



(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)



1-0034106

(51)⁸ C07K 16/28; A61K 39/395

(13) B

(21) 1-2019-02895

(22) 08/11/2017

(86) PCT/US2017/060690 08/11/2017

(87) WO 2018/089532 17/05/2018

(30) 62/419,062 08/11/2016 US

(45) 25/11/2022 416

(43) 25/10/2019 379A

(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)

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

(72) Jesper GROMADA (DK); Panayiotis STEVIS (US); Judith ALTAREJOS (CA).

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

(54) KHÁNG THỂ LIÊN KẾT VỚI THỤ THỂ LEPTIN NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết với thụ thể leptin người (LEPR) và dược phẩm chứa kháng thể này. Theo các phương án nhất định, sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết với LEPR và đối kháng tín hiệu LEPR. Theo các phương án nhất định, sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết với LEPR khi có mặt hoặc vắng mặt leptin. Theo các phương án khác, sáng chế còn bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể thể hiện chủ vận một phần của tín hiệu LEPR. Kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế có hiệu quả trong điều trị nhiều tình trạng khác nhau, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, suy mòn do chứng liệt tim xung huyết, suy mòn phổi và suy mòn do ung thư, rối loạn tự miễn như bệnh viêm ruột, bệnh lupus ban đỏ, đa xơ cứng, bệnh vẩy nến, bệnh tim mạch, cao huyết áp, rối loạn thoái hóa thần kinh, trầm cảm, bệnh ung thư như ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư hắc tố, ung thư vú, và các bệnh và rối loạn khác liên quan đến hoặc gây ra bởi tín hiệu leptin tăng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết với thụ thể leptin (LEPR), và được phẩm chứa kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Leptin là hoocmon polypeptit được biểu hiện chủ yếu bởi mô mỡ và tham gia vào điều hòa quá trình trao đổi chất, cân bằng năng lượng và hấp thụ thức ăn. Hoạt tính leptin được trung hòa bằng cách tương tác với, và bằng cách truyền tín hiệu thông qua, thụ thể leptin. Thụ thể leptin, (còn được gọi là “LEPR”, “WSX”, “thụ thể OB”, “OB-R”, và (CD295) là thụ thể xuyên màng đơn của họ thụ thể xytokin lớp I có miền ngoại bào rộng (818 axit amin). Biểu hiện tăng lên của leptin, thụ thể leptin Ob-R hoặc cả hai có thể gây ra nhiều rối loạn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chứng biếng ăn hoặc rối loạn ăn uống tâm thần khác, chứng suy mòn do bệnh thận mãn tính, các suy mòn khác như suy mòn do chứng liệt tim xung huyết, suy mòn phổi, suy mòn do bức xạ, và suy mòn do ung thư, rối loạn tự miễn như bệnh viêm ruột, bệnh lupus ban đỏ, đa xơ cứng, bệnh vẩy nến, bệnh tim mạch, cao huyết áp, trầm cảm, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu, rối loạn thoái hóa thần kinh, ung thư như ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư hắc tố và ung thư vú.

Các phương pháp trị liệu được đề xuất hướng đến xử lý tín hiệu leptin tăng cao bao gồm sử dụng chất đối kháng peptit thụ thể leptin và chất đối kháng đột biến như biến thể thụ thể leptin hòa tan, chất đối kháng LEPR cạnh tranh như kháng thể 9F8 (Fazeli *et al.* (2006) *J Immunological Methods* 312, 190-200) hoặc thụ thể leptin hướng đích kháng thể nano (McMurphy *et al.*, *PLOS One* (2014) 9(2):e89895), miền fibronectin III, các chất làm ngon miệng (ví dụ, ghrelin và NPY), phong bế chất trung gian cuối dòng của leptin (ví dụ, thụ thể melanocortin 4) và/hoặc thay đổi phong cách sống. Tuy nhiên, các phương pháp này thường có hiệu quả hạn chế. Do đó, cần phải có phương pháp khác để điều trị kháng leptin và các tình trạng khác liên quan đến hàm lượng leptin huyết thanh tăng cao và/hoặc tín hiệu LEPR quá mức.

Danh sách trình tự

Bản sao của trình tự được nộp cùng với bản mô tả thông qua EFS-Web là trình tự được định dạng ASCII có tên tệp là 2017_11_08_10271WO01_SEQ_LIST_ST25.TXT, ngày tạo là ngày 09 tháng 11 năm 2017, và kích thước khoảng 87,4 kilobyte. Trình tự này nằm trong tài liệu định dạng ASCII là một phần của bản mô tả và được kết hợp toàn bộ vào đây để tham khảo.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với thụ thể leptin người (LEPR). Kháng thể theo sáng chế là kháng thể đối kháng; tức là việc kháng thể kháng LEPR theo sáng chế liên kết với LEPR dẫn đến phong bế hoặc làm giảm điều hòa tín hiệu thụ thể leptin ở tế bào. Theo đó, theo nhiều phương án, kháng thể đối kháng theo sáng chế biểu hiện hoạt tính chủ vận một phần rất yếu. Thay vào đó, kháng thể theo sáng chế có hiệu quả, ví dụ, trong làm giảm điều hòa hoạt tính sinh học của leptin ở đối tượng. Do đó, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế có hiệu quả trong điều trị bệnh và rối loạn liên quan đến tín hiệu leptin tăng cao.

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đầy đủ chiều dài (ví dụ, kháng thể IgG1 hoặc IgG4) hoặc có thể chỉ bao gồm phần liên kết kháng nguyên (ví dụ, mảnh Fab, F(ab')₂ hay scFv), và có thể được biến đổi để tác động đến chức năng, ví dụ, để loại bỏ các chức năng phản ứng lại kích thích không cần thiết (Reddy *et al.*, 2000, *J. Immunol.* 164:1925-1933).

Các kháng thể đối kháng LEPR minh họa theo sáng chế được trình bày trong bảng 1 và bảng 2 trong bản mô tả này. Bảng 1 trình bày các mã nhận biết trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), vùng xác định bổ trợ chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) và vùng xác định bổ sung chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2 và LCDR3) của các kháng thể kháng LEPR minh họa. Bảng 2 trình bày các mã nhận dạng trình tự axit nucleic của HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 và LCDR3 của các kháng thể kháng LEPR minh họa.

Sáng chế đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với LEPR, bao gồm HCVR có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong bảng 1, hoặc trình tự gần như

tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với LEPR, bao gồm LCVR có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR được liệt kê trong bảng 1, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với LEPR, chứa cặp trình tự axit amin HCVR và LCVR (HCVR/LCVR) có trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong bảng 1 bất cặp với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR được liệt kê trong bảng 1. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chứa trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LEPR ví dụ được liệt kê trong bảng 1. Theo các phương án nhất định, cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2/10, 18/10, 26/10, 34/10, 42/10, 50/10, 58/10, 66/10, và 74/82.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với LEPR, chứa CDR1 chuỗi nặng (HCDR1) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR1 được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với LEPR, chứa CDR2 chuỗi nặng (HCDR2) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR2 được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với LEPR, chứa CDR3 chuỗi nặng (HCDR3) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR3 được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với LEPR, chứa CDR1 chuỗi nhẹ (LCDR1) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR1 được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với LEPR, chứa CDR2 chuỗi nhẹ (LCDR2) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR2 được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với LEPR, chứa CDR3 chuỗi nhẹ (LCDR3) có trình tự axit amin được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR3 được liệt kê trong bảng 1 hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với LEPR, chứa cặp trình tự axit amin HCDR3 và LCDR3 (HCDR3/LCDR3) có trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR3 được liệt kê trong bảng 1 bất cặp với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR3 được liệt kê trong bảng 1. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 được chứa trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LEPR ví dụ được liệt kê trong bảng 1. Theo các phương án nhất định, cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 8/16, 24/16, 32/16, 40/16, 48/16, 56/16, 64/16, 72/16, 80/16 và 80/88.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với LEPR, chứa tập hợp gồm sáu CDR (cụ thể là, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3) được chứa trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LEPR ví dụ được liệt kê trong bảng 1. Theo các phương án nhất định, tập hợp trình tự axit amin HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14, 16; 20, 22, 24, 12, 14,

16; 28, 30, 32, 12, 14, 16; 36, 38, 40, 12, 14, 16; 52, 54, 56, 12, 14, 16; 60, 62, 64, 12, 14, 16; 68, 70, 72, 12, 14, 16; và 76, 78, 80, 84, 86, 88.

Theo phương án liên quan khác, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với LEPR, bao gồm tập hợp gồm sáu CDR (cụ thể là, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3) được chứa trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR như được xác định bằng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LEPR ví dụ được liệt kê trong bảng 1. Ví dụ, sáng chế bao gồm các kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu với LEPR, bao gồm tập hợp trình tự axit amin HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 chứa trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được lựa chọn từ nhóm gồm các SEQ ID NO: 2/10, 18/10, 26/10, 34/10, 42/10, 50/10, 58/10, 66/10, và 74/82. Phương pháp và kỹ thuật để xác định CDR trong trình tự axit amin HCVR và LCVR là đã biết trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng để xác định CDR trong trình tự axit amin HCVR và/hoặc LCVR cụ thể được bộc lộ trong bản mô tả này. Ví dụ về quy ước mà có thể được sử dụng để xác định ranh giới của CDR bao gồm, ví dụ, định nghĩa Kabat, định nghĩa Chothia, và định nghĩa AbM. Nói chung, định nghĩa Kabat dựa trên sự biến thiên về trình tự, định nghĩa Chothia dựa trên vị trí của vùng cấu trúc vòng lặp, và định nghĩa AbM là sự điều chỉnh giữa phương pháp của Kabat và Chothia. Xem ví dụ, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); and Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Các cơ sở dữ liệu công khai cũng có sẵn để nhận biết trình tự CDR trong kháng thể.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho các kháng thể kháng LEPR hoặc các phần của nó. Ví dụ, sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin HCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 1; theo phương án nhất định, các phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic HCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự về cơ bản tương tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin LCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 1; theo phương án nhất định, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic LCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự về cơ bản tương tự của nó có độ tương đồng trình tự

ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế đề cũng đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin HCDR1 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1; theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic HCDR1 bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự về cơ bản tương tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin HCVR2 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1; theo phương án nhất định, các phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic HCVR2 bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự về cơ bản tương tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin HCVR3 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1; theo phương án nhất định, các phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic HCVR3 bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự về cơ bản tương tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin LCVR1 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1; theo phương án nhất định, các phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic LCVR1 bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự về cơ bản tương tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin LCVR2 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1; theo phương án nhất định, các phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic LCVR2 bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự về cơ bản tương tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho trình tự axit amin LCVR3 bất kỳ được liệt kê trong bảng 1; theo phương án nhất định, các phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic LCVR3 bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự về cơ bản tương tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa HCVR, trong đó HCVR chứa tập hợp gồm ba CDR (cụ thể là, HCDR1, HCDR2, HCDR3), trong đó tập hợp trình tự axit amin HCDR1, HCDR2, HCDR3 như được xác định bằng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LEPR ví dụ được liệt kê trong bảng 1.

Sáng chế còn đề xuất phân tử axit nucleic mã hóa LCVR, trong đó LCVR chứa tập hợp ba CDR (cụ thể là, LCDR1, LCDR2, LCDR3), trong đó tập hợp trình tự axit amin LCDR1, LCDR2, LCDR3 như được xác định bằng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LEPR ví dụ được liệt kê trong bảng 1.

Sáng chế cũng còn đề xuất các phân tử axit nucleic mã hóa cho cả HCVR và LCVR, trong đó, HCVR bao gồm trình tự axit amin có trình tự axit amin HCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 1, và trong đó, LCVR bao gồm trình tự axit amin từ trình tự axit amin LCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 1. Theo các phương án nhất định, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được lựa chọn từ các trình tự axit nucleic HCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự về cơ bản tương tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99% và trình tự polynucleotit được lựa chọn từ trình tự axit nucleic LCVR bất kỳ được liệt kê trong bảng 2, hoặc trình tự về cơ bản tương tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%. Theo một số phương án theo khía cạnh này của sáng chế, phân tử axit nucleic mã hóa HCVR và LCVR, trong đó HCVR và LCVR đều được tạo ra từ cùng một kháng thể kháng LEPR được liệt kê trong bảng 1.

Sáng chế còn đề xuất vector biểu hiện tái tổ hợp có thể biểu hiện polypeptit chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của kháng thể kháng LEPR. Ví dụ, sáng chế bao gồm vector biểu hiện tái tổ hợp chứa phân tử bất kỳ trong số các phân tử axit nucleic như được mô tả trên đây, cụ thể là, phân tử axit nucleic mã hóa bất kỳ trong số HCVR, LCVR, và/hoặc trình tự CDR như được mô tả trong bảng 1. Cũng bao gồm trong phạm vi sáng chế là các tế bào chủ chứa các vector này, cũng như các phương pháp sản xuất kháng thể hay phần kháng thể của nó bằng việc nuôi cấy tế bào chủ trong điều kiện cho phép sản xuất kháng thể hoặc các đoạn kháng thể và thu hồi kháng thể và các đoạn kháng thể đã được sản xuất.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập được phẩm chứa kháng thể người tái tổ hợp hoặc đoạn kháng thể của nó có khả năng liên kết đặc hiệu với LEPR, và chất

mang được dụng. Theo khía cạnh liên quan, sáng chế đề xuất được phẩm, mà là được phẩm kết hợp của kháng thể kháng LEPR và chất trị liệu thứ hai. Theo một khía cạnh, chất trị liệu thứ hai là chất bất kỳ mà được kết hợp một cách có lợi với kháng thể kháng LEPR.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị để giảm điều hòa hoặc loại bỏ tín hiệu LEPR sử dụng kháng thể kháng LEPR hoặc phân liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế. Phương pháp điều trị theo như khía cạnh này của sáng chế bao gồm việc cho đối tượng cần đến phương pháp này dùng lượng được phẩm điều trị hiệu quả chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế. Rối loạn được điều trị là bệnh hoặc tình trạng bệnh lý bất kỳ mà được cải thiện, được làm thuyên giảm, bị ức chế hoặc được ngăn ngừa bằng giảm điều hòa hoặc loại bỏ tín hiệu LEPR, hoặc ngăn chặn hoạt tính của leptin.

Các phương án khác sẽ trở nên rõ ràng thông qua phần mô tả chi tiết sáng chế dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 minh họa thay đổi theo tỉ lệ phần trăm về sự hấp thụ thức ăn của chuột được điều trị bằng 30 mg/kg kháng thể kháng LEPR H4H17322P2, H4H18457P2, hoặc H4H18464 hoặc bằng kháng thể đối chứng kiểu tương đương.

Fig.2 minh họa thay đổi theo tỉ lệ phần trăm trung bình về thể trọng của chuột được điều trị bằng 30 mg/kg kháng thể kháng LEPR H4H17322P2, H4H18457P2, hoặc H4H18464 hoặc bằng kháng thể đối chứng kiểu tương đương.

Fig.3 minh họa khối lượng chất béo trung bình của chuột được điều trị bằng 30 mg/kg kháng thể kháng LEPR H4H17322P2, H4H18457P2, hoặc H4H18464 hoặc bằng kháng thể đối chứng kiểu tương đương.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi bắt đầu mô tả sáng chế, cần phải hiểu rằng, sáng chế này không bị giới hạn ở các điều kiện thí nghiệm và phương pháp cụ thể đã mô tả, các điều kiện và phương pháp này có thể thay đổi. Cũng cần hiểu rằng, các thuật ngữ được sử dụng trong sáng chế chỉ được dùng với mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không làm giới hạn do phạm vi của sáng chế bị giới hạn bởi yêu cầu bảo hộ.

Trừ khi được chỉ ra khác, tất cả thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có ý nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “khoảng”, khi được sử dụng để tham chiếu đến các giá trị dạng số được trích dẫn cụ thể, có nghĩa là giá trị này có thể thay đổi không quá 1% so với giá trị trích dẫn. Ví dụ, như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “khoảng 100” bao gồm 99 và 101 và tất cả các giá trị nằm trong khoảng (ví dụ, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, v.v.).

Mặc dù bất kỳ phương pháp và nguyên liệu nào tương tự hoặc tương đương với phương pháp và nguyên liệu được mô tả ở đây đều có thể được sử dụng trong thực nghiệm hoặc thử nghiệm sáng chế, nhưng các phương pháp và nguyên liệu ưu tiên sẽ được mô tả. Tất cả các bằng sáng chế, đơn sáng chế và các công bố không phải sáng chế đã nêu trong phần mô tả được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Định nghĩa

Thuật ngữ “thụ thể leptin”, “LEPR” và tương tự, như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ thụ thể leptin người, có trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 89 (xem UniProtKB/Swiss-Prot Accession No. P48357). Tên thay thế cho LEPR được sử dụng trong tài liệu khoa học bao gồm “thụ thể OB”, “OB-R” và “CD295”. LEPR còn được gọi là “WSX” (ví dụ, xem patent Mỹ số 7,524,937). Thuật ngữ “LEPR” bao gồm cả phân tử LEPR đơn phân và đa phân (ví dụ, nhị phân). Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “LEPR người đơn phân” có nghĩa là protein LEPR hoặc một phần của nó không chứa hoặc có vùng đa phân hóa bất kỳ và tồn tại dưới các điều kiện bình thường dưới dạng phân tử LEPR đơn lẻ không cần liên kết vật lý trực tiếp với phân tử LEPR khác. Phân tử LEPR đơn phân minh họa được gọi trong bản mô tả này là “hLEPR.mmh” có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 90 (ví dụ, xem ví dụ 3 trong bản mô tả này). Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “LEPR người nhị phân” có nghĩa là cấu trúc chứa hai phân tử LEPR liên kết với nhau thông qua cầu nối, liên kết cộng hóa trị, liên kết không cộng hóa trị, hoặc thông qua vùng đa phân hóa như miền Fc của kháng thể. Phân tử LEPR nhị phân minh họa là phân tử được gọi trong bản mô tả này là “hLEPR.mFc” có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 91 (ví dụ, xem ví dụ 3 trong bản mô tả này), hoặc phân tử được gọi trong bản mô tả này là “hLEPR.hFc” có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 92. Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “kháng thể kháng LEPR”,

“kháng thể liên kết đặc hiệu với LEPR”, “protein liên kết đặc hiệu với LEPR”, và tương tự, trừ khi được chỉ ra cụ thể khác, dùng để chỉ các phân tử liên kết với LEPR người đầy đủ chiều dài, LPER người đơn phân, LEPR người nhị phân, hoặc cấu trúc khác bao gồm hoặc chỉ bao gồm vùng ngoại bào LEPR.

Tất cả các protein, polypeptit và mảnh protein được đề cập ở đây dùng để chỉ protein, polypeptit và mảnh protein ở người trừ khi được chỉ ra rõ ràng là protein, polypeptit và mảnh protein của các loài không phải của người. Do đó, thuật ngữ “LEPR” có nghĩa là LEPR người trừ khi được chỉ ra khác như là loài không phải con người, ví dụ, “LEPR chuột”, “LEPR khỉ”, v.v..

Như được sử dụng trong bản mô tả này, cách diễn đạt “LEPR biểu hiện bề mặt tế bào” nghĩa là một hoặc nhiều protein LEPR, hoặc vùng ngoại bào của chúng được biểu hiện trên bề mặt của một tế bào *in vitro* hoặc *in vivo*, sao cho ít nhất một phần của protein LEPR được biểu hiện ở vùng ngoại bào của màng tế bào và có thể đến gần với phần liên kết kháng nguyên của kháng thể. “LEPR biểu hiện bề mặt tế bào” có thể bao gồm hoặc chỉ bao gồm protein LEPR được biểu hiện trên bề mặt của tế bào mà thường biểu hiện protein LEPR (ví dụ, trong trạng thái tự nhiên hoặc kiểu dại). Ngoài ra, “LEPR biểu hiện bề mặt tế bào” có thể bao gồm protein LEPR biểu hiện trên bề mặt tế bào của tế bào mà thường không biểu hiện LEPR người trên bề mặt của nó nhưng lại được thiết kế nhân tạo để biểu hiện LEPR trên bề mặt của nó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ như “kháng thể kháng LEPR”, hoặc “kháng thể liên kết với thụ thể leptin người”, bao gồm cả kháng thể đơn trị có tính đặc hiệu đơn, cũng như kháng thể đặc hiệu kép bao gồm nhánh thứ nhất liên kết với LEPR và nhánh thứ hai liên kết kháng nguyên (đích) thứ cấp, trong đó nhánh kháng LEPR chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự CDR hoặc HCVR/LCVR như được mô tả trong bảng 1 trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “kháng thể”, như được sử dụng trong bản mô tả này, nghĩa là bất kỳ phức hợp phân tử hoặc phân tử liên kết kháng nguyên bao gồm ít nhất một vùng xác định bổ trợ (CDR) liên kết với hoặc tương tác đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể (ví dụ, LEPR). Thuật ngữ “kháng thể” bao gồm phân tử globulin miễn dịch chứa bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua, cũng như phân tử protein gồm nhiều đơn phân của nó (ví dụ, IgM).

Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng (trong bản mô tả này được viết tắt là HCVR hoặc V_H) và vùng hằng định của chuỗi nặng. Vùng hằng định của chuỗi nặng bao gồm ba vùng, C_{H1} , C_{H2} và C_{H3} . Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ (trong bản mô tả này được viết tắt là LCVR hoặc V_L) và vùng hằng định của chuỗi nhẹ. Vùng hằng định của chuỗi nhẹ bao gồm một vùng (C_{L1}). Vùng V_H và V_L có thể còn được chia nhỏ thành vùng siêu biến, được gọi là vùng xác định bổ trợ (CDR), đặt giữa các vùng bảo thủ hơn, được gọi là vùng khung (FR). Mỗi V_H và V_L bao gồm ba CDR và bốn FR, từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng cacboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo các phương án khác của sáng chế, FR của kháng thể kháng LEPR (hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó) có thể tương đồng với trình tự dòng mầm ở người, hoặc có thể được biến đổi tự nhiên hoặc nhân tạo. Một chuỗi liên ứng axit amin có thể được xác định dựa vào phép phân tích kề nhau của hai hoặc nhiều CDR.

Thuật ngữ “kháng thể”, như được sử dụng ở đây, cũng bao gồm các mảnh liên kết kháng nguyên của phân tử kháng thể hoàn chỉnh. Thuật ngữ “phần liên kết kháng nguyên” của kháng thể, “mảnh liên kết kháng nguyên” của kháng thể, và tương tự, như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein bất kỳ có trong tự nhiên, có thể thu được bằng enzym, tổng hợp, hoặc được biến đổi gen mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo thành phức hợp. Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể có nguồn gốc, ví dụ, từ phân tử kháng thể hoàn chỉnh bằng cách sử dụng bất kỳ kỹ thuật tiêu chuẩn nào thích hợp như thủy phân protein hoặc kỹ thuật thiết kế gen tái tổ hợp bao gồm thao tác di truyền trên gen và biểu hiện ADN mã hóa vùng biến đổi và tùy ý vùng hằng định của kháng thể. ADN này đã được biết đến và/hoặc dễ dàng thu được từ, ví dụ, nguồn thương mại, thư viện ADN (bao gồm, ví dụ, thư viện thực thể khuẩn-kháng thể), hoặc có thể được tổng hợp. ADN này có thể được giải trình tự hoặc thao tác bằng các kỹ thuật hóa học hoặc sinh học phân tử, ví dụ, để sắp xếp một hoặc nhiều vùng biến đổi và/hoặc vùng hằng định thành cấu hình phù hợp, hoặc để đưa vào các mã bộ ba, tạo gốc xystein, sửa đổi, thêm hoặc bớt các axit amin, v.v..

Ví dụ không giới hạn về mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm: (i) mảnh Fab; (ii) mảnh $F(ab')_2$; (iii) mảnh Fd; (iv) mảnh Fv; (v) phân tử Fv (scFv) chuỗi đơn; (vi) mảnh dAb; và (vii) đơn vị nhận diện tối thiểu bao gồm các gốc axit amin giống hệt với

vùng siêu biến của kháng thể (ví dụ, vùng xác định bổ trợ (CDR) được phân lập chẳng hạn như peptit CDR3), hoặc peptit FR3-CDR3-FR4 ràng buộc. Phân tử được biến đổi khác, như kháng thể đặc hiệu vùng, kháng thể đơn vùng, kháng thể loại bỏ vùng, kháng thể khảm, kháng thể ghép CDR, kháng thể đôi, kháng thể ba, kháng thể bốn, kháng thể mini, kháng thể nano (ví dụ: kháng thể nano đơn trị, kháng thể nano lưỡng trị, v.v.), thuốc miễn dịch mô đun nhỏ (SMIP), và miền IgNAR biến đổi từ cá mập, cũng nằm trong phạm vi ý nghĩa của thuật ngữ “mảnh liên kết kháng nguyên” như được sử dụng trong bản mô tả này.

Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể thường sẽ bao gồm ít nhất một vùng biến đổi. Vùng biến đổi có thể có kích thước hoặc thành phần axit amin bất kỳ và thường sẽ bao gồm ít nhất một CDR mà liên kết hoặc ở trong khung với một hoặc nhiều trình tự khung. Trong mảnh liên kết kháng nguyên có miền V_H liên kết với vùng V_L , các miền V_H và V_L có thể được bố trí cân xứng với nhau theo trật tự thích hợp bất kỳ. Ví dụ, vùng biến đổi có thể là nhị phân và chứa các nhị phân V_H - V_H , V_H - V_L hoặc V_L - V_L . Ngoài ra, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa vùng V_H hoặc V_L đơn phân.

Theo một số phương án, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất một vùng biến đổi được liên kết cộng hóa trị với ít nhất một vùng hằng định. Các cấu hình minh họa, không bị giới hạn của vùng hằng định và vùng biến đổi mà có thể tìm thấy trong mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bao gồm: (i) V_H - CH_1 ; (ii) V_H - CH_2 ; (iii) V_H - CH_3 ; (iv) V_H - CH_1 - CH_2 ; (v) V_H - CH_1 - CH_2 - CH_3 ; (vi) V_H - CH_2 - CH_3 ; (vii) V_H - CL ; (viii) V_L - CH_1 ; (ix) V_L - CH_2 ; (x) V_L - CH_3 ; (xi) V_L - CH_1 - CH_2 ; (xii) V_L - CH_1 - CH_2 - CH_3 ; (xiii) V_L - CH_2 - CH_3 ; và (xiv) V_L - CL . Trong cấu hình bất kỳ của vùng biến đổi và vùng hằng định, bao gồm cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình minh họa được liệt kê ở trên, miền biến đổi và miền hằng định có thể liên kết trực tiếp với nhau hoặc có thể liên kết với toàn bộ hoặc một phần vùng bản lề hoặc vùng liên kết. Vùng bản lề có thể bao gồm ít nhất 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều hơn) axit amin mà tạo ra liên kết linh hoạt hoặc bán linh hoạt giữa miền hằng định và/hoặc biến đổi liên kết trong một phân tử polypeptit đơn. Ngoài ra, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể chứa nhị phân giống nhau hoặc nhị phân khác nhau (hoặc đa phân khác) của cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình của vùng hằng định và vùng biến đổi được liệt kê trên đây liên kết không cộng hóa trị với một nhau và/hoặc

với một hoặc nhiều vùng V_H hoặc V_L đơn phân (ví dụ, bằng (các) liên kết disulfua).

Đối với phân tử kháng thể hoàn chỉnh, mảnh liên kết kháng nguyên có thể là đặc hiệu đơn hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Mảnh liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu của kháng thể sẽ thường bao gồm ít nhất hai vùng biến đổi khác nhau, trong đó mỗi vùng biến đổi có khả năng liên kết đặc hiệu với một kháng nguyên riêng biệt hoặc với quyết định kháng nguyên khác trên cùng một kháng nguyên. Bất kỳ định dạng kháng thể đa đặc hiệu nào, bao gồm các định dạng kháng thể đặc hiệu kép tiêu biểu được bộc lộ ở đây, có thể được chỉnh sửa để sử dụng trong phạm vi mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể trong sáng chế sử dụng các kỹ thuật thông thường có sẵn trong lĩnh vực kỹ thuật.

Theo phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng LEPR theo sáng chế là kháng thể người. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng thể người” được dự tính để bao gồm các kháng thể có vùng biến đổi và vùng hằng định có nguồn gốc từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người. Các kháng thể người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi trình tự globulin miễn dịch dòng mầm người (ví dụ, đột biến được tạo ra bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên hoặc tại vị trí cụ thể *in vitro* hoặc bằng cách đột biến xoma *in vivo*), ví dụ trong các CDR và cụ thể là CDR3. Tuy nhiên, thuật ngữ “kháng thể người”, như được sử dụng ở đây, không được dự tính để bao gồm kháng thể có trình tự CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của các loài động vật có vú khác, như chuột, được ghép vào trình tự khung của người.

Kháng thể theo sáng chế có thể, theo một số phương án, là kháng thể người tái tổ hợp. Thuật ngữ “kháng thể người tái tổ hợp”, như được sử dụng ở đây, được dự tính để bao gồm tất cả các kháng thể người được chuẩn bị, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng các phương pháp tái tổ hợp, như các kháng thể được biểu hiện bằng cách sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào tế bào chủ (mô tả thêm bên dưới), các kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể người tái tổ hợp, tổ hợp (mô tả thêm bên dưới), các kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột) được chuyển gen cho gen globulin miễn dịch người (xem, ví dụ, Taylor *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295) hoặc kháng thể được chuẩn bị, biểu hiện, tạo ra hoặc được phân lập bằng bất kỳ phương thức nào khác liên quan đến cắt nối trình tự gen globulin miễn dịch người với trình tự ADN khác. Các kháng thể người tái tổ hợp này có vùng biến đổi hoặc vùng hằng định có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm

người. Tuy nhiên, theo một số phương án, kháng thể người tái tổ hợp này được đem đi gây đột biến gen *in vitro* (hoặc, khi động vật chuyển gen cho trình tự Ig ở người được sử dụng, đột biến xôma *in vivo*) và do đó trình tự axit amin của vùng V_H và V_L của kháng thể tái tổ hợp là trình tự mà, trong khi có nguồn gốc từ và liên quan đến trình tự V_H và V_L dòng mầm ở người, có thể không có trong tự nhiên trong dòng mầm kháng thể người *in vivo*.

Sáng chế bao gồm kháng thể có một hoặc nhiều đột biến trong vùng bản lề, vùng C_{H2} hoặc C_{H3} mà có thể kỳ vọng, ví dụ, trong sản xuất sản xuất, giúp cải thiện hiệu suất của dạng kháng thể mong muốn.

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể được phân lập. “Kháng thể được phân lập” được sử dụng ở đây, có nghĩa là kháng thể được nhận biết và được phân tách và/hoặc thu hồi từ ít nhất một thành phần thuộc môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, kháng thể được phân tách hoặc lấy ra từ ít nhất một thành phần của cơ quan, hoặc từ mô hoặc tế bào, trong đó, kháng thể tồn tại trong tự nhiên hoặc được tạo ra một cách tự nhiên, là “kháng thể được phân lập” cho mục đích của sáng chế. Kháng thể được phân lập cũng bao gồm kháng thể *in situ* trong tế bào tái tổ hợp. Kháng thể được phân lập là kháng thể đã trải qua ít nhất một bước tinh sạch hoặc phân lập. Theo phương án nhất định, kháng thể được phân lập về cơ bản có thể không có các chất hóa học và/hoặc vật liệu tế bào khác.

Sáng chế bao gồm các biến thể của kháng thể kháng LEPR được bộc lộ ở đây bao gồm một hoặc nhiều sự thay thế, thêm và/hoặc bớt axit amin trong vùng khung và/hoặc vùng CDR của miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ so với trình tự dòng mầm tương ứng mà các kháng thể có nguồn gốc từ đó. Các đột biến này có thể được xác định một cách dễ dàng bằng cách so sánh trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này với trình tự có sẵn từ, ví dụ, cơ sở dữ liệu trình tự kháng thể công khai. Sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có nguồn gốc từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này, trong đó, một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều vùng khung và/hoặc vùng CDR bị đột biến thành (các) gốc tương ứng trong trình tự dòng mầm mà kháng thể có nguồn gốc từ đó, hoặc thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm người, hoặc thành đột biến thay thế axit amin bảo thủ của (các) gốc dòng mầm tương ứng (các thay đổi trình tự này được gọi chung trong bản mô tả này là “đột biến dòng mầm”). Người có hiểu

biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, bắt đầu với trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể dễ dàng tạo ra một lượng lớn kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên mà chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm riêng rẽ hoặc tổ hợp của chúng. Theo các phương án nhất định, tất cả các gốc của vùng khung và/hoặc vùng CDR trong miền V_H và/hoặc V_L được đột biến quay trở lại các gốc được tìm thấy trong trình tự dòng mầm ban đầu mà kháng thể có nguồn gốc từ đó. Theo các phương án khác, chỉ một số gốc nhất định được đột biến quay trở lại trình tự dòng mầm ban đầu, ví dụ, chỉ các gốc bị đột biến được tìm thấy trong 8 axit amin đầu tiên của FR1, hoặc trong 8 axit amin cuối cùng của FR4, hoặc chỉ các gốc bị đột biến được tìm thấy ở CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều gốc ở vùng khung và/hoặc vùng CDR bị đột biến thành các gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác (tức là, trình tự dòng mầm khác với trình tự dòng mầm mà kháng thể lúc đầu có nguồn gốc từ đó). Hơn nữa, kháng thể theo sáng chế có thể chứa tổ hợp bất kỳ của hai hay nhiều đột biến dòng mầm trong vùng khung và/hoặc vùng CDR, ví dụ, trong đó các gốc riêng lẻ nhất định bị đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng mầm cụ thể, trong khi các gốc nhất định khác khác với trình tự dòng mầm ban đầu được giữ nguyên hoặc bị đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác. Sau khi thu hồi, các kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm một hoặc nhiều đột biến dòng mầm có thể dễ dàng kiểm tra một hoặc nhiều đặc tính mong muốn chẳng hạn như, tính đặc hiệu liên kết được cải thiện, ái lực liên kết tăng lên, các đặc tính đối vận hay đồng vận được cải thiện hoặc tăng cường (như trường hợp có thể), tính sinh miễn dịch giảm đi, v.v.. Các kháng thể và đoạn kháng nguyên thu được theo cách đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng LEPR chứa biến thể của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được bộc lộ trong bản mô tả này có một hoặc nhiều sự thay thế bảo thủ. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng LEPR có trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR với, ví dụ, 10 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, v.v. sự thay thế axit amin bảo thủ so với trình tự bất kỳ trong số các bộ trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR nêu trong bảng 1 của bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng LEPR bao gồm các trình tự axit amin HCVR, LCVR và/hoặc CDR biến thể so với trình tự nêu trong bảng 1 của bản mô tả này (ví dụ, bao gồm sự thay thế

axit amin bảo thủ), trong đó các kháng thể biến thể này dù sao cũng có một hoặc nhiều chức năng và/hoặc đặc tính của kháng thể kháng LEPR minh họa được bộc lộ trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “quyết định kháng nguyên” dùng để chỉ yếu tố quyết định kháng nguyên mà tương tác với vị trí liên kết với kháng nguyên cụ thể trên vùng biến đổi của phân tử kháng thể được biết đến như là paratop. Một kháng nguyên có thể có nhiều hơn một quyết định kháng nguyên. Do đó, các kháng thể khác nhau có thể liên kết với các vùng khác nhau trên một kháng nguyên và có thể tạo ra hiệu quả sinh học khác nhau. Quyết định kháng nguyên có thể có cấu hình dạng thẳng hoặc cấu trúc ba chiều. Quyết định kháng nguyên cấu trúc ba chiều được tạo ra bằng cách để các axit amin từ các đoạn khác nhau của chuỗi polypeptit mạch thẳng nằm cạnh nhau trong không gian. Quyết định kháng nguyên mạch thẳng được tạo ra bởi các gốc axit amin liền kề trong chuỗi polypeptit. Trong trường hợp nhất định, quyết định kháng nguyên có thể bao gồm các phần của saccarit, nhóm photphoryl, hoặc nhóm sulfonyl trên kháng nguyên.

Sáng chế bao gồm kháng thể kháng LEPR và mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm trình tự axit amin gần như tương tự hoặc gần như tương đồng với một hoặc nhiều trình tự axit amin miền biến đổi hoặc CDR như được tìm thấy trong bất kỳ kháng thể nào trong số các kháng thể kháng LEPR minh họa được bộc lộ trong bản mô tả này.

Đối với polypeptit, thuật ngữ “gần như tương tự” hoặc “về cơ bản tương tự” có nghĩa là hai chuỗi peptit, khi được sắp thẳng hàng một cách tối ưu, bằng chương trình GAP hoặc BESTFIT sử dụng trọng lượng khoảng trống mặc định, tìm ra được độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 95%, và thậm chí tốt hơn là ít nhất khoảng 96%, 97%, 98%, và 99%. Tốt hơn là, vị trí các gốc không giống nhau khá biệt bởi sự thay thế axit amin bảo thủ. “Sự thay thế axit amin bảo thủ” là sự thay thế trong đó một gốc axit amin được thế bằng gốc axit amin khác có chuỗi bên (nhóm R) có đặc tính hóa học (ví dụ, điện tích hoặc tính kỵ nước) giống nhau. Nói chung, sự thay thế axit amin bảo thủ về cơ bản sẽ không thay đổi đặc tính chức năng của protein. Trong trường hợp khi hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau bởi sự thay thế bảo thủ, phần trăm độ tương đồng hay độ tương tự có thể được điều chỉnh lên cho đúng với tính chất tự nhiên của việc thay thế. Các phương pháp điều chỉnh đã được biết đến rộng rãi đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Pearson (1994)

Methods Mol. Biol. 24: 307-331, ở đây được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Ví dụ về nhóm axit amin có chuỗi bên với các đặc tính hóa học giống nhau bao gồm (1) các chuỗi bên béo: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; (2) các chuỗi bên hydroxyl-béo: serin và threonin; (3) các chuỗi bên chứa amit: asparagin và glutamin; (4) các chuỗi bên thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; (5) các chuỗi bên bazơ: lyxin, arginin, và histidin; (6) các chuỗi bên axit: aspartat và glutamat, và (7) các chuỗi bên chứa lưu huỳnh là xystein và metionin Các nhóm thay thế axit amin bảo thủ được ưu tiên là: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat và asparagin-glutamin. Ngoài ra, sự thay thế bảo thủ là bất kỳ thay đổi nào có giá trị dương trong ma trận logarit PAM250 của hàm hợp lý được bộc lộ trong Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-1445, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Sự thay thế “tương đối bảo thủ” là bất kỳ thay đổi nào có giá trị không âm trong ma trận logarit PAM250 của hàm hợp lý.

Độ tương tự trình tự đối với polypeptit, cũng được gọi là độ tương đồng trình tự, thường được đo bằng cách sử dụng phần mềm phân tích trình tự. Phần mềm phân tích protein nối các trình tự tương tự sử dụng các biện pháp đo lường tương tự với việc thay thế, xóa bỏ hoặc các sửa đổi khác, bao gồm việc thay thế axit amin bảo thủ. Ví dụ, phần mềm GCG bao gồm các chương trình như Gap và Bestfit, các phần mềm này có thể được sử dụng với thông số mặc định để xác định độ tương đồng trình tự hoặc độ đồng nhất trình tự giữa các polypeptit gần gũi, như các polypeptit tương đồng từ các loài khác nhau của sinh vật hoặc giữa protein kiểu đại và biến thể của nó. Xem, ví dụ, GCG Version 6.1. Các chuỗi polypeptit cũng có thể được so sánh với nhau sử dụng FASTA sử dụng thông số mặc định hoặc thông số đề nghị, chương trình trong GCG ver.6.1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) cung cấp các sắp xếp và phân trăm trình tự nhận biết của vùng xếp chồng giữa trình tự truy vấn và trình tự tìm kiếm (Pearson (2000) supra). Một thuật toán khác được ưu tiên hơn khi so sánh trình tự của sáng chế với cơ sở dữ liệu bao gồm một lượng lớn trình tự từ các sinh vật khác nhau là chương trình máy tính BLAST, đặc biệt là BLASTP và TBLASTN, sử dụng các thông số mặc định. Tham khảo ví dụ Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 và Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402, được kết hợp vào đây để tham khảo.

Kháng thể kháng LEPR chứa biến thể Fc

Theo phương án theo nhất định của sáng chế, kháng thể kháng LEPR được đề xuất chứa miền Fc có chứa một hoặc nhiều đột biến mà làm tăng hoặc làm giảm khả năng liên kết của kháng thể với thụ thể FcRn, ví dụ, tại pH axit so với pH trung tính. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng LEPR chứa đột biến trong vùng CH_2 hoặc CH_3 của miền Fc, trong đó (các) đột biến này làm tăng ái lực của miền Fc với FcRn trong môi trường axit (ví dụ, trong thể nội bào nơi khoảng pH từ khoảng 5,5 đến khoảng 6,0). Các đột biến này có thể dẫn đến tăng chu kỳ bán rã trong huyết thanh của kháng thể khi dùng cho động vật. Ví dụ không giới hạn về biến đổi Fc này bao gồm, ví dụ, biến đổi ở vị trí 250 (ví dụ, E hoặc Q); và 250 và 428 (ví dụ, L hoặc F); 252 (ví dụ, L/Y/F/W hoặc T), 254 (ví dụ, S hoặc T) và 256 (ví dụ, S/R/Q/E/D hoặc T); hoặc biến đổi ở vị trí 428 và/hoặc 433 (ví dụ, H/L/R/S/P/Q hoặc K) và/hoặc 434 (ví dụ, H/F hoặc Y); hoặc biến đổi ở vị trí 250 và/hoặc 428; hoặc biến đổi ở vị trí 307 hoặc 308 (ví dụ, 308F, V308F), và 434. Theo một phương án, biến đổi bao gồm biến đổi 428L (ví dụ, M428L) và 434S (ví dụ, N434S); biến đổi 428L, 259I (ví dụ, V259I), và 308F (ví dụ, V308F); biến đổi 433K (ví dụ, H433K) và 434 (ví dụ, 434Y); biến đổi 252, 254, và 256 (ví dụ, 252Y, 254T, và 256E); biến đổi 250Q và 428L (ví dụ, T250Q và M428L); và biến đổi 307 và/hoặc 308 (ví dụ, 308F hoặc 308P).

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

Kháng thể kháng LEPR theo sáng chế có thể bao gồm miền Fc được biến đổi có chức năng phản ứng lại kích thích giảm đi. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “miền Fc bị biến đổi có chức năng phản ứng lại kích thích giảm đi” có nghĩa là phần Fc của globulin miễn dịch đã bị biến đổi, đột biến, cắt cụt, v.v.. so với miền Fc kiểu đại, có trong tự nhiên sao cho phân tử chứa Fc bị biến đổi biểu hiện sự giảm tình trạng nghiêm trọng hoặc mức độ của ít nhất là một tác động được chọn từ nhóm bao gồm tiêu diệt tế bào (ví dụ, ADCC và/hoặc CDC), hoạt hóa bổ thể, thực bào và opsonin hóa, so với phân tử so sánh chứa phiên bản kiểu đại, có trong tự nhiên của của phần

Fc. Theo các phương án nhất định, “miền Fc bị biến đổi có chức năng phản ứng lại kích thích giảm đi” là miền Fc có sự liên kết với thụ thể Fc giảm hoặc yếu (ví dụ, Fc γ R).

Theo các phương án nhất định của sáng chế, miền Fc bị biến đổi là biến thể Fc IgG1 hoặc biến thể Fc IgG4 có sự thay thế trong vùng bản lề. Ví dụ, Fc bị biến đổi sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế có thể bao gồm biến thể Fc IgG1 trong đó ít nhất một axit amin của vùng bản lề Fc IgG1 được thay thế bằng axit amin tương ứng từ vùng bản lề Fc IgG2. Ngoài ra, Fc bị biến đổi sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế có thể bao gồm biến thể Fc IgG4 trong đó ít nhất một axit amin của vùng bản lề Fc IgG4 được thay thế bằng axit amin tương ứng từ vùng bản lề Fc IgG2. Miền Fc bị biến đổi minh họa, không giới hạn được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế được nêu trong công bố đơn sáng chế Mỹ số 2014/0243504, toàn bộ phần mô tả của đơn này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn, cũng như bất kỳ biến thể chức năng tương đương nào của miền Fc bị biến đổi nêu trong tài liệu này.

Các việc biến đổi Fc và miền Fc bị biến đổi khác được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế bao gồm bất kỳ biến đổi nào được đề cập trong các tài liệu, US 2014/0171623; US 8,697,396; US 2014/0134162; WO 2014/043361, toàn bộ phần mô tả của các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Phương pháp xây dựng kháng thể hoặc protein dung hợp liên kết với kháng nguyên chứa miền Fc bị biến đổi như được mô tả trong bản mô tả này đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật.

Đặc tính sinh học của kháng thể

Sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với LEPR người và đối kháng truyền tín hiệu LEPR. Kháng thể này có thể được gọi là “kháng thể đối kháng”. Trong ngữ cảnh của sáng chế, “đối kháng tín hiệu LEPR” có nghĩa là kháng thể hoặc mảnh của nó liên kết với LEPR và ức chế tác động nội bào mà thường xảy ra do sự tương tác của leptin với LEPR trong tế bào biểu hiện LEPR. Theo các phương án khác, kháng thể đối kháng theo sáng chế ức chế chức năng của chất chủ vận LEPR, và/hoặc chức năng của chất chủ vận một phần LEPR. Theo các phương án nhất định, “đối kháng tín hiệu LEPR” có nghĩa là ức chế việc hoạt hóa phiên mã được kích thích bằng leptin của STAT3, có thể phát hiện được bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ có thể đo hoặc xác nhận, trực tiếp hoặc gián tiếp, hoạt tính

STAT3, ví dụ, phiên bản được đánh dấu của STAT3 được biểu hiện trong dòng tế bào báo cáo. Ví dụ, sáng chế còn bao gồm kháng thể đối kháng và mảnh liên kết kháng nguyên của nó làm giảm điều hòa tín hiệu LEPR trong thử nghiệm báo cáo trên cơ sở tế bào như được mô tả trong ví dụ 6, hoặc thử nghiệm tương tự. Sáng chế còn bao gồm kháng thể đối kháng và mảnh liên kết kháng nguyên của nó thể hiện sự ức chế hoàn toàn tín hiệu LEPR cảm ứng leptin với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 723 nM đến 1,8 nM trong thử nghiệm của ví dụ 6 hoặc thử nghiệm tương tự. Thử nghiệm liên kết trên cơ sở tế bào phát hiện ra kháng thể liên kết với tế bào biểu hiện LEPR chẳng hạn như thử nghiệm được mô tả trong ví dụ 5 trong bản mô tả này, chứng minh liên kết với tế bào HEK293/hLEPR-GPI có tỉ lệ liên kết là từ 824 đến 3187 lần khi không có leptin và từ 398 đến 3106 lần khi có mặt 1 μ M leptin. Các kháng thể theo sáng chế được phát hiện ra liên kết với LEPR ngay cả trong có mặt leptin với lượng vượt quá 1 μ M, cho thấy rằng kháng thể LEPR theo sáng chế liên kết với các vị trí trên hLEPR mà không trùng lặp với vị trí liên kết leptin. Sáng chế cũng bao gồm kháng thể kháng LEPR mà đối kháng tín hiệu leptin nhưng cũng thúc đẩy tín hiệu LEPR một phần khi vắng mặt leptin; kháng thể này còn được gọi là “chủ vận một phần” hoặc “kháng thể thể hiện cơ chế chủ vận tín hiệu LEPR”.

Theo các phương án minh họa của sáng chế, kháng thể kháng LEPR được đề xuất liên kết với LEPR người nhị phân (hLEPR.hFc, SEQ ID NO: 92) khi có mặt hoặc vắng mặt leptin, không có kháng thể theo sáng chế thể hiện sự phong bế tương tác của LEPR:leptin trên 40%, ví dụ, thường sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 4, hoặc thử nghiệm tương tự.

Sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với LEPR người đơn phân với ái lực cao. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng LEPR liên kết LEPR người đơn phân (ví dụ, hLEPR.mmh, SEQ ID NO: 90) với K_D nhỏ hơn khoảng 10 nM khi được đo bằng bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C, hoặc nhỏ hơn 25 nM khi được đo bằng bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 37°C, ví dụ sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 3, hoặc thử nghiệm tương tự. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LEPR được đề xuất liên kết với LEPR người đơn phân ở 25°C có K_D nhỏ hơn khoảng 12 nM, nhỏ hơn khoảng 11 nM, nhỏ hơn khoảng 10 nM, nhỏ hơn khoảng 9 nM, nhỏ hơn khoảng 8 nM, nhỏ hơn khoảng 7 nM, nhỏ hơn khoảng 6 nM, nhỏ hơn khoảng 5 nM, nhỏ hơn khoảng 4 nM, nhỏ hơn

khoảng 3 nM, nhỏ hơn khoảng 2 nM, nhỏ hơn khoảng 1 nM, nhỏ hơn khoảng 900 pM, nhỏ hơn khoảng 800 pM, nhỏ hơn khoảng 700 pM, nhỏ hơn khoảng 600 pM, nhỏ hơn khoảng 500 pM, nhỏ hơn khoảng 400 pM, nhỏ hơn khoảng 300 pM, nhỏ hơn khoảng 200 pM hoặc nhỏ hơn khoảng 100 pM khi được đo bằng bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 3, hoặc thử nghiệm tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với LEPR người (ví dụ, hLEPR.mmh, SEQ ID NO: 90) có chu kỳ bán rã ($t_{1/2}$) lớn hơn 5 phút khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C hoặc lớn hơn khoảng 1 phút khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 37°C, ví dụ, sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 3, hoặc thử nghiệm tương tự. Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng LEPR được đề xuất liên kết với LEPR người đơn phân ở 25°C có $t_{1/2}$ lớn hơn khoảng 5 phút, lớn hơn khoảng 10 phút, lớn hơn khoảng 20 phút, lớn hơn khoảng 40 phút, lớn hơn khoảng 50 phút hoặc lâu hơn, khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 3, hoặc thử nghiệm tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với LEPR người nhị phân (ví dụ, hLEPR.mFc, SEQ ID NO: 91) với ái lực cao. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng LEPR liên kết với LEPR người nhị phân (ví dụ, hLEPR.mFc, SEQ ID NO: 91) với K_D nhỏ hơn 4 nM khi được đo bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C hoặc 37°C, ví dụ, sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 3, hoặc thử nghiệm tương tự. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LEPR được đề xuất liên kết với LEPR nhị phân người ở 25°C có K_D nhỏ hơn khoảng 15 nM, nhỏ hơn khoảng 10 nM, nhỏ hơn khoảng 9,0 nM, nhỏ hơn khoảng 8,0 nM, nhỏ hơn khoảng 7,0 nM, nhỏ hơn khoảng 6,0 nM, nhỏ hơn khoảng 5,0 nM, nhỏ hơn khoảng 4,0 nM, nhỏ hơn khoảng 3,0 nM, nhỏ hơn khoảng 2,0 nM, nhỏ hơn khoảng 1,0 nM, nhỏ hơn khoảng 900 pM, nhỏ hơn khoảng 800 pM, nhỏ hơn khoảng 700 pM, nhỏ hơn khoảng 600 pM, nhỏ hơn khoảng 500 pM, nhỏ hơn khoảng 400 pM, nhỏ hơn khoảng 300 pM, nhỏ hơn khoảng 200 pM hoặc nhỏ hơn khoảng 100 pM khi được đo bằng bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, sử dụng định dạng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 3, hoặc thử nghiệm tương tự.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên

kết LEPR người nhị phân (ví dụ, hLEPR.mFc, SEQ ID NO: 91) với chu kỳ bán rã ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 10 phút khi được đo bằng bằng cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C hoặc 37°C, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 3 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm tương tự. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LEPR được đề xuất liên kết với LEPR người nhị phân ở 25°C với $t_{1/2}$ lớn hơn khoảng 15 phút, lớn hơn khoảng 20 phút, lớn hơn khoảng 30 phút, lớn hơn khoảng 40 phút, lớn hơn khoảng 50 phút, lớn hơn khoảng 60 phút, lớn hơn khoảng 70 phút, lớn hơn khoảng 80 phút, lớn hơn khoảng 90 phút, lớn hơn khoảng 100 phút, hoặc lâu hơn, khi được đo bằng bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, bằng cách sử dụng thử nghiệm như được xác định trong ví dụ 3 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm tương tự.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với LEPR trong phức hợp với leptin người (“LEPR” trong phức hợp với leptin người” còn được trình bày là “leptin:LEPR”). Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể liên kết với phức hợp được tạo thành từ trước chứa hLEPR và leptin người. Tức là, theo các phương án nhất định, tương tác giữa kháng thể kháng LEPR và LEPR không bị ức chế bởi sự có mặt của leptin trong phức hợp với LEPR; tương tự, tương tác giữa leptin và LEPR, theo khía cạnh này của sáng chế, không bị ức chế bởi sự có mặt của kháng thể kháng LEPR. Định dạng thử nghiệm minh họa để xác định liệu kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có liên kết LEPR trong phức hợp với leptin người hay không được xác định trong ví dụ 4 trong bản mô tả này.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với LEPR biểu hiện bề mặt tế bào khi có mặt và/hoặc vắng mặt leptin người. LEPR biểu hiện bề mặt tế bào có nghĩa là LEPR hoặc một phần của nó (ví dụ, phần LEPR ngoại bào) được biểu hiện trên bề mặt của tế bào, trong dòng tế bào tự nhiên hoặc trong dòng tế bào được thiết kế, sao cho kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có khả năng liên kết với phân tử LEPR. Theo các phương án nhất định, LEPR biểu hiện bề mặt tế bào bao gồm phức hợp tái tổ hợp chứa vùng ngoại bào của LEPR liên kết với tế bào thông qua phần đuôi hoặc mỏ neo (ví dụ, mỏ neo GPI như được minh họa trong ví dụ 6 trong bản mô tả này). Theo khía cạnh này của sáng chế, kháng thể được đề xuất có khả năng liên kết với LEPR biểu hiện bề mặt tế bào khi vắng mặt

leptin, và cũng có khả năng liên kết với LEPR biểu hiện bề mặt tế bào khi vắng mặt leptin (tức là, trong trường hợp trong đó leptin có khả năng liên kết với LEPR biểu hiện bề mặt tế bào). Tức là, theo các phương án nhất định, tương tác giữa kháng thể kháng LEPR và LEPR biểu hiện bề mặt tế bào không bị ức chế bởi sự có mặt của leptin trong phức hợp với LEPR biểu hiện bề mặt tế bào. Kháng thể theo khía cạnh này của sáng chế có thể tạo thành phức hợp ba thành phần trên bề mặt của tế bào bao gồm kháng thể, LEPR biểu hiện bề mặt tế bào và leptin. Định dạng thử nghiệm minh họa để xác định liệu kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có thể liên kết LEPR biểu hiện bề mặt tế bào khi có mặt và vắng mặt leptin người hay không được nêu trong ví dụ 5 trong bản mô tả này.

Kháng thể theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều của đặc tính sinh học được mô tả ở trên, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Các đặc tính sinh học của kháng thể theo sáng chế không chỉ giới hạn ở các đặc tính được mô tả ở trên. Đặc tính sinh học khác của kháng thể theo sáng chế sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này thông qua phần mô tả này bao gồm các ví dụ thực hiện.

Lập bản đồ quyết định kháng nguyên và các kỹ thuật liên quan

Quyết định kháng nguyên mà kháng thể theo sáng chế liên kết với có thể bao gồm chỉ một trình tự liên tiếp của 3 hoặc nhiều (ví dụ, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều) axit amin của protein LEPR. Ngoài ra, quyết định kháng nguyên có thể chứa nhiều axit amin (hoặc trình tự axit amin) không liên tiếp của LEPR. Theo một số phương án, quyết định kháng nguyên nằm trên vùng hoặc gần với vùng liên kết leptin của LEPR. Theo các phương án khác, quyết định kháng nguyên nằm ở vùng khác với vùng liên kết leptin của LEPR, ví dụ, tại vị trí trên bề mặt của LEPR mà tại đó kháng thể, khi đã liên kết với quyết định kháng nguyên này, không gây trở ngại cho leptin liên kết với LEPR.

Các kỹ thuật khác đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để xác định axit amin nằm trong quyết định kháng nguyên được nhận ra bởi kháng thể đặc hiệu. Các kỹ thuật minh họa bao gồm phân tích đột biến quét alanin, phân tích thẩm tách peptit và phân tích cắt peptit. Ngoài ra, các phương pháp như cắt quyết định kháng nguyên, chiết quyết định kháng nguyên và sửa đổi đặc tính hóa học của kháng nguyên có thể được sử dụng (Tomer, 2000,

Protein Science 9:487-496). Một phương pháp khác có thể được sử dụng để nhận biết axit amin trong chuỗi polypeptit, trong các tương tác kháng thể, là phát hiện trao đổi hydro/đoteri bằng khối phổ. Nhìn chung, phương pháp trao đổi hydro/ đoteri bao gồm đánh dấu bằng đoteri protein quan tâm, sau đó liên kết kháng thể với protein được đánh dấu bằng đoteri. Tiếp theo, phức hợp protein/kháng thể được chuyển vào nước để cho phép trao đổi hydro- đoteri xảy ra tại tất cả các gốc ngoại trừ các gốc được kháng thể bảo vệ (còn lại những gốc được đánh dấu đoteri). Sau khi phân ly kháng thể, protein đích trải qua phân cắt proteaza và phân tích khối phổ, do đó bộc lộ các gốc được đánh dấu đoteri tương ứng với các axit amin cụ thể trong tương tác kháng thể. Xem, ví dụ, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Phân tích tinh thể tia X kháng thể trong phức hợp với kháng nguyên cũng có thể được sử dụng để nhận ra axit amin nằm trong polypeptit với cái mà axit amin tương tác.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng LEPR liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên với kháng thể bất kỳ trong số các ví dụ cụ thể về kháng thể được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ kháng thể chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin như được mô tả trong bảng 1 trong bản mô tả này). Tương tự, sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng LEPR mà cạnh tranh để liên kết với LEPR với kháng thể bất kỳ trong số các ví dụ cụ thể về kháng thể được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ kháng thể chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin như được mô tả trong bảng 1 trong bản mô tả này).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định liệu kháng thể liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên, hay cạnh tranh để liên kết với kháng thể kháng LEPR tham chiếu bằng cách sử dụng phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này và được minh họa trong bản mô tả này. Ví dụ, để xác định nếu kháng thể thử nghiệm liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên với kháng thể kháng LEPR tham chiếu theo sáng chế, kháng thể tham chiếu được liên kết với protein LEPR. Sau đó, khả năng kháng thể thử nghiệm liên kết với LEPR phân tử được xác định. Nếu kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với LEPR sau việc tạo liên kết bão hòa với kháng thể kháng LEPR tham chiếu, thì có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm liên kết với quyết định kháng nguyên khác với kháng thể kháng LEPR tham chiếu. Mặt khác, nếu kháng thể thử nghiệm không thể liên kết với phân tử LEPR

sau việc tạo liên kết bão hòa với kháng thể kháng LEPR tham chiếu, thì kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như quyết định kháng nguyên được liên kết bởi kháng thể kháng LEPR tham chiếu theo sáng chế. Sau đó, có thể thực hiện các thử nghiệm thông thường khác (ví dụ, gây đột biến peptit và phân tích liên kết) để xác định việc không quan sát thấy sự liên kết của kháng thể thử nghiệm là do việc liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như kháng thể đối chứng hoặc nếu ngăn chặn không gian bề mặt (hoặc hiện tượng khác) khiến cho không quan sát thấy sự liên kết. Các thí nghiệm loại này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp như ELISA, RIA, Biacore, đếm tế bào theo dòng chảy hoặc bất kỳ các phương pháp định tính, hoặc định lượng khác có sẵn trong lĩnh vực kỹ thuật. Phù hợp với các phương án nhất định của sáng chế, hai kháng thể liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên (hoặc chồng lên nhau) nếu, ví dụ, vượt quá 1-, 5-, 10-, 20- hoặc 100- lần của một kháng thể sẽ ngăn cản liên kết với phân tử khác ít nhất 50%, nhưng tốt hơn là 75%, 90% hoặc thậm chí 99%, các kết quả được đo lường bằng xét nghiệm cạnh tranh liên kết (tham khảo, ví dụ, Junghans et al., Cancer Res. 50:1495-1502). Ngoài ra, hai kháng thể dường như liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên nếu các tất cả đột biến axit amin trong kháng nguyên gần như làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của một kháng thể so với kháng thể còn lại. Hai kháng thể được coi là ‘quyết định kháng nguyên xếp chồng lên nhau’ nếu chỉ có một tập con đột biến axit amin trong kháng nguyên làm giảm hoặc loại bỏ liên kết của một kháng thể so với kháng thể còn lại.

Để xác định nếu kháng thể cạnh tranh để liên kết (hoặc cạnh tranh chéo để liên kết) với kháng thể kháng LEPR tham chiếu, phương pháp liên kết được mô tả trên đây được thực hiện theo hai hướng. Theo hướng thứ nhất, kháng thể tham chiếu được liên kết với protein LEPR dưới điều kiện bão hòa sau đó đánh giá việc liên kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử LEPR. Theo hướng thứ hai, kháng thể thử nghiệm được liên kết với phân tử LEPR dưới điều kiện bão hòa sau đó đánh giá việc liên kết của kháng thể tham chiếu với phân tử LEPR. Nếu, theo cả hai hướng, chỉ kháng thể (bão hòa) thứ nhất có khả năng liên kết với phân tử LEPR, thì có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm và kháng thể tham chiếu cạnh tranh để liên kết với LEPR. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được rằng, kháng thể mà cạnh tranh để liên kết với kháng thể tham chiếu có thể không cần liên kết với cùng một

quyết định kháng nguyên như kháng thể tham chiếu, nhưng có thể cản trở về mặt không gian liên kết của kháng thể tham chiếu bằng cách liên kết với quyết định kháng nguyên xếp chồng hoặc liền kề.

Sản xuất kháng thể người

Kháng thể kháng LEPR theo sáng chế có thể là kháng thể người hoàn chỉnh. Các phương pháp để tạo kháng thể đơn dòng, bao gồm kháng thể đơn dòng người hoàn chỉnh đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Bất kỳ phương pháp nào đã biết đều có thể sử dụng theo sáng chế để tạo ra kháng thể người liên kết đặc hiệu với LEPR người.

Sử dụng công nghệ VELOCIMMUNE™, ví dụ, hoặc bất kỳ phương pháp tương tự đã biết khác để tạo kháng thể đơn dòng người hoàn chỉnh và kháng thể khảm có ái lực cao với LEPR, các kháng thể này bước đầu được phân lập có vùng biến đổi của người và vùng hằng định của chuột. Như trong phần thí nghiệm dưới đây, các đặc điểm và tiêu chí mong muốn để lựa chọn kháng thể bao gồm ái lực, hoạt tính phong bế phối tử, độ chọn lọc, quyết định kháng nguyên, v.v.. Nếu cần thiết, vùng hằng định chuột sẽ được thay thế bằng vùng hằng định người mong muốn, ví dụ kháng thể kiểu đại hay IgG1 hoặc IgG4 được sửa đổi, để tạo ra kháng thể kháng LEPR người hoàn chỉnh. Trong khi vùng hằng định được lựa chọn có thể thay đổi theo mục đích sử dụng cụ thể, thì các đặc tính đặc hiệu đích và liên kết với kháng nguyên ái lực cao lại thuộc về vùng biến đổi. Trong một số trường hợp nhất định, kháng thể kháng LEPR người hoàn chỉnh được phân lập trực tiếp từ tế bào B dương tính kháng nguyên.

Tương đương sinh học

Kháng thể kháng LEPR và mảnh kháng thể theo sáng chế bao gồm protein có trình tự axit amin mà khác nhau về trình tự với kháng thể được mô tả nhưng vẫn giữ nguyên khả năng liên kết LEPR người. Các kháng thể và mảnh kháng thể biến thể này bao gồm một hoặc nhiều đột biến thêm, mất, hoặc thay thế các axit amin so với trình tự mẹ, nhưng có hoạt tính sinh học gần như tương đương với kháng thể đã được mô tả. Tương tự, trình tự mã hóa ADN của kháng thể kháng LEPR theo sáng chế bao gồm trình tự mà chứa một hoặc nhiều đột biến thêm, mất, hoặc thay thế nucleotit so với trình tự được bộc lộ; nhưng mã hóa kháng thể kháng LEPR hoặc mảnh kháng thể mà gần như tương đương sinh học với kháng thể kháng LEPR hoặc mảnh kháng thể theo

sáng chế. Các ví dụ về trình tự ADN và axit amin biến thể này đã được thảo luận ở trên.

Hai protein liên kết kháng nguyên, hoặc kháng thể, được xem là tương đương sinh học nếu, ví dụ chúng tương đương về dược lý hoặc thay thế lẫn nhau về mặt dược lý có tỉ lệ hoặc phạm vi hấp thụ không khác biệt đáng kể khi được dùng ở cùng một liều lượng gam phân tử dưới điều kiện thí nghiệm tương tự, hoặc đơn liều hay đa liều. Một số kháng thể sẽ là được xem là tương đương hoặc thay thế lẫn nhau về mặt dược lý nếu chúng tương đương về mức độ hấp thụ nhưng khác nhau về tốc độ hấp thụ và còn có thể được xem là tương đương sinh học vì sự khác nhau về tốc độ hấp thụ là có chủ đích và được tạo ra trong quá trình đánh dấu, không nhất thiết phải duy trì được nồng độ thuốc hữu hiệu trong cơ thể đối với, ví dụ, việc sử dụng mãn tính, và được xem là khác nhau không đáng kể về mặt dược lý đối với sản phẩm thuốc cụ thể được nghiên cứu.

Theo một phương án, hai protein liên kết với kháng nguyên là tương đương sinh học nếu chúng không khác biệt có ý nghĩa lâm sàng về độ an toàn, độ tinh sạch và hiệu nghiệm của chúng.

Theo một phương án, hai protein liên kết với kháng nguyên là tương đương sinh học nếu bệnh nhân có thể đổi một hoặc nhiều lần giữa sản phẩm tham chiếu với sản phẩm sinh học mà không gây tăng nguy cơ tác dụng phụ, bao gồm thay đổi có ý nghĩa lâm sàng trong sinh miễn dịch, hoặc làm giảm hiệu lực, so với liệu pháp điều trị liên tục mà bệnh nhân không đổi thuốc như trên.

Theo một phương án, hai protein liên kết với kháng nguyên là tương đương sinh học nếu chúng đều hoạt động bằng cơ chế chung hoặc cơ chế hoạt động có điều kiện hay điều kiện sử dụng, trên phạm vi các cơ chế này đã biết.

Tương đương sinh học có thể được chứng minh bằng các phương pháp *in vivo* hoặc *in vitro*. Các phương pháp đo lường tương đương sinh học bao gồm, ví dụ, (a) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc các động vật có vú khác, trong đó nồng độ kháng thể hoặc chất chuyển hóa của nó được đo lại trong máu, huyết tương, huyết thanh hoặc các dịch sinh học khác dưới dạng hàm số theo gian; (b) thử nghiệm *in vitro* được dự đoán hợp lý và tương ứng với các dữ liệu cơ sở sinh khả dụng *in vivo* ở người; (c) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc các loài động vật có vú khác, trong đó hiệu lực được học

cấp tính thích hợp của kháng thể (hoặc đích của nó) được đo theo hàm theo thời gian; và (d) trong thử nghiệm lâm sàng được kiểm soát tốt thiết lập độ an toàn, hiệu lực, hoặc sinh khả dụng hay tương đương sinh học của một kháng thể.

Biến thể tương đương sinh học của kháng thể kháng LEPR theo sáng chế có thể được xây dựng bằng cách, ví dụ, thực hiện các thay thế khác nhau của các gốc hoặc trình tự hoặc loại bỏ gốc hoặc trình tự bên trong hoặc đầu cuối không cần thiết đối với hoạt tính sinh học. Ví dụ, các gốc xystein không cần cho hoạt tính sinh học có thể được loại bỏ hoặc thay thế bằng các axit amin khác để ngăn cản sự hình thành của các cầu disulfua nội phân tử không chính xác hoặc không cần thiết khi hồi tính. Trong các phương án khác, kháng thể tương đương sinh học có thể bao gồm biến thể của kháng thể kháng LEPR có sự thay đổi về axit amin, mà biến đổi đặc tính glycosyl hóa của kháng thể, ví dụ, đột biến mà ngăn ngừa hoặc loại bỏ sự glycosyl hóa.

Tính chọn lọc loài và phản ứng chéo loài

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các kháng thể kháng LEPR có khả năng liên kết với LEPR người nhưng không liên kết với LEPR từ các loài khác. Sáng chế cũng bao gồm các kháng thể kháng LEPR có khả năng liên kết với LEPR người và với LEPR từ một hoặc nhiều loài không phải người. Ví dụ, các kháng thể kháng LEPR theo sáng chế có thể liên kết với LEPR người và có thể liên kết hoặc không liên kết, như trong các trường hợp có thể, với một hoặc nhiều LEPR của chuột, chuột lang, chuột đồng, chuột nhảy, lợn, mèo, chó, thỏ, dê, cừu, bò, ngựa, lạc đà, khỉ đuôi dài, khỉ đuôi sóc, khỉ nâu hoặc tinh tinh. Theo các phương án minh họa nhất định theo sáng chế, kháng thể kháng LEPR được đề cập liên kết đặc hiệu với LEPR người và LEPR khỉ đuôi dài (ví dụ, *Macaca fascicularis*). Các kháng thể kháng LEPR khác theo sáng chế liên kết với LEPR người nhưng không liên kết, hoặc chỉ liên kết yếu, với LEPR khỉ đuôi dài.

Kháng thể đa đặc hiệu

Kháng thể theo sáng chế có thể đặc hiệu đơn hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Các kháng thể đa đặc hiệu có thể liên kết đặc hiệu với các quyết định kháng nguyên khác nhau của chuỗi polypeptit đích hoặc có thể bao gồm các vùng liên kết với kháng nguyên đặc hiệu với nhiều hơn một chuỗi polypeptit đích. Xem, ví dụ, Tutt *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer *et al.* (2004) *Trends Biotechnol.* 22:238-244.

Kháng thể kháng LEPR theo sáng chế có thể được liên kết với hoặc được đồng biểu hiện với phân tử chức năng khác, ví dụ, peptit hoặc protein khác. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh của nó có thể được liên kết về mặt chức năng (ví dụ, bằng liên kết hóa học, dung hợp di truyền, liên hợp không cộng hóa trị hoặc bằng cách khác) với một hoặc nhiều thực thể phân tử khác, chẳng hạn kháng thể hoặc mảnh kháng thể khác để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu với tính liên kết đặc hiệu thứ hai.

Sáng chế bao gồm kháng thể đặc hiệu kép trong đó một nhánh của globulin miễn dịch liên kết với LEPR người, và nhánh còn lại của globulin miễn dịch đặc hiệu đối với kháng nguyên thứ hai. Nhánh liên kết LEPR có thể chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR/LCVR hoặc CDR như được mô tả trong bảng 1 trong bản mô tả này.

Ví dụ về định dạng kháng thể đặc hiệu kép mà có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm sử dụng miền C_H3 globulin miễn dịch (Ig) thứ nhất và miền C_H3 Ig thứ hai, trong đó miền C_H3 Ig thứ nhất và thứ hai khác nhau ở ít nhất một axit amin, và trong đó ít nhất một sự khác nhau về axit amin làm giảm việc liên kết của kháng thể đặc hiệu kép với Protein A so với kháng thể đặc hiệu kép không có sự khác nhau về axit amin. Theo một phương án, miền C_H3 Ig thứ nhất liên kết với Protein A và miền C_H3 Ig thứ hai chứa đột biến mà làm giảm hoặc ngăn chặn liên kết với Protein A chẳng hạn như biến đổi H95R (bằng phương pháp đếm IMGT exon; H435R bằng phương pháp đếm EU). C_H3 thứ hai có thể còn chứa biến đổi Y96F (bằng IMGT; Y436F bằng EU). Biến đổi khác nữa mà có thể thực hiện trong C_H3 thứ hai bao gồm: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, và V82I (bằng IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, và V422I bằng EU) trong trường hợp của kháng thể IgG1; N44S, K52N, và V82I (IMGT; N384S, K392N, và V422I bằng EU) trong trường hợp của kháng thể IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, và V82I (bằng IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, và V422I bằng EU) trong trường hợp của kháng thể IgG4. Các biến thể của định dạng kháng thể đặc hiệu kép được mô tả ở trên đều nằm trong phạm vi sáng chế.

Ví dụ khác về định dạng đặc hiệu kép có thể sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, dạng đặc hiệu kép kháng thể đôi hoặc trên cơ sở scFv, dung hợp IgG-scFv, vùng biến đổi kép (DVD)-Ig, Quadroma, bấm vào lỗ, chuỗi nhẹ thông thường (ví dụ, chuỗi nhẹ thông thường bấm vào lỗ, v.v.), CrossMab,

CrossFab, (SEED)body, vùng khóa kéo leuxin, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG tác động kép, và dạng đặc hiệu kép Mab² (xem, ví dụ, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11, và các tài liệu được trích dẫn trong bản mô tả này, với phần mô tả liên quan đến các dạng trên đây). Kháng thể đặc hiệu kép có thể còn được xây dựng bằng cách sử dụng sự tiếp hợp peptit/axit nucleic, ví dụ, trong đó axit amin không có trong tự nhiên với khả năng phản ứng hóa học trực giao được sử dụng để tạo ra thể tiếp hợp kháng thể-oligonucleotit đặc hiệu vị trí mà sau đó có thể tự lắp ráp vào trong phức hợp đa phân với thành phần, hóa trị và hình thái học xác định. (Ví dụ, xem Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: Dec. 4, 2012]).

Bào chế và sử dụng được phẩm trong điều trị

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể kháng LEPR hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Dược phẩm theo sáng chế được bào chế với các chất mang thích hợp, các tá dược, và các tác nhân khác giúp cải thiện việc chuyển nhiễm, phát phối, dung nạp thuốc và các đặc tính tương tự khác. Nhiều công thức bào chế thích hợp có thể được tìm thấy trong tập công thức pha chế đã biết với tất cả nhà hóa dược: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Những dược phẩm này bao gồm, ví dụ, bột, bột nhão, thuốc mỡ, thạch, sáp, dầu, các lipid, chất dẫn chứa lipid (cation hoặc anion) (như LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), liên hợp ADN, bột nhão hấp thụ khan, hệ nhũ tương dầu-trong-nước và nước-trong-dầu, hệ nhũ tương carbowax (polyetylen glycol của nhiều khối lượng phân tử khác nhau), gel bán rắn, hỗn hợp bán rắn chứa carbowax. Tham khảo thêm Briscoe CP et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Liều lượng của kháng thể được dùng cho bệnh nhân có thể thay đổi khác nhau tùy theo tuổi và kích thước của bệnh nhân, bệnh đích, tình trạng, đường dùng, và yếu tố tương tự. Liều lượng ưu tiên thường được tính toán theo thể trọng hoặc diện tích bề mặt cơ thể. Ở bệnh nhân trưởng thành, tốt hơn là sử dụng kháng thể theo sáng chế theo đường tiêm tĩnh mạch, thông thường, một liều đơn lẻ từ 0,01 đến 20 mg/kg thể trọng, tốt hơn nữa từ 0,02 đến 7 mg/kg thể trọng, từ 0,03 đến 5 mg/kg thể trọng, hoặc từ 0,05 đến 3 mg/kg thể trọng. Tùy thuộc vào mức độ nghiêm trọng của tình trạng bệnh, tần suất và thời gian điều trị có thể được điều chỉnh. Liều có hiệu quả điều trị và chế độ dùng kháng thể kháng LEPR có thể được xác định dựa trên kinh nghiệm; ví dụ, tiến

triển của bệnh nhân có thể được quan sát bằng việc kiểm tra định kỳ, và liều lượng được điều chỉnh một cách tương ứng. Ngoài ra, khoảng giá trị liều lượng có thể được xác định bằng cách sử dụng là phương pháp đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, Mordenti et al., 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

Ví dụ, các hệ phân phối đã biết và có thể được sử dụng để cung cấp dược phẩm theo sáng chế bao gồm bao trong liposom, vi hạt, vi nang, tế bào tái tổ hợp có thể biểu hiện virus đột biến, nhập bào qua trung gian thụ thể (ví dụ, xem Wu et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Các phương pháp đưa vào bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trong da, trong cơ, trong bụng, trong tĩnh mạch, dưới da, qua mũi, gây tê ngoài màng cứng, và đường miệng. Dược phẩm có thể được sử dụng qua con đường thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách truyền hay tiêm thuốc, bằng cách hấp thụ qua biểu mô hoặc lớp lót niêm mạc da (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và đường ruột, v.v.) và có thể được sử dụng cùng với các tác nhân hoạt hóa sinh học khác. Việc sử dụng có thể là toàn thân hoặc tại chỗ.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được tiêm dưới da hoặc trong tĩnh mạch bằng một ống tiêm và mũi kim tiêu chuẩn. Ngoài ra, đối với việc đưa thuốc vào dưới da, thiết bị phân phối dạng bút được dùng để đưa dược phẩm theo sáng chế vào cơ thể bệnh nhân. Thiết bị phân phối dạng bút có thể được tái sử dụng hoặc dùng một lần. Thiết bị phân phối dạng bút tái sử dụng thường dùng vỏ có thể thay thế chứa dược phẩm. Sau khi tất cả dược phẩm trong vỏ đã được sử dụng và vỏ trống, các vỏ trống này có thể dễ dàng được loại bỏ và thay thế bằng một vỏ mới chứa dược phẩm. Sau đó, thiết bị phân phối dạng bút có thể được sử dụng lại. Trong thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần, không có hộp chứa có thể thay thế. Cụ thể hơn, thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần thường được nạp đầy dược phẩm trước trong ngăn chứa của thiết bị. Khi ngăn chứa hết dược phẩm, toàn bộ thiết bị sẽ bị vứt bỏ.

Các bút tái sử dụng và thiết bị phân phối tự tiêm có thể được sử dụng để phân phối dược phẩm theo sáng chế dưới da. Các ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), bút DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), bút HUMALOG MIX 75/25™, bút HUMALOG™, bút HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly và Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), bút BD™ (Becton Dickinson,

Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, và OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany), chỉ nêu tên một vài thiết bị. Ví dụ về thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần có thể được sử dụng để phân phối được phẩm theo sáng chế dưới da bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bút SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), và thiết bị tự tiêm KWIKPEN™ (Eli Lilly), SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.), và bút HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL).

Trong các tình huống nhất định, dược phẩm có thể được đưa vào trong một hệ thống phân phối kiểm soát. Theo một phương án, ống bơm có thể được sử dụng (tham khảo Langer, ở trên; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201). Theo một phương án khác, các vật liệu polyme có thể được sử dụng; tham khảo, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.) (1974) *CRC Pres.*, Boca Raton, Florida. Theo một phương án khác, hệ thống phân phối kiểm soát có thể được đặt ở gần mục tiêu của dược phẩm, vì thế yêu cầu chỉ một phần của liều hệ thống (tham khảo, ví dụ, Goodson, 1984, in *Medical Applications of Controlled Release*, ở trên, vol. 2, pp. 115-138). Các hệ thống phân phối kiểm soát khác được thảo luận trong bài đánh giá của Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

Dược phẩm tiêm có thể bao gồm các dạng liều dùng tiêm trong tĩnh mạch, dưới da, trong da và trong cơ hay dịch truyền nhỏ giọt, v.v.. Những dược phẩm tiêm này có thể được bào chế bằng các phương pháp đã biết. Ví dụ, dược phẩm tiêm có thể được bào chế, ví dụ, bằng cách hòa tan, phân tán hoặc tạo nhũ tương kháng thể hoặc muối của nó được mô tả trên đây trong môi trường nước vô trùng hoặc môi trường dầu thường được sử dụng để tiêm. Dung dịch nước dùng để tiêm, ví dụ, nước muối sinh lý, dung dịch đẳng trương bao gồm glucozo và các tác nhân hỗ trợ khác, v.v., chúng có thể được sử dụng kết hợp với một tác nhân hòa tan như alcohol (ví dụ, etanol), polyalcohol (ví dụ, propylen glycol, polyetylen glycol), chất hoạt hóa bề mặt không ion [ví dụ, phức olysorbat 80, sản phẩm cộng HCO-50 (polyoxyetylen (50 mol) của dầu hải ly được hydro hóa)], v.v.. Các dung dịch dầu được dùng, ví dụ, dầu mè, dầu đậu tương, v.v., chúng có thể được sử dụng kết hợp với tác nhân hòa tan như enzoat, benzyl alcohol, v.v.. Vì thế dược phẩm tiêm được ưu tiên bào chế vào trong một ống thuốc tiêm thích hợp.

Tốt hơn là, dược phẩm dùng theo đường miệng hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa được mô tả ở trên được bào chế thành dạng liều trong các liều đơn vị thích hợp để vừa với liều lượng của các thành phần hoạt hóa. Các dạng liều trong liều đơn vị này bao gồm, ví dụ, viên nén, viên tròn, viên nang, thuốc tiêm (ống), thuốc đạn, v.v. Hàm lượng kháng thể đã nêu thường từ 5 đến 500 mg trên mỗi dạng liều trong đơn vị liều; đặc biệt ở dạng tiêm, kháng thể đã nêu thường được ưu tiên chiếm từ 5 đến 100mg và từ 10 đến 250 mg đối với các dạng liều khác.

Công dụng điều trị của kháng thể

Sáng chế đề xuất phương pháp bao gồm bước cho đối tượng cần đến phương pháp này dùng chế phẩm điều trị chứa kháng thể kháng LEPR đối kháng (ví dụ, kháng thể kháng LEPR chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự HCVR/LCVR hoặc CDR được đề cập trong bảng 1 trong bản mô tả này). Dược phẩm điều trị có thể chứa kháng thể kháng LEPR bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.

Kháng thể theo sáng chế rất có ích, không kể đến cái khác, trong điều trị, phòng ngừa và/hoặc cải thiện bất kỳ bệnh hoặc rối loạn nào liên quan đến hoặc qua trung gian bởi hàm lượng leptin tăng lên (hyperleptinemia) và/hoặc biểu hiện tăng của thụ thể leptin OB-R dẫn đến tín hiệu LEPR quá mức. Theo các phương án khác, bệnh hoặc rối loạn được chọn từ, nhưng không chỉ giới hạn ở, chứng biếng ăn hoặc rối loạn ăn uống tâm thần, suy mòn do bệnh thận mãn tính, các suy mòn khác như suy mòn do chứng liệt tim xung huyết, suy mòn phổi, suy mòn bức xạ, và suy mòn do ung thư, rối loạn tự miễn như bệnh viêm ruột, bệnh lupus ban đỏ, đa xơ cứng, bệnh vẩy nến, bệnh tim mạch, cao huyết áp, trầm cảm, rối loạn thoái hóa thần kinh, ung thư như ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư hắc tố và ung thư vú.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể kháng LEPR và mảnh liên kết kháng nguyên của nó có hiệu quả đối kháng tín hiệu LEPR trong tế bào, mô hoặc cơ quan biểu hiện mức leptin cao hoặc bình thường. Như được sử dụng trong bản mô tả này, đột biến LEPR thể hiện tín hiệu tăng khi có mặt leptin (so với LEPR kiểu dại) được gọi là “đột biến LEPR tăng cường tín hiệu”. Đột biến LEPR tăng cường tín hiệu minh họa là LEPR-Q223R (Chagnon *et al.* (2009) *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85(1):29-34). Do đó, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng LEPR và mảnh

liên kết kháng nguyên của nó có hiệu quả trong điều trị, phòng ngừa và/hoặc cải thiện bệnh và rối loạn gây ra bởi hoặc liên quan đến đột biến LEPR tín hiệu tăng cường.

Trong phạm vi các phương pháp điều trị được mô tả ở đây, kháng thể kháng LEPR có thể được dùng như một liệu pháp đơn (tức là, tác nhân điều trị duy nhất) hoặc kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân điều trị bổ sung (các ví dụ được mô tả ở đâu đó trong bản mô tả này).

Dược phẩm và liệu pháp điều trị kết hợp

Sáng chế đề xuất các chế phẩm và dược phẩm điều trị chứa kháng thể kháng LEPR bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này kết hợp với một hoặc nhiều thành phần hoạt hóa điều trị bổ sung, và các phương pháp điều trị bao gồm cho đối tượng cần đến phương pháp này dùng các các tổ hợp như trên.

Kháng thể đối kháng kháng LEPR theo sáng chế có thể được cùng bào chế với và/hoặc được dùng kết hợp với một hoặc nhiều thành phần hoạt tính điều trị bổ sung, ví dụ, sản phẩm được dùng để điều trị suy mòn do chứng liệt tim xung huyết, suy mòn phổi và suy mòn do ung thư, rối loạn tự miễn như bệnh viêm ruột, bệnh lupus ban đỏ, đa xơ cứng, bệnh vẩy nến, bệnh tim mạch, cao huyết áp, rối loạn thoái hóa thần kinh, trầm cảm, bệnh ung thư như ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư hắc tố, ung thư vú, và bệnh hoặc rối loạn khác liên quan đến hoặc gây ra bởi tín hiệu leptin giảm. Các ví dụ về thành phần hoạt tính điều trị bổ sung bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, chất ức chế enzym chuyển hóa angiotensin (ví dụ, ACE, ACE-I, benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, moexipril, perindopril, quinapril, ramapril, trandolapril), chất chặn thụ thể angiotensin (ví dụ, ARB), chất giãn cơ trơn (ví dụ, hydralazin), nitrat tác dụng lâu dài (ví dụ, isosorbide dinitrate có hoặc không có, ví dụ, ACE-I và ARB), thuốc lợi tiểu (ví dụ, thuốc lợi tiểu chu trình, thuốc lợi tiểu tương tự thiazid và thuốc lợi tiểu không cần kali), điều trị bệnh thiếu máu do thiếu sắt (ví dụ, sắt ngoài đường tiêu hóa), thuốc giãn phế quản tác động ngắn hoặc dài hạn (ví dụ, chất chủ vận β_2 như arformoterol, buphenin, clenbuterol, dopexamin, epinephrin, fentoterol, formoterol, isoetarin, isoprenalin, isoproterenol, levosalbutamol, orciprenalin, pirbuterol, procaterol, ritodrin, salbutamol, albuterol, terbutalin, tiotropium), thuốc chống tác động kiểu colin (ví dụ, hyoscyamin, atropin, phenobarbital, scopolamin, dicyclomin, phenobarbital, mepenzolat và các tổ hợp như

atropin, hyoscyamin, phenobarbital và scopolamin), corticosteroid (ví dụ, hydrocortison, hydrocortison-17-valerat, hydrocortison-17-butytrat, prednison, prednisolon, triamcinolon acetonid, triamcinolon alcohol, betametason, dexametason, floccortolon, flunisolid, budesonid), thuốc kháng sinh dài hạn (ví dụ, các macrolid như erythromyxin, azithromyxin, và các methylxanthin như theophyllin), thuốc chống viêm không steroid (NSAID) (ví dụ, aspirin, celecoxib, diclofenac, diflunisal, etodolac, ibuprofen, indomethacin, ketoprofen, naproxen, oxaprozin, piroxicam, salsalate, sulindac, tolmetin, v.v.), axit 5-aminosalicylic (5-ASA) (ví dụ, mesalazin), chất ức chế miễn dịch (ví dụ, prednison, chất ức chế TNF, azathioprin, methotrexat, 6-mercaptopurin), liệu pháp điều trị đa xơ cứng tái phát (ví dụ, interferon beta-1a, interferon beta-1b, glatiramer acetat, mitoxantron, natalizumab, fingolimod, teriflunomid, mimetyl fumarat, alemtuzumab, daclizumab, kháng thể đơn dòng CD20 như rituximab, ocrelizumab và ofatumumab), chất điều chế bộ trị vẩy nến (ví dụ, chất cục bộ như axit para-aminobenzoic, dầu dừa, nhựa than đá, dithranol, corticosteroid như desoximetason, fluocinonid, vitamin D₃ và chất tương tự vitamin D, psoralen và chất tổng hợp như methotrexat, ciclosporin, hydroxycarbamid, fumarat như dimetyl fumarat và retinoid), chất đối kháng TNF- α (ví dụ, infliximab, adalimumab, golimumab và certolizumab pegol), điều trị bệnh vẩy nến hướng đích tế bào T (ví dụ, efalizumab và alefacept), điều trị cao huyết áp và bệnh tim mạch (ví dụ, aspirin, các statin như atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, mevastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin, simvastatin và các tổ hợp như simvastatin+ezetimibe, lovastatin+niacin, và atorvastatin+amlodipin), điều trị rối loạn thoái hóa thần kinh (ví dụ, dimebon, và peptit giàu prolin (PRP)-1), thuốc chống trầm cảm (ví dụ, sertraline, citalopram, fluoxetine, escitalopram, trazodon, venlafaxin, bupropion, duloxetine, paroxetine, amitriptylin, venlafacin, desvenlafacin, và nortriptylin), và điều trị chống ung thư (ví dụ, sorafenib, JX-594, interleukin-2, ipilimumab (Yervoy), nivolumab (Opdivo), pembrolizumab (Keytruda), vemurafenib (Zelboraf), dabrafenib (Tafinlar), Trametinib (Mekinist), các anthracyclin như (Adriamycin®), epirubicin (Ellence®), taxanes such as paclitaxel (Taxol®) và docetaxel (Taxotere®), 5-fluoracil (5-FU), cyclophosphamid (Cytosan®), carboplatin (Paraplatin®) hoặc tổ hợp của chúng).

Phác đồ dùng thuốc

Theo một số phương án theo sáng chế, các liều của kháng thể kháng LEPR

(hoặc được phẩm chứa hỗn hợp của kháng thể đối kháng kháng LEPR và hoạt chất trị liệu bổ sung bất kỳ được đề cập trong bản mô tả này) có thể được dùng cho đối tượng trong thời gian điều trị xác định. Phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm bước cho đối tượng dùng liên tiếp các liều kháng thể kháng LEPR theo sáng chế. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “dùng liên tiếp” có nghĩa là mỗi liều kháng thể kháng LEPR được dùng cho đối tượng ở các thời điểm khác nhau, ví dụ, vào các ngày khác nhau được tách riêng bằng khoảng thời gian xác định (ví dụ, giờ, ngày, tuần hoặc tháng). Sáng chế bao gồm phương pháp mà có bước dùng liên tiếp cho bệnh nhân liều đơn thứ nhất của kháng thể kháng LEPR, sau đó là một hoặc nhiều liều thứ hai của kháng thể kháng LEPR, và tùy ý sau đó là một hoặc nhiều liều thứ ba của kháng thể kháng LEPR.

Thuật ngữ “liều thứ nhất”, “liều thứ hai” và “liều thứ ba” đề cập đến trình tự dùng theo thời gian của kháng thể kháng LEPR theo sáng chế. Do đó, “liều thứ nhất” là liều mà được sử dụng ở thời điểm bắt đầu chế độ điều trị (còn gọi là “liều cơ sở”, “liều nạp”, “liều ban đầu”, và liều tương tự); “liều thứ hai” là liều mà được sử dụng sau liều thứ nhất; và “liều thứ ba” là liều mà được sử dụng sau liều thứ hai. Liều thứ nhất, thứ hai, và thứ ba có thể đều là các liều chứa cùng một lượng kháng thể kháng LEPR, nhưng thường có thể khác nhau về tần suất sử dụng. Tuy nhiên, theo một số phương án, hàm lượng kháng thể kháng LEPR trong liều thứ nhất, thứ hai và/hoặc thứ ba thay đổi khác nhau (ví dụ, được điều chỉnh nhiều hoặc ít sao cho thích hợp) trong quá trình điều trị. Theo một số phương án, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, hoặc 5) liều được sử dụng ở thời điểm bắt đầu chế độ điều trị làm “liều nạp” sau đó là liều tiếp theo mà được sử dụng trên cơ sở tần suất sử dụng ít hơn (ví dụ, “liều duy trì”).

Sử dụng kháng thể trong phân tích và chẩn đoán

Kháng thể kháng LEPR theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để phát hiện và/hoặc đo LEPR hoặc tế bào biểu hiện LEPR trong mẫu, ví dụ, nhằm mục đích chẩn đoán. Ví dụ, kháng thể kháng LEPR, hoặc mảnh của nó, có thể được sử dụng để chẩn đoán tình trạng bệnh lý hoặc bệnh đặc trưng bởi sự biểu hiện khác thường (ví dụ, biểu hiện quá mức, biểu hiện dưới mức, không biểu hiện, v.v.) của LEPR. Các xét nghiệm chuẩn đoán tiêu biểu cho LEPR có thể bao gồm, ví dụ, cho mẫu, thu được từ bệnh nhân, tiếp xúc với một kháng thể kháng LEPR của sáng chế, trong đó, kháng thể kháng LEPR được đánh dấu với nhãn có thể phát hiện hoặc phân tử báo cáo. Ngoài ra, kháng

thể kháng LEPR không được đánh dấu có thể được sử dụng để chẩn đoán kết hợp với kháng thể thứ cấp được đánh dấu theo cách phát hiện được. Chất đánh dấu hoặc phân tử báo cáo có thể phát hiện có thể là đồng vị phóng xạ, như ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , hoặc ^{125}I ; phân huỳnh quang hoặc quang hóa như florescein isothiocyanat, hoặc rhodamin; hoặc enzym như alkaline phosphatase, beta-galactosidase, horseradish peroxidase, hoặc luciferase. Ví dụ về thử nghiệm đặc hiệu mà có thể được sử dụng để phát hiện hoặc xác định LEPR trong mẫu bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), và phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (FACS).

Mẫu được sử dụng trong thử nghiệm chẩn đoán LEPR theo sáng chế bao gồm mẫu mô hoặc dịch lỏng bất kỳ có thể thu được từ bệnh nhân, chứa lượng có thể phát hiện được của protein LEPR, hoặc mảnh của nó, dưới điều kiện bệnh lý hoặc điều kiện bình thường. Lượng LEPR trong mẫu cụ thể thu được từ người khỏe mạnh (ví dụ, bệnh nhân không bị ảnh hưởng bởi bệnh hoặc tình trạng bệnh lý liên quan đến hàm lượng hoặc hoạt tính LEPR bất thường) thường sẽ được xác định trước để thiết lập đường cơ sở, hoặc tiêu chuẩn, của hàm lượng LEPR. Đường cơ sở của hàm lượng LEPR sau đó được so sánh với hàm lượng LEPR đo được trong các mẫu thu được từ các đối tượng nghi ngờ mắc bệnh hoặc tình trạng liên quan đến LEPR.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được đưa ra để cung cấp toàn bộ công bố và phần mô tả cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này về cách thực hiện và sử dụng phương pháp và thành phần theo sáng chế, và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế. Mặc dù, các tác giả sáng chế đã cố gắng để tạo ra sự chính xác đối với các số được sử dụng (ví dụ, lượng, nhiệt độ, v.v.), nhưng các sai số thử nghiệm và độ lệch là không thể tránh được. Do đó trừ khi được chỉ ra theo cách khác, phần là phần theo khối lượng, khối lượng phân tử là khối lượng phân tử trung bình, nhiệt độ là theo độ C, và áp suất là ở hoặc gần với áp suất khí quyển.

Ví dụ 1: Tạo ra protein liên kết kháng nguyên mà liên kết đặc hiệu với thụ thể leptin (LEPR)

Kháng thể kháng LEPR thu được bằng cách tạo miễn dịch chuột VELOCIMMUNE® (cụ thể là, chuột được biến đổi chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ

kappa và chuỗi nặng globulin miễn dịch người mã hóa ADN) với chất sinh miễn dịch chứa vùng ngoại bào của LEPR. Đáp ứng miễn dịch của kháng thể được quan sát bằng thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu LEPR. Sử dụng các kỹ thuật được mô tả trước đó, kháng thể kháng LEPR người hoàn chỉnh được phân lập và tinh sạch.

Các đặc tính sinh học nhất định của kháng thể kháng LEPR minh họa được tạo ra theo phương pháp của ví dụ này được mô tả chi tiết hơn trong các ví dụ được mô tả sau đây.

Ví dụ 2 Trình tự axit nucleic và axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ

Bảng 1 mô tả mã nhận dạng trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ và các CDR của kháng thể kháng LEPR được chọn theo sáng chế. Mã nhận dạng trình tự axit nucleic tương ứng được mô tả trong bảng 2.

Bảng 1: Mã nhận dạng trình tự axit amin

Tên gọi kháng thể	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H17322P2	2	4	6	8	10	12	14	16
H4H18437P2	18	20	22	24	10	12	14	16
H4H18439P2	26	28	30	32	10	12	14	16
H4H18440P2	34	36	38	40	10	12	14	16
H4H18457P2	42	44	46	48	10	12	14	16
H4H18462P2	50	52	54	56	10	12	14	16
H4H18464P2	58	60	62	64	10	12	14	16
H4H18466P2	66	68	70	72	10	12	14	16
H4H18508P2	74	76	78	80	82	84	86	88

Bảng 2: Mã nhận dạng trình tự axit nucleic

Tên gọi kháng thể	SEQ ID số:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H17322P2	1	3	5	7	9	11	13	15
H4H18437P2	17	19	21	23	9	11	13	15
H4H18439P2	25	27	29	31	9	11	13	15
H4H18440P2	33	35	37	39	9	11	13	15

H4H18457P2	41	43	45	47	9	11	13	15
H4H18462P2	49	51	53	55	9	11	13	15
H4H18464P2	57	59	61	63	9	11	13	15
H4H18466P2	65	67	69	71	9	11	13	15
H4H18508P2	73	75	77	79	81	83	85	87

Kháng thể thường được đề cập đến ở đây theo danh pháp sau: tiền tố Fc (ví dụ, “H4H,” “H1M,” “H2M,” v.v.), sau đó là số nhận dạng (ví dụ, “17322,” 18457,” v.v.), sau đó là hậu tố “P” hoặc “N”. Do đó, theo danh pháp này, kháng thể được đề cập trong bản mô tả này là, ví dụ, “H4H17322P2”, “H4H18457P2”, v.v.. Tiền tố Fc trên cấu trúc kháng thể được sử dụng trong bản mô tả này (H4H, H1M và H2M) chỉ ra kiểu tương đương của miền Fc cụ thể của kháng thể. Ví dụ, kháng thể “H4H” có Fc IgG4 người, trong đó kháng thể “H1M” có Fc IgG1 chuột (tất cả các vùng biến đổi ở người hoàn chỉnh được biểu diễn bởi chữ “H” thứ nhất trong ký hiệu kháng thể). Như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, kháng thể có kiểu tương đương của miền Fc cụ thể có thể được biến đổi bằng kháng thể với kiểu tương đương Fc khác (ví dụ, kháng thể với Fc IgG1 ở chuột có thể được biến đổi bằng kháng thể với IgG4 ở người, v.v.), nhưng trong trường hợp bất kỳ, vùng biến đổi (bao gồm CDR) - mà được thể hiện bằng số nhận dạng trong các bảng 1 và bảng 2 - sẽ giữ nguyên không đổi, và đặc tính liên kết được cho là giống nhau hoặc gần như tương tự bất kể bản chất của miền Fc.

Kháng thể so sánh

Kháng thể so sánh được sử dụng trong các ví dụ dưới đây đề cập đến Fab 9F8 được mô tả trong Fazeli *et al.* (2006) J Immunol Methods 312:190-200 and Carpenter *et al.* (2012) Structure 20(3):487-97.

Ví dụ 3: Ái lực liên kết thu được từ cộng hưởng plasmon bề mặt và hằng số động học của kháng thể đơn dòng kháng LEPR người

Hằng số phân ly cân bằng (giá trị K_D) đối với kháng nguyên liên kết với kháng thể đơn dòng kháng LEPR đã tinh sạch theo sáng chế được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt sử dụng thiết bị Biacore 4000. Tất cả các nghiên cứu liên kết được thực hiện trong đệm làm việc chứa 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, và 0,05% v/v chất hoạt động bề mặt Tween-20, pH 7,4 (đệm làm việc HBS-ET) ở 25°C và 37°C. Bề mặt cảm biến sinh học Biacore đầu tiên được tạo dẫn xuất bằng cách liên

kết amin với kháng thể Fc đơn dòng ở chuột kháng người (GE, # BR-1008-39) để bắt giữ kháng thể đơn dòng kháng LEPR. Chất phản ứng LEPR được thử nghiệm liên kết với kháng thể đơn dòng kháng LEPR chứa vùng ngoại bào LEPR người tái tổ hợp biểu diễn với đuôi myc-myc-hexahistidin tại đầu C (hLEPR.MMH; SEQ ID NO: 90), vùng ngoại bào LEPR khi đuôi dài tái tổ hợp biểu diễn với đuôi myc-myc-hexahistidin tại đầu C (mfLEPR.MMH; SEQ ID NO: 93), vùng ngoại bào LEPR chuột tái tổ hợp biểu diễn với đuôi myc-myc-hexahistidin tại đầu C (mLEPR.MMH; SEQ ID NO: 94), vùng ngoại bào LEPR chuột cống tái tổ hợp biểu diễn với đuôi myc-myc-hexahistidin tại đầu C (rLEPR.MMH; SEQ ID NO: 95), và vùng ngoại bào LEPR người tái tổ hợp biểu diễn với đuôi IgG2a Fc chuột đầu tận cùng (hLEPR.mFc; SEQ ID NO: 91). Cấu trúc LEPR chứa các đuôi MMH là cấu trúc LEPR đơn phân, và cấu trúc LEPR chứa đuôi mFc là cấu trúc LEPR nhị phân. Các nồng độ khác nhau của chất phản ứng LEPR đầu tiên được bào chế trong đệm làm việc HBS-ET ở các nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 100 nM đến 3,7 nM trong dung dịch pha loãng theo dãy 3 lần và sau đó được phun lên bề mặt bắt giữ kháng thể đơn dòng kháng LEPR trong 4 phút với tốc độ dòng là 30 μ L/phút. Sự phân ly của chất phản ứng liên kết kháng thể đơn dòng được quan sát trong 10 phút trong dung dịch đệm làm việc HBS-ET. Hằng số tốc độ liên kết động (k_d) và phân ly (k_a) được xác định bằng cách điều chỉnh biểu đồ cảm biến liên kết thời gian thực thành kiểu liên kết 1:1 có giới hạn vận chuyển khối lượng sử dụng phần mềm điều chỉnh đường cong Scrubber 2.0c. Hằng số cân bằng phân ly liên kết (K_D) và chu kỳ bán rã ($t_{1/2}$) được tính từ hằng số tốc độ động học theo phương trình sau:

$$K_D(M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ và } t_{1/2} \text{ (phút)} = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

Thông số động học liên kết đối với hLEPR-MMH, mfLEPR-MMH, hLEPR.mFc, mLEPR-MMH hoặc rLEPR-MMH liên kết với kháng thể đơn dòng kháng LEPR khác theo sáng chế ở 25°C và 37°C được trình bày trong bảng 3 đến bảng 13.

Bảng 3: Thông số động học liên kết của kháng thể kháng LEPR liên kết với hLEPR-MMH ở 25°C.

mAb bị bắt giữ	Mức độ bắt giữ mAb (RU)	100nM hLEPR-MMH được liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H17322P2	$178 \pm 1,2$	66	$4,38E+04$	$2,24E-04$	$5,11E-09$	52
H4H18437P2	$171 \pm 0,5$	56	$5,74E+04$	$3,75E-03$	$6,53E-08$	3,1
H4H18439P2	$156 \pm 0,7$	21	$1,07E+04$	$1,13E-03$	$1,06E-07$	10
H4H18440P2	$170 \pm 0,5$	71	$4,23E+04$	$4,97E-04$	$1,18E-08$	23
H4H18457P2	$166 \pm 0,9$	119	$2,55E+05$	$2,52E-03$	$9,89E-09$	5
H4H18462P2	$175 \pm 0,6$	34	$6,79E+04$	$7,65E-03$	$1,13E-07$	1,5
H4H18464P2	$160 \pm 0,4$	60	$1,24E+05$	$1,13E-03$	$9,09E-09$	10
H4H18466P2	$161 \pm 0,5$	24	$2,64E+04$	$5,11E-03$	$1,94E-07$	2,3
H4H18508P2	$180 \pm 1,5$	127	$1,76E+05$	$1,67E-03$	$9,53E-09$	7
Kháng thể so sánh	$380 \pm 8,2$	26	$4,48E+04$	$7,46E-05$	$1,66E-09$	155
Kháng thể đối chứng kiểu tương đương	$171 \pm 0,4$	4	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* chỉ ra rằng không có liên kết được quan sát trong các điều kiện thí nghiệm hiện này.

Bảng 4: Thông số động học liên kết của kháng thể kháng LEPR liên kết với hLEPR-MMH ở 37°C.

mAb bị bắt giữ	Mức độ bắt giữ mAb (RU)	100nM hLEPR-MMH được liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H17322P2	225 ± 3	99	$6,95E+04$	$8,12E-04$	$1,17E-08$	14
H4H18437P2	213 ± 3	55	$1,14E+05$	$8,84E-03$	$7,76E-08$	1,3
H4H18439P2	$180 \pm 1,5$	19	$2,32E+04$	$4,69E-03$	$2,02E-07$	2,5
H4H18440P2	$207 \pm 1,2$	95	$6,34E+04$	$1,73E-03$	$2,73E-08$	7
H4H18457P2	$198 \pm 1,6$	108	$3,45E+05$	$8,55E-03$	$2,48E-08$	1,4
H4H18462P2	$204 \pm 2,1$	31	$4,58E+04$	$1,14E-02$	$2,48E-07$	1,0
H4H18464P2	$185 \pm 1,2$	68	$1,54E+05$	$3,15E-03$	$2,05E-08$	3,7
H4H18466P2	$184 \pm 1,3$	26	$4,55E+04$	$6,74E-03$	$1,48E-07$	1,7

H4H18508P2	$204 \pm 1,4$	117	$2,69E+05$	$6,88E-03$	$2,55E-08$	1,7
Kháng thể so sánh	$315 \pm 7,6$	37	$5,39E+04$	$4,81E-04$	$8,92E-09$	24
Kháng thể đối chứng kiểu tương đương	$193 \pm 1,5$	6	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* chỉ ra rằng không có liên kết được quan sát trong các điều kiện thí nghiệm hiện này.

Như được minh họa trong bảng 3, ở 25°C, tất cả kháng thể đơn dòng kháng LEPR theo sáng chế liên kết với hLEPR-MMH có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 5,11 nM đến 194 nM. Như được trình bày trong bảng 4, ở 37°C, tất cả kháng thể đơn dòng kháng LEPR theo sáng chế liên kết với hLEPR-MMH có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 11,7 nM đến 248 nM.

Bảng 5: Thông số động học liên kết của kháng thể kháng LEPR liên kết với mfLEPR-MMH ở 25°C

mAb bị bắt giữ	Mức độ bắt giữ mAb (RU)	100nM mfLEP R-MMH được liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H17322P2	$177 \pm 0,5$	102	$7,02E+04$	$2,92E-04$	$4,16E-09$	40
H4H18437P2	$171 \pm 0,3$	70	$6,87E+04$	$4,05E-03$	$5,89E-08$	2,9
H4H18439P2	$155 \pm 0,5$	22	$1,57E+04$	$1,52E-03$	$9,63E-08$	8
H4H18440P2	$170 \pm 0,9$	67	$4,95E+04$	$2,68E-03$	$5,41E-08$	4,3
H4H18457P2	$165 \pm 0,4$	133	$2,73E+05$	$3,31E-03$	$1,22E-08$	3,5
H4H18462P2	$174 \pm 0,4$	42	$7,42E+04$	$1,33E-02$	$1,79E-07$	0,9
H4H18464P2	$159 \pm 0,4$	15	$3,82E+04$	$2,31E-03$	$6,04E-08$	5,0
H4H18466P2	$161 \pm 0,5$	30	$4,50E+04$	$6,69E-03$	$1,48E-07$	1,7
H4H18508P2	$178 \pm 0,4$	145	$2,04E+05$	$1,63E-03$	$8,00E-09$	7
Kháng thể so sánh	$359 \pm 4,8$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
Đối chứng kiểu tương	$171 \pm 0,4$	0	NB*	NB*	NB*	NB*

đương Kháng thể						
--------------------	--	--	--	--	--	--

NB* chỉ ra rằng không có liên kết được quan sát trong các điều kiện thí nghiệm hiện này.

Bảng 6: Thông số động học liên kết của kháng thể kháng LEPR liên kết với mfLEPR-MMH ở 37°C.

mAb bị bắt giữ	Mức độ bắt giữ mAb (RU)	100nM mfLEP R-MMH được liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H17322P2	$218 \pm 1,7$	142	$1,43E+05$	$1,10E-03$	$7,72E-09$	10
H4H18437P2	$207 \pm 1,4$	58	$8,69E+04$	$1,27E-02$	$1,47E-07$	0,9
H4H18439P2	$178 \pm 1,4$	14	$4,69E+04$	$7,92E-03$	$1,69E-07$	1,5
H4H18440P2	204 ± 1	66	$7,15E+04$	$7,24E-03$	$1,01E-07$	1,6
H4H18457P2	$195 \pm 1,4$	117	$3,47E+05$	$1,04E-02$	$3,00E-08$	1,1
H4H18462P2	$199 \pm 1,1$	28	$1,29E+05$	$3,37E-02$	$2,61E-07$	0,3
H4H18464P2	$183 \pm 0,6$	13	$3,92E+04$	$8,41E-03$	$2,15E-07$	1,4
H4H18466P2	$181 \pm 0,9$	27	$8,43E+04$	$1,38E-02$	$1,64E-07$	0,8
H4H18508P2	200 ± 1	125	$2,85E+05$	$7,89E-03$	$2,77E-08$	1,5
Kháng thể so sánh	$298 \pm 3,2$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
Kháng thể đối chứng kiểu tương đương	190 ± 1	1	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* chỉ ra rằng không có liên kết được quan sát trong các điều kiện thí nghiệm hiện này.

Như được trình bày trong bảng 5, ở 25°C, tất cả kháng thể đơn dòng kháng LEPR theo sáng chế liên kết với mfLEPR-MMH có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 4,16 nM đến 179 nM. Như được trình bày trong bảng 6, ở 37°C, tất cả kháng thể đơn dòng kháng LEPR theo sáng chế liên kết với mfLEPR-MMH có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 7,72 nM đến 261 nM.

Bảng 7: Thông số động học liên kết của kháng thể kháng LEPR liên kết với hLEPR-

mFc ở 25°C

mAb bị bắt giữ	Mức độ bắt giữ mAb (RU)	100nM hLEPR-mFc được liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H17322P2	$176 \pm 0,4$	74	$6,45E+04$	$1,14E-04$	$1,77E-09$	102
H4H18437P2	$169 \pm 1,1$	70	$1,02E+05$	$5,36E-04$	$5,27E-09$	22
H4H18439P2	$155 \pm 0,2$	53	$4,87E+04$	$1,80E-04$	$3,69E-09$	64
H4H18440P2	$169 \pm 0,5$	140	$1,54E+05$	$6,82E-05$	$4,43E-10$	169
H4H18457P2	$165 \pm 0,8$	149	$4,91E+05$	$4,23E-04$	$8,63E-10$	27
H4H18462P2	$173 \pm 0,5$	68	$9,08E+04$	$2,96E-04$	$3,26E-09$	39
H4H18464P2	$159 \pm 0,4$	84	$2,11E+05$	$1,88E-04$	$8,91E-10$	61
H4H18466P2	$160 \pm 0,2$	37	$3,97E+04$	$4,72E-04$	$1,19E-08$	24
H4H18508P2	$178 \pm 0,4$	138	$2,21E+05$	$2,99E-04$	$1,35E-09$	39
Kháng thể so sánh	$344 \pm 4,9$	36	$1,56E+05$	$1,45E-05$	$9,28E-11$	798
Kháng thể đối chứng kiểu tương đương	$170 \pm 0,7$	-2	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* chỉ ra rằng không có liên kết được quan sát trong các điều kiện thí nghiệm hiện này.

Bảng 8: Thông số động học liên kết của kháng thể kháng LEPR liên kết với hLEPR-mFc ở 37°C.

mAb bị bắt giữ	Mức độ bắt giữ mAb (RU)	100nM hLEPR-mFc được liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H17322P2	$214 \pm 1,8$	105	$1,33E+05$	$4,40E-04$	$3,31E-09$	26
H4H18437P2	$202 \pm 1,1$	88	$1,29E+05$	$5,56E-04$	$4,30E-09$	21
H4H18439P2	$176 \pm 0,7$	67	$6,09E+04$	$9,23E-04$	$1,51E-08$	13
H4H18440P2	$200 \pm 1,4$	181	$2,12E+05$	$1,12E-04$	$5,27E-10$	103
H4H18457P2	193 ± 1	166	$5,56E+05$	$7,04E-04$	$1,27E-09$	16
H4H18462P2	$196 \pm 0,9$	84	$1,28E+05$	$5,43E-04$	$4,26E-09$	21

H4H18464P2	182 ± 0,4	105	4,04E+05	5,17E-04	1,28E-09	22
H4H18466P2	179 ± 1	52	5,87E+04	5,20E-04	8,86E-09	22
H4H18508P2	198 ± 1	146	4.71E+05	1,02E-03	2,16E-09	11
Kháng thể so sánh	288 ± 2,5	50	1,50E+05	7,74E-05	5,14E-10	149
Kháng thể đối chứng kiểu tương đương	188 ± 0,8	1	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* chỉ ra rằng không có liên kết được quan sát trong các điều kiện thí nghiệm hiện này.

Như được trình bày trong bảng 7, ở 25°C, tất cả kháng thể đơn dòng kháng LEPR theo sáng chế liên kết với hLEPR-mFc có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 443 nM đến 11,9 nM. Như được trình bày trong bảng 8, ở 37°C, tất cả kháng thể đơn dòng kháng LEPR theo sáng chế liên kết với hLEPR-mFc có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 527 nM đến 15,1 nM.

Bảng 9: Thông số động học liên kết của kháng thể kháng LEPR liên kết với mLEPR-MMH ở 25°C

mAb bị bắt giữ	Mức độ bắt giữ mAb (RU)	100nM mLEPR-MMH được liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H17322P2	176	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18437P2	169	6	1,58E+04	4,18E-03	2,64E-07	2,8
H4H18439P2	155	-2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18440P2	169	-3	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18457P2	164	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18462P2	173	2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18464P2	159	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18466P2	160	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18508P2	177	25	2,78E+05	6,07E-02	2,18E-07	0,19
Kháng thể so	334 ± 2,5	2	NB*	NB*	NB*	NB*

sánh						
Kháng thể đối chứng kiểu tương đương	169	-2	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* chỉ ra rằng không có liên kết được quan sát trong các điều kiện thí nghiệm hiện này.

Bảng 10: Thông số động học liên kết của kháng thể kháng LEPR liên kết với mLEPR-MMH ở 37°C

mAb bị bắt giữ	Mức độ bắt giữ mAb (RU)	100nM mLEPR-MMH được liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H17322P2	212	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18437P2	201	6	1,15E+04	1,33E-02	1,16E-06	0,9
H4H18439P2	175	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18440P2	200	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18457P2	191	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18462P2	194	3	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18464P2	181	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18466P2	178	3	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18508P2	196	17	5,12E+05	1,05E-01	2,05E-07	0,11
Kháng thể so sánh	283 ± 1,1	0	NB*	NB*	NB*	NB*
Kháng thể đối chứng kiểu tương đương	187	0	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* chỉ ra rằng không có liên kết được quan sát trong các điều kiện thí nghiệm hiện này.

*IC chỉ ra rằng liên kết được quan sát bao gồm và có thể phù hợp với dữ liệu liên kết thời gian thực trong các điều kiện thí nghiệm hiện tại.

Như được trình bày trong bảng 9, ở 25°C, hai trong số chín kháng thể đơn dòng kháng LEPR theo sáng chế liên kết với mLEPR-MMH có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 218 nM đến 264 nM. Như được trình bày trong bảng 10, ở 37°C, hai trong số chín

kháng thể đơn dòng kháng LEPR theo sáng chế liên kết với mLEPR-MMH có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 250 nM đến 1,16 μ M.

Bảng 11: Thông số động học liên kết của kháng thể kháng LEPR liên kết với rLEPR-MMH ở 25°C.

mAb bị bắt giữ	Mức độ bắt giữ mAb (RU)	100nM rLEPR-MMH được liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H17322P2	$176 \pm 0,9$	10	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18437P2	$169 \pm 0,2$	13	$4,21E+04$	$1,38E-02$	$3,28E-07$	0,8
H4H18439P2	$155 \pm 0,2$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18440P2	$169 \pm 0,4$	-2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18457P2	$164 \pm 0,5$	18	$2,83E+04$	$2,06E-02$	$7,30E-07$	0,6
H4H18462P2	$173 \pm 0,2$	5	$3,21E+04$	$1,08E-02$	$3,36E-07$	1,1
H4H18464P2	159 ± 0	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18466P2	$160 \pm 0,6$	5	$2,10E+04$	$1,98E-02$	$9,43E-07$	0,6
H4H18508P2	$177 \pm 0,1$	22	$1,39E+05$	$4,76E-02$	$3,41E-07$	0,24
Kháng thể so sánh	$328 \pm 1,6$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
Kháng thể đối chứng kiểu tương đương	$170 \pm 0,2$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* chỉ ra rằng không có liên kết được quan sát trong các điều kiện thí nghiệm hiện này.

*IC chỉ ra rằng liên kết được quan sát bao gồm và có thể phù hợp với dữ liệu liên kết thời gian thực trong các điều kiện thí nghiệm hiện tại.

Bảng 12: Thông số động học liên kết của kháng thể kháng LEPR liên kết với rLEPR-MMH ở 37°C

mAb bị bắt giữ	Mức độ bắt giữ mAb (RU)	100nM rLEPR-MMH	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
----------------	-------------------------	-----------------	-----------------	----------------	--------------	---------------------

		được liên kết (RU)				
H4H17322P2	$212 \pm 0,3$	9	$9,32E+04$	$3,28E-02$	$3,52E-07$	0,4
H4H18437P2	200 ± 0	10	$3,07E+04$	$1,93E-02$	$6,29E-07$	0,6
H4H18439P2	$175 \pm 0,8$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18440P2	$200 \pm 0,1$	0	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18457P2	$192 \pm 0,3$	16	$3,02E+04$	$1,75E-02$	$5,80E-07$	0,7
H4H18462P2	$194 \pm 0,9$	5	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18464P2	$181 \pm 0,1$	1	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H18466P2	$177 \pm 0,7$	6	$3,26E+04$	$2,52E-02$	$7,71E-07$	0,5
H4H18508P2	$196 \pm 1,6$	17	$2,71E+05$	$4,57E-02$	$1,68E-07$	0,25
Kháng thể so sánh	$279 \pm 0,4$	-1	NB*	NB*	NB*	NB*
Kháng thể đối chứng kiểu tương đương	$186 \pm 0,1$	0	NB*	NB*	NB*	NB*

NB* chỉ ra rằng không có liên kết được quan sát trong các điều kiện thí nghiệm hiện này.

*IC chỉ ra rằng liên kết được quan sát bao gồm và có thể phù hợp với dữ liệu liên kết thời gian thực trong các điều kiện thí nghiệm hiện tại.

Như được trình bày trong bảng 11, ở 25°C, năm trong số chín kháng thể đơn dòng kháng LEPR theo sáng chế liên kết với rLEPR-MMH có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 328 nM đến 943 nM. Như được trình bày trong bảng 12, ở 37°C, tất cả kháng thể đơn dòng kháng LEPR theo sáng chế liên kết với rLEPR-MMH có giá trị K_D nằm trong khoảng từ 168 nM đến 771 nM.

Ví dụ 4: Kháng thể kháng LEPR theo sáng chế không phong bế hLEPR-hFc liên kết với hLeptin

Khả năng kháng thể đơn dòng kháng LEPR theo sáng chế trong việc phong bế liên kết của LEPR người nhĩ phân với phối tử tự nhiên của nó, Leptin người, được đo sử dụng ELISA sandwich cạnh tranh.

Đối với ELISA, Leptin người (hLeptin; R&D Systems, # 398-LP-01M) được phủ ở nồng độ 5 µg/mL trong PBS trên đĩa 96 giếng qua đêm ở 4°C. Các vị trí liên kết không đặc hiệu sau đó bị phong bế sử dụng dung dịch BSA 0,5% (w/v) trong PBS. Lượng không đổi 10 nM của phần vùng ngoại bào của protein LEPR được biểu hiện có đuôi Fc người tại đầu C (hLEPR.hFc; SEQ ID NO: 92) được chuẩn độ với kháng thể kháng LEPR, protein hLeptin, hoặc kháng thể đối chứng kiểu tương đương nằm trong khoảng từ 8,5 pM đến 500 nM trong dung dịch pha loãng theo dãy. Phức hợp kháng thể-protein hoặc protein-protein sau đó được ủ trong 1,5 giờ ở nhiệt độ phòng (RT). Các phức hợp sau đó được chuyển đến đĩa vi thể được phủ bằng hLeptin và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, các giếng được rửa, và hLEPR-hF liên kết đĩa được phát hiện bằng kháng thể đa dòng kháng IgG người liên hợp với peroxidaza cải ngựa (Jackson ImmunoResearch Inc, #109-035-098). Các mẫu được phản ứng với dung dịch TMB (BD Biosciences, #555214; cơ chất A và B được trộn với tỉ lệ 1:1 theo hướng dẫn của nhà sản xuất) để tạo ra phản ứng phép đo màu và sau đó được trung hòa bằng axit sulfuric 1M trước khi đo sự hấp thụ ở 450 nm trên thiết bị đọc đĩa Victor X5. Tiến hành phân tích dữ liệu sử dụng mô hình đáp ứng liều lượng hình xichma trong phần mềm Prism™ (GraphPad). Tỉ lệ phần trăm phong bế ở nồng độ tối đa của kháng thể thử nghiệm được tính toán như làm chỉ báo về khả năng của kháng thể trong việc phong bế liên kết 10nM của hLEPR-hFc với Leptin người trên đĩa. Khi tính toán, tín hiệu liên kết của 10nM hLEPR-hFc khi vắng mặt kháng thể được xem là 100% liên kết hoặc 0% phong bế; và tín hiệu cơ sở của một mình đệm mà không có mặt hLEPR-hFc được xem là 0% liên kết hoặc 100% phong bế. Dữ liệu ngăn chặn ở 500 nM nồng độ kháng thể được tổng kết trong bảng 13.

Bảng 13: Phong bế ELISA của liên kết hLEPR-hFc với hLeptin bằng kháng thể kháng LEPR

Kháng thể	500nM Ab phong bế 10nM hLEPR-hFc liên kết với hLeptin (% phong bế)
H4H18440P2	3
H4H18466P2	2
H4H18457P2	4
H4H18437P2	9

H4H18464P2	-5
H4H17322P2	13
H4H18439P2	-1
H4H18462P2	14
H4H18508P2	40
Đối chứng	
Kháng thể đối chứng kiểu tương đương	-3
Leptin người	99
Bộ so sánh Kháng thể	99
Đối chứng kiểu tương đương IgG2a chuột	32

Như được trình bày trong bảng 13, không có kháng thể kháng LEPR nào theo sáng chế thể hiện sự phong bế liên kết hLEPR-hFc >40% với bề mặt được phủ hLeptin. Tuy nhiên, kháng thể so sánh và hLeptin, là đối chứng dương, có thể phong bế 99% hLEPR-hFc liên kết với bề mặt được phủ hLeptin. Kháng thể đối chứng kiểu tương đương chứng minh không phong bế được ở nồng độ lên đến 500 nM.

Ví dụ 5: Liên kết tế bào bằng phân tích FACS với tế bào neo HEK293/Myx2-hLEPR(ecto)-GPI

Thụ thể leptin, LEPR, là thụ thể xuyên màng đơn của họ thụ thể xytokin lớp I có vùng ngoại bào dài gồm 818 axit amin (Tartaglia (1997) *J. Biol. Chem* 272(10):6093-6). LEPR có thể liên kết với Leptin, protein chủ yếu được biểu hiện bởi mô mỡ tham gia vào điều hòa hấp thụ thức ăn và trao đổi chất (Friedman (2014) *J Endocrinol* 223(1):T1-8). Các đồng phân khác nhau của LEPR tồn tại ở dạng liên kết màng hoặc hòa tan của thụ thể và dạng liên kết màng khác về chiều dài của vùng nội bào. Dạng đồng phân có vùng nội bào dài nhất biểu hiện nhiều ở vùng dưới đồi, vị trí quan trọng của hoạt động Leptin liên quan đến tình trạng béo phì (Friedman and Halaas (1998) *Nature* 395(6704):763-70). LEPR phân bố chủ yếu trong thân tế bào và ở mức ít hơn trên bề mặt tế bào. LEPR trải qua quá trình nội hóa do phối tử bổ sung mức độ điều hòa bổ sung của tín hiệu Leptin (Sweeney (2002) *Cell Signal* 14(8):655-63).

Để truy cập liên kết tế bào bởi kháng thể kháng LEPR theo sáng chế, dòng tế

bào HEK293 được tạo thành để biểu hiện ổn định vùng ngoại bào của LEPR người (hLEPR; axit amin 22-839 có số truy xuất # P48357, đồng phân B) đuôi myc-myc ở đầu N và trình tự peptit ở đầu C từ carboxypeptidaza M người giúp hướng dẫn bổ sung glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Marcic *et al.* (2000) *J Biol Chem.* 275(21):16110-8) sao cho protein có thể được neo giữ GPI vào màng. Do hLEPR trong dòng tế bào không có vùng nội bào, nó không được nội hóa vào liên kết phôi tử, tăng đáng kể lượng LEPR có sẵn đối với kháng thể và/hoặc liên kết phôi tử. Dòng tế bào được chọn trong DMEM chứa 10% FBS, NEAA, penixillin/streptomycin, và 500 µg/mL của G418, sau đó được lưu trữ để biểu hiện cao của thụ thể sử dụng kháng thể kháng Myc. Dòng tế bào ổn định kết quả, được giữ trong DMEM chứa 10% FBS, NEAA và penixillin/streptomycin.

Đối với phân tích FACS, dòng HEK293 mẹ và tế bào HEK293/hLEPR-GPI được phân tách và phủ lên trên đĩa đáy chữ V có 96 giếng với 5×10^5 tế bào/giếng trong PBS chứa 2% FBS (đệm FACS). Để thử nghiệm liệu kháng thể kháng hLEPR liên kết với tế bào có bị ảnh hưởng bởi sự có mặt của Leptin, đệm FACS có hoặc không có 1µM Leptin người (R&D Systems, # 398-LP) được ủ với tế bào trong 30 phút ở 4°C, sau đó bổ sung kháng thể kháng LEPR hoặc kháng thể đối chứng ở 10nM trong đệm FACS. Tế bào sau đó được ủ trong 30 phút ở 4°C, sau đó rửa và ủ với 16µg/mL kháng thể thứ hai liên hợp Alexa Fluor®-647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., # 109-547-003) trong 30 phút ở 4°C. Tế bào sau đó được cố định sử dụng BD CytoFix™ (Becton Dickinson, # 554655), lọc, và phân tích bằng đo tế bào theo dòng chảy HyperCyt (Beckman Coulter). Đối chứng một mình kháng thể thứ hai và không được nhuộm cũng được thử nghiệm đối với tất cả các dòng tế bào. Kết quả được phân tích sử dụng phần mềm ForeCyt (IntelliCyt) và FlowJo phiên bản 10 để xác định trung bình hình học của sự phát huỳnh quang đối với các tế bào có thể nhìn thấy. Trung bình hình học của sự phát huỳnh quang đối với mỗi mẫu sau đó được chuẩn hóa với trung bình hình học của tế bào không nhuộm để thu được liên kết tương đối trên điều kiện được gọi là “tỉ lệ liên kết” và tỉ lệ liên kết này được trình bày trong bảng 14 đối với mỗi kháng thể được thử nghiệm.

Như được trình bày trong bảng 14, chín kháng thể kháng LEPR theo sáng chế được thử nghiệm ở 10nM chứng minh khả năng liên kết với tế bào HEK293/hLEPR-GPI với tỉ lệ liên kết nằm trong khoảng từ 824 lần đến 3187 lần khi không có Leptin

và từ 398 lần đến 3590 lần khi có mặt 1 μ M Leptin. Dựa trên sự tương đồng của tỉ lệ liên kết, khả năng của kháng thể kháng LEPR theo sáng chế liên kết với LEPR được biểu hiện trên tế bào không bị tác động đáng kể bởi sự có mặt leptin lượng dư Leptin tại 1 μ M, đưa ra giả thuyết rằng vị trí liên kết của kháng thể kháng LEPR trên LEPR không chồng lên vị trí liên kết Leptin trên LEPR. Kháng thể kháng LEPR theo sáng chế không chứng minh bất kỳ liên kết đáng kể nào với tế bào HEK293 mẹ với tỉ lệ liên kết khi có mặt và vắng mặt 1 μ M Leptin nằm trong khoảng từ 1 lần đến 9 lần. Liên kết của kháng thể so sánh với tế bào biểu hiện LEPR neo giữ GPI bị giảm đi đáng kể khi có mặt của Leptin. Các mẫu một mình kháng thể đối chứng kiểu tương đương và kháng thể thứ hai không chứng minh liên kết đáng kể với dòng tế bào khi có mặt hoặc vắng mặt Leptin, với tỉ lệ liên kết nằm trong khoảng từ 1 đến 6 lần.

Bảng 14: Liên kết của 10nM kháng thể kháng LEPR với tế bào HEK293/hLEPR-GPI và HEK293 mẹ +/- 1 μ M Leptin người.

Kháng thể	Tỉ lệ liên kết: Chuẩn hóa với mẫu không nhuộm của mỗi dòng tế bào			
	Không bổ sung Leptin		1 μ M Leptin	
	HEK293 mẹ	HEK293/ hLEPR- GPI	HEK293 mẹ	HEK293/ hLEPR- GPI
H4H17322P2	3	1307	6	1317
H4H18457P2	2	3187	3	3106
H4H18464P2	5	2318	7	3590
H4H18437P2	1	1314	2	1441
H4H18439P2	4	1533	6	2477
H4H18440P2	3	1640	7	2557
H4H18462P2	2	1173	3	759
H4H18466P2	1	824	2	398
H4H18508P2	1	1311	2	1873
Bộ so sánh Kháng thể	6	2349	3	112
Kháng thể đối chứng kiểu tương đương IgG người	1	6	2	4
Kháng thể thứ hai IgG kháng người	1	3	2	3

đơn				
Kháng thể đối chứng kiểu tương đương IgG chuột	2	2	3	3
Kháng thể thứ hai IgG kháng chuột đơn	2	2	2	2
Không nhuộm màu	1	1	1	1

Ví dụ 6: Kháng thể kháng LEPR theo sáng chế chứng minh ức chế toàn tín hiệu Leptin khi có mặt hLeptin

Thử nghiệm sinh học được phát triển để phát hiện sự hoạt động phiên mã STAT3 thông qua kích hoạt LEPR sử dụng dòng tế bào báo cáo mà biểu hiện ổn định LEPR người đầy đủ chiều dài (hLEPR; axit amin 1 đến 1165 có số truy xuất NP 002294.2) cùng với chất báo cáo luciferaza (STAT3-Luc; Qiagen, # CLS-6028L) trong dòng tế bào IMR-32, dòng tế bào u nguyên bào thần kinh người. Dòng tế bào ổn định thu được, được gọi là IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR, được phân lập và duy trì trong môi trường MEM-Earl được bổ sung 10% FBS, NEAA, 1 μ g/mL Puromycin, 100 μ g/mL Hygromycin B và Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin (môi trường hoàn chỉnh).

Thử nghiệm sinh học thu được được sử dụng để đo tác động của kháng thể kháng LEPR theo sáng chế lên tín hiệu LEPR khi có mặt hoặc vắng mặt leptin. Đối với thử nghiệm sinh học, tế bào IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR được phủ ở mật độ 20.000 tế bào 100 μ l/giếng đối với đĩa 96 giếng trong môi trường hoàn chỉnh và sau đó ngày hôm sau môi trường được thay thế bằng thể tích tích hợp của Opti-MEM được bổ sung 1% BSA và 0,1% FBS (đệm thử nghiệm) trong 30 phút. Để đo tác động của kháng thể theo sáng chế khi sự vắng mặt Leptin, kháng thể kháng LEPR hoặc kháng thể đối chứng kiểu tương đương được pha loãng theo dãy theo nửa hàm log đến nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 100 nM đến 300 fM trong đệm thử nghiệm và sau đó bổ sung thêm tế bào và sau đó ủ qua đêm 37°C trong 5% CO₂. Để đo tác động của kháng thể theo sáng chế khi có mặt Leptin, nồng độ cố định của Leptin người (hLeptin; R&D Systems, #398-LP) ở 200 pM trong đệm thử nghiệm được thêm vào tế bào, ngay sau đó bổ sung thêm kháng thể kháng LEPR hoặc kháng thể đối chứng kiểu tương đương được pha loãng theo dãy theo nửa hàm loga đến nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 100 nM đến 300 fM. Sau đó, các mẫu được ủ qua đêm ở 37°C trong

5% CO₂. Chất phản ứng OneGlo (Promega, # E6051) sau đó được thêm vào mẫu và hoạt tính luciferaza được đo trên thiết bị đọc đĩa Envision Multilable Plate Reader (Perkin Elmer) trong chế độ phát quang. Các giá trị của đơn vị chiếu sáng tương đối thu được và kết quả được phân tích sử dụng hồi quy không tuyến tính với phần mềm GraphPad Prism (GraphPad). Giá trị RLU tối đa thu được từ đáp ứng liều hLeptin được xác định là 100% hoạt hóa trong thử nghiệm IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR.

Như được trình bày trong bảng 15, khi vắng mặt hLeptin, kháng thể kháng LEPR chứng minh kích thích yếu của tế bào IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR với sự hoạt hóa tối đa lần lượt là 4% đến 8%, mà sự hoạt hóa tối đa thu được từ đáp ứng liều hLeptin. Một kháng thể có sự kích thích yếu có giá trị EC₅₀ là 1,27 nM, trong khi sự hoạt hóa khác của kháng thể, H4H18440P2 không có giá trị EC₅₀ đo được. Khi có mặt 200pM hLeptin, ba trong số các kháng thể kháng LEPR được thử nghiệm chứng minh sự ức chế hoàn toàn của Leptin trong tế bào IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR có giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng từ 723 pM (kháng thể H4H18457P2) đến 1,83 nM (kháng thể H4H17322P2) hoặc 2,9 nM (kháng thể H4H18464P2). Sáu trong số các kháng thể kháng LEPR không thể hiện sự ức chế có thể đo được khi có mặt 200pM Leptin người. Kháng thể đối chứng kiểu tương đương không thể hiện sự kích thích có thể đo được bất kỳ của tế bào IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR trong bất kỳ các thử nghiệm.

Bảng 15: Hoạt hóa và ức chế hLEPR bằng kháng thể kháng LEPR

	IMR-32/LEPR không có Leptin người		IMR-32/LEPR có 200 pM Leptin người	
Kháng thể	EC ₅₀ (M)	% Hoạt hóa	IC ₅₀ (M)	% Ức chế
H4H18457P2	N/A	N/A	7.23E-10	100
H4H17322P2	1,27E-09	8	1,83E-09	100
H4H18464P2	1,30E-10	6	2,9E-09	100
H4H18437P2	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
H4H18439P2	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
H4H18440P2	IC*	4	N/A*	N/A*
H4H18462P2	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
H4H18466P2	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*
H4H18508P2	N/A*	N/A*	N/A*	N/A*

Kháng thể so sánh	N/A*	N/A*	1,03E-09	100
-------------------	------	------	----------	-----

*N/A biểu diễn không có sự ức chế và/hoặc hoạt hóa có thể đo được trong thử nghiệm

*IC biểu diễn kết quả không quyết định trong đó giá trị EC₅₀ được tính toán không được xác định.

Ví dụ 7 Cạnh tranh chéo Octet giữa các kháng thể đơn dòng kháng LEPR khác nhau

Sự cạnh tranh liên kết giữa bộ kháng thể đơn dòng kháng LEPR khác nhau được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm giao thoa lớp sinh học không đánh dấu, thời gian thực trên nền tảng cảm biến sinh học Octet HTX (Pall ForteBio Corp.). Toàn bộ thí nghiệm được thực hiện ở 25°C trong đệm chứa 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3mM EDTA, và 0,05% v/v chất hoạt hóa bề mặt Tween-20, và 1mg/mL BSA, pH 7,4 (HBS-EBT), có đĩa lắc ở tốc độ 1000 rpm.

Để đánh giá liệu hai kháng thể có thể cạnh tranh với nhau để liên kết với LEPR người tái tổ hợp được biểu hiện bằng đuôi myc-myc-hexahistidin tại đầu C (hLEPR-MMH; SEQ ID:90), 0,25 nm hLEPR-MMH đầu tiên bị bắt giữ lên trên kháng thể kháng penta-His được phủ đầu cảm biến sinh học Octet (ForteBio Inc, # 18-5122) bằng cách ngâm đầu cảm biến sinh học trong 5 phút trong giếng chứa 20µg/mL hLEPR-MMH. Đầu cảm biến sinh học bắt giữ kháng nguyên sau đó được thăm kháng thể đơn dòng kháng LEPR thứ nhất (sau đây được gọi là mAb-1) bằng cách nhúng vào các giếng chứa 50µg/mL dung dịch mAb-1 trong 210 giây. Các đầu cảm biến sinh học sau đó được nhúng trong các giếng chứa 50µg/mL dung dịch kháng thể đơn dòng kháng LEPR thứ hai (sau đây gọi là mAb-2) trong 150 giây. Đầu cảm biến sinh học được rửa trong đệm HBS-EBT giữa mỗi bước thí nghiệm. Phản ứng liên kết thời gian thực được quan sát trong suốt cả quá trình thí nghiệm và phản ứng liên kết ở mỗi bước được ghi lại. Phản ứng của mAb-2 gắn với tiền phức của hLEPR-MMH với mAb-1 được so sánh và hoạt động cạnh tranh/không cạnh tranh của kháng thể đơn dòng kháng LEPR khác nhau được xác định như được trình bày trong bảng 16.

Bảng 16: Cạnh tranh chéo giữa các kháng thể đơn dòng kháng LEPR

Kháng thể thứ nhất (mAb-1) liên kết với hLEPR-MMH được bắt	Kháng thể thứ hai (mAb-2) được minh họa để cạnh tranh với mAb-1
--	---

giữ	
H4H18439P2	H4H18440P2
H4H18440P2	H4H18439P2
H4H18457P2	H4H18462P2 H4H18437P2 H4H18466P2 H4H18508P2
H4H18462P2	H4H18457P2 H4H18437P2 H4H18466P2
H4H18437P2	H4H18457P2 H4H18462P2 H4H18466P2
H4H18466P2	H4H18457P2 H4H18462P2 H4H18437P2
H4H17322P2	Không có
H4H18464P2	Không có

Như được trình bày trong trong bảng 16, các kháng thể H4H18439P2 và H4H18440P2 cạnh tranh với nhau để liên kết với quyết định kháng nguyên tương ứng. Kháng thể LEPR H4H18457P2, H4H18462P2, H4H18437P2, H4H18466P2 và H4H18508P2 cạnh tranh với nhau để liên kết với quyết định kháng nguyên tương ứng. Kháng thể H4H17322P2 và H4H18464P2 không cạnh tranh để liên kết với quyết định kháng nguyên tương ứng của H4H18439P2, H4H18440P2, H4H18457P2, H4H18462P2, H4H18437P2, và H4H18466P2.

Ví dụ 8: Thử nghiệm hiệu quả *in vivo* đối với các kháng thể đối kháng LEPR ở chuột LEPR được làm giống như của người

Hiệu quả của ba kháng thể kháng LEPR đối kháng đặc hiệu theo sáng chế, H4H17322P2, H4H18457P2 và H4H18464P2, đối với hấp thụ thức ăn, thể trọng và

tình trạng béo phì được xác định ở chuột LEPR^{Hu/Hu} biến đổi gen đơn lẻ biểu hiện thụ thể leptin chứa trình tự vùng cắt bỏ LEPR người thay cho trình tự vùng cắt bỏ LEPR chuột.

Đo sự hấp thụ thức ăn hằng ngày cơ bản từ 1 đến 5 ngày trước khi điều trị (ngày -1 và -5). Bốn ngày trước điều trị và sáu ngày sau điều trị (ngày -4 và ngày -6), cấu tạo cơ thể, bao gồm tình trạng béo phì, được định lượng bằng μ CT. Ở ngày 0, 32 chuột LEPR^{Hu/Hu} đực 12 đến 13 tuần tuổi được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm, mỗi nhóm gồm 8 con chuột dựa vào thể trọng từ ngày 1 trước điều trị (ngày -1). Ở ngày 0, thông qua tiêm dưới da mỗi nhóm tiếp nhận liều đơn chứa kháng thể đối chứng kiểu tương đương 30 mg/kg, H4H17322P2 30 mg/kg, H4H18457P2 30 mg/kg, hoặc H4H18464P2 30 mg/kg. Kháng thể đối chứng kiểu tương đương không liên kết với protein chuột đã biết bất kỳ. Sự hấp thụ thức ăn và thể trọng được đo trong khoảng thời gian nghiên cứu đối với mỗi chuột. FIG.1 tổng hợp sự thay đổi theo tỉ lệ phần trăm trong hấp thụ thức ăn từ hấp thụ thức ăn hằng ngày cơ bản trung bình đối với mỗi nhóm điều trị ở mỗi điểm thời gian. Sự thay đổi theo tỉ lệ phần trăm về thể trọng ngày 0 được tính toán đối với mỗi con chuột tại mỗi điểm thời gian. FIG.2 tổng hợp sự thay đổi theo tỉ lệ phần trăm trung bình về thể trọng đối với các con chuột trong mỗi nhóm điều trị. FIG.3 tổng hợp khối lượng chất béo trung bình đối với mỗi con chuột trong mỗi nhóm điều trị kháng thể bằng μ CT 6 ngày trước và 6 ngày sau điều trị kháng thể. Tất cả các kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình $\pm$ SEM.

Như được trình bày trong FIG.1 và FIG.2, chuột được điều trị bằng kháng thể đối kháng kháng LEPR chứng minh sự gia tăng về phần trăm thay đổi trong hấp thụ thức ăn và phần trăm thay đổi về thể trọng. Những sự gia tăng này không thấy ở chuột điều trị kháng thể đối chứng kiểu tương đương. Như được minh họa trong FIG.1, chuột được điều trị bằng H4H17322P2 30 mg/kg tăng đáng kể trong hấp thụ thức ăn bắt đầu từ ngày 1 sau điều trị (ngày 1) và tại các thời điểm sau đó so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng kiểu tương đương. Chuột được điều trị bằng H4H18457P2 30 mg/kg tăng đáng kể trong hấp thụ thức ăn bắt đầu từ ngày 2 và tại các thời điểm sau đó so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng kiểu tương đương. Chuột được điều trị bằng H4H18464P2 30 mg/kg tăng đáng kể hấp thụ thức ăn bắt đầu từ ngày 2 và tại các thời điểm sau đó, nhưng không phải là ngày 4 so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng kiểu tương đương. Như được minh họa trong

FIG.1, chuột được điều trị bằng H4H17322P2 30 mg/kg tăng đáng kể phần trăm thay đổi thể trọng bắt đầu 4 ngày sau điều trị (ngày 4) và tại các thời điểm sau đó so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng kiểu tương đương. Chuột được điều trị bằng H4H18457P2 30 mg/kg tăng đáng kể phần trăm thay đổi thể trọng bắt đầu từ ngày 3 và tại các thời điểm sau đó so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng kiểu tương đương. Chuột được điều trị bằng H4H18464P2 30 mg/kg tăng đáng kể phần trăm thay đổi thể trọng bắt đầu từ ngày 4 và tại các thời điểm sau đó so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng kiểu tương đương. Như được minh họa trong FIG.3, không có sự khác biệt về khối lượng chất béo giữa các nhóm trước điều trị (ngày -4). Chuột được điều trị bằng kháng thể H4H17322P2, H4H18457P2 và H4H18464P2 30 mg/kg tăng đáng kể về khối lượng chất béo 6 ngày sau điều trị (ngày 6) so với kháng thể đối chứng kiểu tương đương. Kết luận, điều trị bằng kháng thể đối kháng LEPR, nhưng không phải là kháng thể đối chứng kiểu tương đương, làm tăng hấp thụ thức ăn, thể trọng và tình trạng béo phì ở chuột.

Ví dụ 9: Xác định quyết định kháng nguyên của LEPR người mà kháng thể kháng LEPR theo sáng chế liên kết

Để xác định quyết định kháng nguyên của LEPR người mà kháng thể kháng LEPR theo sáng chế liên kết, phân tích dựa trên phương pháp đo tế bào theo dòng chảy Luminex FLEXMAP (FM3DD, LuminexCorp) được sử dụng để xác định tương tác của kháng thể kháng LEPR với vùng protein LEPR người tái tổ hợp. Đối với thử nghiệm này, xấp xỉ 3 triệu hạt cầu siêu nhỏ Microplex^R carboxyl hóa (Luminex, Cat# LC1000A), được rửa, lắc và nghiền bằng sóng âm trong 0,1 M NaPO₄, pH 6,2 (đệm hoạt hóa), sau đó ly tâm để loại bỏ dịch nổi. Hạt cầu siêu nhỏ được tạo huyền phù lại trong 120 μ L đệm hoạt hóa và nhóm cacboxylat (-COOH) được hoạt hóa bằng bổ sung 15 μ L N-hydroxysuccinimide 50 mg/mL (NHS, Thermo Scientific, Cat# 24500) sau đó bổ sung thêm 15 μ L 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide 50 mg/mL (EDC, ThermoScientific, Cat# 22980) ở 25°C. Sau 10 phút, pH của phản ứng giảm đến 5,0 bằng bổ sung 600 μ L MES 50 mM, pH 5 (đệm liên kết), và các hạt cầu siêu nhỏ được lắc, và ly tâm để loại bỏ dịch nổi. Các hạt đã hoạt hóa ngay lập tức được trộn với 500 μ L của 20 μ g/mL kháng thể kháng myc đơn dòng với IgG chuột hoặc IgG người, trong đệm liên kết và ủ trong 2 giờ ở 25°C. Phản ứng liên kết được dập tắt bằng bổ sung 50 μ L Tris-HCl 1M, pH 8,0 và hạt cầu siêu nhỏ được lắc nhanh, ly tâm và rửa 4

lần bằng 1 mL DPBS, loại bỏ protein không liên kết và các thành phần phản ứng khác.

Protein LEPR biểu hiện tạm thời, bao gồm vùng ngoại bào LEPR người biểu hiện với đuôi myc-myc hexahistidin tại đầu C (LEPR-MMH người, SEQ ID NO: 89), LEPR CRH1 người (D1) được biểu hiện với đuôi myc-myc hexahistidin tại đầu C (LEPR CRH1 (D1)-MMH người, axit amin 1-208 nêu trong SEQ ID NO: 89 với đuôi myc-myc hexahistidin, axit amin 209-236), vùng LEPR CRH1 người (D1,D2) biểu hiện với đuôi myc-myc hexahistidin tại đầu C (LEPR CRH1 (D1,D2)-MMH người, axit amin 1-318 nêu trong SEQ ID NO: 89 với đuôi myc-myc hexahistidin, axit amin 319-346), vùng LEPR CRH1-Ig người (D1,D2,D3) được biểu hiện với đuôi myc-myc hexahistidin tại đầu C (LEPR CRH1 (D1,D2,D3)-MMH người, axit amin 1-278 nêu trong SEQ ID NO: 89 với đuôi myc-myc hexahistidin, axit amin 279-306), vùng LEPR CRH1-Ig người (D2,D3) được biểu hiện với đuôi myc-myc hexahistidin tại đầu C (LEPR CRH1-Ig (D2,D3)-MMH người, axit amin 1-198 nêu trong SEQ ID NO: 89 với đuôi myc-myc hexahistidin, axit amin 199-226), vùng LEPR Ig người (D3) được biểu hiện với đuôi myc-myc hexahistidin tại đầu C (LEPR Ig (D3)-MMH người, axit amin 1-88 nêu trong SEQ ID NO: 89 với đuôi myc-myc hexahistidin, axit amin 89-116), vùng CRH2 LEPR người được biểu hiện với đuôi myc-myc hexahistidin tại đầu C (LEPR CRH2-MMH người, axit amin 1-207 nêu trong SEQ ID NO: 89 với đuôi myc-myc hexahistidin, axit amin 208-235), vùng LEPR FNIII người được biểu hiện với đuôi myc-myc hexahistidin tại đầu C (LEPR FNIII-MMH người, axit amin 1-204 nêu trong SEQ ID NO: 89 với đuôi myc-myc hexahistidin, axit amin 205-232), và vùng LEPR Ig-CRH2-FNIII người được biểu hiện với đuôi myc-myc hexahistidin tại đầu C (LEPR Ig-CRH2-FNIII-MMH người, axit amin 1-510 nêu trong SEQ ID NO: 89 với đuôi myc-myc hexahistidin, axit amin 511-538), được tạo huyền phù trong môi trường CHO-S-SFM II không chứa huyết thanh (Thermo Fisher, Cat # 31033020) và sau đó được lọc bằng ly tâm. Ước số của các hạt cầu siêu nhỏ với kháng thể đơn dòng kháng myc bất động, được so sánh với phần mô tả ở trên, được bổ sung riêng rẽ vào 1 mL của mỗi một trong số các dịch huyền phù protein này. Các hạt cầu siêu nhỏ được trộn nhẹ nhàng, ủ trong 2 giờ ở 25°C, được rửa 2 lần bằng 1 mL DBPS, ly tâm để loại bỏ dịch huyền phù và cuối cùng tái tạo huyền phù trong 1 mL đệm DPBS. 48 µL hạt cầu siêu nhỏ liên kết với IgG kháng myc từ các phản ứng riêng rẽ với LEPR người đầy đủ chiều dài và với mỗi một trong số các protein vùng LEPR người được rút ra và trộn

lẫn cùng nhau trong 3,6 mL PBS + 20 mg/mL BSA + 0,05% natri azit (đệm phong bế).

Từ bể được trộn này, 75 μ L hạt cầu siêu nhỏ được phủ trên mỗi giếng trên đĩa lọc có 96 giếng (Millipore, Cat. No: MSBVN1250) và trộn với 25 μ L kháng thể đơn dòng LPER kháng người riêng rẽ (0,5 hoặc 5 μ g/mL), ủ trong 2 giờ ở 25°C và sau đó rửa hai lần với 200 μ L DPBS với 0,05% Tween 20 (đệm rửa). Để phát hiện và xác định lượng mức độ kháng thể kháng LEPR được liên kết với hạt cầu siêu nhỏ riêng rẽ, 100 μ L của 2,5 μ g/mL kappa kháng người F(ab')₂ dê liên hợp R-Phycoerythrin (Southern Biotech, Cat# 2063-09) trong đệm phong bế hoặc 100 μ L của 1,25 μ g/mL R-Phycoerythrin AffiniPure F(ab') trong đệm phong bế hoặc 100 μ L của 1,25 μ g/mL IgG kháng chuột dê đoạn R-Phycoerythrin AffiniPure F(ab')₂, đoạn F(ab')₂ đặc hiệu (Jackson ImmunoResearch, Cat. No: 115-116-072) trong đệm phong bế, được bổ sung và ủ trong 30 phút ở 25°C. Sau 30 phút, các mẫu được rửa 2 lần với 200 μ L đệm rửa và được tái tạo huyền phù trong 150 μ L của đệm rửa. Cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) của hạt cầu siêu nhỏ được đo trong máy phân tích Luminex.

Các kết quả của phân tích dựa trên Luminex được trình bày trong bảng 17. Các cường độ tín hiệu MFI Luminex chỉ ra rằng 9 kháng thể kháng LEPR theo sáng chế liên kết với vùng ngoại bào LEPR người hoàn chỉnh. Kháng thể kháng LEPR H4H18439P2 và H4H18440P2, liên kết với quyết định kháng nguyên trong vùng CRH1 D2 của LEPR người. Kháng thể kháng LEPR H4H17322P2 và COMP3551, liên kết với quyết định kháng nguyên trong vùng CRH2 của LEPR người. Kháng thể kháng LEPR H4H18437P2, H4H18457P2, H4H18508P2, H4H18466P2 và H4H18462P2, liên kết với quyết định kháng nguyên trong vùng FNIII của LEPR người. Kháng thể kháng LEPR H4H18464P2, liên kết với quyết định kháng nguyên trong vùng Ig(D3) của LEPR người.

Bảng 17: Tín hiệu MFI Luminex của kháng thể kháng LEPR liên kết với đuôi myc bắt giữ vùng ngoại bào đầy đủ chiều dài của LEPR người và vùng LEPR người được phân lập.

Kháng thể	CRH1 (D1)	CRH1 (D1,D2)	CRH1-Ig (D1,D2,D3)	CRH1-Ig (D2,D3)	Ig (D3)	CRH2	FNIII	Ig- CRH2- FNIII	Vùng ngoại bào đầy chiều dài	Vị trí liên kết có thể
H4H17322P2	14	50	31	58	26	19745	23	15097	8932	CRH2
H4H18437P2	21	82	34	43	26	25	1593	15625	8644	FNIII
H4H18457P2	13	53	31	43	18	18	1187	13235	7500	FNIII
H4H18508P2	10	274	217	372	24	18	741	13007	5865	FNIII
H4H18466P2	15	56	209	76	26	17	457	11270	5070	FNIII
H4H18439P2	11	21179	8021	10026	18	16	13	43	5472	CRH1 D2
H4H18440P2	8	19337	8245	9165	14	17	10	32	7035	CRH1 D2
H4H18464P2	13	59	5557	3742	27	24	23	15119	9385	Ig(D3)
H4H18462P2	5381	5731	3961	47	21	24	581	14858	5852	FNIII
H4H18462P2*	615	665	461	25	10	8	229	11153	3610	FNIII
Kháng thể so sánh	-14	19	-57	27	10	9404	73	7112	3908	CRH2

* Kháng thể được thử nghiệm ở 0,5 µg/mL thay vì thử nghiệm ở 5 µg/mL.

Sáng chế không bị giới hạn trong phạm vi của các phương án thực hiện cụ thể được mô tả ở đây. Do đó, các cải biến khác nhau theo sáng chế cùng với các sửa đổi được mô tả ở đây có thể trở nên rõ ràng với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này từ bản mô tả đã nêu và các hình vẽ kèm theo. Các cải biến này đều nằm trong phạm vi của các yêu cầu bảo hộ đi kèm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với thụ thể leptin người (LEPR), trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó bao gồm: (a) vùng xác định bổ trợ (CDR) của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 42, và SEQ ID NO: 58 và (b) CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

2. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm:

LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12; LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14; LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16; và

vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm:

(i)

HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4;

HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6; và

HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8;

(ii)

HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 44;

HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 46; và

HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48; hoặc

(iii)

HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 60;

HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 62; và

HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64.

3. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, trong đó kháng thể này là kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự

axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

4. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, trong đó kháng thể này là kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 42 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

5. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 2, trong đó kháng thể này là kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 58 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10.

6. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, và chất mang hoặc chất pha loãng được dụng.

7. Kháng thể theo điểm 3, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được liên kết với Fc IgG4 người.

8. Kháng thể theo điểm 4, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được liên kết với Fc IgG4 người.

9. Kháng thể theo điểm 5, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được liên kết với Fc IgG4 người.

10. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 7, và chất mang hoặc chất pha loãng được dụng.

11. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 8, và chất mang hoặc chất pha loãng được dụng.

12. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 9, và chất mang hoặc chất pha loãng được dụng.

13. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm:

LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12;

LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14; và

LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16;

và vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm:

HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 4;

HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6; và

HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 8.

14. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm:

LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12;

LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14; và

LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16;

và vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm:

HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 44;

HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 46; và

HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 48.

15. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm:

LCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12;

LCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 14; và

LCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 16;

và vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm:

HCDR1 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 60;

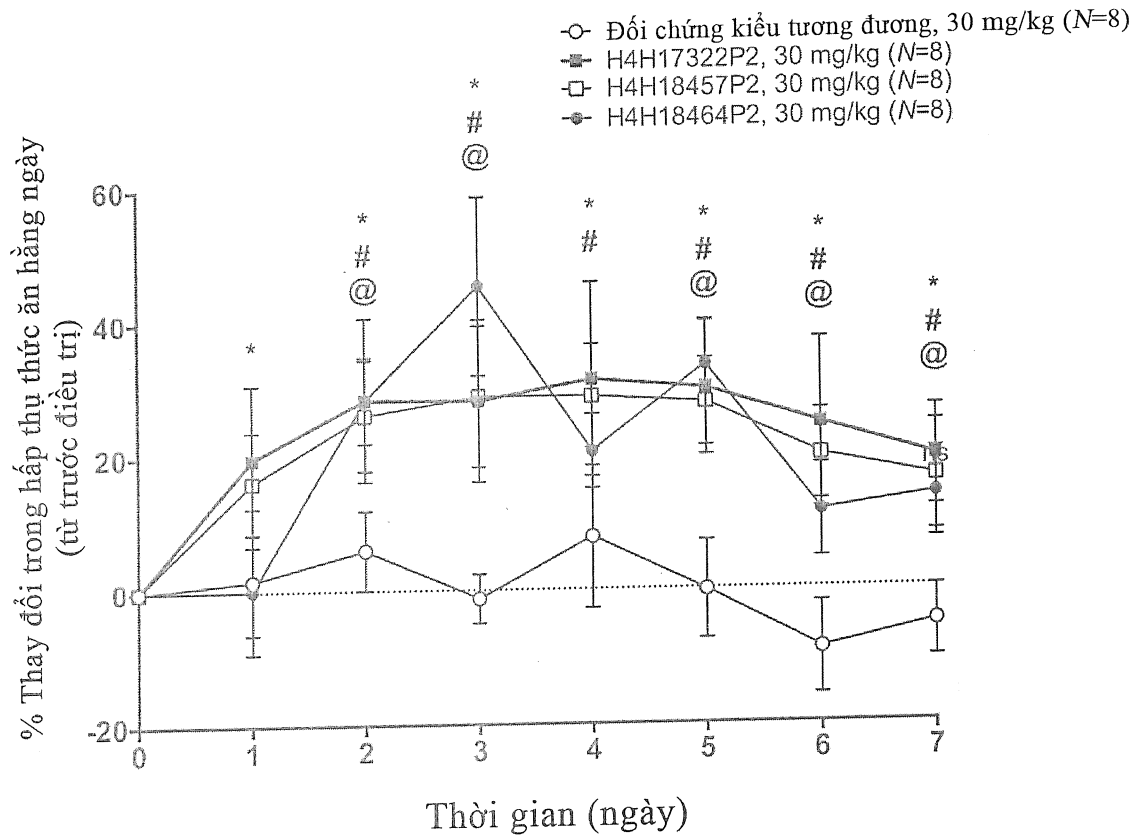
HCDR2 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 62; và

HCDR3 chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 64.

16. Thiết bị tiêm tự động chứa kháng thể theo điểm 3.

17. Thiết bị tiêm tự động chứa kháng thể theo điểm 4.
18. Thiết bị tiêm tự động chứa kháng thể theo điểm 5.
19. Thiết bị phân phối dạng bút chứa kháng thể theo điểm 3.
20. Thiết bị phân phối dạng bút chứa kháng thể theo điểm 4.
21. Thiết bị phân phối dạng bút chứa kháng thể theo điểm 5.
23. Kháng thể theo điểm 8, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết với miền hằng định chuỗi nhẹ kappa.
24. Kháng thể theo điểm 9, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết với miền hằng định chuỗi nhẹ kappa.

% Thay đổi trong hấp thụ thức ăn hằng ngày



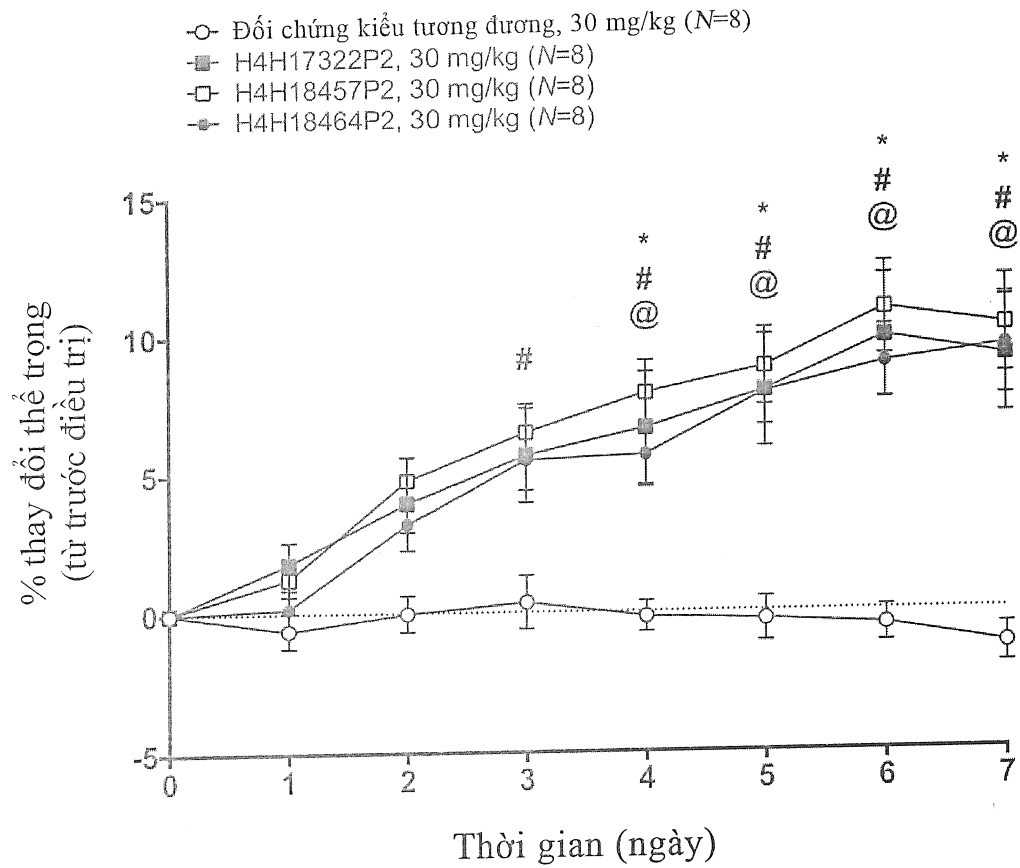
* $P < 0,05$ Đối chứng kiểu tương đương vs H4H17322P2

@ $P < 0,05$ Đối chứng kiểu tương đương vs H4H18457P2

$P < 0,05$ Đối chứng kiểu tương đương vs H4H18464P2

FIG.1

Thay đổi thể trọng



* $P < 0,05$ Đối chứng kiểu tương đương vs H4H17322P2
 @ $P < 0,05$ Đối chứng kiểu tương đương vs H4H18457P2
 # $P < 0,05$ Đối chứng kiểu tương đương vs H4H18464P2

FIG.2

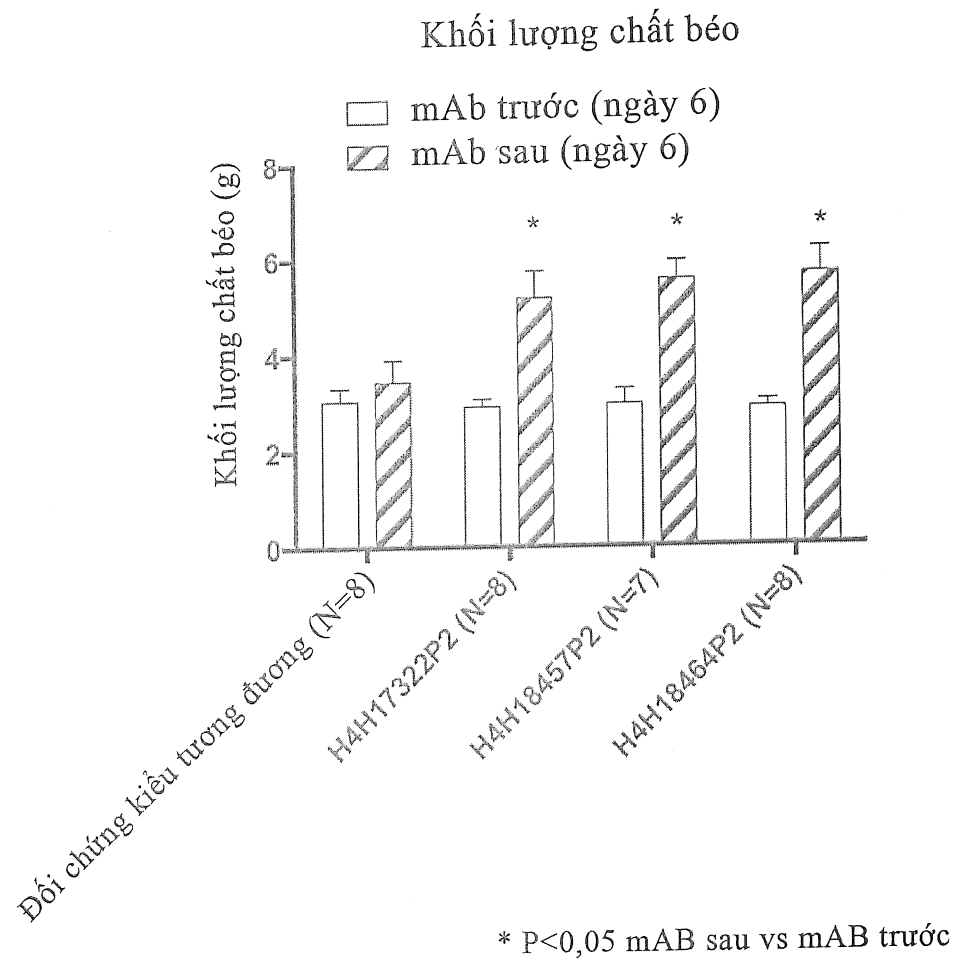


FIG.3

DANH SÁCH TRÌNH TỰ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
 Gromada, Jesper
 Stevis, Panayiotis
 Altarejos, Judith

<120> KHÁNG THỂ LIÊN KẾT VỚI THỤ THỂ LEPTIN NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 10271W001

<140> TBD

<141> 2017-11-08

<150> 62/419,062

<151> 2016-11-08

<160> 95

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 378

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 1

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtgc ctctatcagc agtagtcgtt tctacggggg ctggatccgc	120
cagccccag ggaagggtct ggagtggatt ggggatatct attatagtgg gaatacctac	180
tacaaccgt ccctccagag tcgagtcacc atatccgtag acacgtcaa gaatcagttc	240
tccctgaagc tgagctctgt gaccgccgca gacacggctg tgtattactg tgcgagacac	300
cttatgatta cgtttggggg acttatcgtc gagggttttg atatttgagg ccaagggaca	360
atggtcaccg tctcttca	378

<210> 2

<211> 126

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 2

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

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Ala	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
			20					25					30		

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

Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

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

Cys Ala Arg His Leu Met Ile Thr Phe Gly Gly Leu Ile Val Glu Gly
 100 105 110

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

<210> 3

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 3

gggtgcctcta tcagcagtag tcgtttctac

30

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 4

Gly Ala Ser Ile Ser Ser Ser Arg Phe Tyr

1

5

10

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 5

atctattata gtgggaatac c

21

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 6
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 7
 gcgagacacc ttatgattac gtttggggga cttatcgctg agggttttga tatt 54

<210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 8
 Ala Arg His Leu Met Ile Thr Phe Gly Gly Leu Ile Val Glu Gly Phe
 1 5 10 15

Asp Ile

<210> 9
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 9
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgta 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 10
 <211> 108
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 11

cagagcatta gcagctat

18

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 12

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 13
 gctgcatcc

9

<210> 14
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 14
 Ala Ala Ser
 1

<210> 15
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 15
 caacagagtt acagtacccc tccgatacc

30

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 16
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
 1 5 10

<210> 17
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 17

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tccactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaaataa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaata acagcctgag agctgaggac acggctgtat attactgtgc gaaagatcta 300
 tttttggagt ggttatttca cggatatgggc gtctggggcc aaggaccac ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 18

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 18

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Leu Phe Leu Glu Trp Leu Phe His Gly Met Gly Val Trp
 100 105 110

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

<210> 19

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 19

ggattcactt tcagtagcta tggc

24

<210> 20

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 20
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 21
 atatcatatg atggaaataa taaa

24

<210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 22
 Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys
 1 5

<210> 23
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 23
 gcgaaagatc tatTTTTtgga gtggttattt cacggtatgg gcgtc

45

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 24
 Ala Lys Asp Leu Phe Leu Glu Trp Leu Phe His Gly Met Gly Val
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 25
 cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctagtgaagc cttcgagac cctgtccctc 60
 acctgcattg tctctggtgg cgacatcacc agtagtagtt attactggaa ctggatccgc 120
 cagcccccag ggaaagggct ggagtggatt gggaatatct attatagtgg aagcaccaac 180
 tacaacccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatccatag acacgtccaa gagccagttc 240
 tccctgaagc tgaggtctgt gaccgccgca gacacggctg tttattactg tgcgagatta 300
 ttacgatatt ttgactggtc aaaaggatac cttgactact ggggccaggg aaccctggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 26
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 26
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ile Val Ser Gly Gly Asp Ile Thr Ser Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Leu Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Ser Lys Gly Tyr Leu Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 27
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 27
 ggtggcgaca tcaccagtag tagttattac

30

<210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 28
 Gly Gly Asp Ile Thr Ser Ser Ser Tyr Tyr
 1 5 10

<210> 29
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 29
 atctattata gtggaagcac c

21

<210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 30
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
 1 5

<210> 31
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 31

gcgagattat tacgatattt tgactgggtca aaaggataacc ttgactac

48

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 32

Ala Arg Leu Leu Arg Tyr Phe Asp Trp Ser Lys Gly Tyr Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 33

<211> 369

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 33

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc atgggtcaagc ctggaggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactata tgagctggat ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctggagtg gatttcacac attagtatta ctggtagcac catatactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ttcactgtat 240
ttggaaatga acagactgag agacgaggac acggccgtat attactgtac gagagatgag 300
ccggatatgt tactagtaag gtacgggtatg gacgtctggg gccaagggac cacggtcacc 360
gtctcctca 369

<210> 34

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 34

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

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

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

Ser His Ile Ser Ile Thr Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Thr Arg Asp Glu Pro Asp Ile Val Leu Val Arg Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110

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

<210> 35

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 35

ggattcacct tcagtgacta ctat

24

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr

1

5

<210> 37

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 37

attagtatta ctggtagcac cata

24

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 38

Ile Ser Ile Thr Gly Ser Thr Ile

1

5

<210> 39

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 39

acgagagatg agccggatat tgtactagta aggtacggta tggacgtc

48

<210> 40

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 40

Thr Arg Asp Glu Pro Asp Ile Val Leu Val Arg Tyr Gly Met Asp Val

1

5

10

15

<210> 41

<211> 351

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 41

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaagt gtggtacggc ctggggaatc cctgagactc

60

tcctgtgcag cctctggatt cacatttgat gattatggca tgagctgggt ccgccaagct

120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctctggt attagtggga atggtggcat cacagtttat

180

gcagactctg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat

240

ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggccctct atcactgtgc gagagcccgt

300

tatggtggcg ccgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc a

351

<210> 42

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 42

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

1

5

10

15

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

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 43

ggattcacat ttgatgatta tggc

24

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 44

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly

1

5

<210> 45

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp
 <400> 45
 attagttgga atggtggcat caca

24

<210> 46
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 46
 Ile Ser Trp Asn Gly Gly Ile Thr
 1 5

<210> 47
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 47
 gcgagagccc gttatggtgg cgccgactac

30

<210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 48
 Ala Arg Ala Arg Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr
 1 5 10

<210> 49
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 49

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagac ttggtacagc ctgggcggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agttttgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaggg gactggagtg ggtctcaagt ctgagtata gtggtgataa cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaaaaa tacgttgtat 240
 ctgcaaata acaacctgag agccgaggac acggccgttt attactgtgc gaaagatctc 300
 ttttcggggg ggttattcca tggttttgat gtctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360

tcttca

<210> 50

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

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

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

Ser Ser Leu Ser Asp Ser Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Leu Phe Ser Gly Trp Leu Phe His Gly Phe Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 51

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 51

ggattcacct ttagcagttt tgcc

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala

1

5

<210> 53

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 53

ctcagtgata gtggtgataa caca

24

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 54

Leu Ser Asp Ser Gly Asp Asn Thr

1

5

<210> 55

<211> 45

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 55

gcgaaagatc tcttttcggg gtggttattc catggttttg atgtc

45

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 56

Ala Lys Asp Leu Phe Ser Gly Trp Leu Phe His Gly Phe Asp Val

1

5

10

15

<210> 57

<211> 351

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 57

caggttcagc	tggtgcagtc	tggaacctgaa	gtgaaaaaac	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcttgtaagg	gttctgggta	caccttttcc	tggtatggaa	tcagctggat	ccgacaggcc	120
cctggacacg	gccttgaatg	gatgggatgg	atcagcgctt	ccagtggtaa	tacaagattt	180
gcacagaagg	tccagggcag	actcaccatg	accacagaca	catcgacgag	tacagcctac	240
atggagctga	ggagcctgag	atctgacgac	acggccgttt	attactgtgc	gagaacgggg	300
actcggccct	ttgactattg	gggccaggga	accctgggtca	ccgtctcctc	a	351

<210> 58

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 58

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

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

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

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

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

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

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

Val	Thr	Val	Ser	Ser
				115

<210> 59

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 59
 ggttacacct tttcctggta tgga

24

<210> 60
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 60
 Gly Tyr Thr Phe Ser Trp Tyr Gly
 1 5

<210> 61
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 61
 atcagcgctt ccagtggtaa taca

24

<210> 62
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 62
 Ile Ser Ala Ser Ser Gly Asn Thr
 1 5

<210> 63
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 63
 gcgagaacgg ggactcggcc ctttgactat

30

<210> 64
 <211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 64

Ala Arg Thr Gly Thr Arg Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 65

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 65

gaggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttggtccagc	cggggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtacag	cctctggatt	caccttcagt	agctatggtc	tgacttgggt	ccgccaggct	120
ccaggaagg	gactggaata	tgtttcaagt	attaatcata	atgggggtag	taaataattat	180
gcagactctg	tgaagggcag	attcaccatc	tccagagaca	attcgaagaa	cacgctgttt	240
cttcaaattg	gcagcctgaa	aactgaggac	atggctgttt	attactgtgc	gagagatctc	300
tttttggagt	ggttattcca	tggttttgat	atctggggcc	aagggaacaat	ggtcaccgtc	360
tcttca						366

<210> 66

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 66

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	Thr Ala Ser	Gly Phe Thr	Phe Ser Ser	Tyr
20	25	30			

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

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

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

Leu Gln Met	Gly Ser Leu	Lys Thr Glu	Asp Met Ala	Val Tyr Tyr	Cys
-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-----

85

90

95

Ala Arg Asp Leu Phe Leu Glu Trp Leu Phe His Gly Phe Asp Ile Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 67

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 67

ggattcacct tcagtagcta tgggt

24

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 68

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1

5

<210> 69

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 69

attaatcata atgggggtag taaa

24

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 70

Ile Asn His Asn Gly Gly Ser Lys

1

5

<210> 71
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 71
 gcgagagatc tcttttttgga gtggttattc catggttttg atatac 45

<210> 72
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 72
 Ala Arg Asp Leu Phe Leu Glu Trp Leu Phe His Gly Phe Asp Ile
 1 5 10 15

<210> 73
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 73
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgttctg tctctggtgg ctccataaac actggttctt acttctggac ttggatccgc 120
 cagcaccag gggagggcct ggagtggatt gggtagatct attacaatgg agacacctac 180
 tacaatccgt ccctcaagag tcgagttacc ttatcactag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgaactctct gactgccggg gacacggccg tttattactg tgcgagaagt 300
 gactggaact ccctttttga ccactggggc caggggaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 74
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 74
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Thr Gly
 20 25 30

Ser Tyr Phe Trp Thr Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Glu Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Asn Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Asn Ser Leu Thr Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 75

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 75

ggtggctcca taaacactgg ttcttacttc

30

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 76

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

<210> 77

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 77

atctattaca atggagacac c

21

<210> 78
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 78
 Ile Tyr Tyr Asn Gly Asp Thr
 1 5

<210> 79
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 79
 gcgagaagtg actggaactc cctttttgac cac

33

<210> 80
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 80
 Ala Arg Ser Asp Trp Asn Ser Leu Phe Asp His
 1 5 10

<210> 81
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 81

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gtcaccttg gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 82
 <211> 108
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 82

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 83

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 83

cagagtgtta gcagcagcta c

21

<210> 84

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 84

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 85

<211> 9

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 85
 ggtgcatcc

9

<210> 86
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 86
 Gly Ala Ser
 1

<210> 87
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 87
 cagcagtatg gtagctcacc ttggacg

27

<210> 88
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Tổng hợp
 <400> 88
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 89
 <211> 1165
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> hLEPR P48357
 <400> 89
 Met Ile Cys Gln Lys Phe Cys Val Val Leu Leu His Trp Glu Phe Ile
 1 5 10 15

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

260	265	270
Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val		
275	280	285
Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr		
290	295	300
Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser		
305	310	315 320
Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe		
	325	330 335
Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys		
	340	345 350
Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp		
	355	360 365
Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val		
	370	375 380
Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys		
385	390	395 400
Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His		
	405	410 415
Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile		
	420	425 430
Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg		
	435	440 445
Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu		
	450	455 460
Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His		
465	470	475 480
Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr		
	485	490 495
Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp		
	500	505 510

Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys
 515 520 525
 Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys
 530 535 540
 Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys
 545 550 555 560
 Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu
 565 570 575
 Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys
 580 585 590
 Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala
 595 600 605
 Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn
 610 615 620
 Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met
 625 630 635 640
 Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys
 645 650 655
 Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser
 660 665 670
 Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn
 675 680 685
 Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu
 690 695 700
 Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile
 705 710 715 720
 Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser
 725 730 735
 Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser
 740 745 750

Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met
 755 760 765
 Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys
 770 775 780
 Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His
 785 790 795 800
 Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met
 805 810 815
 Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp
 820 825 830
 Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val Ile Val Pro Val
 835 840 845
 Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser His
 850 855 860
 Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro Asn Pro Lys Asn
 865 870 875 880
 Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Pro Glu Thr Phe Glu
 885 890 895
 His Leu Phe Ile Lys His Thr Ala Ser Val Thr Cys Gly Pro Leu Leu
 900 905 910
 Leu Glu Pro Glu Thr Ile Ser Glu Asp Ile Ser Val Asp Thr Ser Trp
 915 920 925
 Lys Asn Lys Asp Glu Met Met Pro Thr Thr Val Val Ser Leu Leu Ser
 930 935 940
 Thr Thr Asp Leu Glu Lys Gly Ser Val Cys Ile Ser Asp Gln Phe Asn
 945 950 955 960
 Ser Val Asn Phe Ser Glu Ala Glu Gly Thr Glu Val Thr Tyr Glu Asp
 965 970 975
 Glu Ser Gln Arg Gln Pro Phe Val Lys Tyr Ala Thr Leu Ile Ser Asn
 980 985 990
 Ser Lys Pro Ser Glu Thr Gly Glu Glu Gln Gly Leu Ile Asn Ser Ser

995						1000					1005				
Val	Thr	Lys	Cys	Phe	Ser	Ser	Lys	Asn	Ser	Pro	Leu	Lys	Asp	Ser	
1010						1015					1020				
Phe	Ser	Asn	Ser	Ser	Trp	Glu	Ile	Glu	Ala	Gln	Ala	Phe	Phe	Ile	
1025						1030					1035				
Leu	Ser	Asp	Gln	His	Pro	Asn	Ile	Ile	Ser	Pro	His	Leu	Thr	Phe	
1040						1045					1050				
Ser	Glu	Gly	Leu	Asp	Glu	Leu	Leu	Lys	Leu	Glu	Gly	Asn	Phe	Pro	
1055						1060					1065				
Glu	Glu	Asn	Asn	Asp	Lys	Lys	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Val	Thr	
1070						1075					1080				
Ser	Ile	Lys	Lys	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	Leu	Leu	Thr	Asp	Lys	Ser	
1085						1090					1095				
Arg	Val	Ser	Cys	Pro	Phe	Pro	Ala	Pro	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Ile	
1100						1105					1110				
Arg	Val	Leu	Gln	Asp	Ser	Cys	Ser	His	Phe	Val	Glu	Asn	Asn	Ile	
1115						1120					1125				
Asn	Leu	Gly	Thr	Ser	Ser	Lys	Lys	Thr	Phe	Ala	Ser	Tyr	Met	Pro	
1130						1135					1140				
Gln	Phe	Gln	Thr	Cys	Ser	Thr	Gln	Thr	His	Lys	Ile	Met	Glu	Asn	
1145						1150					1155				
Lys	Met	Cys	Asp	Leu	Thr	Val									
1160						1165									
<210> 90															
<211> 846															
<212> PRT															
<213> Trình tự nhân tạo															
<220>															
<223> hLEPR-mmh aa 1-818: F22-D839 trong P48357 aa 819-846:đuôi myc-myc-hexahistidin															
<400> 90															
Phe	Asn	Leu	Ser	Tyr	Pro	Ile	Thr	Pro	Trp	Arg	Phe	Lys	Leu	Ser	
1						5					10			15	

Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu
 20 25 30

Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu
 35 40 45

Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr
 50 55 60

Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu
 65 70 75 80

Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser
 85 90 95

Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu
 100 105 110

Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys
 115 120 125

Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu
 130 135 140

Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe
 145 150 155 160

Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu
 165 170 175

Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu
 180 185 190

Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser Pro Leu Met Ser Val
 195 200 205

Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met
 210 215 220

Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro
 225 230 235 240

Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser
 245 250 255

Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu

260	265	270
Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg		
275	280	285
Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro		
290	295	300
Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu		
305	310	315 320
Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu		
	325	330 335
Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala		
	340	345 350
Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser		
	355	360 365
Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe		
	370	375 380
Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg		
	385	390 395 400
Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu		
	405	410 415
Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr		
	420	425 430
Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser		
	435	440 445
Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro		
	450	455 460
Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln		
	465	470 475 480
Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His		
	485	490 495
Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser		
	500	505 510

Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile
 515 520 525

Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu
 530 535 540

Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val
 545 550 555 560

Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser
 565 570 575

Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys
 580 585 590

Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala
 595 600 605

Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe
 610 615 620

Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr
 625 630 635 640

Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln
 645 650 655

Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu
 660 665 670

Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala
 675 680 685

His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala
 690 695 700

Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val
 705 710 715 720

Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser
 725 730 735

Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu
 740 745 750

Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser
 755 760 765

Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu
 770 775 780

Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys
 785 790 795 800

Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln
 805 810 815

Ser Asp Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln
 820 825 830

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
 835 840 845

<210> 91

<211> 1051

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hLEPR-mFc aa 1-818: F22-D839 trong P48357 aa 819-1051: IgG2a chuột
 (E98-K330 trong P01863)

<400> 91

Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys
 1 5 10 15

Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu
 20 25 30

Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu
 35 40 45

Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr
 50 55 60

Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu
 65 70 75 80

Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser
 85 90 95

Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu
 100 105 110

Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys
 115 120 125

Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu
 130 135 140

Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe
 145 150 155 160

Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu
 165 170 175

Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu
 180 185 190

Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser Pro Leu Met Ser Val
 195 200 205

Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met
 210 215 220

Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro
 225 230 235 240

Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser
 245 250 255

Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu
 260 265 270

Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg
 275 280 285

Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro
 290 295 300

Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu
 305 310 315 320

Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu
 325 330 335

Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala
 340 345 350

Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser
 355 360 365
 Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe
 370 375 380
 Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg
 385 390 395 400
 Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu
 405 410 415
 Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr
 420 425 430
 Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser
 435 440 445
 Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro
 450 455 460
 Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln
 465 470 475 480
 Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His
 485 490 495
 Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser
 500 505 510
 Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile
 515 520 525
 Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu
 530 535 540
 Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val
 545 550 555 560
 Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser
 565 570 575
 Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys
 580 585 590
 Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala

595	600	605
Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe		
610	615	620
Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr		
625	630	635 640
Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln		
	645	650 655
Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu		
	660	665 670
Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala		
	675	680 685
His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala		
	690	695 700
Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val		
705	710	715 720
Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser		
	725	730 735
Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu		
	740	745 750
Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser		
	755	760 765
Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu		
	770	775 780
Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys		
785	790	795 800
Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln		
	805	810 815
Ser Asp Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys		
	820	825 830
Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro		
	835	840 845

Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr
 850 855 860
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser
 865 870 875 880
 Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His
 885 890 895
 Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile
 900 905 910
 Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn
 915 920 925
 Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys
 930 935 940
 Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu
 945 950 955 960
 Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe
 965 970 975
 Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu
 980 985 990
 Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr
 995 1000 1005
 Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu
 1010 1015 1020
 Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn
 1025 1030 1035
 His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 1040 1045 1050

<210> 92

<211> 1045

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hLEPR-hFc aa 1-818: F22-D839 trong P48357 aa 819-1045: IgG1 người

(D104-K330 trong P01857)

<400> 92

Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys
 1 5 10 15

Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu
 20 25 30

Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu
 35 40 45

Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr
 50 55 60

Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu
 65 70 75 80

Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser
 85 90 95

Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu
 100 105 110

Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys
 115 120 125

Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu
 130 135 140

Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe
 145 150 155 160

Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu
 165 170 175

Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu
 180 185 190

Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser Pro Leu Met Ser Val
 195 200 205

Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met
 210 215 220

Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro
 225 230 235 240

Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser
 245 250 255
 Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu
 260 265 270
 Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg
 275 280 285
 Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro
 290 295 300
 Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu
 305 310 315 320
 Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu
 325 330 335
 Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala
 340 345 350
 Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser
 355 360 365
 Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe
 370 375 380
 Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg
 385 390 395 400
 Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu
 405 410 415
 Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr
 420 425 430
 Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser
 435 440 445
 Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro
 450 455 460
 Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln
 465 470 475 480

Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His
 485 490 495
 Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser
 500 505 510
 Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile
 515 520 525
 Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu
 530 535 540
 Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val
 545 550 555 560
 Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser
 565 570 575
 Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys
 580 585 590
 Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala
 595 600 605
 Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe
 610 615 620
 Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr
 625 630 635 640
 Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln
 645 650 655
 Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu
 660 665 670
 Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala
 675 680 685
 His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala
 690 695 700
 Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val
 705 710 715 720
 Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser

725	730	735
Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu		
740	745	750
Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser		
755	760	765
Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu		
770	775	780
Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys		
785	790	795 800
Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln		
	805	810 815
Ser Asp Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		
	820	825 830
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
	835	840 845
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
	850	855 860
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
865	870	875 880
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
	885	890 895
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
	900	905 910
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
	915	920 925
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
	930	935 940
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
945	950	955 960
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
	965	970 975

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 980 985 990
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 995 1000 1005
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 1010 1015 1020
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 1025 1030 1035
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 1040 1045
 <210> 93
 <211> 844
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> MfLEPR-mmh aa 1-816: LEPR khi đuôi dài (F22-D837 trong
 XP_005543194.1 có thay thế T827A) aa 817-844: đuôi
 myc-myc-hexahistidin
 <400> 93
 Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu
 20 25 30
 Ser Lys Asn Thr Ser Asn Leu Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu
 35 40 45
 Phe Asn Ser Ser Asp Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe
 50 55 60
 His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala
 65 70 75 80
 Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Ser Val
 85 90 95
 Phe Gln Gln Met Gly Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly
 100 105 110

Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Pro
 115 120 125

Phe Lys Asn Tyr Lys His Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu
 130 135 140

Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met
 145 150 155 160

Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu Arg Cys Glu Cys Leu Val Pro
 165 170 175

Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile
 180 185 190

Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser Pro Leu Met Ser Val Gln Pro
 195 200 205

Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu Arg Met Glu Ile
 210 215 220

Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val
 225 230 235 240

Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Glu Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr
 245 250 255

Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val
 260 265 270

Asp Gly Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Gly Lys
 275 280 285

Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro His Val
 290 295 300

Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser
 305 310 315 320

Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Asn Glu Asn Lys
 325 330 335

Ile Val Ser Ser Lys Lys Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys
 340 345 350

Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser Lys Val

355	360	365
Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr		
370	375	380
Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg Tyr Ala		
385	390	395 400
Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp		
	405	410 415
Gly His Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Asn Thr Ile Gln		
	420	425 430
Ser Leu Ala Gly Ser Thr Leu Gln Leu Arg Tyr Arg Arg Ser Ser Leu		
	435	440 445
Tyr Cys Phe Asp Ile Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Lys Pro Lys Asp		
	450	455 460
Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Val Phe Gln Pro Ile		
465	470	475 480
Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Pro Leu		
	485	490 495
Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val		
	500	505 510
Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Ile Lys Asn Ile		
	515	520 525
Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn		
	530	535 540
Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Ile Gln Trp		
545	550	555 560
Lys Met Tyr Asp Val Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro		
	565	570 575
Val Pro Asp Phe Cys Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg		
	580	585 590
Ser Asp Gly Leu Gly Leu Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr		
	595	600 605

Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg
 610 615 620
 Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu
 625 630 635 640
 Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr
 645 650 655
 Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val
 660 665 670
 Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr
 675 680 685
 Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe
 690 695 700
 Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val Gln Ser
 705 710 715 720
 Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Leu Ser Trp Ile
 725 730 735
 Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys
 740 745 750
 Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser
 755 760 765
 Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr
 770 775 780
 Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys
 785 790 795 800
 Ile Ile Asn Ser Phe Ala Gln Asp Asn Thr Glu Lys His Gln Asn Asp
 805 810 815
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu
 820 825 830
 Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
 835 840

<210> 94
 <211> 846
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> mLEPR-mmh aa 1-818: LEPR chuột (L22-G839 của NP_666258.2) aa
 819-846: đuôi myc-myc-hexahistidin
 <400> 94
 Leu Asn Leu Ala Tyr Pro Ile Ser Pro Trp Lys Phe Lys Leu Phe Cys
 1 5 10 15
 Gly Pro Pro Asn Thr Thr Asp Asp Ser Phe Leu Ser Pro Ala Gly Ala
 20 25 30
 Pro Asn Asn Ala Ser Ala Leu Lys Gly Ala Ser Glu Ala Ile Val Glu
 35 40 45
 Ala Lys Phe Asn Ser Ser Gly Ile Tyr Val Pro Glu Leu Ser Lys Thr
 50 55 60
 Val Phe His Cys Cys Phe Gly Asn Glu Gln Gly Gln Asn Cys Ser Ala
 65 70 75 80
 Leu Thr Asp Asn Thr Glu Gly Lys Thr Leu Ala Ser Val Val Lys Ala
 85 90 95
 Ser Val Phe Arg Gln Leu Gly Val Asn Trp Asp Ile Glu Cys Trp Met
 100 105 110
 Lys Gly Asp Leu Thr Leu Phe Ile Cys His Met Glu Pro Leu Pro Lys
 115 120 125
 Asn Pro Phe Lys Asn Tyr Asp Ser Lys Val His Leu Leu Tyr Asp Leu
 130 135 140
 Pro Glu Val Ile Asp Asp Ser Pro Leu Pro Pro Leu Lys Asp Ser Phe
 145 150 155 160
 Gln Thr Val Gln Cys Asn Cys Ser Leu Arg Gly Cys Glu Cys His Val
 165 170 175
 Pro Val Pro Arg Ala Lys Leu Asn Tyr Ala Leu Leu Met Tyr Leu Glu
 180 185 190
 Ile Thr Ser Ala Gly Val Ser Phe Gln Ser Pro Leu Met Ser Leu Gln
 195 200 205

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

Tyr Cys Pro Asp Ser Pro Ser Ile His Pro Thr Ser Glu Pro Lys Asn
 450 455 460

Cys Val Leu Gln Arg Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Val Phe Gln Pro Ile
 465 470 475 480

Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu
 485 490 495

Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val
 500 505 510

Lys Pro Leu Pro Pro Ser Asn Val Lys Ala Glu Ile Thr Val Asn Thr
 515 520 525

Gly Leu Leu Lys Val Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn
 530 535 540

Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Ile Gln Trp
 545 550 555 560

Lys Thr His Glu Val Phe Asp Ala Lys Ser Lys Ser Ala Ser Leu Leu
 565 570 575

Val Ser Asp Leu Cys Ala Val Tyr Val Val Gln Val Arg Cys Arg Arg
 580 585 590

Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Ser Pro Ala Tyr Thr
 595 600 605

Leu Val Met Asp Val Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg
 610 615 620

Lys Met Asp Gly Asp Val Thr Lys Lys Glu Arg Asn Val Thr Leu Leu
 625 630 635 640

Trp Lys Pro Leu Thr Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Arg Arg Tyr
 645 650 655

Val Val Lys His Arg Thr Ala His Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val
 660 665 670

Gly Asn Arg Thr Asn Leu Thr Phe Leu Trp Thr Glu Pro Ala His Thr
 675 680 685

Val Thr Val Leu Ala Val Asn Ser Leu Gly Ala Ser Leu Val Asn Phe

690 695 700
 Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val Ser Ala Val Glu Ser
 705 710 715 720
 Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Ser Ser Ser Cys Val Ile Leu Ser Trp Thr
 725 730 735
 Leu Ser Pro Asp Asp Tyr Ser Leu Leu Tyr Leu Val Ile Glu Trp Lys
 740 745 750
 Ile Leu Asn Glu Asp Asp Gly Met Lys Trp Leu Arg Ile Pro Ser Asn
 755 760 765
 Val Lys Lys Phe Tyr Ile His Asp Asn Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr
 770 775 780
 Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Val Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys
 785 790 795 800
 Ile Ile Asn Gly Phe Thr Lys Asp Ala Ile Asp Lys Gln Gln Asn Asp
 805 810 815
 Ala Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln
 820 825 830
 Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
 835 840 845
 <210> 95
 <211> 846
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> rLEPR-mmh aa 1-818: LEPR chuột (L22-G839 trong NP_036728.1) aa
 819-846: đuôi myc-myc-hexahistidin
 <400> 95
 Leu Asn Leu Ala Tyr Pro Thr Ser Pro Trp Arg Phe Lys Leu Phe Cys
 1 5 10 15
 Ala Pro Pro Ser Thr Thr Asp Asp Ser Phe Leu Ser Pro Ala Gly Val
 20 25 30
 Pro Asn Asn Thr Ser Ser Leu Lys Gly Ala Ser Glu Ala Leu Val Glu
 35 40 45

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

290	295	300
Phe Thr Thr Gln Asp Val Met Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser		
305	310	315 320
Val Gly Ser Asn Ala Ser Phe Cys Cys Ile Tyr Lys Asn Glu Asn Gln		
	325	330 335
Thr Ile Ser Ser Lys Gln Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys		
	340	345 350
Ile Pro Glu Thr Gln Tyr Asn Thr Val Ser Asp His Ile Ser Lys Val		
	355	360 365
Thr Phe Ser Asn Leu Lys Ala Thr Arg Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr		
	370	375 380
Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu Gln Ala Cys His His Arg Tyr Ala		
385	390	395 400
Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp		
	405	410 415
Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg Trp Ser Pro Ser Thr Ile Gln		
	420	425 430
Ser Leu Val Gly Ser Thr Val Gln Leu Arg Tyr His Arg Arg Ser Leu		
	435	440 445
Tyr Cys Pro Asp Asn Pro Ser Ile Arg Pro Thr Ser Glu Leu Lys Asn		
	450	455 460
Cys Val Leu Gln Thr Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Val Phe Gln Pro Ile		
465	470	475 480
Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu		
	485	490 495
Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val		
	500	505 510
Lys Pro Leu Pro Pro Ser Asn Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Thr		
	515	520 525
Gly Leu Leu Lys Val Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn		
	530	535 540

Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu Asn Gly Lys Glu Ile Gln Trp
 545 550 555 560
 Lys Thr His Glu Val Phe Asp Ala Lys Ser Lys Ser Ala Ser Leu Pro
 565 570 575
 Val Ser Asp Leu Cys Ala Val Tyr Val Val Gln Val Arg Cys Arg Arg
 580 585 590
 Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Ser Pro Ala Tyr Thr
 595 600 605
 Leu Val Met Asp Val Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg
 610 615 620
 Ile Met Asp Gly Asp Ile Thr Lys Lys Glu Arg Asn Val Thr Leu Leu
 625 630 635 640
 Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Arg Arg Tyr
 645 650 655
 Val Val Lys His Arg Thr Ala His Asn Gly Thr Trp Ser Gln Asp Val
 660 665 670
 Gly Asn Gln Thr Asn Leu Thr Phe Leu Trp Ala Glu Ser Ala His Thr
 675 680 685
 Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Leu Val Asn Phe
 690 695 700
 Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ala Val Gln Ser
 705 710 715 720
 Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Ser Ser Ser Cys Val Ile Leu Ser Trp Thr
 725 730 735
 Leu Ser Pro Asn Asp Tyr Ser Leu Leu Tyr Leu Val Ile Glu Trp Lys
 740 745 750
 Asn Leu Asn Asp Asp Asp Gly Met Lys Trp Leu Arg Ile Pro Ser Asn
 755 760 765
 Val Asn Lys Tyr Tyr Ile His Asp Asn Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr
 770 775 780

Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Val Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys
785 790 795 800

Ile Ile Asn Gly Phe Thr Lys Asp Asp Ile Ala Lys Gln Gln Asn Asp
805 810 815

Ala Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln
820 825 830

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
835 840 845