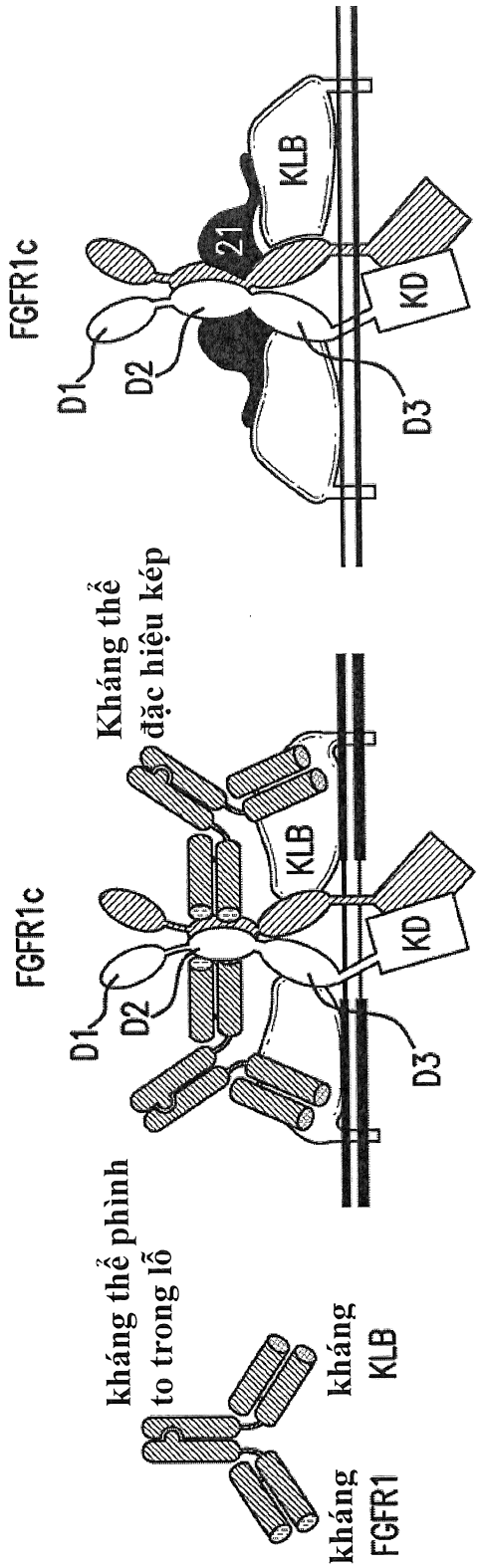

FGFR1c
D1
D2
21
KLB
KD
D3
Kháng thể đặc hiệu kép
FGFR1c
D1
D2
KLB
KD
D3
kháng thể phình to trong lỗ
kháng KLB
kháng FGFR1

FIG. 6B

FIG. 6A

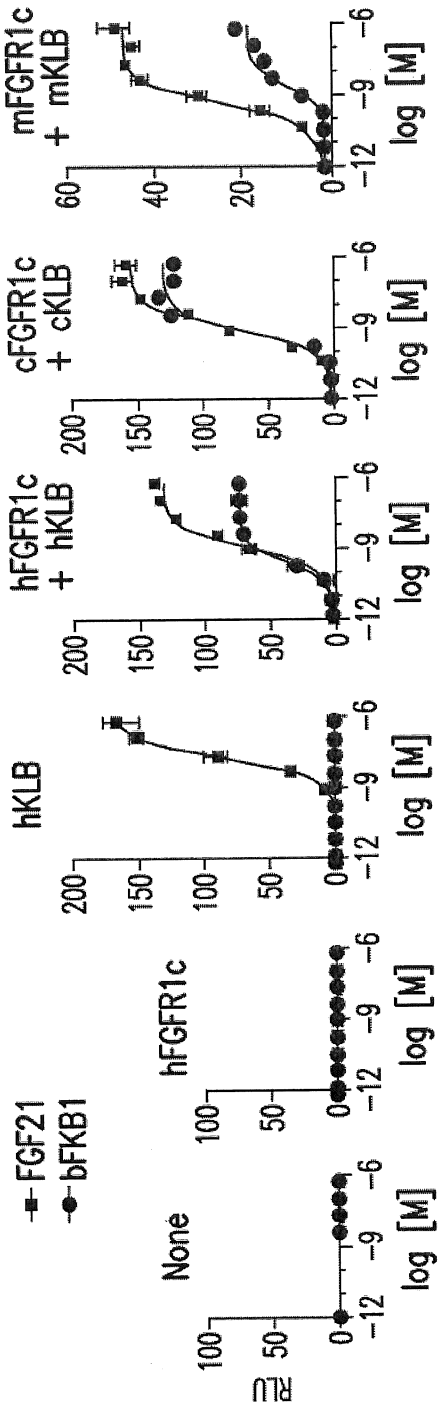

FGF21
bFKB1
None
hFGFR1c
hKLB
hFGFR1c + hKLB
cFGFR1c + cKLB
mFGFR1c + mKLB
RLU
log [M]

FIG. 6C

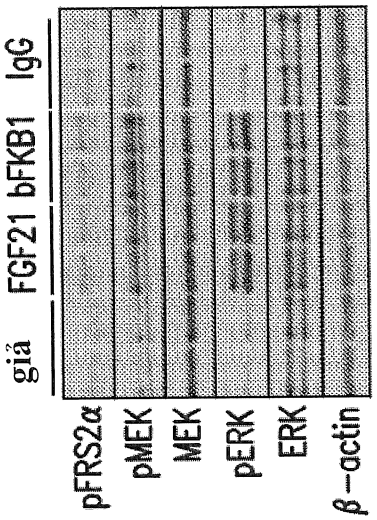
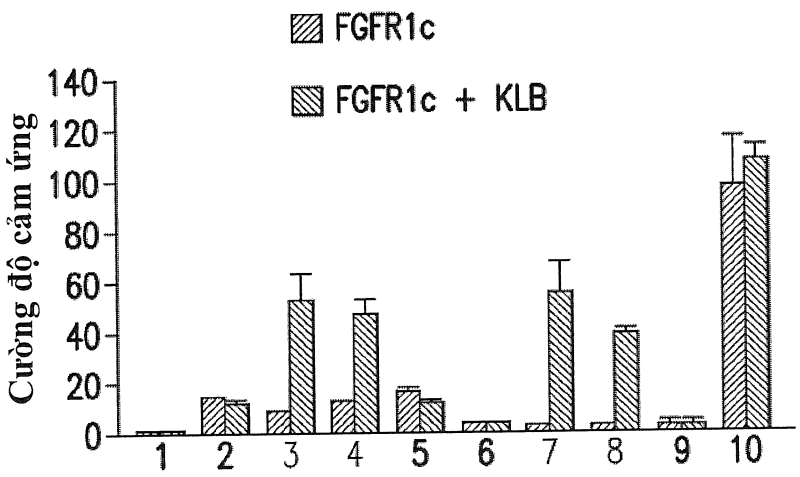
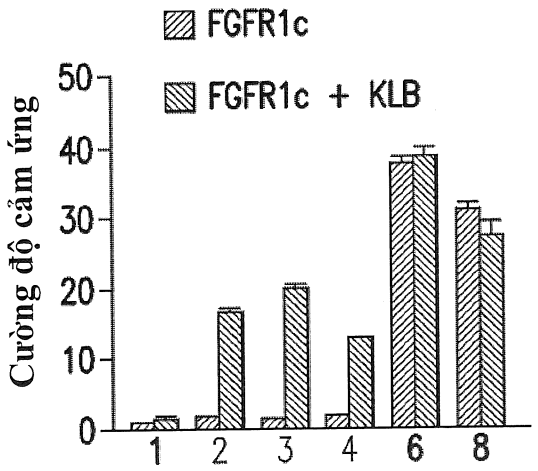

giả
FGF21
bFKB1
IgG
pFRS2α
pMEK
MEK
pERK
ERK
β−actin

FIG. 6D



1. Gây nhiễm giả
2. R1MAb1/trastumab
3. R1MAb1/KLBmAb1
4. R1MAb1/KLBmAb3
5. R1MAb1/KLBmAb7
6. R1MAb2/trastumab
7. R1MAb2/KLBmAb1
8. R1MAb2/KLBmAb3
9. R1MAb2/KLBmAb7
10. R1MAb1 tinh chế (133 nM)

FIG. 7A



1. Gây nhiễm giả
2. R1MAb3/KLBmAb1 (bFKB1)
3. R1MAb3/KLBmAb2
4. R1MAb3/KLBmAb3
5. R1MAb3 tinh chế (133 nM)
6. R1MAb2 tinh chế (133 nM)

FIG. 7B

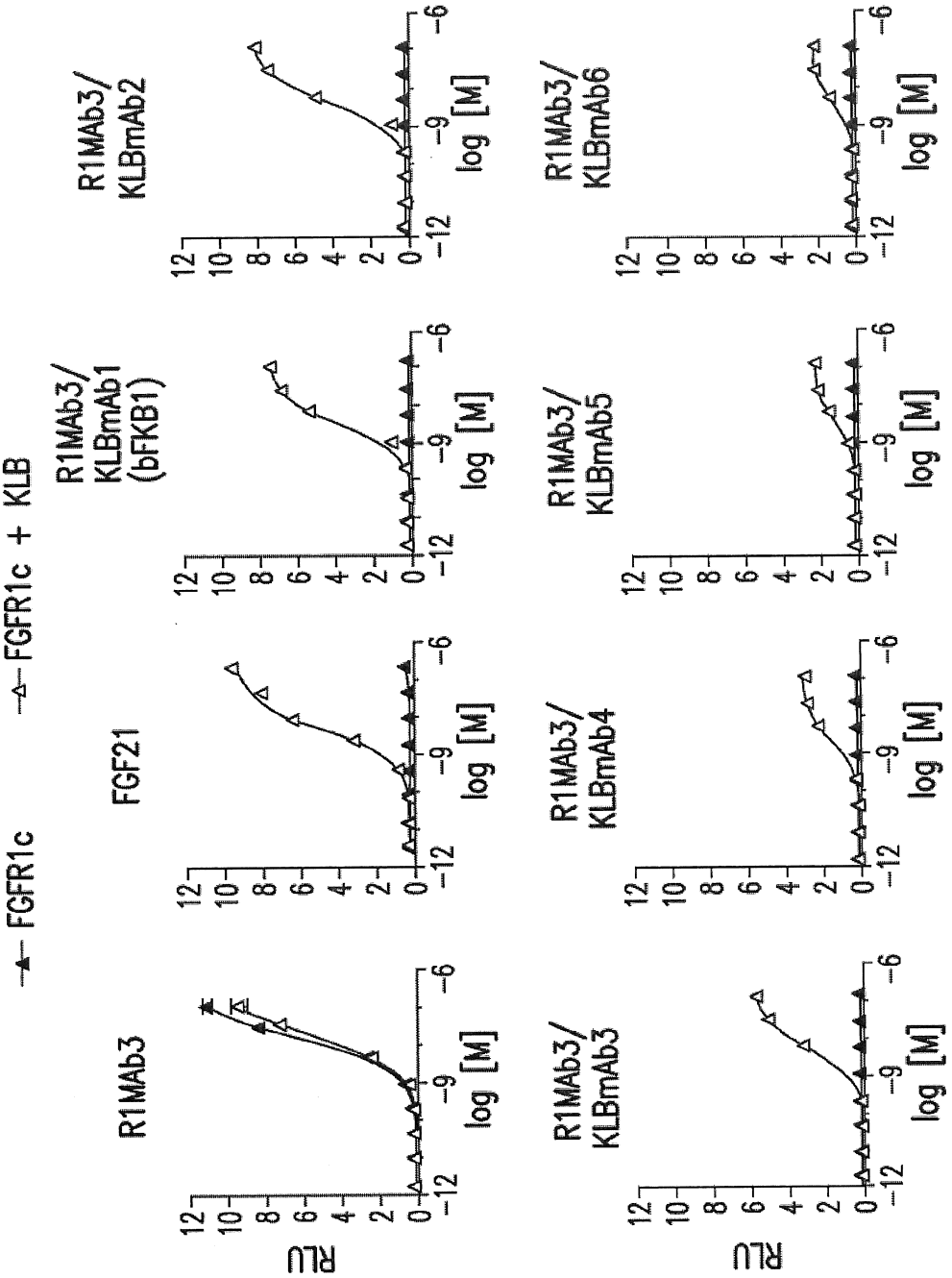

FGFR1c
FGFR1c + KLB
R1MAb3
FGF21
R1MAb3/
KLBmAb1
(bFKB1)
R1MAb3/
KLBmAb2
R1MAb3/
KLBmAb3
R1MAb3/
KLBmAb4
R1MAb3/
KLBmAb5
R1MAb3/
KLBmAb6
RLU
log [M]
12
10
8
6
4
2
0
−12
−9
−6

FIG. 7C

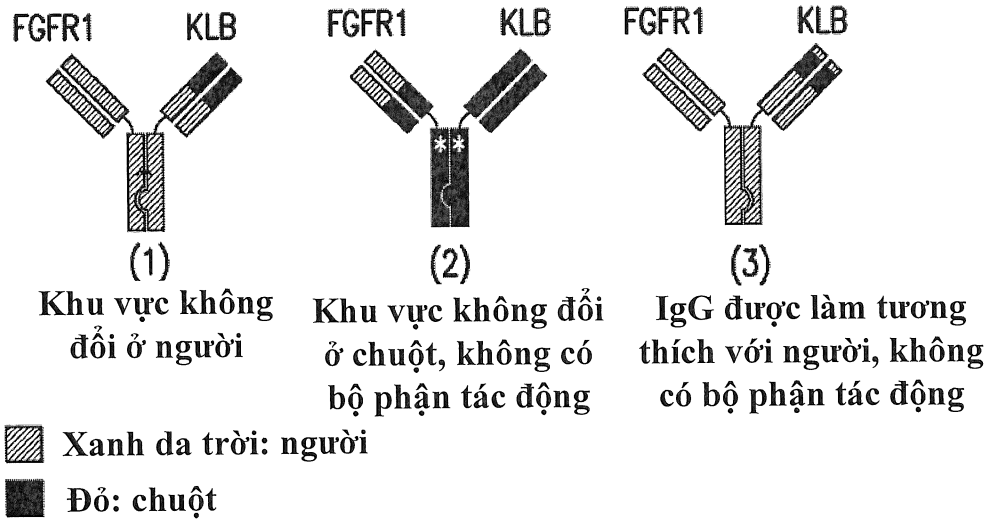

FGFR1
KLB
FGFR1
KLB
FGFR1
KLB
(1)
Khu vực không đổi ở người
(2)
Khu vực không đổi ở chuột, không có bộ phận tác động
(3)
IgG được làm tương thích với người, không có bộ phận tác động
Xanh da trời: người
Đỏ: chuột

FIG. 8A

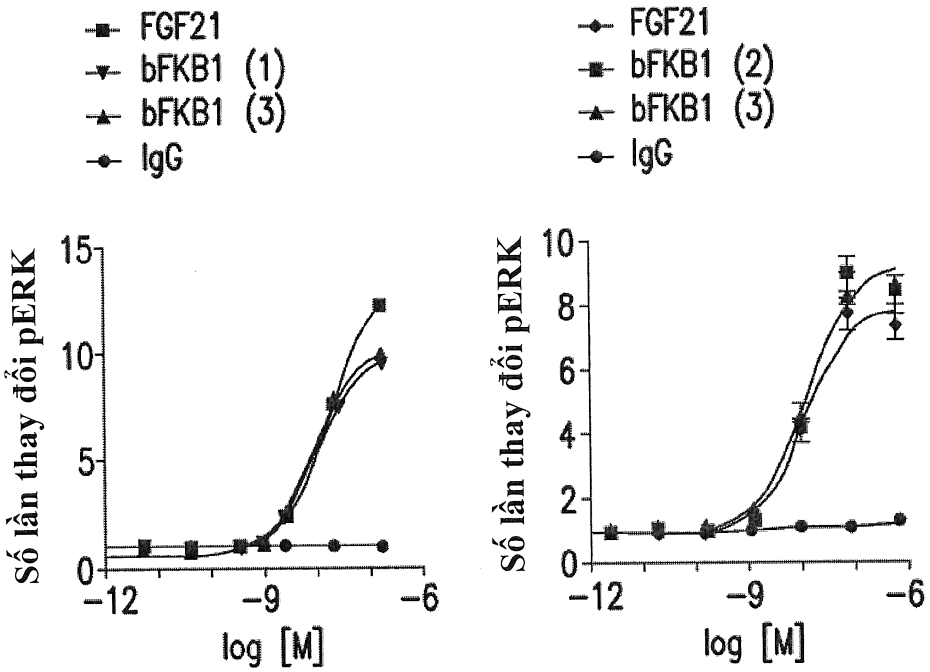

FGF21
bFKB1 (1)
bFKB1 (3)
IgG
Số lần thay đổi pERK
15
10
5
0
−12
−9
−6
log [M]
FGF21
bFKB1 (2)
bFKB1 (3)
IgG
Số lần thay đổi pERK
10
8
6
4
2
0
−12
−9
−6
log [M]

FIG. 8B

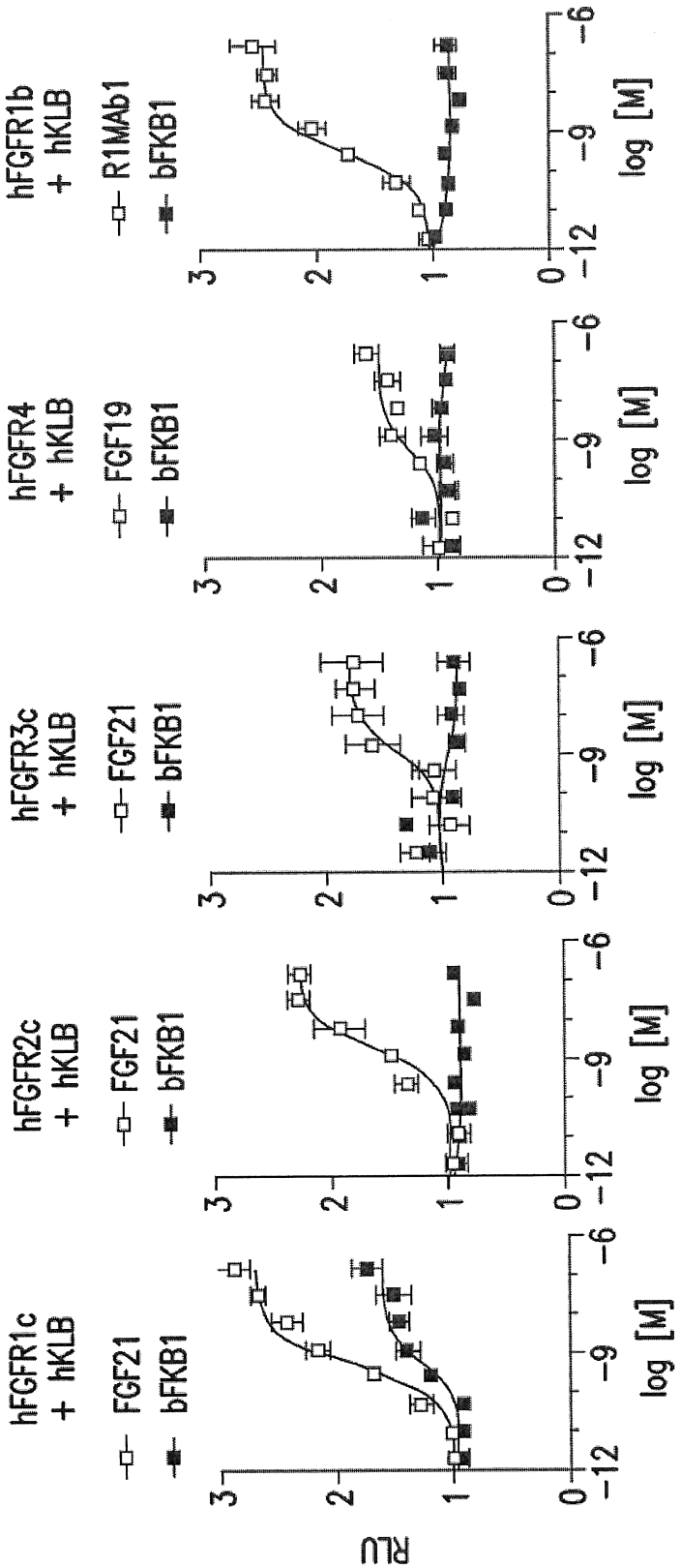

hFGFR1c
+ hKLB
FGF21
bFKB1
hFGFR2c
+ hKLB
FGF21
bFKB1
hFGFR3c
+ hKLB
FGF21
bFKB1
hFGFR4
+ hKLB
FGF19
bFKB1
hFGFR1b
+ hKLB
R1MAb1
bFKB1
RLU
log [M]
0
1
2
3
−12
−9
−6

FIG. 9A

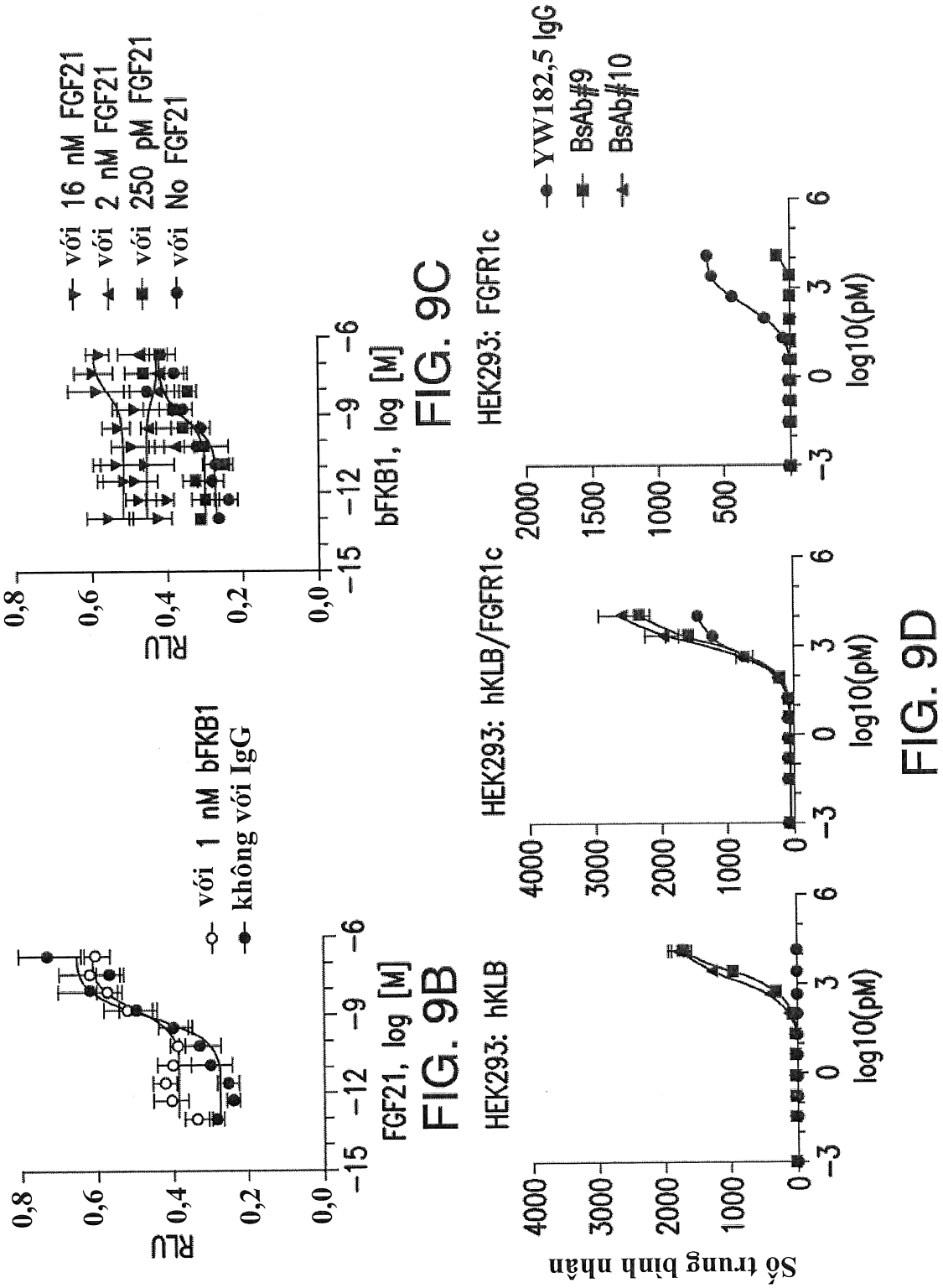


FIG. 9B

FIG. 9C

FIG. 9D

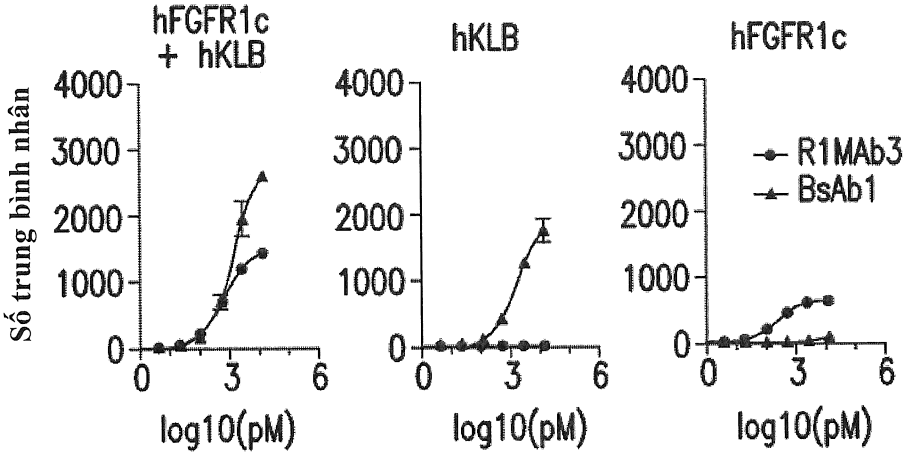


FIG. 10A

FGFR1 KLB	Người Người	Người (không)	(không) Người	(không) Chuột
BsAb1	2,3 nM	>300nM	6,6 nM	15,5 nM
FGF21	5,3 nM	n.d.	n.d.	n.d.

FIG. 10B

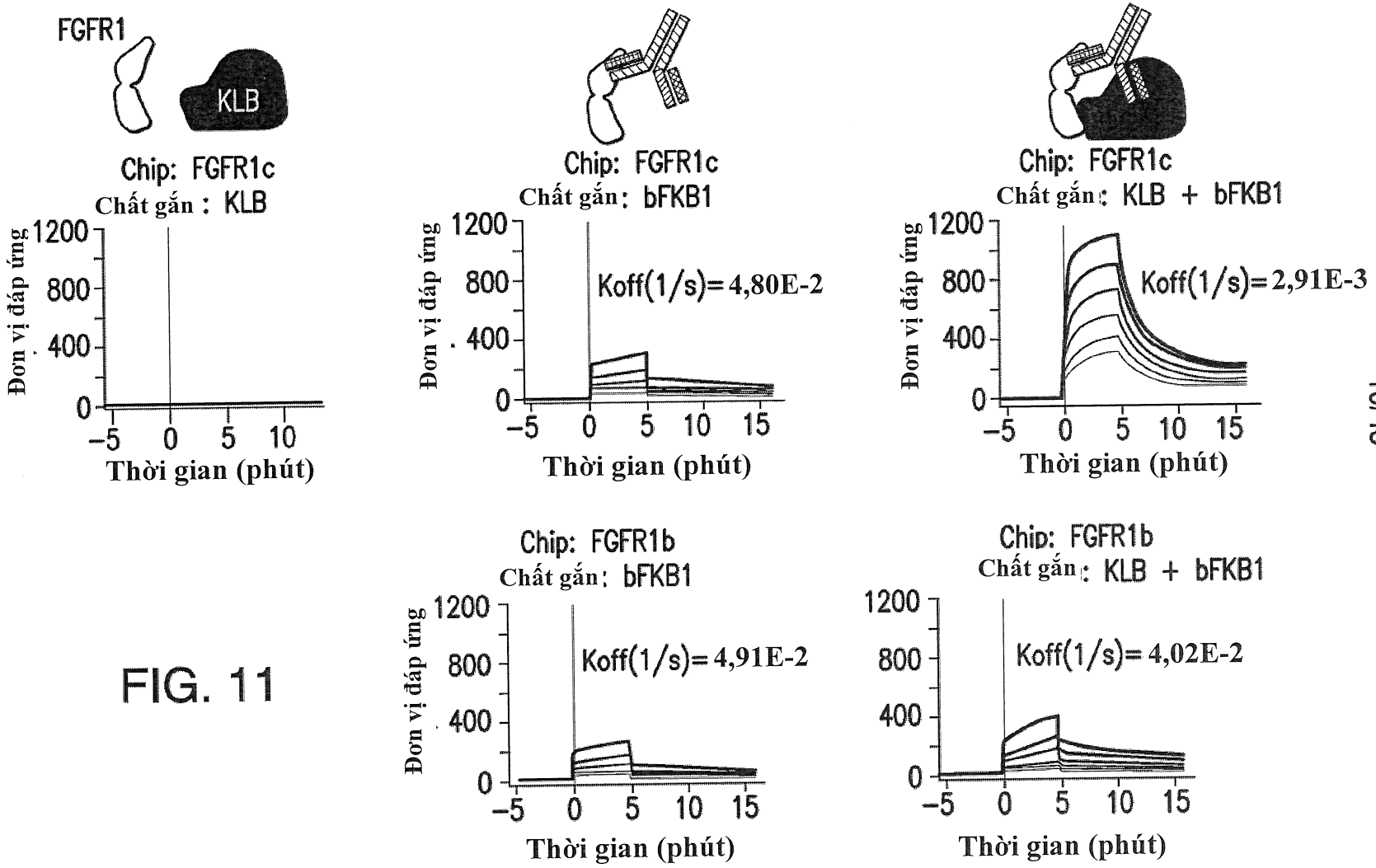

FGFR1
KLB
Chip: FGFR1c
Chất gắn : KLB
Đơn vị đáp ứng
1200
800
400
0
−5
0
5
10
Thời gian (phút)
Chip: FGFR1c
Chất gắn: bFKB1
Koff(1/s)= 4,80E-2
15
Chip: FGFR1c
Chất gắn: KLB + bFKB1
Koff(1/s)= 2,91E-3
Chip: FGFR1b
Chất gắn: bFKB1
Koff(1/s)= 4,91E-2
Chip: FGFR1b
Chất gắn: KLB + bFKB1
Koff(1/s)= 4,02E-2

FIG. 11

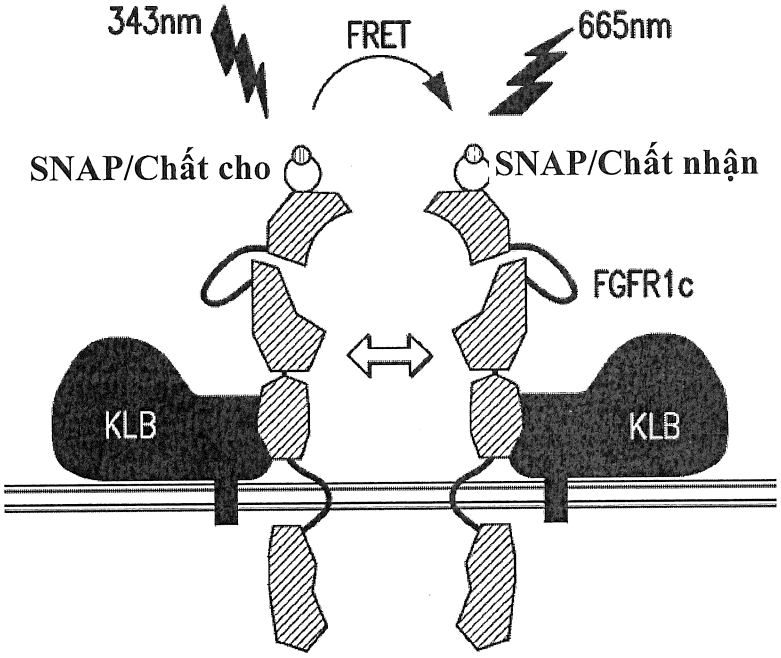


FIG. 12A

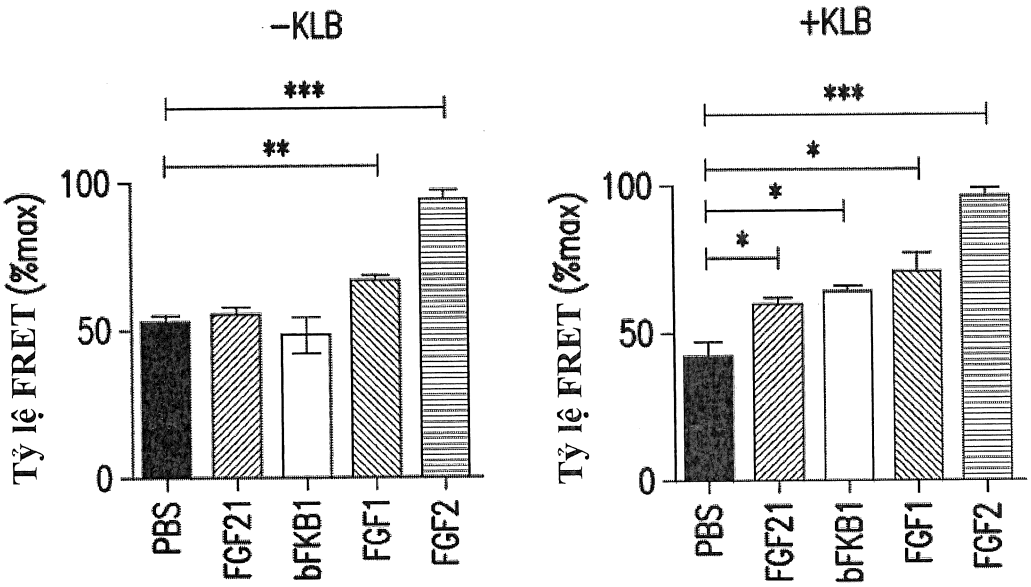


FIG. 12B

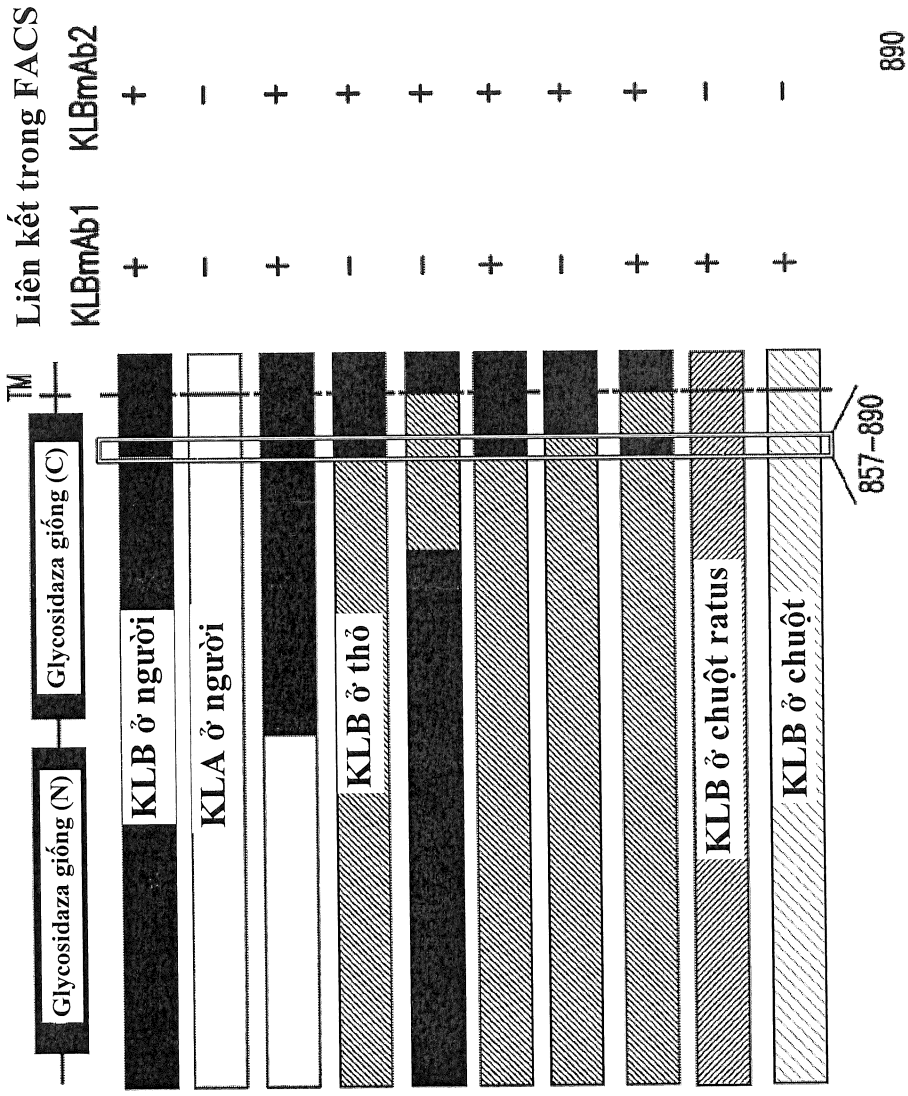


FIG. 13A

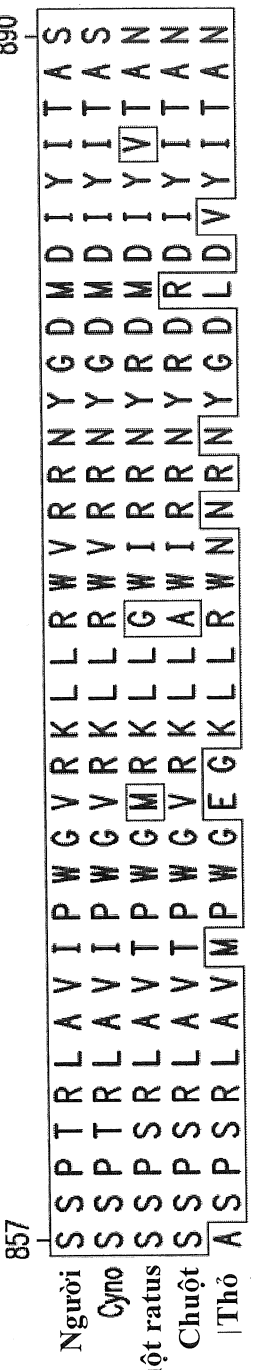


FIG. 13B

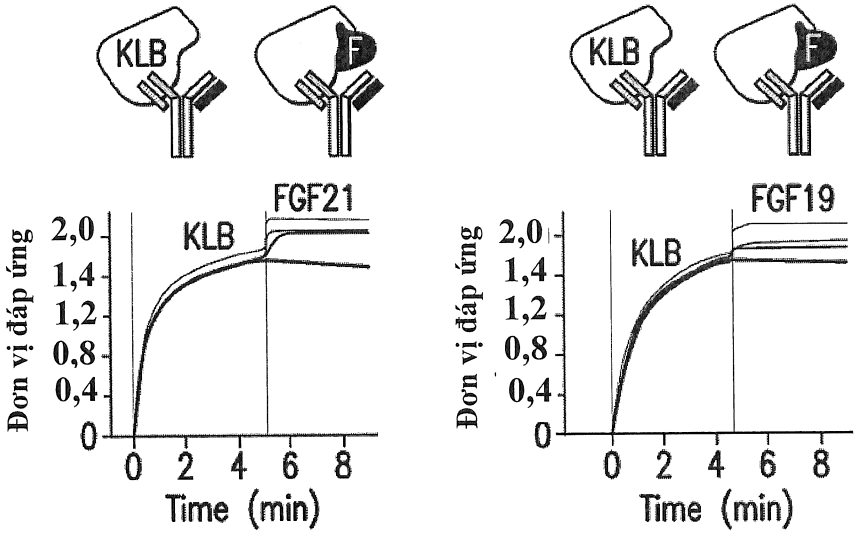


FIG. 14A

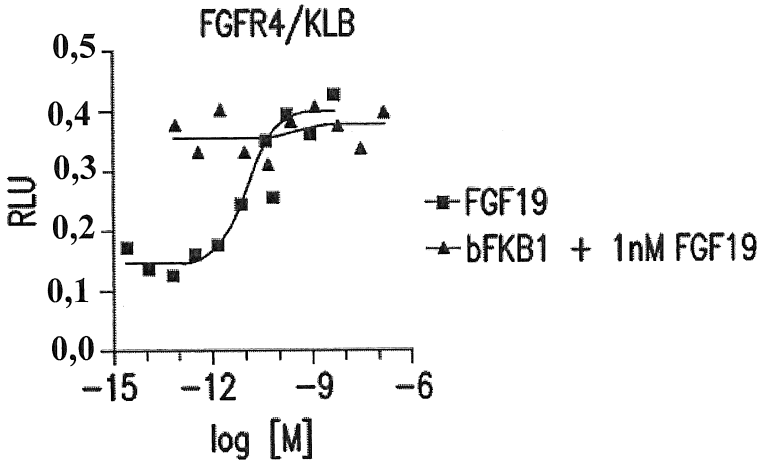


FIG. 14B

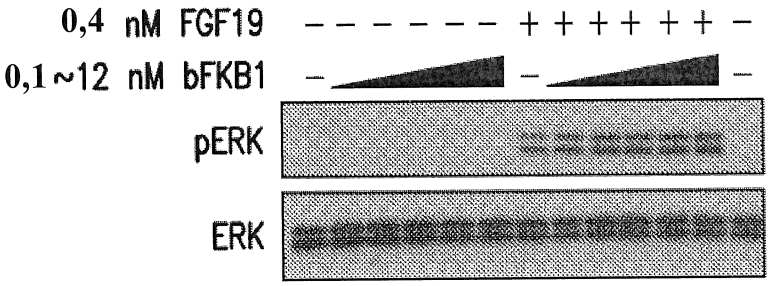


FIG. 14C

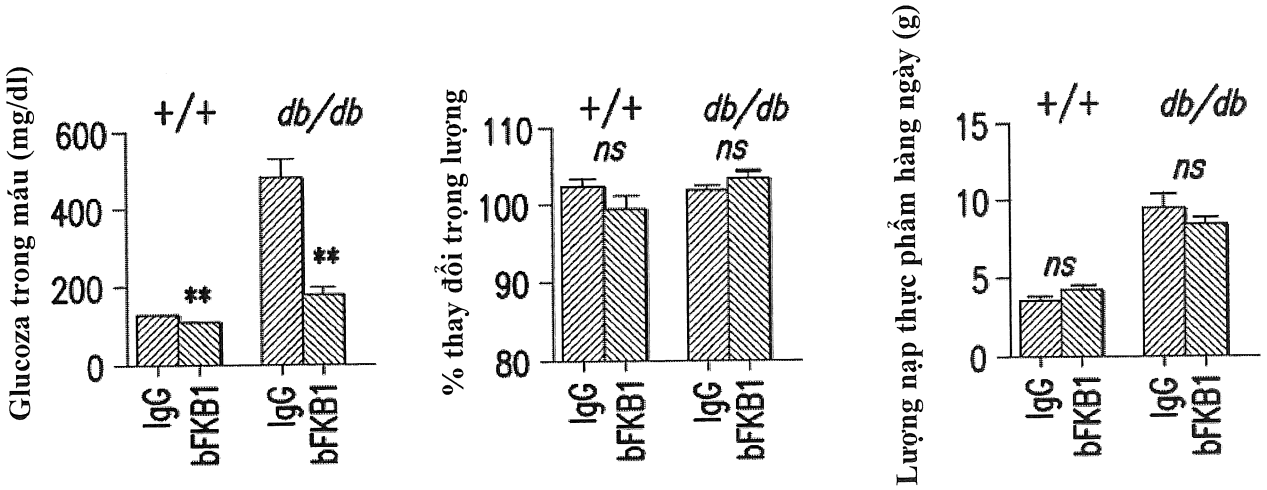


FIG. 15A

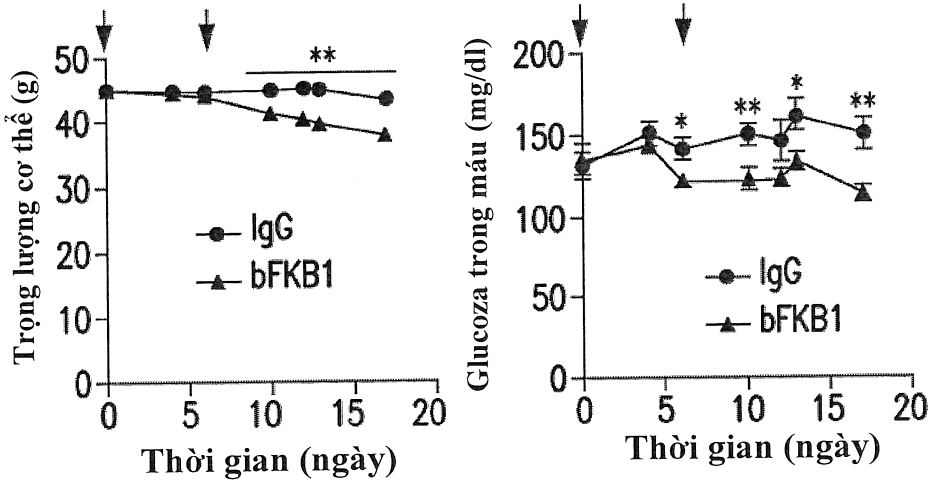


FIG. 15B

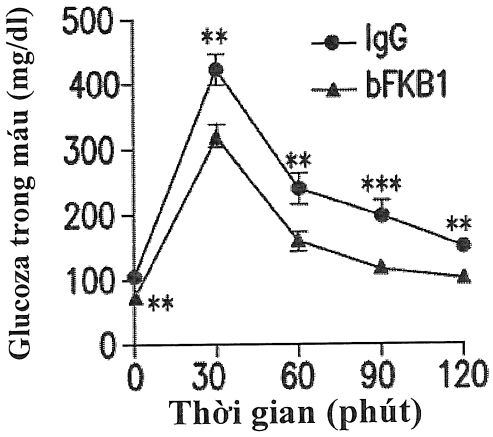


FIG. 15C

FIG. 15D

FIG. 15E

FIG. 15F

FIG. 15G

wt: F S G D G K A I W D K K Q Y V S P ...
ko: F S E T G K Q Y G I K N S T *

FIG. 16A

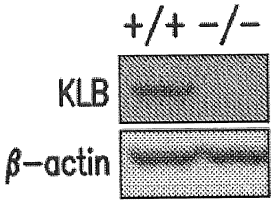


FIG. 16B

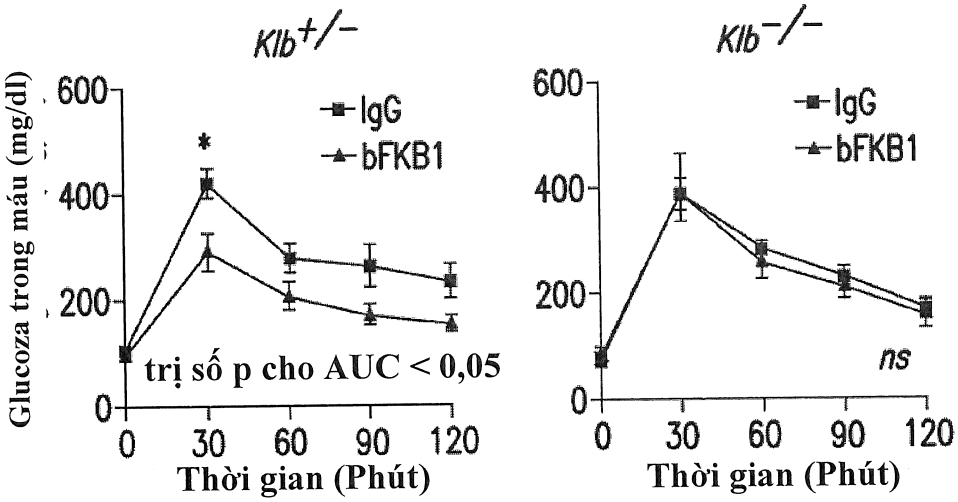


FIG. 16C

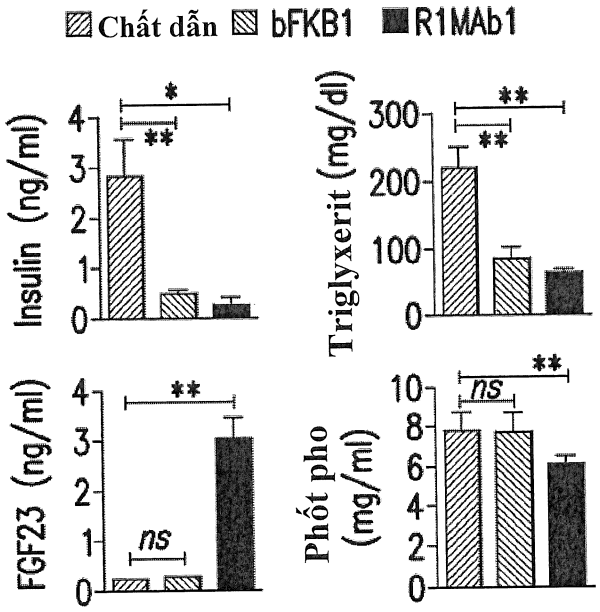
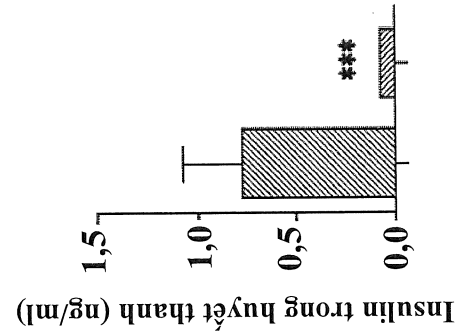
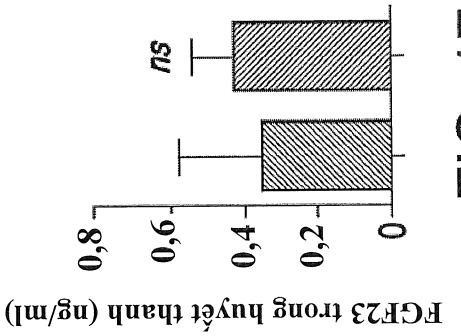


FIG. 16D


Insulin trong huyết thanh (ng/ml)
1,5
1,0
0,5
0,0
***


FGF23 trong huyết thanh (ng/ml)
0,8
0,6
0,4
0,2
0
ns

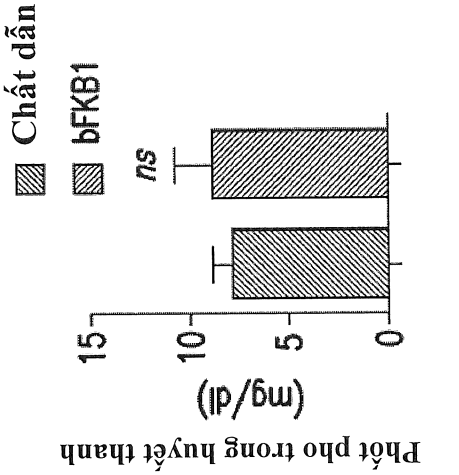

Phốt pho trong huyết thanh
(mg/dl)
15
10
5
0
ns
Chất dẫn
bFKB1

FIG. 17

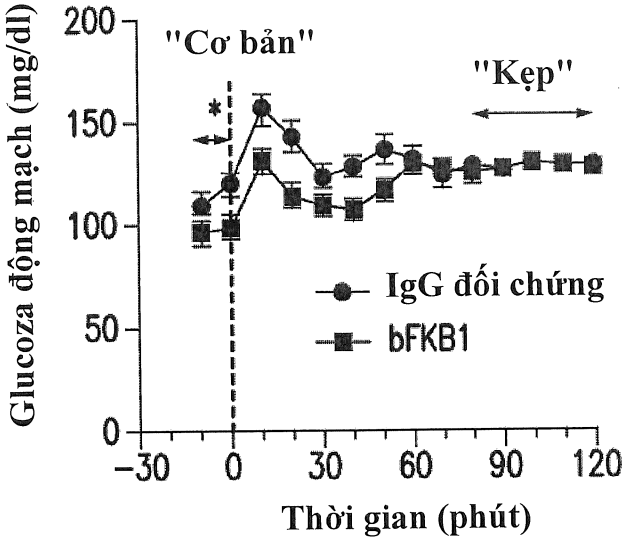


FIG. 18A

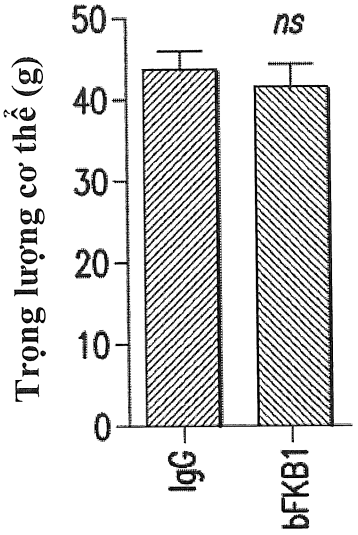


FIG. 18B

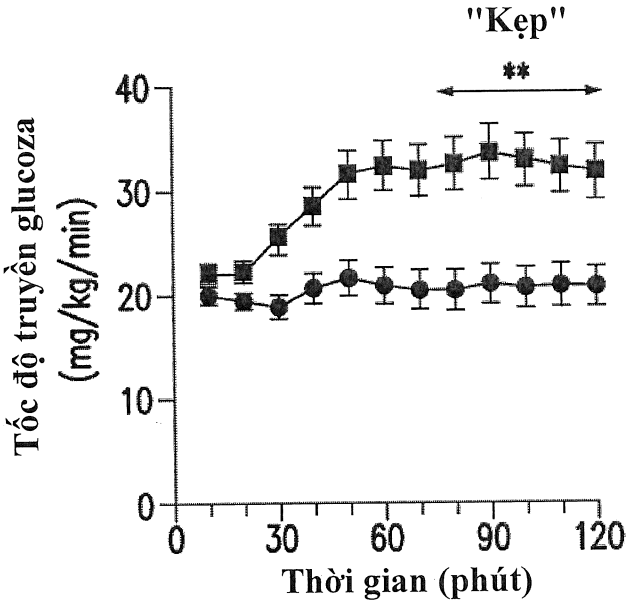
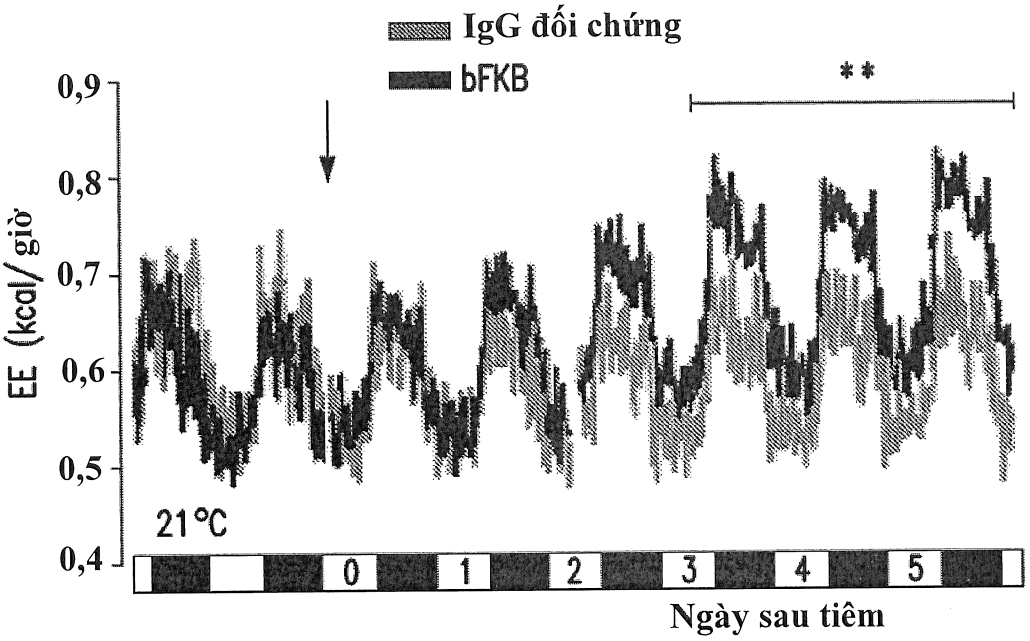


FIG. 18C

28/43


IgG đối chứng
bFKB
**
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
EE (kcal/ giờ
21°C
0
1
2
3
4
5
Ngày sau tiêm

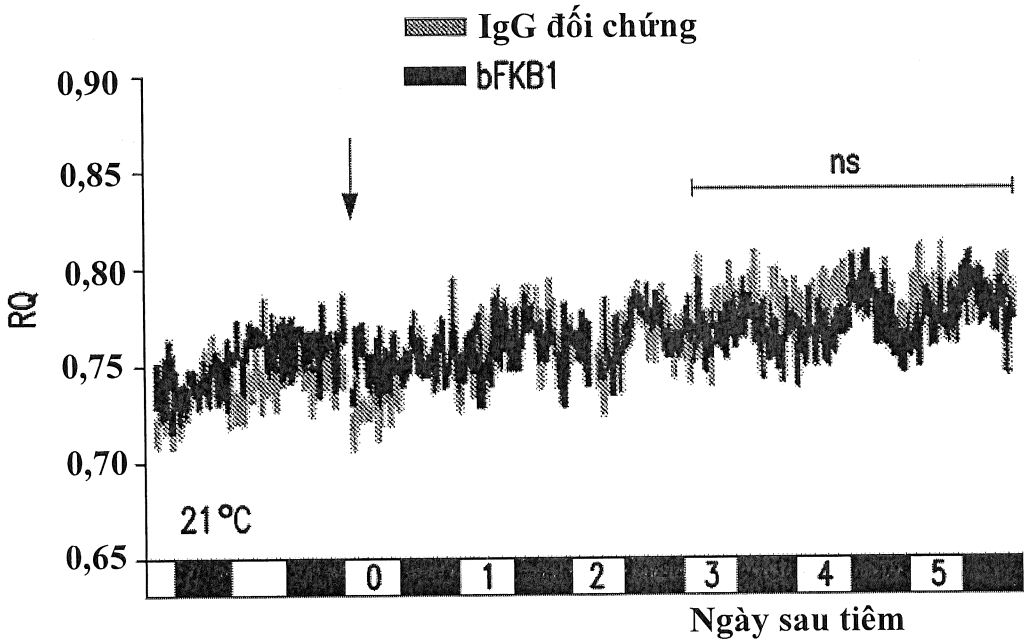

IgG đối chứng
bFKB1
ns
0,90
0,85
0,80
0,75
0,70
0,65
RQ
21°C
0
1
2
3
4
5
Ngày sau tiêm

FIG. 19A

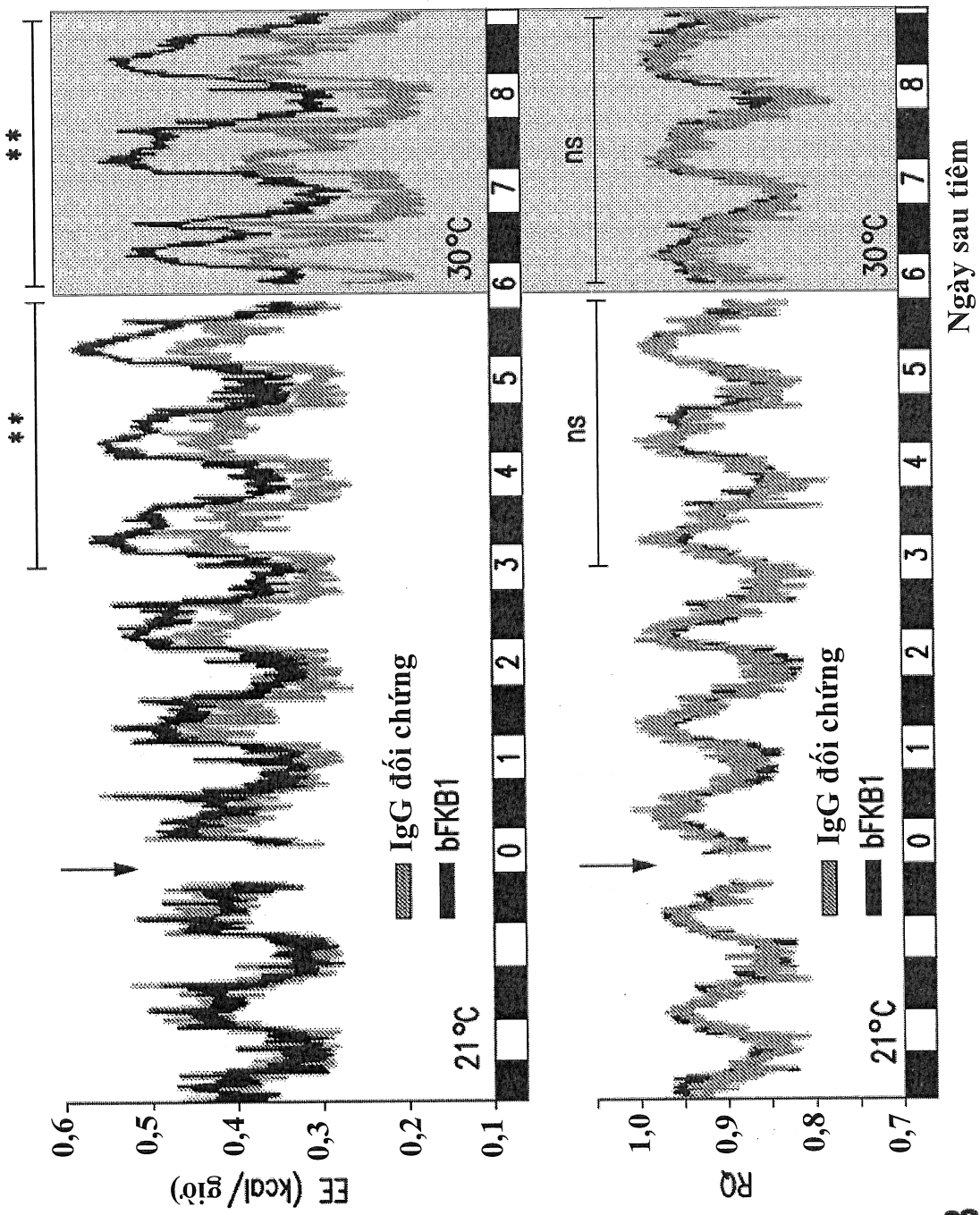

EE (kcal/ giờ)
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
**
**
IgG đối chứng
bFKB1
21°C
30°C
0
1
2
3
4
5
6
7
8
RQ
1,0
0,9
0,8
0,7
ns
ns
Ngày sau tiêm

FIG. 19B

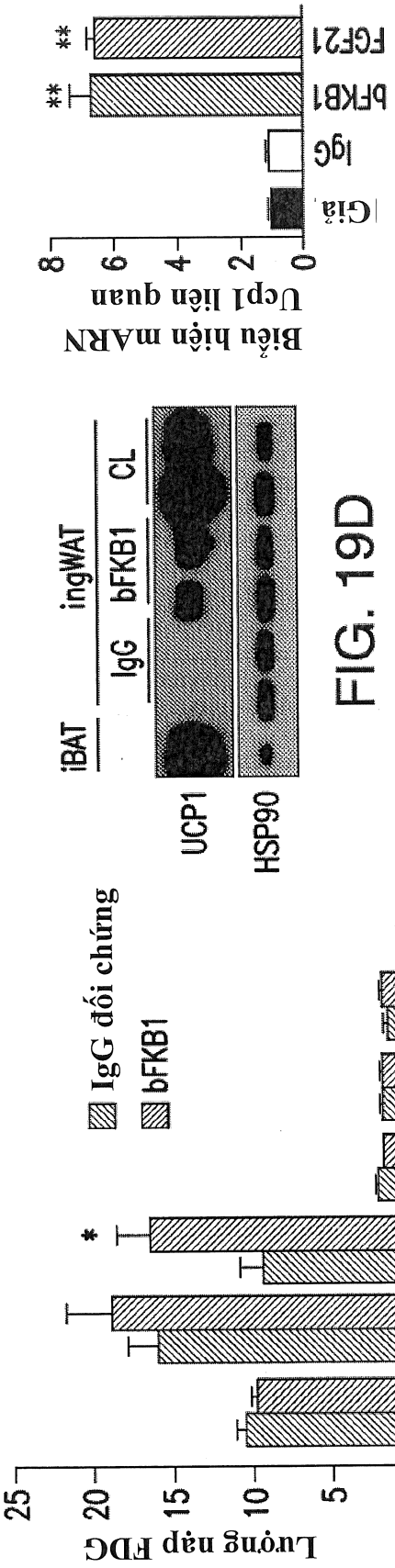


FIG. 19C

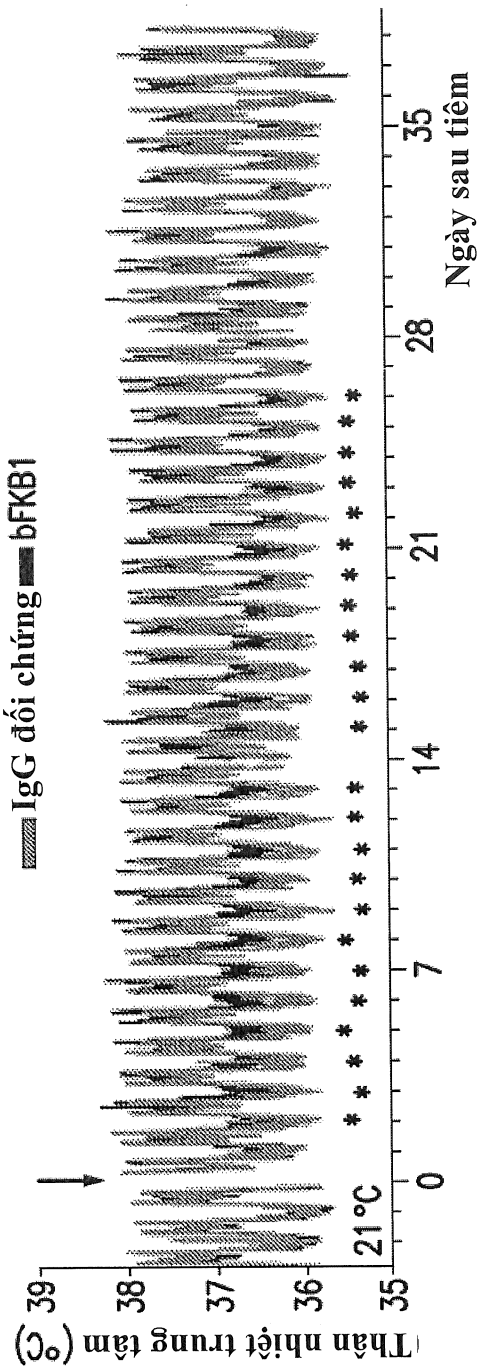


FIG. 19D

FIG. 19E

31/43

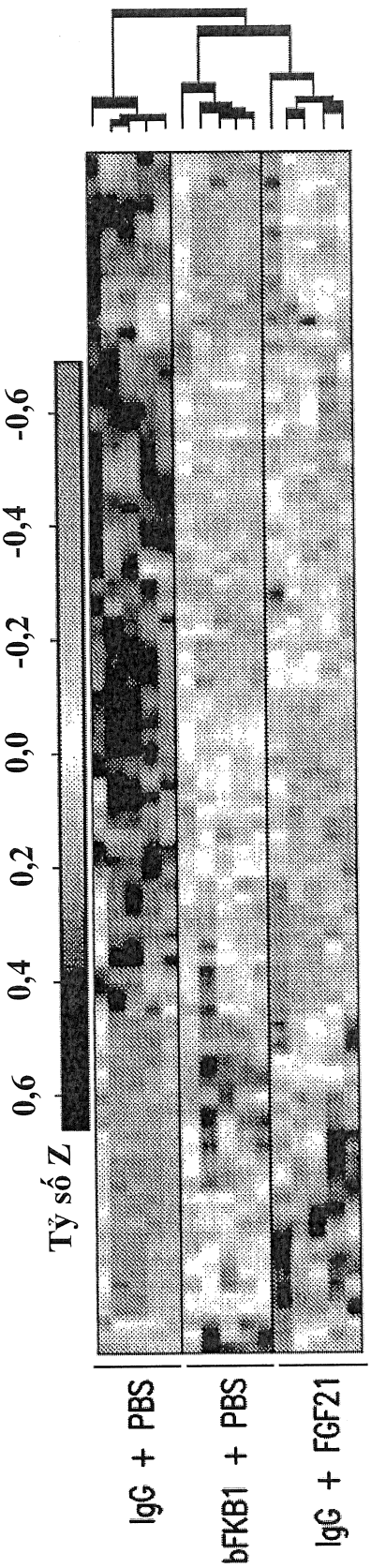


FIG. 19G

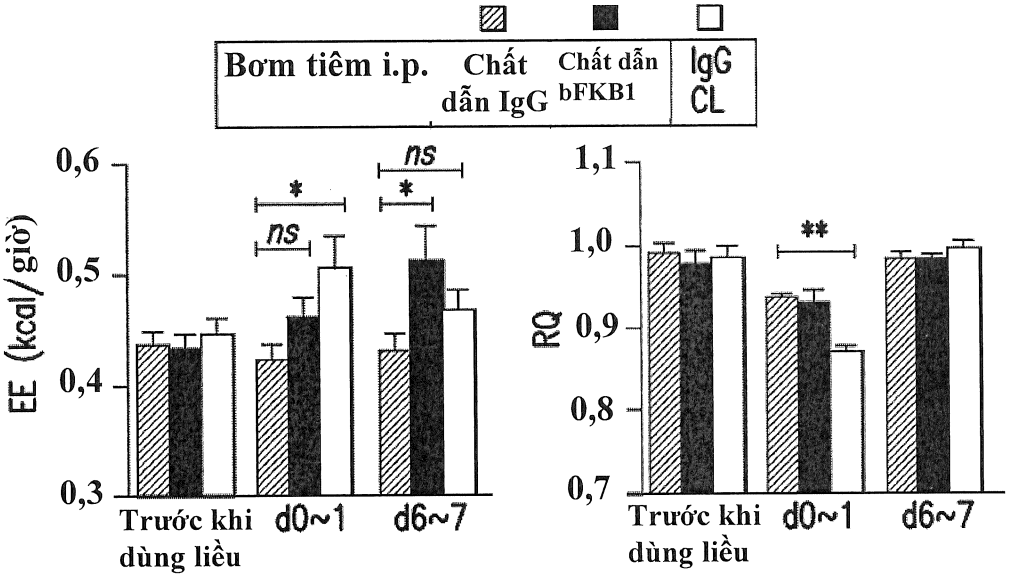

Bơm tiêm i.p.
Chất dẫn IgG
Chất dẫn bFKB1
IgG CL
EE (kcal/giờ)
0,6
0,5
0,4
0,3
ns
*
ns
*
Trước khi dùng liều
d0~1
d6~7
RQ
1,1
1,0
0,9
0,8
0,7
**
Trước khi dùng liều
d0~1
d6~7

FIG. 19H

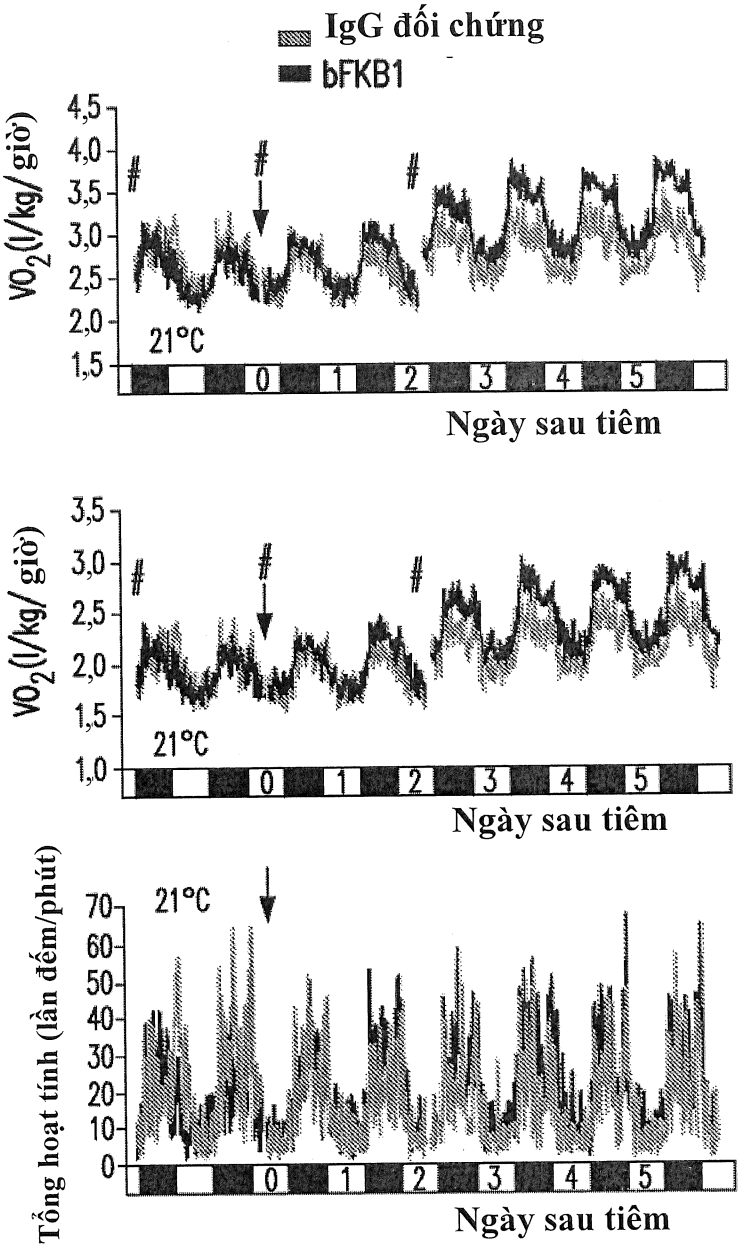

IgG đối chứng
bFKB1
VO_2(l/kg/ giờ)
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
#
21°C
0
1
2
3
4
5
Ngày sau tiêm
VO_2(l/kg/ giờ)
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
Ngày sau tiêm
Tổng hoạt tính (lần đếm/phút)
70
60
50
40
30
20
10
0
Ngày sau tiêm

FIG. 20A

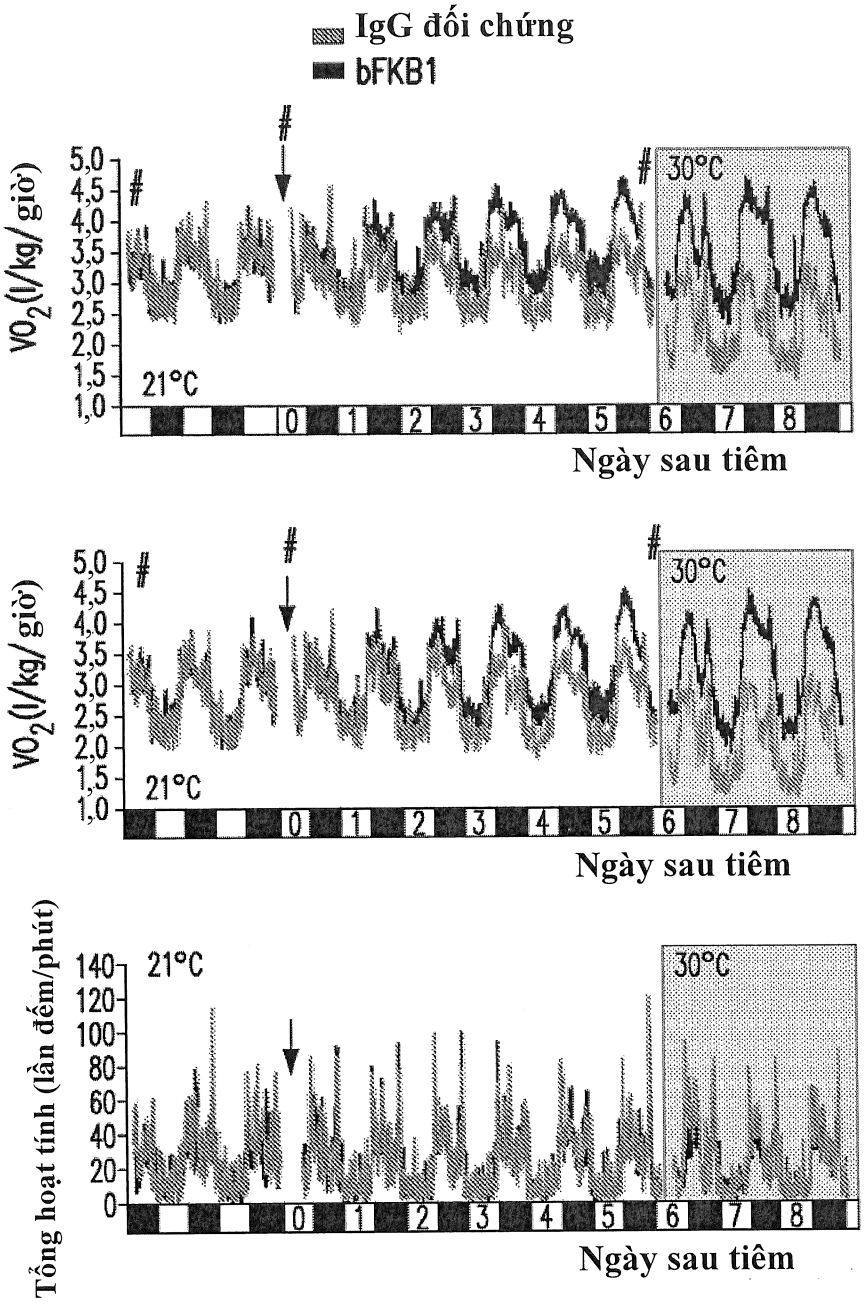

IgG đối chứng
bFKB1
VO2(l/kg/giờ)
5,0
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
21°C
30°C
0 1 2 3 4 5 6 7 8
Ngày sau tiêm
Tổng hoạt tính (lần đếm/phút)
140
120
100
80
60
40
20
0

FIG. 20B

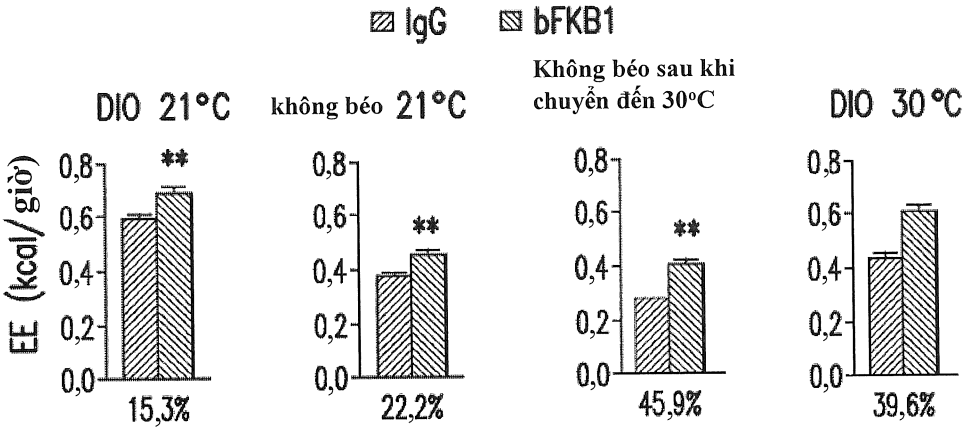


FIG. 21A

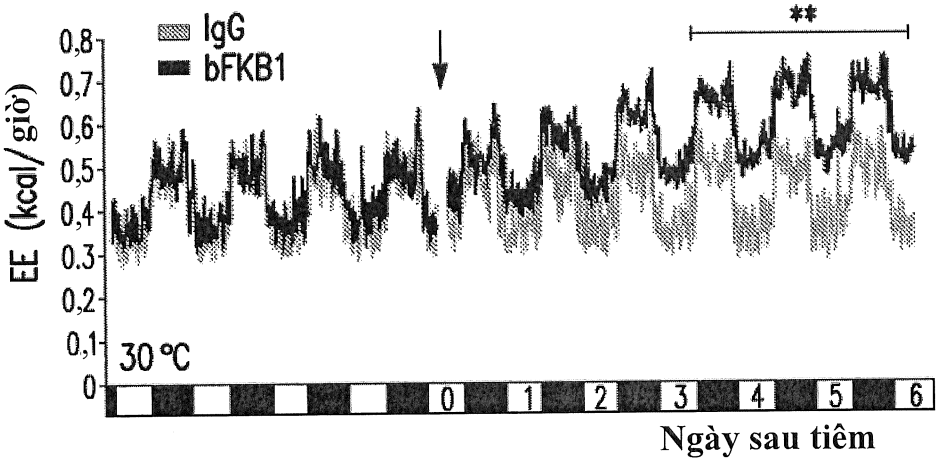


FIG. 21B

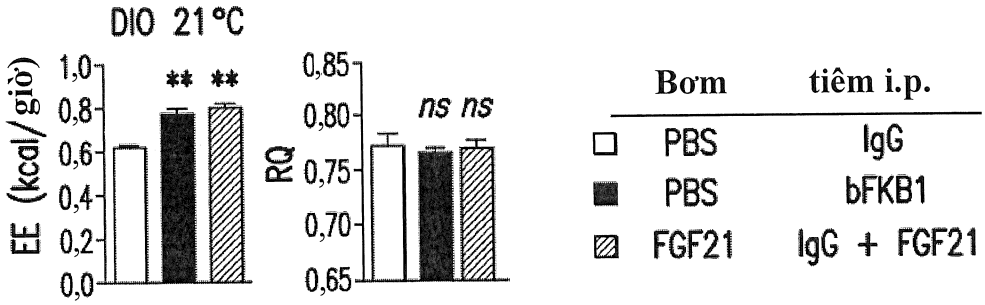


FIG. 21C

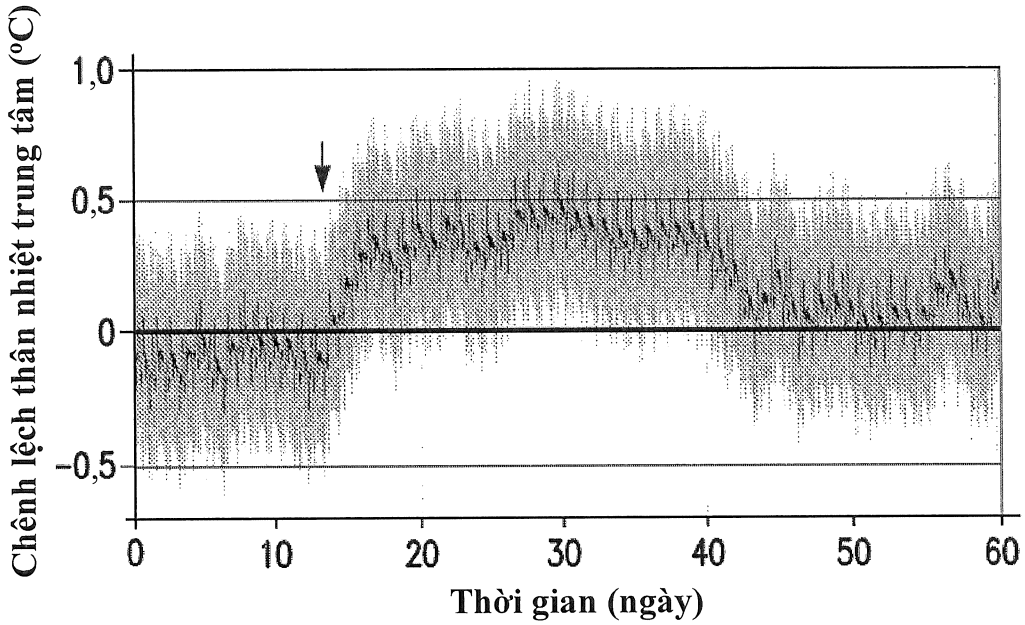

Chênh lệch thân nhiệt trung tâm (°C)
1,0
0,5
0
−0,5
0
10
20
30
40
50
60
Thời gian (ngày)

FIG. 22

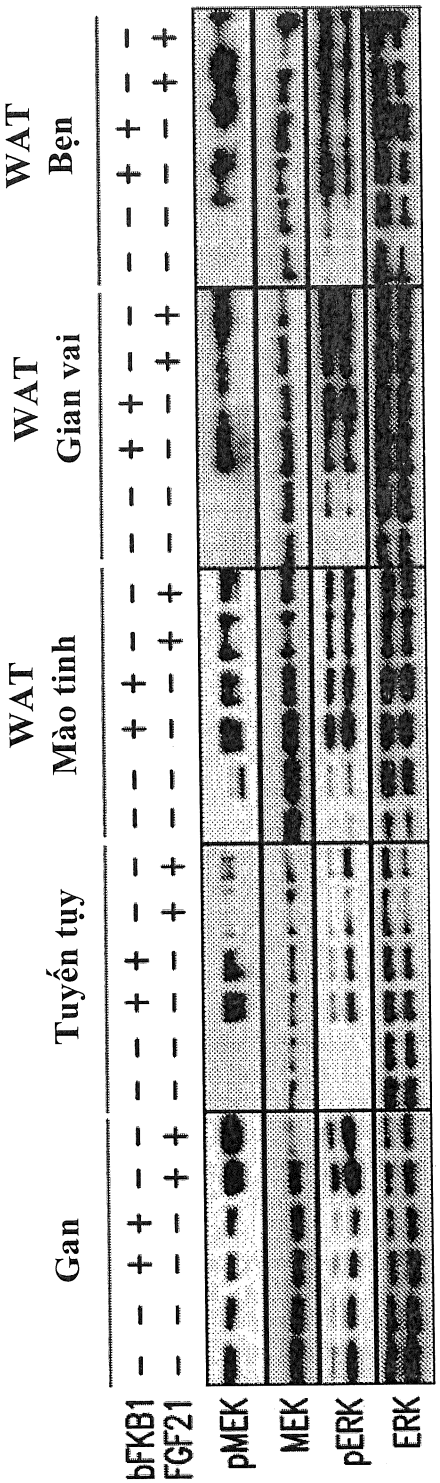

Gan
Tuyến tụy
WAT
Mào tinh
WAT
Gian vai
WAT
Bẹn
bFKB1
FGF21
pMEK
MEK
pERK
ERK

FIG. 23

FIG. 24A

FIG. 24B

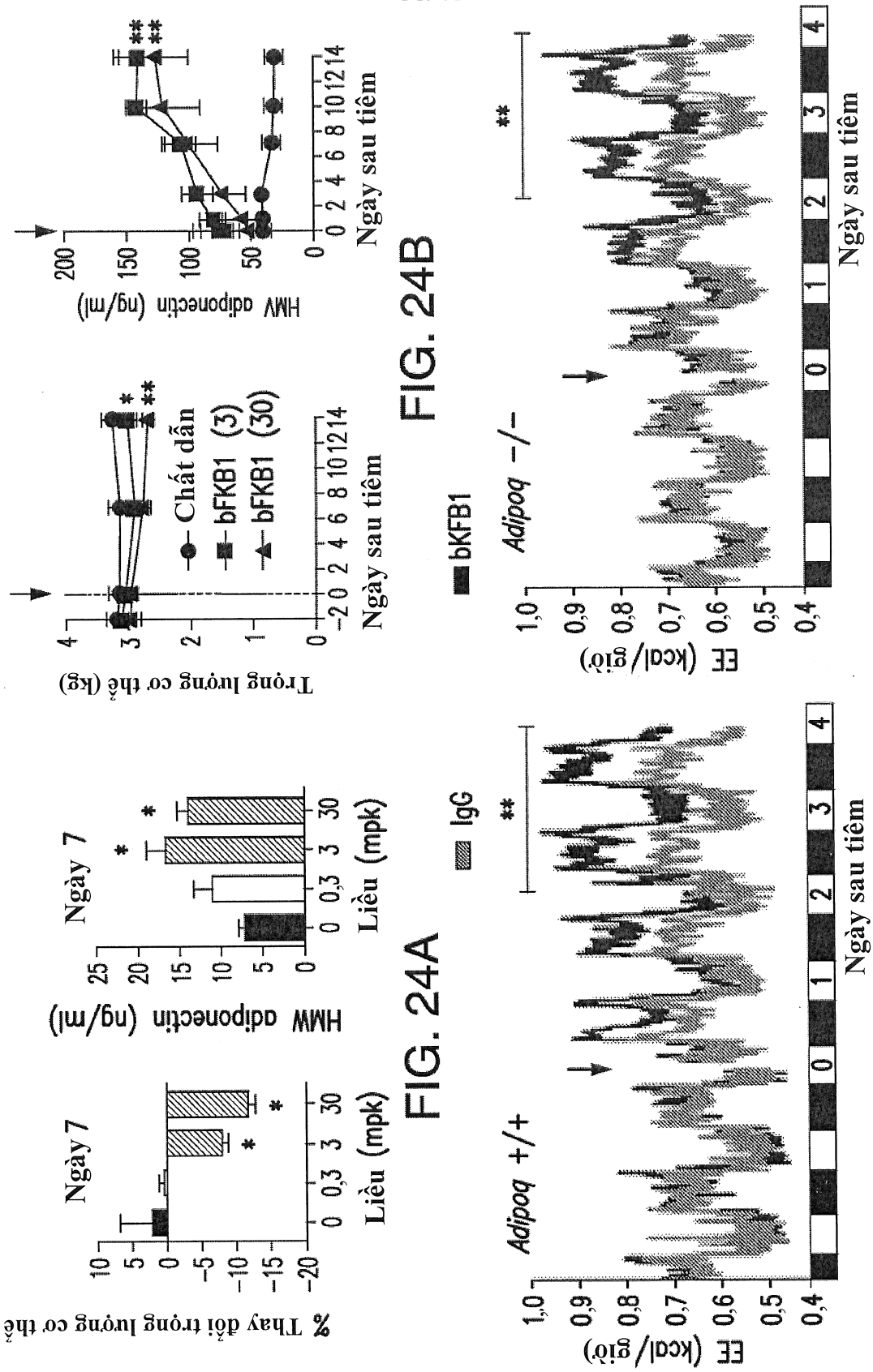


FIG. 24C

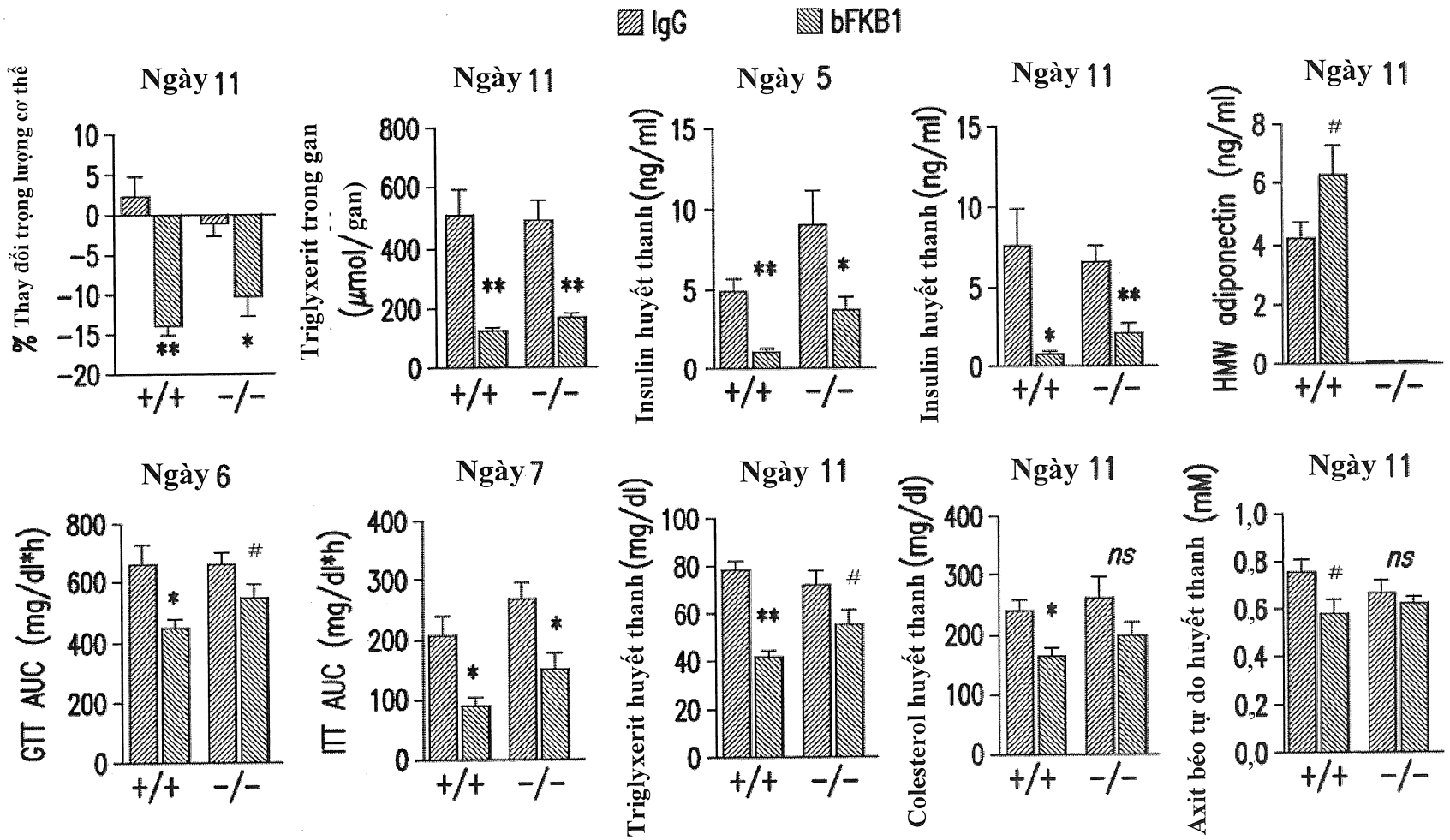

IgG
bFKB1
Ngày 11
% Thay đổi trọng lượng cơ thể
Ngày 11
Triglyxerit trong gan (µmol/gan)
Ngày 5
Insulin huyết thanh (ng/ml)
Ngày 11
Insulin huyết thanh (ng/ml)
Ngày 11
HMW adiponectin (ng/ml)
Ngày 6
GTT AUC (mg/dl*h)
Ngày 7
ITT AUC (mg/dl*h)
Ngày 11
Triglyxerit huyết thanh (mg/dl)
Ngày 11
Colesterol huyết thanh (mg/dl)
Ngày 11
Axit béo tự do huyết thanh (mM)
+/+
-/-
ns

FIG. 24D

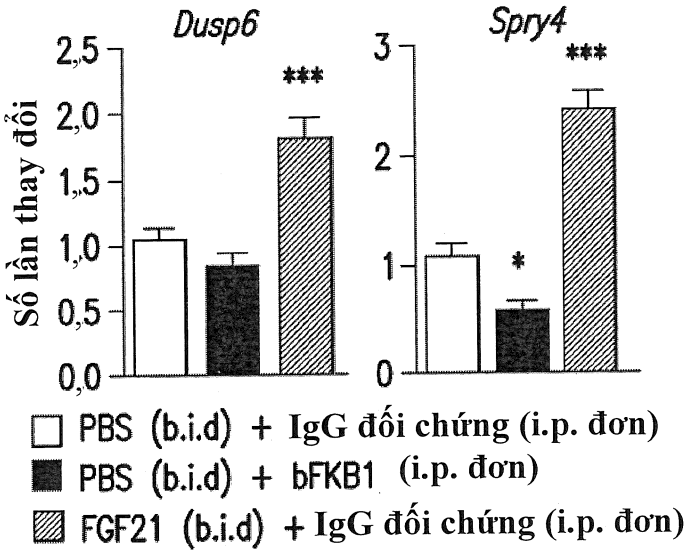


FIG. 25

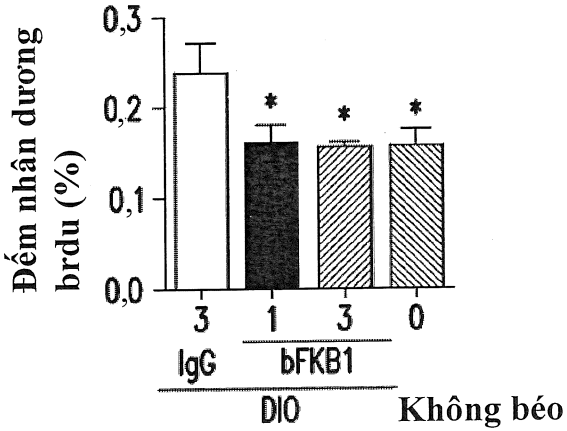


FIG. 27

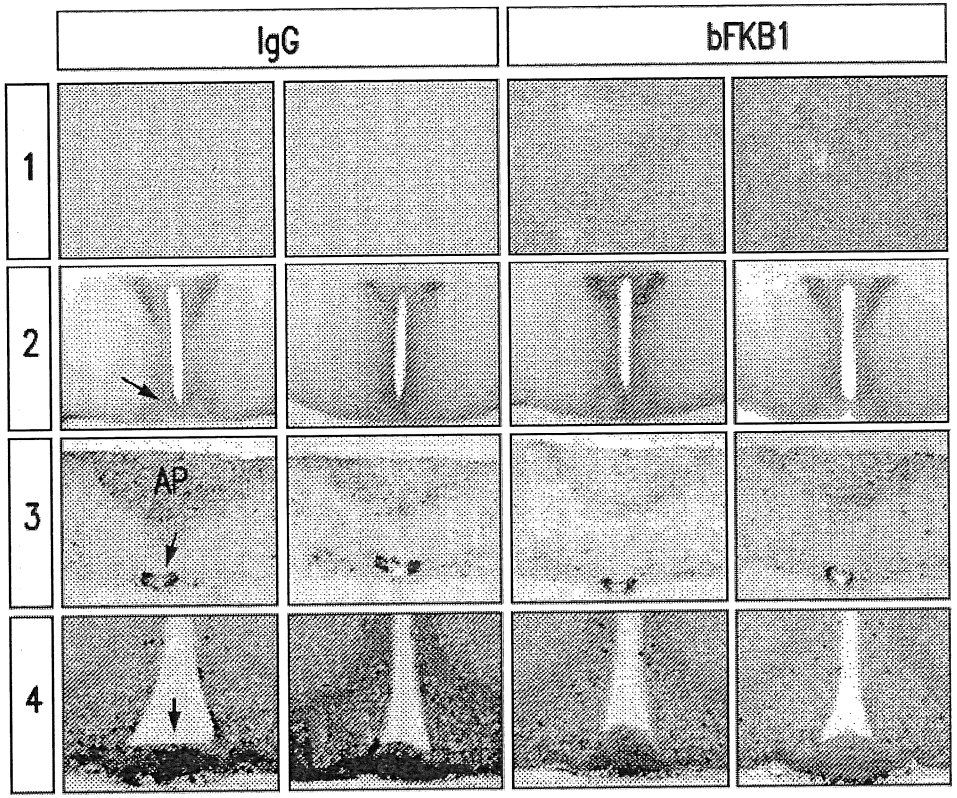


FIG. 26

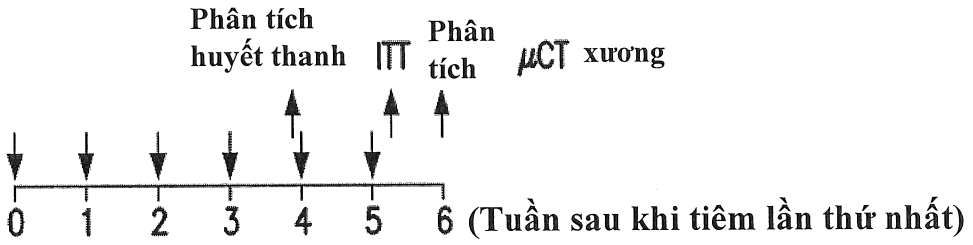


FIG. 28A

	Đối chứng IgG	bFKB1 (1 mpk)	bFKB1 (3 mpk)	Đối chứng không béo
Thay đổi trọng lượng cơ thể (%)	112,8 ± 1,1	116,6 ± 1,1	102,3 ± 4,7 *	
ITT AUC (h*mg/kg)	226 ± 18	153 ± 15 *	156 ± 23 *	
Phân tích huyết thanh				
Insulin (ng/ml)	3,87 ± 0,42	2,00 ± 0,54 *	1,37 ± 0,65 *	0,59 ± 0,60 ***
FGF21 (pg/ml)	824 ± 67	754 ± 65	696 ± 62 #	690 ± 60 *
Leptin (pg/ml)	46,5 ± 2,3	45,6 ± 2,1	32,9 ± 1,9 *	3,20 ± 1,8 ***
HMW Adiponectin (ng/ml)	2802 ± 202	4174 ± 199	5667 ± 299 *	2745 ± 321 *
Tổng colesterol (mg/dl)	240,6 ± 9,3	200,7 ± 9,4 **	177,4 ± 9,7 ***	74,6 ± 9,6 ***
Triglyxerit (mg/dl)	41,3 ± 2,7	44,8 ± 2,8	31,9 ± 2,9 $	57,69 ± 2,8 **
FFA (mM)	1,01 ± 0,04	1,04 ± 0,04	0,81 ± 0,04 **	0,77 ± 0,03 **
Phân tích μCT xương xốp				
BV/TV	0,107 ± 0,006	0,114 ± 0,006	0,117 ± 0,010	0,136 ± 0,004 *
Mật độ xương (mg HA/ccm)	1028 ± 3	1026 ± 6	1033 ± 3	975 ± 6 ***
Thể tích xương (mm^3)	0,286 ± 0,026	0,327 ± 0,025	0,330 ± 0,033	0,390 ± 0,017 *
Tổng thể tích (mm^3)	2,65 ± 0,09	2,86 ± 0,07	2,80 ± 0,10	2,87 ± 0,09
Tb.N (mm^{-1})	4,11 ± 0,04	4,08 ± 0,09	4,22 ± 0,13	4,73 ± 0,07 ***
Tb.Th (mm)	0,0517 ± 0,0009	0,0526 ± 0,0008	0,0528 ± 0,0014	0,0477 ± 0,0002 *
Tb.Sp (mm)	0,234 ± 0,003	0,235 ± 0,006	0,228 ± 0,008	0,202 ± 0,003 ***
Diện tích bề mặt xương (mm^2)	13,6 ± 1,0	15,5 ± 1,0	15,3 ± 1,2	19,5 ± 0,9 **
BS/BV(mm^{-1})	52,6 ± 1,7	51,3 ± 1,1	51,2 ± 2,1	53,5 ± 0,4
Phân tích μCT xương đặc				
BV/TV	0,404 ± 0,005	0,391 ± 0,005	0,391 ± 0,006	0,393 ± 0,007
Mật độ xương (mg HA/cm^3)	1236 ± 2	1239 ± 3	1240 ± 22	1243 ± 2 *
Thể tích xương (mm^3)	2,55 ± 0,06	2,57 ± 0,06	2,46 ± 0,07	2,56 ± 0,09
Tổng thể tích (mm^3)	6,33 ± 0,17	6,6 ± 0,23	6,33 ± 0,26	6,52 ± 0,26
Độ dày xương (mm)	0,119 ± 0,001	0,116 ± 0,001	0,115 ± 0,001 $	0,115 ± 0,002
Thể tích tủy (mm^3)	3,79 ± 0,12	4,05 ± 0,17	3,88 ± 0,22	3,98 ± 0,18

FIG. 28B

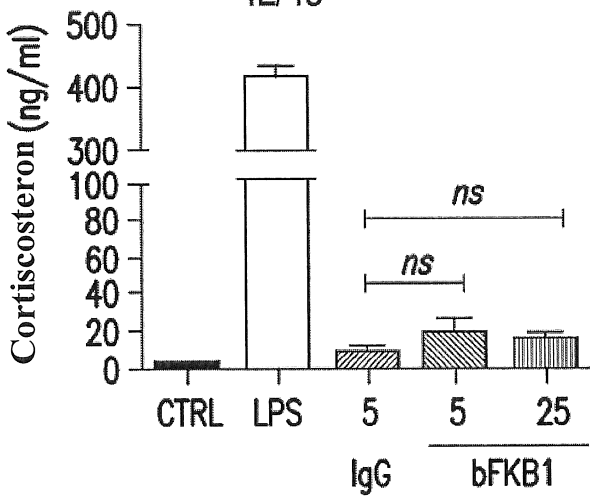

Cortiscosteron (ng/ml)
500
400
300
100
80
60
40
20
0
ns
ns
CTRL
LPS
5
5
25
IgG
bFKB1

FIG. 29

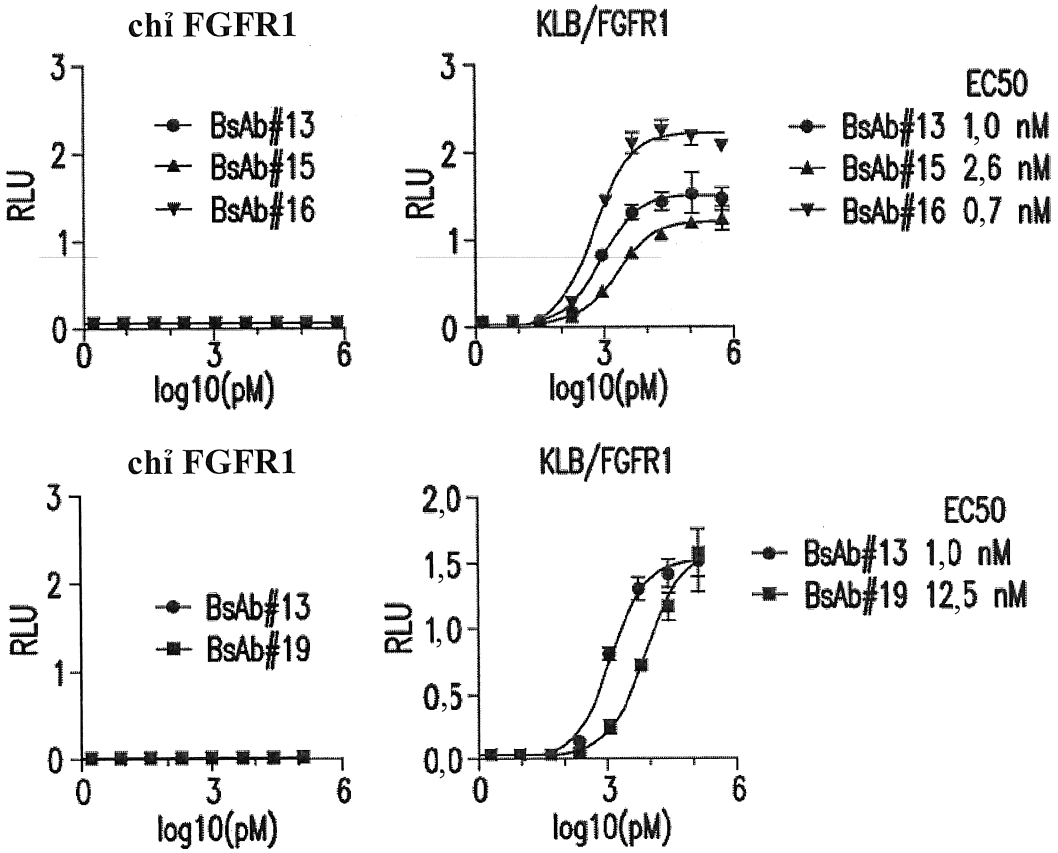

chỉ FGFR1
KLB/FGFR1
RLU
log10(pM)
BsAb#13
BsAb#15
BsAb#16
EC50
BsAb#13 1,0 nM
BsAb#15 2,6 nM
BsAb#16 0,7 nM
chỉ FGFR1
KLB/FGFR1
BsAb#13
BsAb#19
EC50
BsAb#13 1,0 nM
BsAb#19 12,5 nM

FIG. 30

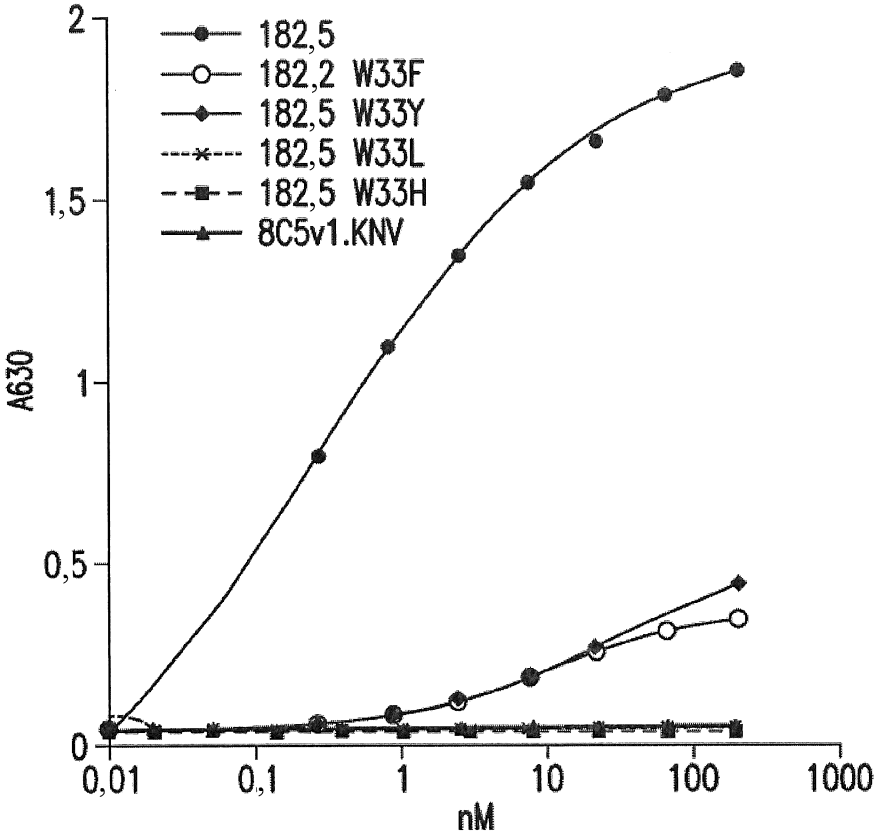

182,5
182,2 W33F
182,5 W33Y
182,5 W33L
182,5 W33H
8C5v1.KNV
A630
2
1,5
1
0,5
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
nM

FIG. 31

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> GENENTECH, INC.
KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP PHÂN LẬP ĐƯỢC LIÊN KẾT VỚI BETA-KLOTHO (KLB) VÀ
<120> THỤ THỂ YẾU TỐ TĂNG TRƯỞNG NGUYÊN BÀO SỢI 1c (FGFR1c), VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY
<130> 00B206.0170

<140>
<141>

<150> 62/081,435
<151> 2014-11-18

<150> 61/920,396
<151> 2013-12-23

<160> 166

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 1
Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 2
Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 3
<211> 5
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 3
Asn Tyr Gly Val Ser
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 4
Asp Thr Tyr Met Asn
1 5

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

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 5
Asp Thr Tyr Ile His
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 6
Ser Tyr Trp Ile His

1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 7
Asp Thr Phe Thr His
1 5

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 8
Glu Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 9
Ser Tyr Trp Ile Glu
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 10
Asp Tyr Glu Met His
1 5

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 11
Asp Thr Tyr Ile His
1 5

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 12
Arg Tyr Trp Met Ser
1 5

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 13
Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 14
Thr Ser Ala Met Gly Ile Gly
1 5

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 15
Thr Tyr Gly Val His
1 5

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 16
Thr Val Ser Ser Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

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

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 17
Trp Ile Asp Pro Glu Asn Asp Asp Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 18
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 18
Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Ile Asn Tyr His Ser Ala Leu Ile Ser
1 5 10 15

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 19
Arg Ile Asp Pro Ser Asn Gly Asn Ala Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

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

<220>

<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 20
Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Asp

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 21
Glu Ile Asp Pro Ser Val Ser Asn Ser Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 22
Arg Ile Asp Pro Ser Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 23
<211> 17
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 23
Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Glu Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 24
Glu Ile Phe Pro Gly Gly Gly Ser Thr Ile Tyr Asn Glu Asn Phe Arg
1 5 10 15

Asp

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 25
Ala Ile Trp Pro Glu Asn Ala Asp Ser Val Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 26
Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 27
Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Thr Lys Tyr Val Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Val

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 28
Glu Ile Ser Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 29
Trp Ile Asp Thr Asp Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Thr Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

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

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 30
His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

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

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 31
Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser
1 5 10 15

<210> 32
<211> 9

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 32
Gly Gly Asp Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 33
Phe Thr Thr Val Phe Ala Tyr
1 5

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 34
Thr His Asp Trp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 35

Arg Ala Leu Gly Asn Gly Tyr Ala Leu Gly Tyr
1 5 10

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

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

<210> 37
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 37
Leu Gly Val Met Val Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Trp Phe Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 38
Arg Ala Leu Gly Asn Gly Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 39
Lys Thr Thr Asn Tyr
1 5

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 40
Arg Gly Tyr Tyr Asp Ala Ala Trp Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 41
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 41
Glu Gly Gly Asn Tyr
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 42
Ser Gly Asn Tyr Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 43
Gly Gly Tyr His Tyr Pro Gly Trp Leu Val Tyr
1 5 10

<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 44
Pro Ser Pro Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 45
Glu Glu Tyr Gly Leu Phe Gly Phe Pro Tyr
1 5 10

<210> 46
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit

tổng hợp"

<400> 46
Ile Asp Gly Ile Tyr Asp Gly Ser Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 47
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 47
Asp Tyr Gly Ser Thr Tyr Val Asp Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 48
Ser Ala Ser Gln Val Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 49
Ser Ala Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Phe
1 5 10

<210> 50
<211> 11

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 50
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Phe Asn
1 5 10

<210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 51
Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 52
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 52
Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 53

Lys Ala Ser Gln Phe Val Ser Asp Ala Val Ala
1 5 10

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 54
Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 55
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 55
Ser Ala Ser Ser Ser Leu Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr
1 5 10

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 56
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Ser Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 57

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

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 57
Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn His Met Tyr
1 5 10

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 58
Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Ser Tyr Val Ala
1 5 10

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 59
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 60
Lys Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg Leu Ala
1 5 10

<210> 61
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 61
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 62
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 62
Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr Gly Asn Arg Tyr Met Thr
1 5 10 15

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 63
Phe Thr Ser Ser Leu Arg Ser
1 5

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 64
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 65
Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 66
Gly Thr Thr Asn Leu Glu Thr
1 5

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 67
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 68
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 69
Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 70
Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser
1 5

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 71
Gly Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 72
Leu Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 73
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 73
Tyr Thr Ser Thr Leu Ala Pro
1 5

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 74
Ser Ala Ser Tyr Arg Phe Ser
1 5

<210> 75

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

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 75
Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 76
Ala Ala Thr Ser Leu Glu Thr
1 5

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 77
Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 78
Arg Ala Ala Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 79
Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 80
Phe Gln Gly Thr Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 81
His Gln Val Arg Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 82
Gln Gln Tyr Trp Asn Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 83
Phe Gln Gly Ser His Val Leu Thr
1 5

<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 84
Gln Gln His Tyr Ile Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 85
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 85
Leu Gln Tyr Gly Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 86
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 86
His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 87
Gln Gln His His Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 88
Gln Gln Phe Thr Ile Ser Pro Ser Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 89
Gln Gln Tyr Asn Ile Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 90
Gln Asn Gly His Asn Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 91
Gln Gln Tyr Trp Ser Asn Pro Leu Thr
1 5

<210> 92
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 92
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Tyr Thr
1 5

<210> 93

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

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 93
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 94
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 94
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Pro Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 95
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 95
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Leu Val Asn Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Asp Asp Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Ala Phe Thr Thr Val Phe Ala Tyr Trp Gly His Gln Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ala
115

<210> 96
<211> 115
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit

tổng hợp"

<400> 96
Gln Val Gln Val Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Ile Asn Tyr His Ser Ala Leu Ile
50 55 60

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

Lys Leu Asn Ser Leu Glu Ala Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Thr His Asp Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ala
115

<210> 97
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 97
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ala Asp Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 98
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 98
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Asp Phe Asn Ile Ile Asp Thr
20 25 30

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

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

Gln Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ser Asp Thr Asp Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Ser Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Ser Val Ser Ala
115

<210> 99
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 99
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Ile Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Val Ser Asn Ser Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Val Arg Leu Gly Val Met Val Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Trp Phe Ala
100 105 110

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

<210> 100
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 100
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Ile Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Val Ser Asn Ser Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Val Arg Leu Gly Val Met Val Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Trp Phe Ala
100 105 110

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

<210> 101
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 101
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Leu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Phe Thr His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ser Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 102
<211> 114
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 102
Glu Val Pro Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Pro Ser Gly Asp Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80

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

Ala Arg Lys Thr Thr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Ile Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 103
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 103
Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Phe Pro Gly Gly Gly Ser Thr Ile Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60

Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Tyr Tyr Asp Ala Ala Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 104
<211> 114
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 104
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15

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

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

Gly Ala Ile Trp Pro Glu Asn Ala Asp Ser Val Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Glu Gly Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 105
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 105
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ser Ser Asp Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

Gln Gly Lys Ala Ala Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 106
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 106
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Asp Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Thr Lys Tyr Val Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Val Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Tyr His Tyr Pro Gly Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 107
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 107
Glu Val Lys Phe Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ala
        115

<210> 108
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
      tổng hợp"

<400> 108
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Ala Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Asn Tyr
            20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Asp Leu Lys Trp Met
        35 40 45

Gly Trp Ile Asp Thr Asp Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Thr Asp Asp Phe
    50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Glu Tyr Gly Leu Phe Gly Phe Pro Tyr Trp Gly His Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 109
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 109
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

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

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Asp Gly Ile Tyr Asp Gly Ser Phe Tyr Ala Met Asp
100 105 110

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

<210> 110
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 110
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Thr Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 111
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 111

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 Ile Cys Ser Ala Ser Gln Val Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu Arg 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 Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
85 90 95

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

<210> 112
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 112
Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Asn Thr Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Thr Gly Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 113
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 113
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Phe Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asn Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln 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 Lys Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Val Arg Thr Leu Pro Trp
85 90 95

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

<210> 114
<211> 107

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 114
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Tyr Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gly Ser Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp
20 25 30

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

Tyr Gly Thr Thr Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ile Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

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

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

<210> 115
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 115
Ala Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

Ser His Val Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 116
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 116
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Arg Thr
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Val Pro Tyr

85 90 95

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

<210> 117
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 117
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Arg Thr
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Val Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 118
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit

tổng hợp"

<400> 118
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Tyr Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Thr
65 70 75 80

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

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

<210> 119
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 119
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
35 40 45

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

Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

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

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

<210> 120
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 120
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Leu Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

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

Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 121
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 121
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Met Ser Val Gly
1 5 10 15

Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

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

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

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln
85 90 95

His His Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 122
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 122
Glu Ser Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Asn His Met
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Gly Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 123
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 123
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 124
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 124
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Ile Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 125

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

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 125
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Ser Phe Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg
20 25 30

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

Ser Ala Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln Thr
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Asn Pro Leu
85 90 95

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

<210> 126
<211> 110
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 126
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr

20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Glu Asp Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 127
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 127
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Arg Tyr Met Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 128
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 128
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 129
<211> 450
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 129
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
50 55 60

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

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

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

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

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

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

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

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

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

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

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

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

Gly Lys
450

<210> 130
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 130
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Arg Tyr Met Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ala Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 131
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 131
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ser Tyr
20 25 30

Gly Asn Arg Tyr Met Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ala Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 132
<211> 116
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 132
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Asn
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Gly Thr Asp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 133
<211> 446
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 133
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Asn
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Gly Thr Asp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu 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 Gly 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 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp 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> 134
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 134
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 135
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 135
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg 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> 136
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 136
Ser Asn Tyr Ile Ser
1 5

<210> 137
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 137
Glu Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 138
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 138
Gly Thr Asp Val Met Asp Tyr
1 5

<210> 139
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 139
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 140
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 140
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

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

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 141
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 142
<211> 34
<212> PRT
<213> Không biết

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Không biết: peptit
beta-Klotho"

<400> 142
Ser Ser Pro Thr Arg Leu Ala Val Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu
1 5 10 15

Leu Arg Trp Val Arg Arg Asn Tyr Gly Asp Met Asp Ile Tyr Ile Thr
20 25 30

Ala Ser

<210> 143
<211> 16
<212> PRT
<213> Không biết

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Không biết: Peptit thụ thể
yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 1"

<400> 143
Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro
1 5 10 15

<210> 144
<211> 14
<212> PRT
<213> Không biết

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Không biết: Peptit thụ thể
yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 1"

<400> 144
Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr
1 5 10

<210> 145
<211> 992
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 145
Phe Ser Gly Asp Gly Arg Ala Ile Trp Ser Lys Asn Pro Asn Phe Thr
1 5 10 15

Pro Val Asn Glu Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr Phe Pro Lys Asn
20 25 30

Phe Phe Trp Gly Ile Gly Thr Gly Ala Leu Gln Val Glu Gly Ser Trp
35 40 45

Lys Lys Asp Gly Lys Gly Pro Ser Ile Trp Asp His Phe Ile His Thr
50 55 60

His Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Asn Gly Ser Ser Asp Ser Tyr Ile
65 70 75 80

Phe Leu Glu Lys Asp Leu Ser Ala Leu Asp Phe Ile Gly Val Ser Phe
85 90 95

Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro Asp Gly Ile Val
100 105 110

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

Ala Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr Leu Tyr His Trp
130 135 140

Asp Leu Pro Leu Ala Leu Gln Glu Lys Tyr Gly Gly Trp Lys Asn Asp
145 150 155 160

Thr Ile Ile Asp Ile Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Cys Phe Gln Met
165 170 175

Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile His Asn Pro Tyr Leu
180 185 190

Val Ala Trp His Gly Tyr Gly Thr Gly Met His Ala Pro Gly Glu Lys
195 200 205

Gly Asn Leu Ala Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn Leu Ile Lys Ala
210 215 220

His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr Asn Thr His Phe Arg Pro His Gln
225 230 235 240

Lys Gly Trp Leu Ser Ile Thr Leu Gly Ser His Trp Ile Glu Pro Asn
245 250 255

Arg Ser Glu Asn Thr Met Asp Ile Phe Lys Cys Gln Gln Ser Met Val
260 265 270

Ser Val Leu Gly Trp Phe Ala Asn Pro Ile His Gly Asp Gly Asp Tyr
275 280 285

Pro Glu Gly Met Arg Lys Lys Leu Phe Ser Val Leu Pro Ile Phe Ser
290 295 300

Glu Ala Glu Lys His Glu Met Arg Gly Thr Ala Asp Phe Phe Ala Phe
305 310 315 320

Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe Lys Pro Leu Asn Thr Met Ala Lys Met
325 330 335

Gly Gln Asn Val Ser Leu Asn Leu Arg Glu Ala Leu Asn Trp Ile Lys
340 345 350

Leu Glu Tyr Asn Asn Pro Arg Ile Leu Ile Ala Glu Asn Gly Trp Phe
355 360 365

Thr Asp Ser Arg Val Lys Thr Glu Asp Thr Thr Ala Ile Tyr Met Met
370 375 380

Lys Asn Phe Leu Ser Gln Val Leu Gln Ala Ile Arg Leu Asp Glu Ile
385 390 395 400

Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Leu Asp Gly Phe Glu Trp

405 410 415

Gln Asp Ala Tyr Thr Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp Phe Asn
420 425 430

Ser Lys Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His Tyr Tyr Lys
435 440 445

Gln Ile Ile Arg Glu Asn Gly Phe Ser Leu Lys Glu Ser Thr Pro Asp
450 455 460

Val Gln Gly Gln Phe Pro Cys Asp Phe Ser Trp Gly Val Thr Glu Ser
465 470 475 480

Val Leu Lys Pro Glu Ser Val Ala Ser Ser Pro Gln Phe Ser Asp Pro
485 490 495

His Leu Tyr Val Trp Asn Ala Thr Gly Asn Arg Leu Leu His Arg Val
500 505 510

Glu Gly Val Arg Leu Lys Thr Arg Pro Ala Gln Cys Thr Asp Phe Val
515 520 525

Asn Ile Lys Lys Gln Leu Glu Met Leu Ala Arg Met Lys Val Thr His
530 535 540

Tyr Arg Phe Ala Leu Asp Trp Ala Ser Val Leu Pro Thr Gly Asn Leu
545 550 555 560

Ser Ala Val Asn Arg Gln Ala Leu Arg Tyr Tyr Arg Cys Val Val Ser
565 570 575

Glu Gly Leu Lys Leu Gly Ile Ser Ala Met Val Thr Leu Tyr Tyr Pro
580 585 590

Thr His Ala His Leu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Leu His Ala Asp Gly
595 600 605

Trp Leu Asn Pro Ser Thr Ala Glu Ala Phe Gln Ala Tyr Ala Gly Leu
610 615 620

Cys Phe Gln Glu Leu Gly Asp Leu Val Lys Leu Trp Ile Thr Ile Asn
625 630 635 640

Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp Ile Tyr Asn Arg Ser Gly Asn Asp Thr
645 650 655

Tyr Gly Ala Ala His Asn Leu Leu Val Ala His Ala Leu Ala Trp Arg
660 665 670

Leu Tyr Asp Arg Gln Phe Arg Pro Ser Gln Arg Gly Ala Val Ser Leu
675 680 685

Ser Leu His Ala Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Tyr Ala Asp Ser
690 695 700

His Trp Arg Ala Ala Glu Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile Ala Trp Phe
705 710 715 720

Ala Glu Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ala Ala Met Arg Glu
725 730 735

Tyr Ile Ala Ser Lys His Arg Arg Gly Leu Ser Ser Ser Ala Leu Pro
740 745 750

Arg Leu Thr Glu Ala Glu Arg Arg Leu Leu Lys Gly Thr Val Asp Phe
755 760 765

Cys Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg Phe Val Met His Glu Gln Leu
770 775 780

Ala Gly Ser Arg Tyr Asp Ser Asp Arg Asp Ile Gln Phe Leu Gln Asp
785 790 795 800

Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Thr Arg Leu Ala Val Ile Pro Trp Gly
805 810 815

Val Arg Lys Leu Leu Arg Trp Val Arg Arg Asn Tyr Gly Asp Met Asp
820 825 830

Ile Tyr Ile Thr Ala Ser Gly Ile Asp Asp Gln Ala Leu Glu Asp Asp

835 840 845

Arg Leu Arg Lys Tyr Tyr Leu Gly Lys Tyr Leu Gln Glu Val Leu Lys
850 855 860

Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala Phe Lys
865 870 875 880

Leu Ala Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe Thr Ser Asp
885 890 895

Phe Lys Ala Lys Ser Ser Ile Gln Phe Tyr Asn Lys Val Ile Ser Ser
900 905 910

Arg Gly Phe Pro Phe Glu Asn Ser Ser Ser Arg Cys Ser Gln Thr Gln
915 920 925

Glu Asn Thr Glu Cys Thr Val Cys Leu Phe Leu Val Gln Lys Lys Pro
930 935 940

Leu Ile Phe Leu Gly Cys Cys Phe Phe Ser Thr Leu Val Leu Leu Leu
945 950 955 960

Ser Ile Ala Ile Phe Gln Arg Gln Lys Arg Arg Lys Phe Trp Lys Ala
965 970 975

Lys Asn Leu Gln His Ile Pro Leu Lys Lys Gly Lys Arg Val Val Ser
980 985 990

<210> 146
<211> 820
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 146
Met Trp Ser Trp Lys Cys Leu Leu Phe Trp Ala Val Leu Val Thr Ala
1 5 10 15

Thr Leu Cys Thr Ala Arg Pro Ser Pro Thr Leu Pro Glu Gln Ala Gln
20 25 30

Pro Trp Gly Ala Pro Val Glu Val Glu Ser Phe Leu Val His Pro Gly

35 40 45

Asp Leu Leu Gln Leu Arg Cys Arg Leu Arg Asp Asp Val Gln Ser Ile
50 55 60

Asn Trp Leu Arg Asp Gly Val Gln Leu Ala Glu Ser Asn Arg Thr Arg
65 70 75 80

Ile Thr Gly Glu Glu Val Glu Val Gln Asp Ser Val Pro Ala Asp Ser
85 90 95

Gly Leu Tyr Ala Cys Val Thr Ser Ser Pro Ser Gly Ser Asp Thr Thr
100 105 110

Tyr Phe Ser Val Asn Val Ser Asp Ala Leu Pro Ser Ser Glu Asp Asp
115 120 125

Asp Asp Asp Asp Asp Ser Ser Ser Glu Glu Lys Glu Thr Asp Asn Thr
130 135 140

Lys Pro Asn Pro Val Ala Pro Tyr Trp Thr Ser Pro Glu Lys Met Glu
145 150 155 160

Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys
165 170 175

Pro Ser Ser Gly Thr Pro Asn Pro Thr Leu Arg Trp Leu Lys Asn Gly
180 185 190

Lys Glu Phe Lys Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr
195 200 205

Ala Thr Trp Ser Ile Ile Met Asp Ser Val Val Pro Ser Asp Lys Gly
210 215 220

Asn Tyr Thr Cys Ile Val Glu Asn Glu Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr
225 230 235 240

Tyr Gln Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln
245 250 255

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

Phe Met Cys Lys Val Tyr Ser Asp Pro Gln Pro His Ile Gln Trp Leu
275 280 285

Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp Asn Leu Pro
290 295 300

Tyr Val Gln Ile Leu Lys Thr Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu
305 310 315 320

Met Glu Val Leu His Leu Arg Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu
325 330 335

Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser His His Ser Ala
340 345 350

Trp Leu Thr Val Leu Glu Ala Leu Glu Glu Arg Pro Ala Val Met Thr
355 360 365

Ser Pro Leu Tyr Leu Glu Ile Ile Ile Tyr Cys Thr Gly Ala Phe Leu
370 375 380

Ile Ser Cys Met Val Gly Ser Val Ile Val Tyr Lys Met Lys Ser Gly
385 390 395 400

Thr Lys Lys Ser Asp Phe His Ser Gln Met Ala Val His Lys Leu Ala
405 410 415

Lys Ser Ile Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ser Ala Asp Ser Ser
420 425 430

Ala Ser Met Asn Ser Gly Val Leu Leu Val Arg Pro Ser Arg Leu Ser
435 440 445

Ser Ser Gly Thr Pro Met Leu Ala Gly Val Ser Glu Tyr Glu Leu Pro
450 455 460

Glu Asp Pro Arg Trp Glu Leu Pro Arg Asp Arg Leu Val Leu Gly Lys

465 470 475 480

Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Leu Ala Glu Ala Ile
485 490 495

Gly Leu Asp Lys Asp Lys Pro Asn Arg Val Thr Lys Val Ala Val Lys
500 505 510

Met Leu Lys Ser Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu Ile Ser
515 520 525

Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn
530 535 540

Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val Ile Val Glu
545 550 555 560

Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Gln Ala Arg Arg Pro
565 570 575

Pro Gly Leu Glu Tyr Cys Tyr Asn Pro Ser His Asn Pro Glu Glu Gln
580 585 590

Leu Ser Ser Lys Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly
595 600 605

Met Glu Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala
610 615 620

Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe
625 630 635 640

Gly Leu Ala Arg Asp Ile His His Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr
645 650 655

Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp
660 665 670

Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu
675 680 685

Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Val Pro Val
690 695 700

Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro
705 710 715 720

Ser Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met Arg Asp Cys Trp His
725 730 735

Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp Leu
740 745 750

Asp Arg Ile Val Ala Leu Thr Ser Asn Gln Glu Tyr Leu Asp Leu Ser
755 760 765

Met Pro Leu Asp Gln Tyr Ser Pro Ser Phe Pro Asp Thr Arg Ser Ser
770 775 780

Thr Cys Ser Ser Gly Glu Asp Ser Val Phe Ser His Glu Pro Leu Pro
785 790 795 800

Glu Glu Pro Cys Leu Pro Arg His Pro Ala Gln Leu Ala Asn Gly Gly
805 810 815

Leu Lys Arg Arg
820

<210> 147
<211> 948
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit
tổng hợp"

<400> 147
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Glu Phe Ser Gly Asp Gly Lys
1 5 10 15

Ala Ile Trp Asp Lys Lys Gln Tyr Val Ser Pro Val Asn Pro Gly Gln
20 25 30

Leu Phe Leu Tyr Asp Thr Phe Pro Lys Asn Phe Ser Trp Gly Val Gly
35 40 45

Thr Gly Ala Phe Gln Val Glu Gly Ser Trp Lys Ala Asp Gly Arg Gly
50 55 60

Pro Ser Ile Trp Asp Arg Tyr Val Asp Ser His Leu Arg Gly Val Asn
65 70 75 80

Ser Thr Asp Arg Ser Thr Asp Ser Tyr Val Phe Leu Glu Lys Asp Leu
85 90 95

Leu Ala Leu Asp Phe Leu Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser
100 105 110

Trp Pro Arg Leu Phe Pro Asn Gly Thr Val Ala Ala Val Asn Ala Lys
115 120 125

Gly Leu Gln Tyr Tyr Arg Ala Leu Leu Asp Ser Leu Val Leu Arg Asn
130 135 140

Ile Glu Pro Ile Val Thr Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Thr Leu
145 150 155 160

Gln Glu Glu Tyr Gly Gly Trp Lys Asn Ala Thr Met Ile Asp Leu Phe
165 170 175

Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Cys Phe Gln Thr Phe Gly Asp Arg Val Lys
180 185 190

Tyr Trp Ile Thr Ile His Asn Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Phe
195 200 205

Gly Thr Gly Met His Ala Pro Gly Glu Lys Gly Asn Leu Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Thr Val Gly His Asn Leu Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His
225 230 235 240

Asn Tyr Asp Lys Asn Phe Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile
245 250 255

Thr Leu Gly Ser His Trp Ile Glu Pro Asn Arg Thr Glu Asn Met Glu
260 265 270

Asp Val Ile Asn Cys Gln His Ser Met Ser Ser Val Leu Gly Trp Phe
275 280 285

Ala Asn Pro Ile His Gly Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Phe Met Lys Thr
290 295 300

Ser Ser Val Ile Pro Glu Phe Ser Glu Ala Glu Lys Glu Glu Val Arg
305 310 315 320

Gly Thr Ala Asp Phe Phe Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe Arg
325 330 335

Pro Ser Asn Thr Val Val Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu Asn Leu
340 345 350

Arg Gln Val Leu Asn Trp Ile Lys Leu Glu Tyr Asp Asn Pro Arg Ile
355 360 365

Leu Ile Ser Glu Asn Gly Trp Phe Thr Asp Ser Tyr Ile Lys Thr Glu
370 375 380

Asp Thr Thr Ala Ile Tyr Met Met Lys Asn Phe Leu Asn Gln Val Leu
385 390 395 400

Gln Ala Ile Lys Phe Asp Glu Ile Gln Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp
405 410 415

Thr Leu Leu Asp Gly Phe Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Thr Arg Arg
420 425 430

Gly Leu Phe Tyr Val Asp Phe Asn Ser Glu Gln Lys Glu Arg Lys Pro
435 440 445

Lys Ser Ser Ala His Tyr Tyr Lys Gln Ile Ile Gln Asp Asn Gly Phe
450 455 460

Pro Leu Gln Glu Ser Thr Pro Asp Met Lys Gly Gln Phe Pro Cys Asp
465 470 475 480

Phe Ser Trp Gly Val Thr Glu Ser Val Leu Lys Pro Glu Phe Thr Val
485 490 495

Ser Ser Pro Gln Phe Thr Asp Pro His Leu Tyr Val Trp Asn Val Thr
500 505 510

Gly Asn Arg Leu Leu Tyr Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys Thr Arg
515 520 525

Pro Ser Gln Cys Thr Asp Tyr Val Ser Ile Lys Lys Arg Val Glu Met
530 535 540

Leu Ala Lys Met Lys Val Thr His Tyr Gln Phe Ala Leu Asp Trp Thr
545 550 555 560

Ser Ile Leu Pro Thr Gly Asn Leu Ser Lys Ile Asn Arg Gln Val Leu
565 570 575

Arg Tyr Tyr Arg Cys Val Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Ile Ser
580 585 590

Pro Met Val Thr Leu Tyr His Pro Thr His Ser His Leu Gly Leu Pro
595 600 605

Met Pro Leu Leu Ser Ser Gly Gly Trp Leu Asn Thr Asn Thr Ala Lys
610 615 620

Ala Phe Gln Asp Tyr Ala Gly Leu Cys Phe Lys Glu Leu Gly Asp Leu
625 630 635 640

Val Lys Leu Trp Ile Thr Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp Met
645 650 655

Tyr Asn Arg Thr Ser Asn Asp Thr Tyr Arg Ala Ala His Asn Leu Met
660 665 670

Ile Ala His Ala Gln Val Trp His Leu Tyr Asp Arg Gln Tyr Arg Pro
675 680 685

Val Gln His Gly Ala Val Ser Leu Ser Leu His Ser Asp Trp Ala Glu
690 695 700

Pro Ala Asn Pro Tyr Val Glu Ser His Trp Lys Ala Ala Glu Arg Phe
705 710 715 720

Leu Gln Phe Glu Ile Ala Trp Phe Ala Asp Pro Leu Phe Lys Thr Gly
725 730 735

Asp Tyr Pro Leu Ala Met Lys Glu Tyr Ile Ala Ser Lys Lys Gln Arg
740 745 750

Gly Leu Ser Ser Ser Val Leu Pro Arg Phe Thr Leu Lys Glu Ser Arg
755 760 765

Leu Val Lys Gly Thr Ile Asp Phe Tyr Ala Leu Asn His Phe Thr Thr
770 775 780

Arg Phe Val Ile His Lys Gln Leu Asn Thr Asn Cys Ser Val Ala Asp
785 790 795 800

Arg Asp Val Gln Phe Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Ser
805 810 815

Arg Leu Ala Val Thr Pro Trp Gly Met Arg Lys Leu Leu Gly Trp Ile
820 825 830

Arg Arg Asn Tyr Arg Asp Met Asp Ile Tyr Val Thr Ala Asn Gly Ile
835 840 845

Asp Asp Leu Ala Leu Glu Asp Asp Gln Ile Arg Lys Tyr Tyr Leu Glu
850 855 860

Lys Tyr Val Gln Glu Ala Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Lys
865 870 875 880

Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala Phe Lys Leu Thr Glu Glu Lys Ser Lys Pro
885 890 895

Arg Phe Gly Phe Phe Thr Ser Asp Phe Lys Ala Lys Ser Ser Val Gln
900 905 910

Phe Tyr Ser Lys Leu Ile Ser Ser Ser Gly Phe Ser Ser Glu Asn Arg
915 920 925

Ser Pro Ala Cys Gly Gln Pro Pro Glu Asp Thr Glu Cys Ala Ile Cys
930 935 940

Ser Phe Leu Thr
945

<210> 148
<211> 949
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit
tổng hợp"

<400> 148
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Asp Phe Pro Gly Asp Gly Arg
1 5 10 15

Ala Val Trp Ser Gln Asn Pro Asn Leu Ser Pro Val Asn Glu Ser Gln
20 25 30

Leu Phe Leu Tyr Asp Thr Phe Pro Lys Asn Phe Phe Trp Gly Val Gly
35 40 45

Thr Gly Ala Phe Gln Val Glu Gly Ser Trp Lys Lys Asp Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Ser Val Trp Asp His Phe Ile Ala Thr His Leu Asn Val Ser Ser
65 70 75 80

Arg Asp Gly Ser Ser Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Ser
85 90 95

Ala Leu Asp Phe Leu Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp

100 105 110

Pro Arg Leu Phe Pro Asp Gly Thr Val Ala Val Ala Asn Ala Lys Gly
115 120 125

Leu Gln Tyr Tyr Asn Arg Leu Leu Asp Ser Leu Leu Leu Arg Asn Ile
130 135 140

Glu Pro Val Val Thr Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Trp Ala Leu Gln
145 150 155 160

Glu Lys Tyr Gly Gly Trp Lys Asn Glu Thr Leu Ile Asp Leu Phe Asn
165 170 175

Asp Tyr Ala Thr Tyr Cys Phe Gln Thr Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr
180 185 190

Trp Ile Thr Ile His Asn Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Tyr Gly
195 200 205

Thr Gly Leu His Ala Pro Gly Glu Lys Gly Asn Val Ala Ala Val Tyr
210 215 220

Thr Val Gly His Asn Leu Leu Lys Ala His Ser Lys Val Trp His Asn
225 230 235 240

Tyr Asn Arg Asn Phe Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile Thr
245 250 255

Leu Gly Ser His Trp Ile Glu Pro Asn Arg Ala Glu Ser Ile Val Asp
260 265 270

Ile Leu Lys Cys Gln Gln Ser Met Val Ser Val Leu Gly Trp Phe Ala
275 280 285

Asn Pro Ile His Gly Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Val Met Thr Lys Lys
290 295 300

Leu Leu Ser Val Leu Pro Ala Phe Ser Glu Ala Glu Lys Asn Glu Val
305 310 315 320

Arg Gly Thr Ala Asp Phe Phe Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe
325 330 335

Lys Pro Leu Asn Thr Met Ala Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu Asn
340 345 350

Leu Arg Gln Val Leu Asn Trp Ile Lys Leu Glu Tyr Gly Asn Pro Arg
355 360 365

Ile Leu Ile Ala Glu Asn Gly Trp Phe Thr Asp Ser Tyr Val Gln Thr
370 375 380

Glu Asp Thr Thr Ala Ile Tyr Met Met Lys Asn Phe Leu Asn Gln Val
385 390 395 400

Leu Gln Ala Ile Arg Leu Asp Gly Val Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala
405 410 415

Trp Ser Leu Leu Asp Gly Phe Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Asn Thr Arg
420 425 430

Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp Phe Asn Ser Glu Gln Arg Glu Arg Arg
435 440 445

Pro Lys Ser Ser Ala His Tyr Tyr Lys Gln Val Ile Gly Glu Asn Gly
450 455 460

Phe Thr Leu Arg Glu Ala Thr Pro Asp Leu Gln Gly Gln Phe Pro Cys
465 470 475 480

Asp Phe Ser Trp Gly Val Thr Glu Ser Val Leu Lys Pro Glu Ser Val
485 490 495

Ala Ser Ser Pro Gln Phe Ser Asp Pro His Leu Tyr Val Trp Asn Ala
500 505 510

Thr Gly Asn Arg Met Leu His Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys Thr
515 520 525

Arg Pro Ala Gln Cys Thr Asp Phe Ile Thr Ile Lys Lys Gln Leu Glu

530 535 540

Met Leu Ala Arg Met Lys Val Thr His Phe Arg Phe Ala Leu Asp Trp
545 550 555 560

Ala Ser Val Leu Pro Thr Gly Asn Leu Ser Glu Val Asn Arg Gln Ala
565 570 575

Leu Arg Tyr Tyr Arg Cys Val Val Thr Glu Gly Leu Lys Leu Asn Ile
580 585 590

Ser Pro Met Val Thr Leu Tyr Tyr Pro Thr His Ala His Leu Gly Leu
595 600 605

Pro Ala Pro Leu Leu His Ser Gly Gly Trp Leu Asp Pro Ser Thr Ala
610 615 620

Lys Ala Phe Arg Asp Tyr Ala Gly Leu Cys Phe Arg Glu Leu Gly Asp
625 630 635 640

Leu Val Lys Leu Trp Ile Thr Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp
645 650 655

Val Tyr Asn Arg Thr Ser Asn Asp Thr Tyr Gln Ala Ala His Asn Leu
660 665 670

Leu Ile Ala His Ala Ile Val Trp His Leu Tyr Asp Arg Gln Tyr Arg
675 680 685

Pro Ser Gln Arg Gly Ala Leu Ser Leu Ser Leu His Ser Asp Trp Ala
690 695 700

Glu Pro Ala Asn Pro Tyr Val Ala Ser His Trp Gln Ala Ala Glu Arg
705 710 715 720

Phe Leu Gln Phe Glu Ile Ala Trp Phe Ala Glu Pro Leu Phe Lys Thr
725 730 735

Gly Asp Tyr Pro Val Ala Met Arg Glu Tyr Ile Ala Ser Lys Thr Arg
740 745 750

Arg Gly Leu Ser Ser Ser Val Leu Pro Arg Phe Ser Asp Ala Glu Arg
755 760 765

Arg Leu Val Lys Gly Ala Ala Asp Phe Tyr Ala Leu Asn His Phe Thr
770 775 780

Thr Arg Phe Val Met His Glu Gln Gln Asn Gly Ser Arg Tyr Asp Ser
785 790 795 800

Asp Arg Asp Val Gln Phe Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ala Ser Pro
805 810 815

Ser Arg Leu Ala Val Met Pro Trp Gly Glu Gly Lys Leu Leu Arg Trp
820 825 830

Met Arg Asn Asn Tyr Gly Asp Leu Asp Val Tyr Ile Thr Ala Asn Gly
835 840 845

Ile Asp Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Gln Leu Arg Gln Tyr Tyr Leu
850 855 860

Glu Lys Tyr Val Gln Glu Ala Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Ile
865 870 875 880

Lys Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala Phe Lys Leu Thr Glu Glu Lys Ser Lys
885 890 895

Pro Arg Phe Gly Phe Phe Thr Ser Asp Phe Lys Ala Lys Ser Ser Ile
900 905 910

Gln Phe Tyr Asn Lys Leu Ile Thr Ser Asn Gly Phe Pro Ser Glu Asn
915 920 925

Gly Gly Pro Arg Cys Asn Gln Thr Gln Gly Asn Pro Glu Cys Thr Val
930 935 940

Cys Leu Leu Leu Leu
945

<210> 149

<211> 950
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit
tổng hợp"

<400> 149
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Glu Phe Ser Gly Asp Gly Arg
1 5 10 15

Ala Val Trp Ser Lys Asn Pro Asn Phe Thr Pro Val Asn Glu Ser Gln
20 25 30

Leu Phe Leu Tyr Asp Thr Phe Pro Lys Asn Phe Phe Trp Gly Val Gly
35 40 45

Thr Gly Ala Leu Gln Val Glu Gly Ser Trp Lys Lys Asp Gly Lys Gly
50 55 60

Pro Ser Ile Trp Asp His Phe Val His Thr His Leu Lys Asn Val Ser
65 70 75 80

Ser Thr Asn Gly Ser Ser Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu
85 90 95

Ser Ala Leu Asp Phe Ile Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser
100 105 110

Trp Pro Arg Leu Phe Pro Asp Gly Ile Val Thr Val Ala Asn Ala Lys
115 120 125

Gly Leu Gln Tyr Tyr Asn Thr Leu Leu Asp Ser Leu Val Leu Arg Asn
130 135 140

Ile Glu Pro Ile Val Thr Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Ala Leu
145 150 155 160

Gln Glu Lys Tyr Gly Gly Trp Lys Asn Asp Thr Ile Ile Asp Ile Phe
165 170 175

Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Cys Phe Gln Thr Phe Gly Asp Arg Val Lys
180 185 190

Tyr Trp Ile Thr Ile His Asn Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Tyr
195 200 205

Gly Thr Gly Met His Ala Pro Gly Glu Lys Gly Asn Leu Ala Ala Val
210 215 220

Tyr Thr Val Gly His Asn Leu Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His
225 230 235 240

Asn Tyr Asn Thr His Phe Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile
245 250 255

Thr Leu Gly Ser His Trp Ile Glu Pro Asn Arg Ser Glu Asn Thr Met
260 265 270

Asp Ile Leu Lys Cys Gln Gln Ser Met Val Ser Val Leu Gly Trp Phe
275 280 285

Ala Ser Pro Ile His Gly Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Gly Met Lys Lys
290 295 300

Lys Leu Leu Ser Ile Leu Pro Leu Phe Ser Glu Ala Glu Lys Asn Glu
305 310 315 320

Val Arg Gly Thr Ala Asp Phe Phe Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn
325 330 335

Phe Lys Pro Leu Asn Thr Met Ala Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu
340 345 350

Asn Leu Arg Glu Ala Leu Asn Trp Ile Lys Leu Glu Tyr Asn Asn Pro
355 360 365

Arg Ile Leu Ile Ala Glu Asn Gly Trp Phe Thr Asp Ser His Val Lys
370 375 380

Thr Glu Asp Thr Thr Ala Ile Tyr Met Met Lys Asn Phe Leu Ser Gln
385 390 395 400

Val Leu Gln Ala Ile Arg Leu Asp Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr
405 410 415

Ala Trp Ser Leu Leu Asp Gly Phe Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Ile
420 425 430

Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp Phe Asn Ser Lys Gln Lys Glu Arg
435 440 445

Lys Pro Lys Ser Ser Ala His Tyr Tyr Lys Gln Ile Ile Arg Glu Asn
450 455 460

Gly Phe Ser Leu Lys Glu Ala Thr Pro Asp Val Gln Gly Gln Phe Pro
465 470 475 480

Cys Asp Phe Ser Trp Gly Val Thr Glu Ser Val Leu Lys Pro Glu Ser
485 490 495

Val Ala Ser Ser Pro Gln Phe Ser Asp Pro Tyr Leu Tyr Val Trp Asn
500 505 510

Ala Thr Gly Asn Arg Leu Leu His Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys
515 520 525

Thr Arg Pro Ala Gln Cys Thr Asp Phe Val Asn Ile Lys Lys Gln Leu
530 535 540

Glu Met Leu Ala Arg Met Lys Val Thr His Tyr Arg Phe Ala Leu Asp
545 550 555 560

Trp Ala Ser Val Leu Pro Thr Gly Asn Leu Ser Ala Val Asn Arg Gln
565 570 575

Ala Leu Arg Tyr Tyr Arg Cys Val Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly
580 585 590

Ile Ser Ala Met Val Thr Leu Tyr Tyr Pro Thr His Ala His Leu Gly
595 600 605

Leu Pro Glu Pro Leu Leu His Ala Gly Gly Trp Leu Asn Pro Ser Thr
610 615 620

Val Glu Ala Phe Gln Ala Tyr Ala Gly Leu Cys Phe Gln Glu Leu Gly
625 630 635 640

Asp Leu Val Lys Leu Trp Ile Thr Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser
645 650 655

Asp Ile Tyr Asn Arg Ser Gly Asn Asp Thr Tyr Gly Ala Ala His Asn
660 665 670

Leu Leu Val Ala His Ala Leu Ala Trp Arg Leu Tyr Asp Arg Gln Phe
675 680 685

Arg Pro Ser Gln Arg Gly Ala Val Ser Leu Ser Leu His Ala Asp Trp
690 695 700

Ala Glu Pro Ala Asn Pro Tyr Ala Asp Ser His Trp Arg Ala Ala Glu
705 710 715 720

Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile Ala Trp Phe Ala Glu Pro Leu Phe Lys
725 730 735

Thr Gly Asp Tyr Pro Ala Ala Met Arg Glu Tyr Ile Ala Ser Lys His
740 745 750

Arg Arg Gly Leu Ser Ser Ser Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Ala Glu
755 760 765

Arg Arg Leu Leu Lys Gly Thr Val Asp Phe Cys Ala Leu Asn His Phe
770 775 780

Thr Thr Arg Phe Val Met His Glu Gln Leu Ala Gly Ser Arg Tyr Asp
785 790 795 800

Ser Asp Arg Asp Ile Gln Phe Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser
805 810 815

Pro Thr Arg Leu Ala Val Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Arg
820 825 830

Trp Val Arg Arg Asn Tyr Gly Asp Met Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Ser
835 840 845

Gly Ile Asp Asp Gln Ala Leu Glu Asp Asp Arg Leu Arg Lys Tyr Tyr
850 855 860

Leu Glu Lys Tyr Leu Gln Glu Val Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys
865 870 875 880

Val Arg Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala Phe Lys Leu Ala Glu Glu Lys Ser
885 890 895

Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe Thr Ser Asp Phe Lys Ala Lys Ser Ser
900 905 910

Ile Gln Phe Tyr Asn Lys Met Ile Ser Ser Ser Gly Phe Pro Ser Glu
915 920 925

Asn Ser Ser Ser Arg Cys Ser Gln Thr Gln Lys Asn Thr Glu Cys Thr
930 935 940

Val Cys Leu Phe Leu Ala
945 950

<210> 150
<211> 950
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit
tổng hợp"

<400> 150
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Glu Phe Ser Gly Asp Gly Arg
1 5 10 15

Ala Val Trp Ser Lys Asn Pro Asn Phe Thr Pro Val Asn Glu Ser Gln
20 25 30

Leu Phe Leu Tyr Asp Thr Phe Pro Lys Asn Phe Phe Trp Gly Val Gly

35 40 45

Thr Gly Ala Leu Gln Val Glu Gly Ser Trp Lys Lys Asp Gly Lys Gly
50 55 60

Pro Ser Ile Trp Asp His Phe Val His Thr His Leu Lys Asn Val Ser
65 70 75 80

Ser Thr Asn Gly Ser Ser Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu
85 90 95

Ser Ala Leu Asp Phe Ile Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser
100 105 110

Trp Pro Arg Leu Phe Pro Asp Gly Ile Val Thr Val Ala Asn Ala Lys
115 120 125

Gly Leu Gln Tyr Tyr Asn Ala Leu Leu Asp Ser Leu Val Leu Arg Asn
130 135 140

Ile Glu Pro Ile Val Thr Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Ala Leu
145 150 155 160

Gln Glu Lys Tyr Gly Gly Trp Lys Asn Asp Thr Ile Ile Asp Ile Phe
165 170 175

Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Cys Phe Gln Thr Phe Gly Asp Arg Val Lys
180 185 190

Tyr Trp Ile Thr Ile His Asn Pro Tyr Leu Val Ala Trp His Gly Tyr
195 200 205

Gly Thr Gly Met His Ala Pro Gly Glu Lys Gly Asn Leu Ala Ala Val
210 215 220

Tyr Thr Val Gly His Asn Leu Ile Lys Ala His Ser Lys Val Trp His
225 230 235 240

Asn Tyr Asn Thr His Phe Arg Pro His Gln Lys Gly Trp Leu Ser Ile
245 250 255

Thr Leu Gly Ser His Trp Ile Glu Pro Asn Arg Ser Glu Asn Thr Met
260 265 270

Asp Ile Leu Lys Cys Gln Gln Ser Met Val Ser Val Leu Gly Trp Phe
275 280 285

Ala Asn Pro Ile His Gly Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Gly Met Lys Lys
290 295 300

Lys Leu Leu Ser Ile Leu Pro Leu Phe Ser Glu Ala Glu Lys Asn Glu
305 310 315 320

Val Arg Gly Thr Ala Asp Phe Phe Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn
325 330 335

Phe Lys Pro Leu Asn Thr Met Ala Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu
340 345 350

Asn Leu Arg Glu Ala Leu Asn Trp Ile Lys Leu Glu Tyr Asn Asn Pro
355 360 365

Gln Ile Leu Ile Ala Glu Asn Gly Trp Phe Thr Asp Ser His Val Lys
370 375 380

Thr Glu Asp Thr Thr Ala Ile Tyr Met Met Lys Asn Phe Leu Ser Gln
385 390 395 400

Val Leu Gln Ala Ile Arg Leu Asp Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr
405 410 415

Ala Trp Ser Leu Leu Asp Gly Phe Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Ile
420 425 430

Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp Phe Asn Ser Lys Gln Lys Glu Arg
435 440 445

Lys Pro Lys Ser Ser Ala His Tyr Tyr Lys Gln Ile Ile Arg Glu Asn
450 455 460

Gly Phe Ser Leu Lys Glu Ala Thr Pro Asp Val Gln Gly Gln Phe Pro

465 470 475 480

Cys Asp Phe Ser Trp Gly Val Thr Glu Ser Val Leu Lys Pro Glu Ser
485 490 495

Val Ala Ser Ser Pro Gln Phe Ser Asp Pro Tyr Leu Tyr Val Trp Asn
500 505 510

Ala Thr Gly Asn Arg Leu Leu His Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys
515 520 525

Thr Arg Pro Ala Gln Cys Thr Asp Phe Val Asn Ile Lys Lys Gln Leu
530 535 540

Glu Met Leu Ala Arg Met Lys Val Thr His Tyr Arg Phe Ala Leu Asp
545 550 555 560

Trp Ala Ser Val Leu Pro Thr Gly Asn Leu Ser Ala Val Asn Arg Gln
565 570 575

Ala Leu Arg Tyr Tyr Arg Cys Val Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly
580 585 590

Ile Ser Ala Met Val Thr Leu Tyr Tyr Pro Thr His Ala His Leu Gly
595 600 605

Leu Pro Glu Pro Leu Leu His Ala Gly Gly Trp Leu Asn Pro Ser Thr
610 615 620

Val Glu Ala Phe Gln Ala Tyr Ala Gly Leu Cys Phe Gln Glu Leu Gly
625 630 635 640

Asp Leu Val Lys Leu Trp Ile Thr Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser
645 650 655

Asp Ile Tyr Asn Arg Ser Gly Asn Asp Thr Tyr Gly Ala Ala His Asn
660 665 670

Leu Leu Val Ala His Ala Leu Ala Trp Arg Leu Tyr Asp Arg Gln Phe
675 680 685

Arg Pro Ser Gln Arg Gly Ala Val Ser Leu Ser Leu His Ala Asp Trp
690 695 700

Ala Glu Pro Ala Asn Pro Tyr Ala Asp Ser His Trp Arg Ala Ala Glu
705 710 715 720

Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile Ala Trp Phe Ala Glu Pro Leu Phe Lys
725 730 735

Thr Gly Asp Tyr Pro Ala Ala Met Arg Glu Tyr Ile Ala Ser Lys His
740 745 750

Arg Arg Gly Leu Ser Ser Ser Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Ala Glu
755 760 765

Arg Arg Leu Leu Lys Gly Thr Val Asp Phe Cys Ala Leu Asn His Phe
770 775 780

Thr Thr Arg Phe Val Met His Glu Gln Leu Ala Gly Ser Arg Tyr Asp
785 790 795 800

Ser Asp Arg Asp Ile Gln Phe Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser
805 810 815

Pro Thr Arg Leu Ala Val Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Arg
820 825 830

Trp Val Arg Arg Asn Tyr Gly Asp Met Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Ser
835 840 845

Gly Ile Asp Asp Gln Ala Leu Glu Asp Asp Arg Leu Arg Lys Tyr Tyr
850 855 860

Leu Glu Lys Tyr Leu Gln Glu Val Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys
865 870 875 880

Val Arg Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala Phe Lys Leu Ala Glu Glu Lys Ser
885 890 895

Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe Thr Ser Asp Phe Lys Ala Lys Ser Ser

900 905 910

Ile Gln Phe Tyr Asn Lys Met Ile Ser Ser Ser Gly Phe Pro Ser Glu
915 920 925

Asn Ser Ser Ser Arg Cys Ser Gln Thr Gln Lys Asn Thr Glu Cys Thr
930 935 940

Val Cys Leu Phe Leu Val
945 950

<210> 151
<211> 989
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit
tổng hợp"

<400> 151
Glu Pro Gly Asp Gly Ala Gln Thr Trp Ala Arg Phe Ser Arg Pro Pro
1 5 10 15

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Leu Phe Gln Gly Thr Phe Pro Asp Gly Phe
20 25 30

Leu Trp Ala Val Gly Ser Ala Ala Tyr Gln Thr Glu Gly Gly Trp Gln
35 40 45

Gln His Gly Lys Gly Ala Ser Ile Trp Asp Thr Phe Thr His His Pro
50 55 60

Leu Ala Pro Pro Gly Asp Ser Arg Asn Ala Ser Leu Pro Leu Gly Ala
65 70 75 80

Pro Ser Pro Leu Gln Pro Ala Thr Gly Asp Val Ala Ser Asp Ser Tyr
85 90 95

Asn Asn Val Phe Arg Asp Thr Glu Ala Leu Arg Glu Leu Gly Val Thr
100 105 110

His Tyr Arg Phe Ser Ile Ser Trp Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser
115 120 125

Ala Gly Val Pro Asn Arg Glu Gly Leu Arg Tyr Tyr Arg Arg Leu Leu
130 135 140

Glu Arg Leu Arg Glu Leu Gly Val Gln Pro Val Val Thr Leu Tyr His
145 150 155 160

Trp Asp Leu Pro Gln Arg Leu Gln Asp Ala Tyr Gly Gly Trp Ala Asn
165 170 175

Arg Ala Leu Ala Asp His Phe Arg Asp Tyr Ala Glu Leu Cys Phe Arg
180 185 190

His Phe Gly Gly Gln Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile Asp Asn Pro Tyr
195 200 205

Val Val Ala Trp His Gly Tyr Ala Thr Gly Arg Leu Ala Pro Gly Ile
210 215 220

Arg Gly Ser Pro Arg Leu Gly Tyr Leu Val Ala His Asn Leu Leu Leu
225 230 235 240

Ala His Ala Lys Val Trp His Leu Tyr Asn Thr Ser Phe Arg Pro Thr
245 250 255

Gln Gly Gly Gln Val Ser Ile Ala Leu Ser Ser His Trp Ile Asn Pro
260 265 270

Arg Arg Met Thr Asp His Ser Ile Lys Glu Cys Gln Lys Ser Leu Asp
275 280 285

Phe Val Leu Gly Trp Phe Ala Lys Pro Val Phe Ile Asp Gly Asp Tyr
290 295 300

Pro Glu Ser Met Lys Asn Asn Leu Ser Ser Ile Leu Pro Asp Phe Thr
305 310 315 320

Glu Ser Glu Lys Lys Phe Ile Lys Gly Thr Ala Asp Phe Phe Ala Leu
325 330 335

Cys Phe Gly Pro Thr Leu Ser Phe Gln Leu Leu Asp Pro His Met Lys
340 345 350

Phe Arg Gln Leu Glu Ser Pro Asn Leu Arg Gln Leu Leu Ser Trp Ile
355 360 365

Asp Leu Glu Phe Asn His Pro Gln Ile Phe Ile Val Glu Asn Gly Trp
370 375 380

Phe Val Ser Gly Thr Thr Lys Arg Asp Asp Ala Lys Tyr Met Tyr Tyr
385 390 395 400

Leu Lys Lys Phe Ile Met Glu Thr Leu Lys Ala Ile Lys Leu Asp Gly
405 410 415

Val Asp Val Ile Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Met Asp Gly Phe Glu
420 425 430

Trp His Arg Gly Tyr Ser Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp Phe
435 440 445

Leu Ser Gln Asp Lys Met Leu Leu Pro Lys Ser Ser Ala Leu Phe Tyr
450 455 460

Gln Lys Leu Ile Glu Lys Asn Gly Phe Pro Pro Leu Pro Glu Asn Gln
465 470 475 480

Pro Leu Glu Gly Thr Phe Pro Cys Asp Phe Ala Trp Gly Val Val Asp
485 490 495

Asn Tyr Ile Gln Val Asp Thr Thr Leu Ser Gln Phe Thr Asp Leu Asn
500 505 510

Val Tyr Leu Trp Asp Val His His Ser Lys Arg Leu Ile Lys Val Asp
515 520 525

Gly Val Val Thr Lys Lys Arg Lys Ser Tyr Cys Val Asp Phe Ala Ala
530 535 540

Ile Gln Pro Gln Ile Ala Leu Leu Gln Glu Met His Val Thr His Phe
545 550 555 560

Arg Phe Ser Leu Asp Trp Ala Leu Ile Leu Pro Leu Gly Asn Gln Ser
565 570 575

Gln Val Asn His Thr Ile Leu Gln Tyr Tyr Arg Cys Met Ala Ser Glu
580 585 590

Leu Val Arg Val Asn Ile Thr Pro Val Val Ala Leu Trp Gln Pro Met
595 600 605

Ala Pro Asn Gln Gly Leu Pro Arg Leu Leu Ala Arg Gln Gly Ala Trp
610 615 620

Glu Asn Pro Tyr Thr Ala Leu Ala Phe Ala Glu Tyr Ala Arg Leu Cys
625 630 635 640

Phe Gln Glu Leu Gly His His Val Lys Leu Trp Ile Thr Met Asn Glu
645 650 655

Pro Tyr Thr Arg Asn Met Thr Tyr Ser Ala Gly His Asn Leu Leu Lys
660 665 670

Ala His Ala Leu Ala Trp His Val Tyr Asn Glu Lys Phe Arg His Ala
675 680 685

Gln Asn Gly Lys Ile Ser Ile Ala Leu Gln Ala Asp Trp Ile Glu Pro
690 695 700

Ala Cys Pro Phe Ser Gln Lys Asp Lys Glu Val Ala Glu Arg Val Leu
705 710 715 720

Glu Phe Asp Ile Gly Trp Leu Ala Glu Pro Ile Phe Gly Ser Gly Asp
725 730 735

Tyr Pro Trp Val Met Arg Asp Trp Leu Asn Gln Arg Asn Asn Phe Leu
740 745 750

Leu Pro Tyr Phe Thr Glu Asp Glu Lys Lys Leu Ile Gln Gly Thr Phe
755 760 765

Asp Phe Leu Ala Leu Ser His Tyr Thr Thr Ile Leu Val Asp Ser Glu
770 775 780

Lys Glu Asp Pro Ile Lys Tyr Asn Asp Tyr Leu Glu Val Gln Glu Met
785 790 795 800

Thr Asp Ile Thr Trp Leu Asn Ser Pro Ser Gln Val Ala Val Val Pro
805 810 815

Trp Gly Leu Arg Lys Val Leu Asn Trp Leu Lys Phe Lys Tyr Gly Asp
820 825 830

Leu Pro Met Tyr Ile Ile Ser Asn Gly Ile Asp Asp Gly Leu His Ala
835 840 845

Glu Asp Asp Gln Leu Arg Val Tyr Tyr Met Gln Asn Tyr Ile Asn Glu
850 855 860

Ala Leu Lys Ala His Ile Leu Asp Gly Ile Asn Leu Cys Gly Tyr Phe
865 870 875 880

Ala Tyr Ser Phe Asn Asp Arg Thr Ala Pro Arg Phe Gly Leu Tyr Arg
885 890 895

Tyr Ala Ala Asp Gln Phe Glu Pro Lys Ala Ser Met Lys His Tyr Arg
900 905 910

Lys Ile Ile Asp Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Glu Thr Leu Glu Arg
915 920 925

Phe Cys Pro Glu Glu Phe Thr Val Cys Thr Glu Cys Ser Phe Phe His
930 935 940

Thr Arg Lys Ser Leu Leu Ala Phe Ile Ala Phe Leu Phe Phe Ala Ser
945 950 955 960

Ile Ile Ser Leu Ser Leu Ile Phe Tyr Tyr Ser Lys Lys Gly Arg Arg
965 970 975

Ser Tyr Lys Leu Glu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
980 985

<210> 152
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit
tổng hợp"

<400> 152
Ser Thr Tyr Ile Ser
1 5

<210> 153
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit
tổng hợp"

<400> 153
Glu Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 154
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Polypeptit
tổng hợp"

<400> 154
Glu His Phe Asp Ala Trp Val His Tyr Tyr Val Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 155

<211> 455
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 155
Phe Pro Cys Asp Phe Ser Trp Gly Val Thr Glu Ser Val Leu Lys Pro
1 5 10 15

Glu Ser Val Ala Ser Ser Pro Gln Phe Ser Asp Pro His Leu Tyr Val
20 25 30

Trp Asn Ala Thr Gly Asn Arg Leu Leu His Arg Val Glu Gly Val Arg
35 40 45

Leu Lys Thr Arg Pro Ala Gln Cys Thr Asp Phe Val Asn Ile Lys Lys
50 55 60

Gln Leu Glu Met Leu Ala Arg Met Lys Val Thr His Tyr Arg Phe Ala
65 70 75 80

Leu Asp Trp Ala Ser Val Leu Pro Thr Gly Asn Leu Ser Ala Val Asn
85 90 95

Arg Gln Ala Leu Arg Tyr Tyr Arg Cys Val Val Ser Glu Gly Leu Lys
100 105 110

Leu Gly Ile Ser Ala Met Val Thr Leu Tyr Tyr Pro Thr His Ala His
115 120 125

Leu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Leu His Ala Asp Gly Trp Leu Asn Pro
130 135 140

Ser Thr Ala Glu Ala Phe Gln Ala Tyr Ala Gly Leu Cys Phe Gln Glu
145 150 155 160

Leu Gly Asp Leu Val Lys Leu Trp Ile Thr Ile Asn Glu Pro Asn Arg
165 170 175

Leu Ser Asp Ile Tyr Asn Arg Ser Gly Asn Asp Thr Tyr Gly Ala Ala
180 185 190

His Asn Leu Leu Val Ala His Ala Leu Ala Trp Arg Leu Tyr Asp Arg

195 200 205

Gln Phe Arg Pro Ser Gln Arg Gly Ala Val Ser Leu Ser Leu His Ala
210 215 220

Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Tyr Ala Asp Ser His Trp Arg Ala
225 230 235 240

Ala Glu Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile Ala Trp Phe Ala Glu Pro Leu
245 250 255

Phe Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ala Ala Met Arg Glu Tyr Ile Ala Ser
260 265 270

Lys His Arg Arg Gly Leu Ser Ser Ser Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu
275 280 285

Ala Glu Arg Arg Leu Leu Lys Gly Thr Val Asp Phe Cys Ala Leu Asn
290 295 300

His Phe Thr Thr Arg Phe Val Met His Glu Gln Leu Ala Gly Ser Arg
305 310 315 320

Tyr Asp Ser Asp Arg Asp Ile Gln Phe Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu
325 330 335

Ser Ser Pro Thr Arg Leu Ala Val Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu
340 345 350

Leu Arg Trp Val Arg Arg Asn Tyr Gly Asp Met Asp Ile Tyr Ile Thr
355 360 365

Ala Ser Gly Ile Asp Asp Gln Ala Leu Glu Asp Asp Arg Leu Arg Lys
370 375 380

Tyr Tyr Leu Gly Lys Tyr Leu Gln Glu Val Leu Lys Ala Tyr Leu Ile
385 390 395 400

Asp Lys Val Arg Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala Phe Lys Leu Ala Glu Glu
405 410 415

Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe Thr Ser Asp Phe Lys Ala Lys
420 425 430

Ser Ser Ile Gln Phe Tyr Asn Lys Val Ile Ser Ser Arg Gly Phe Pro
435 440 445

Phe Glu Asn Ser Ser Ser Arg
450 455

<210> 156
<211> 36
<212> ADN
<213> Mus sp.

<400> 156
gttaccggct tctccggaga cgggaaagca atatgg
36

<210> 157
<211> 52
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 157
Met Lys Pro Gly Cys Ala Ala Gly Ser Pro Gly Asn Glu Trp Ile Phe
1 5 10 15

Phe Ser Thr Asp Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Arg Asn Thr Met Ser Asn
20 25 30

Gly Gly Leu Gln Arg Ser Val Ile Leu Ser Ala Leu Ile Leu Leu Arg
35 40 45

Ala Val Thr Gly
50

<210> 158
<211> 938
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 158
Phe Ser Gly Asp Gly Lys Ala Ile Trp Asp Lys Lys Gln Tyr Val Ser
1 5 10 15

Pro Val Asn Pro Ser Gln Leu Phe Leu Tyr Asp Thr Phe Pro Lys Asn
20 25 30

Phe Ser Trp Gly Val Gly Thr Gly Ala Phe Gln Val Glu Gly Ser Trp
35 40 45

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

His Leu Arg Gly Val Asn Gly Thr Asp Arg Ser Thr Asp Ser Tyr Ile
65 70 75 80

Phe Leu Glu Lys Asp Leu Leu Ala Leu Asp Phe Leu Gly Val Ser Phe
85 90 95

Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg Leu Phe Pro Asn Gly Thr Val
100 105 110

Ala Ala Val Asn Ala Gln Gly Leu Arg Tyr Tyr Arg Ala Leu Leu Asp
115 120 125

Ser Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro Ile Val Thr Leu Tyr His Trp
130 135 140

Asp Leu Pro Leu Thr Leu Gln Glu Glu Tyr Gly Gly Trp Lys Asn Ala
145 150 155 160

Thr Met Ile Asp Leu Phe Asn Asp Tyr Ala Thr Tyr Cys Phe Gln Thr
165 170 175

Phe Gly Asp Arg Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile His Asn Pro Tyr Leu
180 185 190

Val Ala Trp His Gly Phe Gly Thr Gly Met His Ala Pro Gly Glu Lys
195 200 205

Gly Asn Leu Thr Ala Val Tyr Thr Val Gly His Asn Leu Ile Lys Ala
210 215 220

His Ser Lys Val Trp His Asn Tyr Asp Lys Asn Phe Arg Pro His Gln

225 230 235 240

Lys Gly Trp Leu Ser Ile Thr Leu Gly Ser His Trp Ile Glu Pro Asn
245 250 255

Arg Thr Asp Asn Met Glu Asp Val Ile Asn Cys Gln His Ser Met Ser
260 265 270

Ser Val Leu Gly Trp Phe Ala Asn Pro Ile His Gly Asp Gly Asp Tyr
275 280 285

Pro Glu Phe Met Lys Thr Gly Ala Met Ile Pro Glu Phe Ser Glu Ala
290 295 300

Glu Lys Glu Glu Val Arg Gly Thr Ala Asp Phe Phe Ala Phe Ser Phe
305 310 315 320

Gly Pro Asn Asn Phe Arg Pro Ser Asn Thr Val Val Lys Met Gly Gln
325 330 335

Asn Val Ser Leu Asn Leu Arg Gln Val Leu Asn Trp Ile Lys Leu Glu
340 345 350

Tyr Asp Asp Pro Gln Ile Leu Ile Ser Glu Asn Gly Trp Phe Thr Asp
355 360 365

Ser Tyr Ile Lys Thr Glu Asp Thr Thr Ala Ile Tyr Met Met Lys Asn
370 375 380

Phe Leu Asn Gln Val Leu Gln Ala Ile Lys Phe Asp Glu Ile Arg Val
385 390 395 400

Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Thr Leu Leu Asp Gly Phe Glu Trp Gln Asp
405 410 415

Ala Tyr Thr Thr Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp Phe Asn Ser Glu
420 425 430

Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys Ser Ser Ala His Tyr Tyr Lys Gln Ile
435 440 445

Ile Gln Asp Asn Gly Phe Pro Leu Lys Glu Ser Thr Pro Asp Met Lys
450 455 460

Gly Arg Phe Pro Cys Asp Phe Ser Trp Gly Val Thr Glu Ser Val Leu
465 470 475 480

Lys Pro Glu Phe Thr Val Ser Ser Pro Gln Phe Thr Asp Pro His Leu
485 490 495

Tyr Val Trp Asn Val Thr Gly Asn Arg Leu Leu Tyr Arg Val Glu Gly
500 505 510

Val Arg Leu Lys Thr Arg Pro Ser Gln Cys Thr Asp Tyr Val Ser Ile
515 520 525

Lys Lys Arg Val Glu Met Leu Ala Lys Met Lys Val Thr His Tyr Gln
530 535 540

Phe Ala Leu Asp Trp Thr Ser Ile Leu Pro Thr Gly Asn Leu Ser Lys
545 550 555 560

Val Asn Arg Gln Val Leu Arg Tyr Tyr Arg Cys Val Val Ser Glu Gly
565 570 575

Leu Lys Leu Gly Val Phe Pro Met Val Thr Leu Tyr His Pro Thr His
580 585 590

Ser His Leu Gly Leu Pro Leu Pro Leu Leu Ser Ser Gly Gly Trp Leu
595 600 605

Asn Met Asn Thr Ala Lys Ala Phe Gln Asp Tyr Ala Glu Leu Cys Phe
610 615 620

Arg Glu Leu Gly Asp Leu Val Lys Leu Trp Ile Thr Ile Asn Glu Pro
625 630 635 640

Asn Arg Leu Ser Asp Met Tyr Asn Arg Thr Ser Asn Asp Thr Tyr Arg
645 650 655

Ala Ala His Asn Leu Met Ile Ala His Ala Gln Val Trp His Leu Tyr

660 665 670

Asp Arg Gln Tyr Arg Pro Val Gln His Gly Ala Val Ser Leu Ser Leu
675 680 685

His Cys Asp Trp Ala Glu Pro Ala Asn Pro Phe Val Asp Ser His Trp
690 695 700

Lys Ala Ala Glu Arg Phe Leu Gln Phe Glu Ile Ala Trp Phe Ala Asp
705 710 715 720

Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp Tyr Pro Ser Val Met Lys Glu Tyr Ile
725 730 735

Ala Ser Lys Asn Gln Arg Gly Leu Ser Ser Ser Val Leu Pro Arg Phe
740 745 750

Thr Ala Lys Glu Ser Arg Leu Val Lys Gly Thr Val Asp Phe Tyr Ala
755 760 765

Leu Asn His Phe Thr Thr Arg Phe Val Ile His Lys Gln Leu Asn Thr
770 775 780

Asn Arg Ser Val Ala Asp Arg Asp Val Gln Phe Leu Gln Asp Ile Thr
785 790 795 800

Arg Leu Ser Ser Pro Ser Arg Leu Ala Val Thr Pro Trp Gly Val Arg
805 810 815

Lys Leu Leu Ala Trp Ile Arg Arg Asn Tyr Arg Asp Arg Asp Ile Tyr
820 825 830

Ile Thr Ala Asn Gly Ile Asp Asp Leu Ala Leu Glu Asp Asp Gln Ile
835 840 845

Arg Lys Tyr Tyr Leu Glu Lys Tyr Val Gln Glu Ala Leu Lys Ala Tyr
850 855 860

Leu Ile Asp Lys Val Lys Ile Lys Gly Tyr Tyr Ala Phe Lys Leu Thr
865 870 875 880

Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg Phe Gly Phe Phe Thr Ser Asp Phe Arg
885 890 895

Ala Lys Ser Ser Val Gln Phe Tyr Ser Lys Leu Ile Ser Ser Ser Gly
900 905 910

Leu Pro Ala Glu Asn Arg Ser Pro Ala Cys Gly Gln Pro Ala Glu Asp
915 920 925

Thr Asp Cys Thr Ile Cys Ser Phe Leu Val
930 935

<210> 159
<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 159
Met Glu Lys Lys Leu His Ala Val Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe
1 5 10 15

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

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

Arg Tyr Ala Thr Trp
50

<210> 160
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 160
Ser Ser Pro Thr Arg Leu Ala Val Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu
1 5 10 15

Leu Arg Trp Val Arg Arg Asn Tyr Gly Asp Met Asp Ile Tyr Ile Thr
20 25 30

Ala Ser

<210> 161
<211> 34
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 161
Ser Ser Pro Thr Arg Leu Ala Val Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu
1 5 10 15

Leu Arg Trp Val Arg Arg Asn Tyr Gly Asp Met Asp Ile Tyr Ile Thr
20 25 30

Ala Ser

<210> 162
<211> 34
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 162
Ser Ser Pro Ser Arg Leu Ala Val Thr Pro Trp Gly Met Arg Lys Leu
1 5 10 15

Leu Gly Trp Ile Arg Arg Asn Tyr Arg Asp Met Asp Ile Tyr Val Thr
20 25 30

Ala Asn

<210> 163
<211> 34
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 163
Ser Ser Pro Ser Arg Leu Ala Val Thr Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu
1 5 10 15

Leu Ala Trp Ile Arg Arg Asn Tyr Arg Asp Arg Asp Ile Tyr Ile Thr
20 25 30

Ala Asn

<210> 164
<211> 34
<212> PRT
<213> Không biết

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Không biết: Polypeptit
thỏ"

<400> 164
Ala Ser Pro Ser Arg Leu Ala Val Met Pro Trp Gly Glu Gly Lys Leu
1 5 10 15

Leu Arg Trp Met Arg Asn Asn Tyr Gly Asp Leu Asp Val Tyr Ile Thr
20 25 30

Ala Asn

<210> 165
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 165
Phe Ser Gly Asp Gly Lys Ala Ile Trp Asp Lys Lys Gln Tyr Val Ser
1 5 10 15

Pro

<210> 166
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /note="Mô tả Trình tự nhân tạo: Peptit
tổng hợp"

<400> 166
Phe Ser Glu Thr Gly Lys Gln Tyr Gly Ile Lys Asn Ser Thr
1 5 10