



(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)



1-0034397

(51)⁷ A61K 39/395; C07K 16/22

(13) B

-
- (21) 1-2016-00661 (22) 30/07/2014
(86) PCT/US2014/048957 30/07/2014 (87) WO/2015/017576 05/02/2015
(30) 61/859,926 30/07/2013 US; 61/864,036 09/08/2013 US; 61/911,834 04/12/2013 US;
61/913,885 09/12/2013 US
(45) 26/12/2022 417 (43) 25/04/2016 337A
(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591, USA
(72) GROMADA, Jesper (US); LATRES, Esther (US); MURPHY, Andrew, J. (US);
YANCOPOULOS, George, D. (US); MORTON, Lori, C. (US).
(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK
CO., LTD.)
-

(54) KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP LIÊN KẾT VỚI ACTIVIN A VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể được phân lập hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó liên kết với activin A và dược phẩm chứa chúng. Theo một số phương án nhất định của sáng chế, kháng thể này là các kháng thể đầy đủ của người liên kết với activin A với ái lực cao. Các kháng thể theo sáng chế có thể dùng để điều trị các bệnh và rối loạn đặc trưng bởi sự giảm khối lượng cơ hoặc sức mạnh cơ, như chứng mất mô cơ, chứng suy mòn, tổn thương cơ, hao mòn cơ/teo cơ, bệnh ung thư, bệnh xơ hóa, và giảm cân. Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể dung kết hợp với protein liên kết GDF8 để điều trị các bệnh và rối loạn đặc trưng bởi sự giảm khối lượng cơ hoặc sức mạnh cơ. Các kháng thể theo sáng chế cũng có thể dùng để phòng ngừa, điều trị hoặc làm thuyên giảm rối loạn và bệnh gây bởi, thúc đẩy bởi, làm trầm trọng bởi, và/hoặc nặng thêm bởi activin A, như bệnh xơ hóa thận.

		1 mM mAb + 50 mM Bufferin A														
o-Antibin A	mAb khuếch đại gD (nm)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (-)	13 (-)	
HH10440P2	1,66 ± 0,26	1	0,32	0,36	0,39	0,33	1,39	1,61	1,68	1,61	1,67	0,83	1,21	0,47	0,29	
HH10468P2	1,65 ± 0,37	2	0,33	0,39	0,40	0,41	1,41	1,68	1,73	1,66	1,70	1,68	0,79	0,41	0,28	
HH10442P2	1,75 ± 0,30	3	0,35	0,36	0,39	0,27	1,33	1,55	1,59	1,44	1,50	0,99	0,99	0,46	0,20	
HH10423P	1,62 ± 0,25	4	0,51	0,58	0,59	0,27	0,28	1,48	1,32	1,49	1,31	0,60	0,79	0,30	0,26	
HH10430P	1,67 ± 0,23	5	1,55	1,84	1,76	0,33	0,27	0,62	0,26	0,31	0,31	0,20	-0,03	0,43	0,27	
HH10429P	1,71 ± 0,29	6	1,24	1,37	1,40	1,39	0,65	0,32	0,26	0,34	0,29	0,16	-0,01	0,39	0,24	
HH10432P2	1,54 ± 0,45	7	1,36	1,58	1,63	1,32	0,28	0,32	0,24	0,29	0,27	0,15	-0,05	0,30	0,17	
HH10436P2	1,66 ± 0,45	8	1,22	1,32	1,39	1,41	0,28	0,36	0,23	0,30	0,27	0,16	-0,04	0,23	0,14	
HH10440P2	1,44 ± 0,35	9	1,17	1,37	1,40	1,22	0,29	0,41	0,27	0,32	0,28	0,13	-0,05	0,21	0,13	
Đối chứng 1	1,33 ± 0,14	10	1,37	1,37	1,30	1,14	0,24	0,24	0,13	0,20	0,25	0,15	-0,05	0,27	0,12	
Đối chứng 3	0,78 ± 0,10	11	0,69	0,35	0,15	0,58	0,06	0,01	0,01	0,00	0,03	-0,02	0,21	0,15	0,23	
Đối chứng isotyp	1,48 ± 0,27	12 (-)	0,27	0,25	0,23	0,16	0,22	0,22	0,14	0,20	0,23	0,26	0,02	0,15	0,32	
Đối chứng isotyp	1,18 ± 0,09	13 (-)	0,22	0,02	0,01	0,02	0,06	0,10	0,00	0,01	0,06	0,03	0,20	0,02	0,24	

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng đặc hiệu đối với activin A, và phương pháp sử dụng chúng, bao gồm phương pháp sử dụng kháng thể đặc hiệu đối với activin A kết hợp với chất ức chế myostatin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Activin thuộc về siêu họ yếu tố sinh trưởng biến đổi beta (TGF- β) và có phổ tác dụng sinh học rộng đối với quá trình tăng sinh, biệt hóa tế bào và chết tế bào theo chương trình. Activin là các homodime (đồng dime) hoặc heterodime (dị dime) của inhibin β A, inhibin β B, inhibin β C và inhibin β E, tổ hợp khác nhau của chúng tạo ra các thành viên khác nhau của nhóm protein activin. Ví dụ, activin A là homodime của inhibin β A và activin B là homodime của inhibin β B, trong khi activin AB là heterodime của inhibin β A và inhibin β B và activin AC là heterodime của inhibin β A và inhibin β C (Tsuchida, K. *et al.*, Cell Commun Signal 7:15 (2009)).

Activin A liên kết với và hoạt hóa phức chất thụ thể trên bề mặt của các tế bào được gọi là thụ thể activin typ II (typ IIA và typ IIB, còn được gọi là ActRIIA và ActRIIB tương ứng). Sự hoạt hóa các thụ thể này dẫn tới sự phosphoryl hóa thụ thể activin typ I (ví dụ, Alk4 hoặc 7), điều này lại dẫn tới sự phosphoryl hóa protein SMAD 2 và 3, tạo ra phức chất SMAD (với SMAD4), và chuyển đoạn phức chất SMAD này với nhân tế bào, trong đó SMAD2 và SMAD3 có chức năng điều hòa quá trình phiên mã các gen khác nhau (Sozzani, S. and Musso, T., Blood 117(19):5013-5015 (2011)). Nhiều phối tử khác liên kết với và hoạt hóa ActRIIB bao gồm GDF8 (myostatin), activin B, activin AB, Inhibin A, Inhibin B, GDF3, GDF11, Nodal, BMP2, BMP4, BMP7, BMP9, và BMP10. Việc ức chế sự tương tác của ActRIIB với phối tử của nó có thể dẫn tới các tác dụng sinh lý có lợi. Ví dụ, GDF8 đóng vai trò chính trong quá trình phát triển và duy trì cơ xương, tác dụng như chất điều hòa âm khối lượng cơ (McPherron AC *et al.* (1997). Nature 387(6628):83-90). Việc sử dụng ActRIIB-Fc (tức là phần ngoại bào của thụ thể typ IIB, ActRIIB, được ổn định bằng cách dung hợp với vùng Fc của IgG) dẫn tới làm tăng đáng kể khối lượng cơ xương và cải thiện trọng lượng cơ và sức mạnh cơ bắp ở chuột (Lee SJ, *et al.* (2005) Proc Natl Acad Sci, Mỹ 102(50):18117- 18122). Hiệu quả của ActRIIB-Fc

giảm đi nhưng không mất đi ở chuột không có *Mstn* (myostatin) chứng tỏ rằng (các) phối tử ActRIIB khác ngoài myostatin có thể hoạt động như chất điều hòa âm đối với quá trình sinh trưởng của cơ. Do đó, cần có chất ức chế sự truyền tín hiệu ActRIIB khác có thể có lợi trong lâm sàng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chất ức chế sự truyền tín hiệu ActRIIB khác có thể có lợi trong lâm sàng.

Sáng chế đề cập đến các kháng thể liên kết với inhibin βA và dime chứa inhibin βA , ví dụ, activin A, activin AB v.v.. Ngoài các tác dụng khác, các kháng thể theo sáng chế có thể dùng để ức chế sự truyền tín hiệu trung gian bởi activin A, tạo ra kết quả lâm sàng có lợi nhờ ức chế sự truyền tín hiệu trung gian bởi activin A, ví dụ để điều trị các bệnh và rối loạn gây bởi hoặc liên quan đến hoạt tính của activin A và/hoặc sự truyền tín hiệu activin A. Các kháng thể theo sáng chế còn dùng để sử dụng kết hợp với chất ức chế phối tử khác của thụ thể ActRIIA và ActRIIB, như chất ức chế GDF8.

Các kháng thể theo sáng chế có thể có chiều dài đầy đủ (ví dụ, kháng thể IgG1, IgG4) hoặc có thể chỉ chứa phần liên kết kháng nguyên (ví dụ, đoạn Fab, $F(ab')_2$ hoặc scFv), và có thể được cải biến để ảnh hưởng đến chức năng, ví dụ, để làm mất chức năng của tế bào thực hiện sót lại (Reddy *et al.*, J Immunol 164:1925-1933 (2000)).

Sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu với activin A với hằng số cân bằng liên kết (K_a) nhỏ hơn khoảng 500nM và hằng số cân bằng phân ly (K_D) nhỏ hơn khoảng 5pM như được xác định trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C. Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể phân lập, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu với activin A với K_D nhỏ hơn khoảng 4pM như được xác định trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C. Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể phân lập, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu với activin A với hằng số cân bằng liên kết (K_a) nhỏ hơn khoảng 500nM.

Sáng chế đề cập đến kháng thể phân lập, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu với activin A và ức chế sự liên kết của ít nhất một thụ thể activin A với activin A. Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể phân lập, hoặc đoạn liên

kết với kháng nguyên của nó, ức chế sự liên kết của activin A với thụ thể activin A với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 80pM như được xác định trong thử nghiệm sinh học liên kết thụ thể/phối tử *in vivo* ở nhiệt độ 25°C. Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể phân lập, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, ức chế sự liên kết của activin A với thụ thể activin A với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 60pM như được xác định trong thử nghiệm sinh học liên kết thụ thể/phối tử *in vivo* ở nhiệt độ 25°C. Sáng chế còn đề xuất kháng thể phân lập, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, liên kết đặc hiệu với activin A và ức chế sự hoạt hóa ít nhất một thụ thể activin A bởi activin A. Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể phân lập, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, không ức chế đáng kể sự liên kết của activin A với thụ thể activin typ II. Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể phân lập, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, ức chế sự liên kết của activin A với thụ thể activin A được chọn từ nhóm bao gồm thụ thể activin typ IIA (ActRIIA), thụ thể activin typ IIB (ActRIIB), và thụ thể activin typ I. Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể phân lập, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, ức chế sự hoạt hóa trung gian bởi activin A đối với quá trình truyền tín hiệu của phức chất SMAD.

Sáng chế đề cập đến kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable region: HCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nhận biết số 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 106, 114, 122, 130, 138, 154, 162, 170, 178, 186, 194, và 202, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (light chain variable region: LCVR) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nhận biết số 10, 26, 42, 58, 74, 90, 146, và 210, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó chứa cặp trình tự HCVR và LCVR (HCVR/LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nhận biết số 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/90, 106/90, 114/90, 122/90, 130/90, 138/146, 154/146, 162/146, 170/146, 178/146, 186/146, 194/146, và 202/210.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó

chứa vùng CDR3 của chuỗi nặng (HCDR3) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nhận biết số 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 112, 120, 128, 136, 144, 160, 168, 176, 184, 192, 200, và 208, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và chứa vùng CDR3 của chuỗi nhẹ (LCDR3) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nhận biết số 16, 32, 48, 64, 80, 96, 152, và 216, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Theo một số phương án nhất định, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó chứa cặp trình tự axit amin HCDR3/LCDR3 được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nhận biết số 8/16, 24/32, 40/48, 56/64, 72/80, 88/96, 104/96, 112/96, 120/96, 128/96, 136/96, 144/152, 160/152, 168/152, 176/152, 184/152, 192/152, 200/152, và 208/216.

Sáng chế còn đề cập đến kháng thể hoặc đoạn kháng thể còn chứa vùng CDR1 của chuỗi nặng (HCDR1) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nhận biết số 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 108, 116, 124, 132, 140, 156, 164, 172, 180, 188, 196, và 204, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; vùng CDR2 của chuỗi nặng (HCDR2) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nhận biết số 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 110, 118, 126, 134, 142, 158, 166, 174, 182, 190, 198, và 206, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; vùng CDR1 của chuỗi nhẹ (LCDR1) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nhận biết số 12, 28, 44, 60, 76, 92, 148, và 212, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%; và vùng CDR2 của chuỗi nhẹ (LCDR2) có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nhận biết số 14, 30, 46, 62, 78, 94, 150, và 214, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Một số kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên theo sáng chế để làm ví dụ không làm giới hạn phạm vi sáng chế chứa các vùng HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1- LCDR2-LCDR3 tương ứng có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nhận biết 4-6-8-12-14-16 (ví dụ, H4H10423P); 20-22-24-28-30-32 (ví dụ H4H10424P); 36-38-40-44-46-48 (ví dụ, H4H10426P);

52-54-56-60-62-64 (ví dụ H4H10429P); 68-70-72-74-76-78-80 (ví dụ, H4H10430P); 84-86-88-92-94-96 (H4H10432P); 100-102-104-92-94-96 (ví dụ, H4H10433P2); 108-110-112-92-94-96 (ví dụ, H4H10436P2); 116-118-120-92-94-96 (ví dụ, H4H10437P2); 124-126-128-92-94-96 (ví dụ, H4H10438P2); 132-134-136-92-94-96 (ví dụ, H4H10440P2); 140-142-144-148- 150-152 (ví dụ, H4H10442P2); 156-158-160-148-150-152 (H4H10445P2); 164-166-168-148-150-152 (H4H10446P2); 172-174-176-148-150-152 (H4H10447P2); 180-182-184-148-150-152 (H4H10448P2); 188-190-192-148-150-152 (H4H10452P2); 196-198-200-148-150-152 (H4H10468P2); và 204-206-208-212-214-216 (H2aM10965N).

Theo một phương án có liên quan, sáng chế bao gồm kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với activin A, trong đó kháng thể hoặc đoạn kháng thể này chứa các vùng CDR của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nằm trong trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (HCVR/LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm trình tự nhận biết số 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/90, 106/90, 114/90, 122/90, 130/90, 138/146, 154/146, 162/146, 170/146, 178/146, 186/146, 194/146, và 202/210. Phương pháp và kỹ thuật xác định vùng CDR trong trình tự axit amin của HCVR và LCVR là đã biết rõ trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng để xác định các vùng CDR trong trình tự axit amin của HCVR và/hoặc LCVR đã nêu được bộc lộ ở đây. Các quy ước làm ví dụ có thể được sử dụng để xác định ranh giới của vùng CDR bao gồm, ví dụ, định nghĩa Kabat, định nghĩa Chothia, và định nghĩa AbM. Theo thuật ngữ chung, định nghĩa Kabat dựa trên sự thay đổi trình tự, định nghĩa Chothia dựa trên vị trí của vùng có cấu trúc vòng, và định nghĩa AbM là sự thỏa hiệp giữa định nghĩa Kabat và định nghĩa Chothia. Ví dụ, xem tài liệu: Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); và Martin *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. Mỹ* 86:9268-9272 (1989). Các cơ sở dữ liệu công khai cũng có thể dùng để xác định trình tự vùng CDR trong kháng thể.

Sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa kháng thể kháng activin A hoặc các đoạn của nó. Ví dụ, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic này mã hóa trình tự axit amin của vùng HCVR bất kỳ nêu trong bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic này chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic của vùng HCVR bất kỳ nêu trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ tương

đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của vùng LCVR bất kỳ nêu trong bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic của vùng LCVR bất kỳ nêu trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của vùng HCDR1 bất kỳ nêu trong bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic của vùng HCDR1 bất kỳ nêu trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin bất kỳ của vùng HCDR2 bất kỳ nêu trong bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic của HCDR2 bất kỳ nêu trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của vùng HCDR3 bất kỳ nêu trong bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic của vùng HCDR3 bất kỳ nêu trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của vùng LCDR1 bất kỳ nêu trong bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic của vùng LCDR1 bất kỳ nêu trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của vùng LCDR2 bất kỳ nêu trong bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic của vùng LCDR2 bất kỳ nêu trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít

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

Sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của vùng LCDR3 bất kỳ nêu trong bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic của vùng LCDR3 bất kỳ nêu trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%.

Sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa vùng HCVR, trong đó vùng HCVR này chứa tập hợp của ba vùng CDR (tức là HCDR1-HCDR2-HCDR3), trong đó tập hợp trình tự axit amin của vùng HCDR1-HCDR2-HCDR3 là như được xác định bởi kháng thể kháng activin A làm ví dụ bất kỳ nêu trong bảng 1.

Sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa vùng LCVR, trong đó vùng LCVR này chứa tập hợp của ba vùng CDR (tức là LCDR1-LCDR2-LCDR3), trong đó tập hợp trình tự axit amin LCDR1-LCDR2-LCDR3 là như được xác định bởi kháng thể kháng activin A làm ví dụ bất kỳ nêu trong bảng 1.

Sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic mã hóa cả vùng HCVR và vùng LCVR, trong đó vùng HCVR chứa trình tự axit amin của vùng HCVR bất kỳ nêu trong bảng 1, và trong đó vùng LCVR chứa trình tự axit amin của vùng LCVR bất kỳ nêu trong bảng 1. Theo một số phương án nhất định, phân tử axit nucleic chứa trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic của vùng HCVR bất kỳ nêu trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 98% hoặc ít nhất 99%, và trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự axit nucleic của vùng LCVR bất kỳ nêu trong bảng 2, hoặc trình tự gần giống của chúng có mức 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 vùng HCVR và vùng LCVR, trong đó vùng HCVR và vùng LCVR này đều có nguồn gốc từ cùng một kháng thể kháng activin A nêu trong bảng 1.

Sáng chế còn đề cập đến vector biểu hiện tái tổ hợp có thể biểu hiện polypeptit chứa vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể kháng activin A. Ví dụ, sáng chế bao gồm vector biểu hiện tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic bất kỳ nêu trên, tức là phân tử axit nucleic mã hóa trình tự vùng HCVR, LCVR, và/hoặc CDR bất kỳ như nêu trong bảng 1. Sáng chế cũng bao gồm tế bào vật chủ mà vector nêu trên đã được đưa vào, cũng

như phương pháp tạo ra kháng thể hoặc đoạn kháng thể của chúng bằng cách nuôi cấy tế bào vật chủ trong điều kiện cho phép tạo ra kháng thể hoặc đoạn kháng thể, và thu hồi kháng thể và đoạn kháng thể tạo ra theo cách này.

Sáng chế bao gồm kháng thể kháng activin A có lượng hydrat cacbon thay đổi. Theo một số phương án, việc cải biến để loại bỏ các vị trí glycosyl hóa không mong muốn có thể là hữu ích. Theo một số phương án, việc cải biến để làm thay đổi kiểu glycosyl hóa có thể là hữu ích, ví dụ, cải biến kháng thể để không có gốc fucoza trên mạch oligosacarit, ví dụ, để làm tăng chức năng gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody dependent cellular cytotoxicity: ADC.C) (Shield *et al.* J Biol Chem 277:26733 (2002)). Theo các phương án khác, việc cải biến galactosyl hóa có thể được thực hiện để làm thay đổi chức năng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement dependent cytotoxicity: CDC). Theo một số phương án, kháng thể có thể có kiểu glycosyl hóa được biến đổi để làm giảm đến mức tối thiểu chức năng của tế bào thực hiện. Ví dụ, kháng thể có thể được biến đổi để thu được kháng thể được glycosyl hóa hoặc sialyl hóa bổ sung.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể tái tổ hợp của người hoặc đoạn kháng thể của chúng liên kết đặc hiệu với activin A và chất mang dược dụng. Theo một khía cạnh có liên quan, sáng chế đề cập đến dược phẩm là hỗn hợp của kháng thể kháng activin A và chất điều trị thứ hai. Theo một phương án, chất điều trị thứ hai là chất bất kỳ được kết hợp có lợi với kháng thể kháng activin A. Các chất làm ví dụ có thể được kết hợp có lợi với kháng thể kháng activin A bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất khác có tác dụng ức chế hoạt tính của activin A (bao gồm các kháng thể khác hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, chất ức chế peptit, chất đối kháng có phân tử nhỏ, v.v..) và/hoặc chất không liên kết trực tiếp với activin A nhưng gây cản trở, ngăn chặn hoặc làm giảm sự truyền tín hiệu trung gian bởi activin A. Theo một phương án, chất điều trị thứ hai có tác dụng ức chế, gây cản trở, ngăn chặn và/hoặc làm giảm hoạt tính của phối tử khác của thụ thể ActRIIA và/hoặc ActRIIB (ví dụ, GDF8, activin B, activin AB, inhibin A, inhibin B, GDF3, GDF11, Nodal, BMP2, BMP4, và/hoặc BMP7). Theo một phương án, chất điều trị thứ hai là chất đối kháng kháng GDF8 (ví dụ, kháng thể kháng GDF8 của người hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó). Chất kháng GDF8 làm ví dụ để sử dụng cùng với kháng thể kháng

activin A theo sáng chế bao gồm kháng thể kháng GDF8 của người (ví dụ, kháng thể kháng GDF8 chứa trình tự axit amin của vùng HCVR/LCVR hoặc vùng CDR bất kỳ như nêu trong US 2011-0293630 A1 (ví dụ, H4H1657N2, đây là kháng thể kháng GDF8 có vùng quyết định tính bổ thể của chuỗi nặng (heavy chain complementarity determining region: FICDR) của vùng HCVR chứa trình tự nhận biết số 217 (ví dụ, trình tự của vùng CDR1, CDR2, và CDR3 nêu trong trình tự nhận biết số 218, 219, và 220 tương ứng), và vùng quyết định tính bổ thể của chuỗi nhẹ (light chain complementarity determining region: LCDR) của vùng LCVR chứa trình tự nhận biết số 221 (ví dụ, trình tự của vùng CDR1, CDR2, và CDR3 nêu trong trình tự nhận biết số 222, 223, và 224)). Các liệu pháp điều trị kết hợp và đồng được phẩm khác liên quan đến kháng thể kháng activin A theo sáng chế được bộc lộ ở chỗ khác trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh nữa, sáng chế đề cập đến phân tử liên kết kháng nguyên chứa vùng liên kết đặc hiệu activin A và vùng liên kết đặc hiệu GDF8. Theo một phương án của khía cạnh này của sáng chế, phân tử liên kết kháng nguyên là kháng thể hai giá chứa vùng biến đổi thứ nhất liên kết đặc hiệu với activin A và vùng biến đổi thứ hai liên kết đặc hiệu với GDF8.

Sáng chế mô tả phương pháp điều trị ức chế hoạt tính của activin A bằng cách sử dụng kháng thể kháng activin A hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế, trong đó phương pháp điều trị này bao gồm việc sử dụng lượng hữu hiệu điều trị của dược phẩm chứa kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế. Rối loạn được điều trị là bệnh hoặc tình trạng bất kỳ được cải thiện, làm thuyên giảm, ức chế hoặc phòng ngừa bằng cách loại bỏ, ức chế hoặc làm giảm hoạt tính của activin A hoặc sự truyền tín hiệu của activin A: Kháng thể kháng activin A hoặc đoạn kháng thể theo sáng chế có thể có tác dụng ức chế sự tương tác giữa activin A và thụ thể activin typ II (ví dụ, thụ thể activin typ IIA và/hoặc thụ thể activin typ IIB); giữa activin A và thụ thể activin typ I; giữa activin A và cả thụ thể typ II và typ I; hoặc nếu không thì ức chế hoạt tính truyền tín hiệu của activin A.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng kháng thể kháng activin A hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế để sản xuất thuốc để điều trị bệnh hoặc rối loạn liên quan đến hoặc gây bởi hoạt tính của activin A ở bệnh nhân. Sáng chế còn mô tả phương pháp làm tăng khối lượng cơ hoặc sức mạnh cơ ở đối tượng bằng cách cho đối tượng này sử dụng kháng thể activin A hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó.

Sáng chế còn mô tả phương pháp làm tăng khối lượng cơ hoặc sức mạnh cơ ở đối tượng bằng cách cho đối tượng này sử dụng: protein liên kết đặc hiệu với activin A và protein liên kết đặc hiệu GDF8, hoặc bằng cách cho đối tượng này sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên chứa vùng liên kết đặc hiệu activin A và vùng liên kết đặc hiệu GDF8.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị, phòng ngừa và/hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn đặc trưng bởi sự giảm khối lượng cơ hoặc sức mạnh cơ bằng cách cho đối tượng cần điều trị sử dụng protein liên kết đặc hiệu với activin A (ví dụ, kháng thể kháng activin A). Theo một khía cạnh có liên quan, phương pháp theo sáng chế bao gồm việc điều trị, phòng ngừa và/hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn đặc trưng bởi sự giảm khối lượng cơ hoặc sức mạnh cơ bằng cách cho đối tượng cần điều trị sử dụng protein liên kết đặc hiệu với activin A và protein liên kết đặc hiệu với GDF8 (ví dụ, kháng thể kháng activin A và kháng thể kháng GDF8). Phương pháp theo sáng chế còn bao gồm việc điều trị, phòng ngừa và/hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn đặc trưng bởi sự giảm khối lượng cơ hoặc sức mạnh cơ bằng cách cho đối tượng cần điều trị sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên chứa vùng liên kết đặc hiệu activin A và vùng liên kết đặc hiệu GDF8. Bệnh hoặc rối loạn đặc trưng bởi sự giảm khối lượng cơ hoặc sức mạnh cơ có thể được điều trị, phòng ngừa và/hoặc làm thuyên giảm bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế bao gồm chứng mất mô cơ, chứng suy mòn (ví dụ, chứng suy mòn tự phát hoặc chứng suy mòn do một bệnh khác (ví dụ, bệnh ung thư, bệnh suy thận mạn tính, hoặc bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính)), tổn thương cơ, chứng hao mòn cơ và/hoặc teo cơ (ví dụ, gây bởi hoặc liên quan đến tình trạng không sử dụng, bất động, nằm liệt giường, tổn thương, điều trị nội khoa, can thiệp phẫu thuật (ví dụ, gãy cổ xương đùi, thay khớp háng, và thay khớp gối) và cần thở máy, bệnh ung thư, bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường, bệnh viêm khớp, bệnh xơ cứng rải rác, loạn dưỡng cơ, bệnh xơ cứng cột bên teo cơ, bệnh Parkinson, bệnh loãng xương; bệnh viêm xương khớp, bệnh thừa xương, và hội chứng chuyển hóa (ví dụ, một hoặc nhiều bệnh trong số bệnh đái tháo đường, bệnh béo phì, rối loạn dinh dưỡng, teo cơ quan, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, và chứng chán ăn).

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị, phòng ngừa và/hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn gây bởi, thúc đẩy bởi, làm trầm trọng bởi, hoặc làm nặng thêm bởi hoạt tính của phân tử chứa inhibin β A (ví dụ, dime chứa inhibin β A, ví dụ, activin A,

activin AB, v.v..) bằng cách cho đối tượng cần điều trị sử dụng protein liên kết đặc hiệu với activin A (tức là dime inhibin β A), ví dụ, kháng thể kháng activin A hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó. Theo một khía cạnh của sáng chế, phương pháp theo sáng chế bao gồm phương pháp điều trị, phòng ngừa, và/hoặc làm thuyên giảm bệnh xơ hóa thận bằng cách cho đối tượng cần điều trị sử dụng kháng thể kháng activin A. Theo các khía cạnh cụ thể của sáng chế, phương pháp theo sáng chế bao gồm phương pháp điều trị, phòng ngừa, và/hoặc làm thuyên giảm bệnh xơ hóa thận gây bởi bệnh thận mạn tính (ví dụ, do hậu quả của bệnh tăng huyết áp, bệnh đái tháo đường, bệnh viêm thận-tiểu cầu, bệnh di truyền (như bệnh thận đa nang), dị tật ở thận, bệnh tự miễn (ví dụ, bệnh luput), hoặc tắc mạch (ví dụ, bệnh sỏi thận, khối u, bệnh phì đại tuyến tiền liệt), hoặc nhiễm trùng đường tiết niệu nhiều lần bằng cách cho đối tượng cần điều trị sử dụng kháng thể kháng activin A. Theo các khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị, phòng ngừa, và/hoặc làm thuyên giảm bệnh nhiễm khuẩn, bệnh suy tim mạn tính, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, u tế bào ưa crom lành tính hoặc ác tính, u xơ tử cung, tiền sản giật, sẹ lồi, sẹ phì đại, hoặc bệnh tăng áp lực động mạch phổi bằng cách cho đối tượng cần điều trị sử dụng kháng thể kháng activin A. Theo các khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị, phòng ngừa, và/hoặc làm thuyên giảm chứng suy mòn gây bởi, thúc đẩy bởi, làm trầm trọng bởi, hoặc làm nặng thêm bởi hoạt tính của activin A bằng cách cho đối tượng cần điều trị sử dụng kháng thể kháng activin A. Theo các khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị, phòng ngừa, và/hoặc làm thuyên giảm tình trạng giảm cân gây bởi, thúc đẩy bởi, làm trầm trọng bởi, hoặc làm nặng thêm bởi hoạt tính của activin A bằng cách cho đối tượng cần điều trị sử dụng kháng thể kháng activin A.

Các phương án khác sẽ trở nên rõ ràng hơn dựa vào phần mô tả chi tiết sau đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là bảng thể hiện kết quả của thử nghiệm cạnh tranh chéo kháng thể trong đó kháng thể kháng activin A thứ nhất (“mẫu kháng thể”) được bôi vào đầu cảm biến phủ Fc kháng người, sau đó nhúng trong dung dịch chứa kháng thể kháng activin A thứ hai (1 μ M) đã được liên kết trước với activin A. Phản ứng liên kết (giá trị bằng số nằm trong khoảng từ 0,22 đến 1,84) của mỗi hỗn hợp kháng thể thử nghiệm được mô tả. Phản ứng liên kết thể hiện trong các ô màu trắng có phông chữ màu đen cho thấy không có sự cạnh tranh để liên kết với activin A, gợi ý các vùng liên kết rõ ràng.

Fig.2: biểu đồ A cho thấy tác dụng của việc điều trị bằng kháng thể kháng GDF8 trong 21 ngày (H4H1657N2, 10mg/kg hoặc 30 mg/kg) đối với lực co cứng cơ cực đại trung bình so với kháng thể đối chứng isotyp. Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp phân tích phương sai một chiều (ANOVA), sau đó bằng kiểm định Tukey. * $p < 0,05$ có ý nghĩa so với kháng thể đối chứng isotyp ($n=6$, kiểm định t Student không cặp đôi); n.s. = không có ý nghĩa thống kê so với kháng thể đối chứng isotyp ở liều 30mg/kg. Đồ thị B cho thấy sự tăng lực co cứng cơ cực đại của cơ cẳng chân trước (tibialis anterior: TA) ở chuột được điều trị bằng H4H1657N2 (10mg/kg) so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp trong 3 tuần ($n=6$), khi được kích thích bằng dòng điện trong một khoảng tần số (40 đến 100 Hz). Dữ liệu được thể hiện dưới dạng lực co cứng cơ cực đại trung bình $\pm$ SEM.

Fig.3: Sơ đồ A thể hiện thiết kế thử nghiệm để đánh giá tác dụng của H4H1657N2 trong giai đoạn phục hồi của chứng teo cơ gây bởi việc treo chân sau. Biểu đồ B cho thấy sự thay đổi theo tỷ lệ phần trăm của trọng lượng cơ TA và cơ bụng chân (Gastrocnemius: GA) của chuột được điều trị bằng H4H1657N2 và chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp sau khi hồi phục sau 7 ngày treo chân sau (HLS+7Rec) so với chuột không có thời gian phục hồi sau 7 ngày treo chân sau (HLS) và chuột đối chứng (chuột đối chứng không treo chân sau). Kết quả được thể hiện dưới dạng mức độ thay đổi trung bình theo tỷ lệ phần trăm so với chuột đối chứng không treo chân sau $\pm$ SEM. Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp phân tích phương sai một chiều (ANOVA), sau đó bằng kiểm định Tukey. * = $p < 0,05$ có ý nghĩa so với nhóm không treo chân sau. # = $p < 0,05$ có ý nghĩa so với nhóm treo chân sau.

Fig.4: Đồ thị A cho thấy tác dụng của việc sử dụng kháng thể kháng activin A H4H10446P2 đối với thể trọng của chuột biểu hiện quá mức activin A (so với kháng thể đối chứng isotyp). Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp phân tích phương sai hai chiều (thử nghiệm ANOVA đo nhiều lần + thử nghiệm Bonferroni so sánh nhiều lần), sau đó bằng kiểm định Tukey. * = $p < 0,05$ so với kháng thể đối chứng isotyp; # = $p < 0,05$ so với kháng thể kháng activin A + kháng thể đối chứng isotyp. Biểu đồ B cho thấy tác dụng của kháng thể kháng activin A H4H10446P2 đối với trọng lượng của cơ cẳng chân trước (TA) và cơ bụng chân (GA) ở chuột biểu hiện quá mức activin A (so với kháng thể đối chứng isotyp). Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phương

pháp phân tích phương sai một chiều (ANOVA), sau đó bằng kiểm định Tukey. $*$ = $p < 0,05$ so với vector + kháng thể đối chứng isotyp; $\#$ = $p < 0,05$ so với kháng thể kháng activin A + kháng thể đối chứng isotyp.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi sáng chế được mô tả, cần hiểu rằng sáng chế không chỉ giới hạn ở phương pháp và điều kiện thử nghiệm cụ thể được mô tả do các phương pháp và điều kiện này có thể thay đổi. Cũng cần hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng ở đây chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, và không được dự định làm giới hạn phạm vi sáng chế, do phạm vi của sáng chế sẽ chỉ bị giới hạn bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Nếu không được định nghĩa theo cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật sử dụng ở đây có nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực của sáng chế. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khoảng" khi được sử dụng liên quan đến giá trị bằng số cụ thể để chỉ rằng giá trị này có thể thay đổi không quá 1% so với giá trị đã nêu. Ví dụ, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khoảng 100" bao gồm cả 99 và 101 và tất cả các giá trị nằm giữa hai giá trị này (ví dụ, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, v.v.).

Mặc dù phương pháp và vật liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với phương pháp và vật liệu được mô tả ở đây có thể được sử dụng để thực hành hoặc thử nghiệm theo sáng chế, phương pháp và vật liệu được ưu tiên sẽ được mô tả ở đây.

Protein liên kết đặc hiệu kháng nguyên

Sáng chế đề cập đến được phẩm chứa protein liên kết đặc hiệu kháng nguyên. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa protein liên kết đặc hiệu activin A.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "protein liên kết đặc hiệu kháng nguyên" để chỉ protein chứa ít nhất một vùng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể. Các loại protein liên kết đặc hiệu kháng nguyên làm ví dụ bao gồm kháng thể, phần liên kết kháng nguyên của kháng thể, peptit tương tác đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể (ví dụ, protein dung hợp peptit-Fc), phân tử thụ thể tương tác đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể, và protein chứa phần liên kết phối tử của thụ thể liên kết đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể.

Sáng chế bao gồm protein liên kết đặc hiệu kháng nguyên, protein này liên kết đặc hiệu với activin A, tức là "protein liên kết đặc hiệu activin A". Activin là các phân tử

homodime và heterodime chứa các tiểu đơn vị beta, tức là inhibin β A, inhibin β B, inhibin β C, và/hoặc inhibin β E. Tiểu đơn vị β A có trình tự axit amin nêu trong trình tự nhận biết số 226 và tiểu đơn vị β B có trình tự axit amin nêu trong trình tự nhận biết số 228. Activin A là homodime của hai tiểu đơn vị β A; activin B là homodime của hai tiểu đơn vị β B; activin AB là heterodime của một tiểu đơn vị PA và một tiểu đơn vị β B; và activin AC là heterodime của một tiểu đơn vị β A và một tiểu đơn vị β C. Protein liên kết đặc hiệu với activin A có thể là protein liên kết đặc hiệu kháng nguyên liên kết đặc hiệu với tiểu đơn vị β A. Do tiểu đơn vị β A được tìm thấy trong phân tử activin A, activin AB, và activin AC, "protein liên kết đặc hiệu activin A" có thể là protein liên kết đặc hiệu kháng nguyên liên kết đặc hiệu với activin A cũng như activin AB và activin AC (do nó tương tác với tiểu đơn vị β A). Do đó, theo một phương án của sáng chế, protein liên kết đặc hiệu với activin A sẽ liên kết đặc hiệu với activin A; hoặc activin A và activin AB; hoặc activin A và activin AC; hoặc activin A, activin AB và activin AC, nhưng không liên kết với các phối tử ActRIIB khác như activin B, GDF3, GDF8, BMP2, BMP4, BMP7, BMP9, BMP 10, GDF11, Nodal, v.v.. Do vậy, theo một phương án theo sáng chế, protein liên kết đặc hiệu với activin A sẽ liên kết đặc hiệu với activin A nhưng không liên kết đáng kể với activin B hoặc activin C. Theo một phương án khác, protein liên kết đặc hiệu với activin A cũng có thể liên kết với activin B (do phản ứng chéo với tiểu đơn vị β B, tức là Inhibin β B). Theo một phương án khác, protein liên kết đặc hiệu với activin A là protein liên kết và liên kết đặc hiệu với activin A nhưng không liên kết với phối tử bất kỳ khác của ActRIIB. Theo một phương án khác, protein liên kết đặc hiệu với activin A là protein liên kết và liên kết đặc hiệu với activin A và không liên kết với protein tạo hình thái xương bất kỳ (Bone Morphogenetic Protein: BMP) (ví dụ, BMP2, BMP4, BMP6, BMP9, BMP 10). Theo một phương án khác, protein liên kết đặc hiệu với activin A là protein liên kết để liên kết đặc hiệu với activin A nhưng không liên kết với thành viên bất kỳ khác của siêu họ yếu tố sinh trưởng biến đổi beta (TGF β).

Sáng chế còn bao gồm protein liên kết đặc hiệu kháng nguyên liên kết đặc hiệu với GDF8, tức là "protein liên kết đặc hiệu GDF8". Thuật ngữ "GDF8" (còn được gọi là "yếu tố sinh trưởng và biệt hóa 8" và "myostatin") để chỉ protein có trình tự axit amin nêu trong trình tự nhận biết số 225 (protein trưởng thành). Theo sáng chế, protein liên kết đặc hiệu GDF8 liên kết đặc hiệu với GDF8 nhưng không liên kết với các phối tử

ActRIIB khác như GDF3, BMP2, BMP4, BMP7, BMP9, BMP10, GDF11, activin A, activin B, activin AB, Nodal, v.v..

Theo sáng chế, các phân tử như ActRIIB-Fc (ví dụ, "ACE-031"), chứa phần liên kết phối tử của thụ thể ActRIIB, không được cho là "protein liên kết đặc hiệu activin A" hoặc "protein liên kết đặc hiệu GDF8" do các phân tử này liên kết với nhiều phối tử ngoài GDF8, activin A và activin AB.

Tất cả các protein, polypeptit và đoạn protein ở đây được dự định để chỉ protein, polypeptit hoặc đoạn protein tương ứng của người nếu không được chỉ rõ theo cách khác là của loài không phải người.

Phân tử liên kết kháng nguyên có hai vùng liên kết đặc hiệu kháng nguyên khác nhau

Sáng chế còn bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên chứa hai vùng liên kết đặc hiệu kháng nguyên khác nhau. Cụ thể, sáng chế bao gồm phân tử liên kết kháng nguyên chứa vùng liên kết đặc hiệu activin A và vùng liên kết đặc hiệu GDF8. Thuật ngữ "vùng liên kết đặc hiệu kháng nguyên" như được sử dụng ở đây, bao gồm các polypeptit chứa hoặc bao gồm: (i) đoạn liên kết với kháng nguyên của phân tử kháng thể, (ii) peptit tương tác đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể (ví dụ, protein dung hợp peptit-Fc), và/hoặc (iii) phần liên kết phối tử của thụ thể liên kết đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể hai giá với một nhánh chứa cặp vùng biến đổi chuỗi nặng/vùng biến đổi chuỗi nhẹ (HCVR/LCVR) thứ nhất liên kết đặc hiệu với activin A và một nhánh khác chứa cặp HCVR/LCVR thứ hai liên kết đặc hiệu với GDF8.

Liên kết đặc hiệu

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" hoặc thuật ngữ tương tự, để chỉ protein liên kết đặc hiệu kháng nguyên, hoặc vùng liên kết đặc hiệu kháng nguyên, tạo thành phức chất với kháng nguyên cụ thể đặc trưng bởi hằng số phân ly (K_D) bằng hoặc nhỏ hơn 500pM, và không liên kết với các kháng nguyên không liên quan khác trong điều kiện thử nghiệm thông thường. "Kháng nguyên không liên quan" là protein, peptit hoặc polypeptit có mức độ giống nhau về axit amin nhỏ hơn 95%. Phương pháp xác định hai phân tử có liên kết đặc hiệu với nhau hay không là đã biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, thẩm tách cân bằng, cộng hưởng plasmon bề mặt, và phương pháp tương tự. Ví dụ, protein liên kết đặc hiệu kháng nguyên hoặc vùng liên kết đặc hiệu kháng nguyên như được sử dụng theo sáng chế bao gồm các phân tử liên kết với kháng

nguyên cụ thể (ví dụ, activin A và/hoặc AB, hoặc GDF8) hoặc một phần của nó với K_D nhỏ hơn khoảng 500pM, nhỏ hơn khoảng 400pM, nhỏ hơn khoảng 300pM, nhỏ hơn khoảng 200pM, nhỏ hơn khoảng 100pM, nhỏ hơn khoảng 90pM, nhỏ hơn khoảng 80pM, nhỏ hơn khoảng 70pM, nhỏ hơn khoảng 60pM, nhỏ hơn khoảng 50pM, nhỏ hơn khoảng 40pM, nhỏ hơn khoảng 30pM, nhỏ hơn khoảng 20pM, nhỏ hơn khoảng 10pM, nhỏ hơn khoảng 5pM, nhỏ hơn khoảng 4pM, nhỏ hơn khoảng 2pM, nhỏ hơn khoảng 1pM, nhỏ hơn khoảng 0,5pM, nhỏ hơn khoảng 0,2pM, nhỏ hơn khoảng 0,1pM, hoặc nhỏ hơn khoảng 0,05pM như được xác định trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt.

Như được sử dụng ở đây, protein liên kết đặc hiệu kháng nguyên hoặc vùng liên kết đặc hiệu kháng nguyên "không liên kết" với một phân tử đã được chỉ rõ (ví dụ, "không liên kết với GDF11", "không liên kết với BMP9", "không liên kết với BMP10", v.v..) nếu protein hoặc vùng liên kết này, khi được thử nghiệm về khả năng liên kết với phân tử đã nêu ở nhiệt độ 25°C trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt, có K_D lớn hơn 50,0nM, hoặc không thể hiện liên kết bất kỳ trong thử nghiệm này hoặc thử nghiệm tương đương của nó.

Thuật ngữ "cộng hưởng plasmon bề mặt" như được sử dụng ở đây để chỉ hiện tượng quang học cho phép phân tích tương tác theo thời gian thực bằng cách phát hiện các thay đổi về nồng độ protein trong nền cảm biến sinh học, ví dụ bằng cách sử dụng hệ thống BIAcore™ (Biacore Life Sciences division of GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Thuật ngữ " K_D " như được sử dụng ở đây để chỉ hằng số phân ly cân bằng của tương tác protein-protein cụ thể (ví dụ, tương tác kháng thể-kháng nguyên). Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, K_D được bộc lộ ở đây để chỉ K_D được xác định bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở nhiệt độ 25°C.

Kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể

Như nêu trên, protein liên kết đặc hiệu kháng nguyên có thể chứa hoặc bao gồm kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể. Ngoài ra, trong trường hợp phân tử liên kết kháng nguyên chứa hai vùng liên kết đặc hiệu kháng nguyên khác nhau, một hoặc cả hai vùng liên kết đặc hiệu kháng nguyên có thể chứa hoặc bao gồm đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể.

Như được sử dụng ở đây, "kháng thể liên kết với activin" hoặc "kháng thể kháng

activin A" bao gồm các kháng thể, và đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng, liên kết với đoạn dễ tan của protein activin A và cũng có thể liên kết với heterodime activin chứa tiểu đơn vị activin β A.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể" để chỉ phân tử hoặc phức chất phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ chứa ít nhất một vùng quyết định tính bổ thể (CDR) liên kết đặc hiệu với hoặc tương tác với kháng nguyên cụ thể (ví dụ, activin A). Thuật ngữ "kháng thể" bao gồm phân tử globulin miễn dịch chứa bốn mạch polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) liên kết với nhau bằng liên kết disulfua, cũng như multime của chúng (ví dụ, IgM). Mỗi chuỗi nặng chứa vùng biến đổi chuỗi nặng (được ký hiệu ở đây là HCVR hoặc V_H) và vùng hằng định chuỗi nặng. Vùng hằng định chuỗi nặng có ba miền, C_{H1} , C_{H2} và C_{H3} . Mỗi chuỗi nhẹ chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (được ký hiệu ở đây là LCVR hoặc V_L) và vùng hằng định chuỗi nhẹ. Vùng hằng định chuỗi nhẹ này có một miền (C_{L1}). Các vùng V_H và V_L có thể được chia nhỏ tiếp thành các vùng siêu biến, được gọi là vùng quyết định tính bổ thể (CDR), xen giữa các vùng bảo toàn hơn được gọi là vùng khung (FR). Mỗi vùng V_H và V_L bao gồm ba vùng CDR và bốn vùng FR, được sắp xếp từ đầu tận cùng amino đến đầu tận cùng carboxy theo thứ tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo các phương án khác nhau của sáng chế, các vùng FR của kháng thể kháng activin A (hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó) có thể giống với trình tự dòng mầm của người, hoặc có thể được cải biến theo cách tự nhiên hoặc nhân tạo. Trình tự axit amin liên ứng có thể được xác định dựa trên việc phân tích hai hoặc nhiều vùng CDR cạnh nhau.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể" còn bao gồm đoạn liên kết với kháng nguyên của phân tử kháng thể đầy đủ. Thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" của kháng thể, "đoạn liên kết với kháng nguyên" của kháng thể và thuật ngữ tương tự như được sử dụng ở đây bao gồm polypeptit hoặc glycoprotein tự nhiên, được tạo ra bằng enzym, tổng hợp, hoặc được thiết kế di truyền bất kỳ liên kết đặc hiệu với kháng nguyên để tạo thành phức chất. Đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể có thể thu được từ phân tử kháng thể đầy đủ bằng cách sử dụng kỹ thuật chuẩn thích hợp bất kỳ như phân hủy protein hoặc kỹ thuật di truyền tái tổ hợp đòi hỏi phải thao tác và biểu hiện ADN mã hóa vùng hằng định và vùng biến đổi tùy ý của kháng thể. ADN này là đã biết và/hoặc dễ dàng thu được từ nguồn trên thị trường, thư viện ADN (ví dụ, thư viện thể thực khuẩn-kháng thể), hoặc có thể được tổng hợp. ADN này có thể được giải trình tự và

thao tác bằng phương pháp hóa học hoặc bằng cách sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử, ví dụ, để sắp xếp một hoặc nhiều vùng biến đổi và/hoặc hằng định thành cấu hình thích hợp, hoặc để đưa codon vào, tạo ra gốc xystein, cải biến, bổ sung hoặc xóa axit amin v.v..

Ví dụ không làm giới hạn phạm vi sáng chế về đoạn liên kết với kháng nguyên bao gồm: (i) đoạn Fab; (ii) đoạn F(ab')₂; (iii) đoạn Fd; (iv) đoạn Fv; (v) phân tử Fv chuỗi đơn (single-chain Fv: scFv); (vi) đoạn dAb; và (vii) đơn vị nhận biết tối thiểu bao gồm các gốc axit amin giống với vùng siêu biến của kháng thể (ví dụ, vùng quyết định tính bổ thể (CDR) được phân lập như peptit CDR3), hoặc peptit FR3-CDR3-FR4 ràng buộc. Các phân tử được thiết kế khác, như kháng thể đặc hiệu vùng, kháng thể có một vùng, kháng thể được xóa vùng, kháng thể thể khảm, kháng thể ghép CDR, kháng thể dime, kháng thể trime, kháng thể tetrame, kháng thể mini, kháng thể nano (ví dụ, kháng thể nano đơn giá, kháng thể nano hai giá v.v..), thuốc có hoạt tính miễn dịch modul nhỏ (small modular immunopharmaceutical: SMIP), và vùng IgNAR biến đổi của cá mập, cũng được bao gồm trong thuật ngữ "đoạn liên kết với kháng nguyên" như được sử dụng ở đây.

Đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể sẽ thường chứa ít nhất một vùng biến đổi. Vùng biến đổi này có thể có kích thước hoặc thành phần axit amin bất kỳ và sẽ thường chứa ít nhất một vùng CDR liền kề với hoặc trong khung với một hoặc nhiều trình tự vùng khung. Trong đoạn liên kết với kháng nguyên có vùng V_H liên quan đến vùng V_L, các vùng V_H và V_L này có thể được bố trí tương đối với nhau theo cách sắp xếp thích hợp bất kỳ. Ví dụ, vùng biến đổi có thể là dime và chứa dime V_H-V_H, V_H-V_L hoặc V_L-V_L. Theo cách khác, đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể có thể chứa vùng V_H hoặc V_L monome.

Theo một số phương án nhất định đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất một vùng biến đổi liên kết cộng hóa trị với ít nhất một vùng hằng định. Cấu trúc làm ví dụ không làm giới hạn phạm vi sáng chế về các vùng biến đổi và hằng định có thể được tìm thấy trong đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bao gồm: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; và (xiv) V_L-C_L. Trong cấu trúc bất

kỳ của các vùng biến đổi và hằng định; kể cả cấu trúc bất kỳ trong số các cấu trúc làm ví dụ nêu trên, các vùng biến đổi và hằng định này có thể được liên kết trực tiếp với nhau hoặc có thể được liên kết nhờ vùng bản lề hoặc vùng liên kết đầy đủ hoặc không đầy đủ. Vùng bản lề có thể bao gồm ít nhất 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều hơn 60) axit amin tạo ra liên kết mềm dẻo hoặc nửa mềm dẻo giữa các vùng biến đổi và/hoặc hằng định liên kế trong một phân tử polypeptit. Ngoài ra, đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể chứa homodime hoặc heterodime (hoặc multime khác) của các cấu hình vùng biến đổi và hằng định bất kỳ nêu trên được liên kết không cộng hóa trị với nhau và/hoặc với một hoặc nhiều vùng V_H hoặc V_L monome (ví dụ, bằng (các) liên kết disulfua).

Giống như với phân tử kháng thể đầy đủ, đoạn liên kết với kháng nguyên có thể là đơn giá hoặc đa giá (ví dụ, hai giá). Đoạn liên kết với kháng nguyên đa giá của kháng thể sẽ thường chứa ít nhất hai vùng biến đổi khác nhau, trong đó mỗi vùng biến đổi có thể liên kết đặc hiệu với một kháng nguyên riêng biệt hoặc với một epitop khác trên cùng một kháng nguyên. Dạng kháng thể đa giá bất kỳ, bao gồm các dạng kháng thể hai giá làm ví dụ được-bộc lộ ở đây, có thể là thích hợp để sử dụng trong đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết trong lĩnh vực này.

Kháng thể theo sáng chế có thể hoạt động thông qua tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể (complement-dependent cytotoxicity (CDC) hoặc tính độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC). "Tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể" (CDC) để chỉ sự làm tan tế bào biểu hiện kháng nguyên nhờ kháng thể theo sáng chế khi có mặt bổ thể. "Tính độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể" (ADCC) để chỉ phản ứng qua trung gian tế bào trong đó các tế bào gây độc tế bào không đặc hiệu biểu hiện thụ thể Fc (FcRs) (ví dụ, tế bào giết tự nhiên (Natural Killer: NK), bạch cầu trung tính, và đại thực bào) nhận biết kháng thể đã liên kết trên tế bào đích và nhờ đó dẫn tới làm tan tế bào đích này. CDC và ADCC có thể được xác định bằng cách sử dụng các thử nghiệm đã biết rõ và có thể sử dụng trong lĩnh vực này. (Ví dụ, patent Mỹ số 5,500,362 và 5,821,337, và Clynes *et al*, PNAS USA 95:652-656 (1998)). Vùng hằng định của kháng thể là quan trọng đối với khả năng của kháng thể cố định bổ thể và trung gian cho tính độc tế bào phụ thuộc tế bào. Do đó, isotyp của kháng thể có thể được chọn dựa trên việc có cần kháng thể để trung gian cho

tính độc tế bào hay không.

Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể kháng activin A theo sáng chế là kháng thể của người. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "kháng thể của người" được dự định bao gồm kháng thể có các vùng biến đổi và hằng định thu được từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Kháng thể của người theo sáng chế có thể bao gồm các gốc axit amin không được mã hóa bởi các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người (ví dụ, các đột biến được đưa vào bằng cách gây đột biến ngẫu nhiên hoặc gây đột biến đặc hiệu vị trí *in vitro* hoặc bằng cách đột biến sinh dưỡng *in vivo*), ví dụ trong các vùng CDR và cụ thể là vùng CDR3. Tuy nhiên, thuật ngữ "kháng thể của người" như được sử dụng ở đây không được dự định bao gồm kháng thể trong đó các trình tự vùng CDR có nguồn gốc từ dòng mầm của loài động vật có vú khác, như chuột, được ghép vào trình tự vùng khung của người.

Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể tái tổ hợp của người. Thuật ngữ "kháng thể tái tổ hợp của người" như được sử dụng ở đây được dự định bao gồm tất cả các kháng thể của người được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng cách tái tổ hợp, như kháng thể được biểu hiện bằng cách sử dụng vector biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nhiễm vào tế bào vật chủ (được mô tả thêm dưới đây), kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể tổ hợp, tái tổ hợp của người (được mô tả thêm dưới đây), kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột) được chuyển gen globulin miễn dịch của người (ví dụ, xem tài liệu: Taylor *et al*; Nucl Acids Res 20:6287-6295 (1992)) hoặc kháng thể được điều chế, biểu hiện, tạo ra hoặc phân lập bằng cách bất kỳ khác liên quan đến sự ghép các trình tự gen globulin của người với các trình tự ADN khác. Các kháng thể tái tổ hợp này của người có vùng biến đổi và hằng định thu được từ các trình tự globulin miễn dịch dòng mầm của người. Tuy nhiên, theo một số phương án nhất định, kháng thể tái tổ hợp này của người được gây đột biến *in vitro* (hoặc được gây đột biến soma *in vivo* nếu việc chuyển gen động vật bằng trình tự Ig của người được sử dụng) và do đó trình tự axit amin của vùng V_H và V_L của kháng thể tái tổ hợp là các trình tự mặc dù thu được từ và có liên quan đến trình tự vùng V_H và V_L dòng mầm của người nhưng có thể không tồn tại tự nhiên trong kho dòng mầm của kháng thể của người *in vivo*.

Kháng thể của người có thể tồn tại ở hai dạng liên quan đến tính không đồng nhất

của vùng bản lề. Ở một dạng, phân tử globulin miễn dịch có cấu trúc bốn mạch ổn định có trọng lượng phân tử khoảng 150-160 kDa trong đó các dime được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua của chuỗi nặng giữa các mạch, ở dạng thứ hai, các dime không liên kết với nhau bằng liên kết disulfua giữa các mạch và phân tử có trọng lượng khoảng 75-80kDa được tạo ra bao gồm chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được liên kết cộng hóa trị (nửa kháng thể). Các dạng này cực kỳ khó tách, ngay cả sau khi tinh chế bằng ái lực.

Tần suất xuất hiện dạng thứ hai trong các isotyp IgG nguyên vẹn khác nhau là do, nhưng không chỉ giới hạn ở sự khác nhau về cấu trúc liên quan đến isotyp vùng bản lề của kháng thể. Việc thay thế một axit amin trong vùng bản lề IgG4 của người có thể làm giảm đáng kể tần suất xuất hiện dạng thứ hai (Angal *et al.* Molecular Immunology 30:105 1993)) tới mức thường quan sát được khi sử dụng vùng bản lề IgG1 của người. Sáng chế bao gồm các kháng thể có một hoặc nhiều đột biến trong vùng bản lề, vùng C_H2 hoặc C_H3, chúng có thể là mong muốn trong quá trình sản xuất để cải thiện hiệu suất của dạng kháng thể cần thiết.

Các kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể phân lập. Như được sử dụng ở đây, "kháng thể phân lập" để chỉ kháng thể được xác định và tách ra và/hoặc thu hồi từ ít nhất một thành phần của môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, kháng thể được tách ra hoặc thu hồi từ ít nhất một thành phần của sinh vật, hoặc từ mô hoặc tế bào trong đó kháng thể này có trong tự nhiên hoặc được tạo ra tự nhiên là "kháng thể phân lập" nhằm mục đích của sáng chế. Kháng thể phân lập còn bao gồm kháng thể *in situ* trong tế bào tái tổ hợp. Kháng thể phân lập là kháng thể đã được xử lý bằng ít nhất một bước tinh chế hoặc phân lập. Theo một số phương án nhất định, kháng thể phân lập có thể hầu như không chứa chất và/hoặc hóa chất khác của tế bào.

Sáng chế bao gồm kháng thể trung hòa và/hoặc phong bế kháng activin A. Như được sử dụng ở đây, kháng thể "trung hòa" hoặc "phong bế", được dự định để chỉ kháng thể mà sự liên kết của nó với activin A: (i) có tác dụng ức chế sự tương tác giữa activin A và thụ thể activin A (ví dụ, thụ thể activin typ IIA, thụ thể activin typ IIB, thụ thể activin typ I, v.v.); (ii) có tác dụng ngăn cản sự tạo thành phức chất activin-thụ thể activin; và/hoặc (iii) dẫn tới sự ức chế ít nhất một chức năng sinh học của activin A. Tác dụng ức chế gây bởi kháng thể trung hòa hoặc phong bế activin A không cần phải đầy đủ, miễn là nó có thể phát hiện được bằng cách sử dụng thử nghiệm thích hợp. Thử nghiệm làm ví dụ để phát hiện sự ức chế activin A được mô tả trong các Ví dụ thực hiện sáng chế ở đây.

Kháng thể kháng activin A được bộc lộ ở đây có thể chứa một hoặc nhiều sự thay thế, chèn và/hoặc xóa axit amin trong vùng khung và/hoặc vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ so với các trình tự dòng mầm tương ứng mà từ đó thu được các kháng thể này. Các đột biến này có thể được xác định dễ dàng bằng cách so sánh trình tự axit amin được bộc lộ ở đây với các trình tự dòng mầm của cơ sở dữ liệu công khai về trình tự kháng thể. Sáng chế bao gồm kháng thể, và đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng, thu được từ trình tự axit amin bất kỳ được bộc lộ ở đây, trong đó một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều vùng khung và/hoặc vùng CDR được đột biến thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm mà từ đó thu được kháng thể, hoặc thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác của người, hoặc thay thế axit amin bảo toàn của (các) gốc dòng mầm tương ứng (các sự thay đổi trình tự này được gọi chung ở đây là "đột biến dòng mầm"). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, khi bắt đầu bằng trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được bộc lộ ở đây, có thể dễ dàng tạo ra các kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm riêng rẽ hoặc tổ hợp của chúng. Theo một số phương án nhất định, tất cả các gốc của vùng khung và/hoặc vùng CDR trong vùng V_H và/hoặc V_L được đột biến ngược thành các gốc được tìm thấy trong trình tự dòng mầm ban đầu mà từ đó thu được kháng thể. Theo các phương án khác, chỉ một số gốc nhất định được đột biến ngược thành trình tự dòng mầm ban đầu, ví dụ, chỉ các gốc đột biến được tìm thấy trong 8 axit amin đầu tiên của vùng FR1 hoặc trong 8 axit amin cuối cùng của FR4, hoặc chỉ các gốc đột biến được tìm thấy trong vùng CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều gốc của vùng khung và/hoặc vùng CDR được 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 từ đó thu được kháng thể ban đầu). Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có thể chứa tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều đột biến dòng mầm trong vùng khung và/hoặc vùng CDR, ví dụ, trong đó một số gốc riêng biệt được đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng mầm cụ thể trong khi một số gốc khác khác với trình tự dòng mầm ban đầu được duy trì hoặc đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác. Khi được tạo ra, kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm có thể được thử nghiệm dễ dàng về một hoặc nhiều đặc tính mong muốn như, tính đặc hiệu liên kết được cải thiện, ái lực liên kết gia tăng, đặc tính sinh học chủ vận hoặc đối kháng (nếu có) được gia tăng hoặc cải thiện, tính sinh miễn dịch giảm v.v.. Kháng

thể và đoạn liên kết với kháng nguyên thu được theo cách chung này là thuộc phạm vi của sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng activin A chứa các biến thể của trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin của vùng HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được bộc lộ ở đây có một hoặc nhiều sự thay thế bảo toàn. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng activin A có trình tự axit amin vùng HCVR, LCVR, và/hoặc CDR có ít hơn hoặc bằng 10, ít hơn hoặc bằng 8, ít hơn hoặc bằng 6, ít hơn hoặc bằng 4, v.v.. sự thay thế axit amin bảo toàn so với trình tự axit amin của vùng HCVR, LCVR, và/hoặc CDR bất kỳ được bộc lộ ở đây.

Thuật ngữ "epitop" (biểu vị) để chỉ quyết định kháng nguyên tương tác với vị trí liên kết kháng nguyên đặc hiệu trong vùng biến đổi của phân tử kháng thể được gọi là paratop (cận vị). Một kháng nguyên có thể có nhiều hơn một epitop. Do đó, các kháng thể khác nhau có thể liên kết với các vùng khác nhau của kháng nguyên và có thể có tác dụng sinh học khác nhau. Epitop có thể là epitop cấu dạng hoặc mạch thẳng. Epitop cấu dạng được tạo ra bởi các axit amin cạnh nhau trong không gian của các đoạn khác nhau của polypeptit mạch thẳng. Epitop mạch thẳng là epitop được tạo ra bởi các gốc axit amin cạnh nhau trong mạch polypeptit. Trong trường hợp nhất định, epitop có thể bao gồm các gốc sacarit, nhóm phosphoryl, hoặc nhóm sulfonyl trên kháng nguyên.

Thuật ngữ "gần giống" khi nói tới axit nucleic hoặc đoạn của nó để chỉ rằng khi được dóng thẳng hàng tối ưu với axit nucleic khác (hoặc sợi bổ trợ của nó), kết hợp với chèn hoặc xóa nucleotit thích hợp, mức độ giống nhau về trình tự nucleotit của chúng ít nhất là khoảng 95%, và tốt hơn nữa là ít nhất khoảng 96%, 97%, 98% hoặc 99% bazơ nucleotit, được xác định bằng thuật toán đã biết rõ bất kỳ để xác định mức độ giống nhau về trình tự, như FASTA, BLAST hoặc Gap, như được bàn luận dưới đây. Trong một số trường hợp nhất định, phân tử axit nucleic gần giống với phân tử axit nucleic so sánh có thể mã hóa polypeptit có trình tự axit amin giống hệt hoặc gần giống với polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic so sánh này.

Khi áp dụng với polypeptit, thuật ngữ "gần tương tự" để chỉ hai trình tự peptit khi được dóng thẳng hàng tối ưu như bằng chương trình GAP hoặc BESTFIT bằng cách sử dụng trọng số khe hở ngầm định, có mức độ giống nhau về trình tự ít nhất là 95%, thậm chí tốt hơn nữa là có mức độ giống nhau về trình tự ít nhất 98% hoặc 99%. Tốt hơn nếu

các vị trí gốc không giống nhau khác nhau ở sự thay thế axit amin bảo toàn. "Sự thay thế axit amin bảo toàn" là sự thay thế trong đó gốc axit amin được thay bằng gốc axit amin khác có mạch bên (nhóm R) có đặc tính hóa học tương tự (ví dụ, điện tích hoặc tính kỵ nước). Nói chung, sự thay thế axit amin bảo toàn sẽ không làm thay đổi đáng kể đặc tính chức năng của protein. Trong các trường hợp trong đó hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau ở sự thay thế bảo toàn, tỷ lệ phần trăm giống nhau về trình tự hoặc mức độ giống nhau có thể được điều chỉnh tăng lên để hiệu chỉnh cho bản chất bảo toàn của sự thay thế này. Cách thực hiện việc điều chỉnh này là đã được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ. Ví dụ, xem tài liệu: Pearson, W.R., *Methods Mol Biol* 24: 307-331 (1994). Ví dụ về các nhóm axit amin có mạch bên có đặc tính hóa học giống nhau bao gồm (1) mạch bên béo: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; (2) mạch bên hydroxyl béo: serin và threonin; (3) mạch bên chứa amit asparagin và glutamin; (4) mạch bên thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; (5) mạch bên có tính bazơ: lysin, arginin, và histidin; (6) mạch bên có tính axit: aspartat và glutamat, và (7) mạch bên chứa lưu huỳnh: xystein và methionin. Các nhóm thể axit amin bảo toàn được ưu tiên là: valin-leuxin- isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat, và asparagin-glutamin. Theo cách khác, sự thay thế bảo toàn là sự thay đổi bất kỳ có giá trị dương trong ma trận log khả năng PAM250 được bộc lộ trong tài liệu: Gonnet *et al.*, *Science* 256: 1443-1445 (1992). "Sự thay thế bảo toàn vừa phải" là sự thay đổi bất kỳ có giá trị không âm trong ma trận log khả năng PAM250.

Sự giống nhau về trình tự của các polypeptit, còn được gọi là mức độ tương đồng trình tự, thường được xác định bằng cách sử dụng chương trình phần mềm phân tích trình tự. Chương trình phần mềm phân tích protein bắt cặp các trình tự tương tự bằng cách sử dụng mức độ tương tự được gán cho sự thay thế, sự xóa khác nhau và các cải biến khác, kể cả sự thay thế axit amin bảo toàn. Ví dụ, phần mềm GCG chứa các chương trình như Gap và Bestfit có thể được sử dụng với thông số ngầm định để xác định mức độ đồng nhất trình tự hoặc mức độ tương đồng trình tự giữa các polypeptit có liên hệ gần, như các polypeptit đồng nhất của các loài sinh vật khác nhau hoặc giữa protein kiểu đại và protein đột biến của nó. Ví dụ, xem chương trình GCG phiên bản 6.1. Các trình tự polypeptit cũng có thể được so sánh bằng cách sử dụng chương trình FASTA với các thông số ngầm định hoặc được khuyến cáo, là một chương trình trong phần mềm GCG

phiên bản 6.1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) đưa ra sự dồng thẳng hàng và tỷ lệ phần trăm tương đồng trình tự của các vùng chồng khớp nhất giữa các trình tự hỏi và tìm kiếm (Pearson, W.R., *Methods Mol Biol* 132: 185-219 (2000)). Một thuật toán được ưu tiên khác khi so sánh trình tự theo sáng chế với cơ sở dữ liệu chứa một số lượng lớn các trình tự của các sinh vật khác nhau: là chương trình máy tính BLAST, đặc biệt là BLASTP hoặc TBLASTN, sử dụng các thông số ngầm định, ví dụ, xem tài liệu: Altschul *et al.* *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990) và Altschul *et al.* *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997).

Đặc tính sinh học của kháng thể

Sáng chế bao gồm kháng thể kháng activin A và đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng liên kết với activin A với ái lực cao. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể và đoạn liên kết với kháng nguyên của các kháng thể liên kết với activin A (ví dụ, ở nhiệt độ 25°C hoặc 37°C) với K_D nhỏ hơn khoảng 30nM được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, bằng cách sử dụng kiểu thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 3 ở đây. Theo một số phương án nhất định, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo sáng chế liên kết với activin A với K_D nhỏ hơn khoảng 25nM, nhỏ hơn khoảng 20nM, nhỏ hơn khoảng 15nM, nhỏ hơn khoảng 10nM, nhỏ hơn khoảng 5nM, nhỏ hơn khoảng 2nM, nhỏ hơn khoảng 1nM, nhỏ hơn khoảng 500pM, nhỏ hơn khoảng 250pM, nhỏ hơn khoảng 240pM, nhỏ hơn khoảng 230pM, nhỏ hơn khoảng 220pM, nhỏ hơn khoảng 210pM, nhỏ hơn khoảng 200pM, nhỏ hơn khoảng 190pM, nhỏ hơn khoảng 180pM, nhỏ hơn khoảng 170pM, nhỏ hơn khoảng 160pM, nhỏ hơn khoảng 150pM, nhỏ hơn khoảng 140pM, nhỏ hơn khoảng 130pM, nhỏ hơn khoảng 120pM, nhỏ hơn khoảng 110pM, nhỏ hơn khoảng 100pM, nhỏ hơn khoảng 95pM, nhỏ hơn khoảng 90pM, nhỏ hơn khoảng 85pM, nhỏ hơn khoảng 80pM, nhỏ hơn khoảng 75pM, nhỏ hơn khoảng 70pM, nhỏ hơn khoảng 65pM, nhỏ hơn khoảng 60pM, nhỏ hơn khoảng 55pM, nhỏ hơn khoảng 50pM, nhỏ hơn khoảng 45pM, nhỏ hơn khoảng 40pM, nhỏ hơn khoảng 35pM, nhỏ hơn khoảng 30pM, nhỏ hơn khoảng 25pM, nhỏ hơn khoảng 20pM, nhỏ hơn khoảng 15pM, nhỏ hơn khoảng 10pM, nhỏ hơn khoảng 9pM, nhỏ hơn khoảng 8pM, nhỏ hơn khoảng 7pM, nhỏ hơn khoảng 6pM, nhỏ hơn khoảng 5pM, nhỏ hơn khoảng 4pM, hoặc nhỏ hơn khoảng 3pM, được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, bằng cách sử dụng kiểu thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 3 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng activin A và đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng ức chế sự truyền tín hiệu tế bào trung gian bởi activin A. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng activin A ức chế sự hoạt hóa con đường truyền tín hiệu phức chất SMAD bằng cách liên kết activin A với thụ thể activin typ I hoặc II với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 4nM, được xác định trong thử nghiệm sinh học phong bế tế bào, ví dụ, bằng cách sử dụng kiểu thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 5 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo một số phương án nhất định, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo sáng chế ức chế sự hoạt hóa con đường truyền tín hiệu phức chất SMAD bằng cách liên kết activin A với thụ thể activin typ I hoặc II với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 3nM, nhỏ hơn khoảng 2nM, nhỏ hơn khoảng 1nM, nhỏ hơn khoảng 500pM, nhỏ hơn khoảng 250pM, nhỏ hơn khoảng 240pM, nhỏ hơn khoảng 230pM, nhỏ hơn khoảng 220pM, nhỏ hơn khoảng 210pM, nhỏ hơn khoảng 200pM, nhỏ hơn khoảng 190pM, nhỏ hơn khoảng 180pM, nhỏ hơn khoảng 170pM, nhỏ hơn khoảng 160pM, nhỏ hơn khoảng 150pM, nhỏ hơn khoảng 140pM, nhỏ hơn khoảng 130pM, nhỏ hơn khoảng 120pM, nhỏ hơn khoảng 110pM, nhỏ hơn khoảng 100pM, nhỏ hơn khoảng 95pM, nhỏ hơn khoảng 90pM, nhỏ hơn khoảng 85pM, nhỏ hơn khoảng 80pM, nhỏ hơn khoảng 75pM, nhỏ hơn khoảng 70pM, nhỏ hơn khoảng 65pM, nhỏ hơn khoảng 60pM, nhỏ hơn khoảng 55pM, nhỏ hơn khoảng 50pM, nhỏ hơn khoảng 49pM, nhỏ hơn khoảng 48pM, nhỏ hơn khoảng 47pM, nhỏ hơn khoảng 46pM, nhỏ hơn khoảng 45pM, nhỏ hơn khoảng 44pM, nhỏ hơn khoảng 43pM, nhỏ hơn khoảng 42pM, nhỏ hơn khoảng 41pM, nhỏ hơn khoảng 40pM, hoặc nhỏ hơn khoảng 39pM, được xác định trong thử nghiệm sinh học phong bế tế bào, ví dụ, bằng cách sử dụng kiểu thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 5 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo một số phương án nhất định, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo sáng chế ức chế sự hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu của activin B bằng cách ức chế sự liên kết: của activin B với thụ thể activin typ I hoặc II với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 50nM, nhỏ hơn; khoảng 20nM, nhỏ hơn khoảng 10nM, nhỏ hơn khoảng 5nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 1nM, được xác định trong thử nghiệm sinh học phong bế tế bào, ví dụ, bằng cách sử dụng kiểu thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 5 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo một số phương án nhất định, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo sáng chế ức chế sự hoạt hóa con đường truyền tín hiệu phức chất SMAD thông qua sự liên kết của activin AB với thụ thể activin typ I hoặc II với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 500pM, nhỏ hơn

khoảng 450pM, nhỏ hơn khoảng 440pM, nhỏ hơn khoảng 430pM, nhỏ hơn khoảng 420pM, nhỏ hơn khoảng 410pM, nhỏ hơn khoảng 400pM, nhỏ hơn khoảng 390pM, nhỏ hơn khoảng 380pM, nhỏ hơn khoảng 370pM, nhỏ hơn khoảng 360pM, nhỏ hơn khoảng 350pM, nhỏ hơn khoảng 340pM, nhỏ hơn khoảng 320pM, nhỏ hơn khoảng 310pM, nhỏ hơn khoảng 300pM, nhỏ hơn khoảng 290pM, nhỏ hơn khoảng 280pM, nhỏ hơn khoảng 270pM, nhỏ hơn khoảng 260pM, nhỏ hơn khoảng 250pM, nhỏ hơn khoảng 240pM, nhỏ hơn khoảng 230pM, nhỏ hơn khoảng 220pM, nhỏ hơn khoảng 210pM, nhỏ hơn khoảng 200pM, nhỏ hơn khoảng 190pM, nhỏ hơn khoảng 180pM, nhỏ hơn khoảng 170pM, nhỏ hơn khoảng 160pM, nhỏ hơn khoảng 150pM, hoặc nhỏ hơn khoảng 140pM, được xác định trong thử nghiệm sinh học phong bế tế bào, ví dụ, bằng cách sử dụng kiểu thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 5 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo một số phương án nhất định, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên theo sáng chế ức chế sự hoạt hóa con đường truyền tín hiệu phức chất SMAD nhờ sự liên kết của activin AC với thụ thể activin typ I hoặc II với IC_{50} nhỏ hơn khoảng 1nM, nhỏ hơn khoảng 900pM, nhỏ hơn khoảng 800pM, nhỏ hơn khoảng 750pM, nhỏ hơn khoảng 700pM, nhỏ hơn khoảng 650pM, nhỏ hơn khoảng 600pM, hoặc nhỏ hơn khoảng 580pM, được xác định trong thử nghiệm sinh học phong bế tế bào, ví dụ, bằng cách sử dụng kiểu thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 5 ở đây, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Kháng thể theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều đặc tính sinh học nêu trên, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Các đặc tính sinh học khác của kháng thể theo sáng chế sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ dựa vào phần mô tả này, kể cả các ví dụ thực hiện sáng chế ở đây.

Kháng thể kháng activin A chứa biến thể Fc

Theo một số phương án nhất định của sáng chế, kháng thể kháng activin A được tạo ra chứa vùng Fc có một hoặc nhiều đột biến làm tăng hoặc làm giảm sự liên kết của kháng thể với thụ thể FcRn, ví dụ, ở độ pH axit so với độ pH trung tính. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng activin A chứa đột biến trong vùng C_H2 hoặc C_H3 của vùng Fc, trong đó (các) đột biến này làm tăng ái lực của vùng Fc với FcRn trong môi trường axit (ví dụ, trong thể nhân trong đó độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến khoảng 6,0). Các đột biến này có thể làm tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh của kháng thể khi được sử dụng cho động vật. Ví dụ không làm giới hạn phạm vi sáng chế về các cải biến ở vùng

Fc này bao gồm, ví dụ, cải biến ở vị trí 250 (ví dụ, E hoặc Q); 250 và 428 (ví dụ, L hoặc F); 252 (ví dụ, L/Y/F/W hoặc T), 254: (ví dụ, S hoặc T), và 256 (ví dụ, S/R/Q/E/D hoặc T); hoặc cải biến ở vị trí 428 và/hoặc 433 (ví dụ, H/L/R/S/P/Q hoặc K) và/hoặc 434 (ví dụ, A, W, H, F hoặc Y [N434A, N434W, N434H, N434F hoặc N434Y]); hoặc cải biến ở vị trí 250 và/hoặc 428; hoặc cải biến ở vị trí 307 hoặc 308 (ví dụ, 308F, V308F), và 434. Theo một phương án, cải biến này bao gồm cải biến 428L (ví dụ, M428L) và 434S (ví dụ, N434S); cải biến 428L, 259I (ví dụ, V259I), và 308F (ví dụ, V308F); cải biến 433K (ví dụ, H433K) và 434 (ví dụ, 434Y); cải biến ở vị trí 252, 254, và 256 (ví dụ, 252Y, 254T, và 256E); cải biến 250Q và 428L (ví dụ, T250Q và M428L); và cải biến ở vị trí 307 và/hoặc 308 (ví dụ, 308F hoặc 308P). Theo một phương án khác nữa, cải biến này là cải biến 265A (ví dụ, D265A) và/hoặc cải biến 297A (ví dụ, N297A).

Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng activin A chứa vùng Fc bao gồm 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); 257I và 311I (ví dụ, P257I và Q311I); 257I và 434H (ví dụ, P257I và N434H); 376V và 434H (ví dụ, D376V và N434H); 307A, 380A và 434A (ví dụ, T307A, E380A và N434A); và 433K và 434F (ví dụ, E1433K và N434F). Tất cả các tổ hợp có thể có của các đột biến của vùng Fc nêu trên, và các đột biến khác trong vùng biến đổi của kháng thể được bộc lộ ở đây, được dự định thuộc phạm vi của sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng activin A chứa vùng hằng định chuỗi nặng (CH) thể khảm, trong đó vùng CH thể khảm này chứa các đoạn thu được từ vùng CH của nhiều hơn một isotyp globulin miễn dịch. Ví dụ, các kháng thể theo sáng chế có thể chứa vùng CH thể khảm chứa một phần hoặc toàn bộ vùng CH2 thu được từ phân tử IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người, kết hợp với một phần hoặc toàn bộ vùng CH3 thu được từ phân tử IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người. Theo một số phương án nhất định, các kháng thể theo sáng chế chứa vùng CH thể khảm có vùng bản lề thể khảm. Ví dụ, vùng bản lề thể khảm có thể chứa trình tự axit amin của "vùng bản lề trên" (các gốc axit amin từ vị trí 216 đến 227 theo cách đánh số của EU) thu được từ vùng bản lề của IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người, kết hợp với trình tự axit amin của "vùng bản lề dưới" (các gốc axit amin từ vị trí 228 đến 236

theo cách đánh số của EU) thu được từ vùng bản lề của IgG1 của người, IgG2 của người hoặc IgG4 của người. Theo một số phương án nhất định, vùng bản lề thể khảm này chứa các gốc axit amin thu được từ vùng bản lề trên của IgG1 của người hoặc IgG4 của người và gốc axit amin thu được từ vùng bản lề dưới của IgG2 của người. Theo một số phương án nhất định, kháng thể chứa vùng CH thể khảm như được mô tả ở đây có thể có chức năng của tế bào thực hiện có vùng Fc được cải biến mà không ảnh hưởng bất lợi đến các đặc tính dược động học hoặc điều trị của kháng thể này. (ví dụ, xem đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 61/759,578, nộp ngày 1.2.2013).

Lập bản đồ epitop và các kỹ thuật liên quan

Sáng chế bao gồm kháng thể kháng activin A tương tác với một hoặc nhiều axit amin trong activin A (ví dụ, trong vị trí liên kết thụ thể activin typ II). Epitop mà kháng thể liên kết với có thể bao gồm trình tự kế tiếp đơn của 3 hoặc nhiều axit amin (ví dụ, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều axit amin) nằm trong tiểu đơn vị activin β A. Theo cách khác, epitop này có thể bao gồm nhiều axit amin (hoặc trình tự axit amin) không kế tiếp nằm trong dime activin A.

Các kỹ thuật khác nhau mà người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này đã biết có thể được sử dụng để xác định xem kháng thể có "tương tác với một hoặc nhiều axit amin" trong polypeptit hoặc protein hay không. Các kỹ thuật làm ví dụ bao gồm thử nghiệm phong bế chéo thông thường như thử nghiệm được mô tả trong tài liệu: Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), phân tích đột biến kiểu quét analin, phân tích thẩm tách peptit (Reineke, Methods Mol Biol 248:443-463 (2004)), và phân tích cắt peptit. Ngoài ra, các phương pháp như cắt epitop, tách epitop và biến đổi hóa học kháng nguyên có thể được sử dụng (Tomer, Protein Science 9:487-496 (2000)). Một phương pháp khác có thể được sử dụng để xác định các axit amin trong polypeptit tương tác với kháng thể là phương pháp trao đổi hydro/đoteri phát hiện bằng phương pháp phổ khối. Theo thuật ngữ chung, phương pháp trao đổi hydro/đoteri bao gồm đánh dấu protein cần quan tâm bằng đoteri, sau đó liên kết kháng thể với protein đã đánh dấu bằng đoteri. Tiếp theo, phức chất protein/kháng thể này được chuyển vào nước để sự trao đổi hydro-đoteri xảy ra ở tất cả các gốc trừ các gốc được bảo vệ bởi kháng thể (các gốc này vẫn được đánh dấu bằng đoteri). Sau khi tách kháng thể, protein đích được phân cắt bằng proteaza và phân tích bằng phương pháp phổ khối, nhờ đó phát hiện các gốc được đánh dấu bằng đoteri tương ứng với các axit amin

đặc hiệu mà kháng thể tương tác với. Xem tài liệu: Ehring, *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259 (1999); Engen and Smith, *Anal. Chem* 73:256A-265A (2001).

Sáng chế còn bao gồm các kháng thể kháng activin A liên kết với epitop giống như kháng thể đặc hiệu làm ví dụ bất kỳ được mô tả ở đây (ví dụ, H4H10423P, H4H10424P, H4H10426P, H4H10429P, H4H10430P, H4H10432P2, H4H10433P2, H4H10436P2, H4H10437P2, H4H10438P2, H4H10440P2, H4H10442P2, H4H10445P2, H4H10446P2, H4H10447P2, H4H10448P2, H4H10452P2, H4H10468P2, H2aM10965N, v.v.). Tương tự, sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng activin A cạnh tranh liên kết với activin A với kháng thể đặc hiệu làm ví dụ bất kỳ được mô tả ở đây (ví dụ, H4H10423P, H4H10424P, H4H10426P, H4H10429P, H4H10430P, H4H10432P2, H4H10433P2, H4H10436P2, H4H10437P2, H4H10438P2, H4H10440P2, H4H10442P2, H4H10445P2, H4H10446P2, H4H10447P2, H4H10448P2, H4H10452P2, H4H10468P2, H2aM10965N, v.v.). Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng activin A cạnh tranh chéo để liên kết với activin A với một hoặc nhiều kháng thể thuộc "nhóm 1" như được xác định trong Ví dụ 5 ở đây (ví dụ, H4H10423P, H4H10446P2, H4H10468P2 và H4H10442P2). Sáng chế còn bao gồm kháng thể kháng activin A cạnh tranh chéo để liên kết với activin A với một hoặc nhiều kháng thể thuộc "nhóm 2" như được xác định trong Ví dụ 5 ở đây (ví dụ, H4H10429, H4H10430P, H4H10432P2, H4H10436P2, và H4H10440P2).

Có thể dễ dàng xác định một kháng thể có liên kết với cùng một epitop như kháng thể kháng activin A so sánh, hoặc cạnh tranh liên kết với kháng thể này hay không bằng cách sử dụng phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này và được ví dụ ở đây. Ví dụ, để xác định xem một kháng thể thử nghiệm có liên kết với vùng một epitop như kháng thể kháng activin A so sánh theo sáng chế hay không, kháng thể so sánh này được liên kết với activin A (hoặc heterodime chứa tiểu đơn vị β A). Tiếp đó, khả năng của kháng thể thử nghiệm liên kết với activin A được đánh giá. Nếu kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với activin A sau khi liên kết bão hòa với kháng thể kháng activin A so sánh, có thể kết luận rằng kháng thể thử nghiệm liên kết với epitop khác với kháng thể kháng activin A so sánh. Mặt khác, nếu kháng thể thử nghiệm không thể liên kết với activin A sau khi liên kết bão hòa với kháng thể kháng activin A so sánh, thì kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với cùng một epitop giống như epitop được liên kết bởi kháng thể kháng

activin A so sánh theo sáng chế. Sau đó, thử nghiệm bổ sung thông thường (ví dụ, thử nghiệm đột biến peptit và phân tích liên kết) có thể được thực hiện để khẳng định việc không quan sát được liên kết của kháng thể thử nghiệm thực tế có phải là do sự liên kết với cùng một epitop như kháng thể so sánh hay không hoặc hiện tượng phong bế không gian (hoặc hiện tượng khác) chịu trách nhiệm về sự không liên kết quan sát được này. Các thử nghiệm loại này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA, RIA, Biacore, đếm tế bào theo dòng hoặc thử nghiệm liên kết với kháng thể định tính hoặc định lượng bất kỳ khác có thể dùng trong lĩnh vực này. Theo một số phương án nhất định của sáng chế, hai kháng thể liên kết với cùng một epitop (hoặc epitop chồng lên nhau) nếu lượng dư gấp 1, 5, 10, 20 hoặc 100 lần của một kháng thể ức chế sự gắn của kháng thể còn lại ít nhất 50% nhưng tốt hơn là 75%, 90% hoặc thậm chí 99% khi xác định bằng thử nghiệm liên kết cạnh tranh (ví dụ, xem tài liệu: Junghans *et al*, Cancer Res. 50:1495-1502 (1990)). Theo cách khác, hai kháng thể được cho là liên kết với cùng một epitop nếu gần như tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên làm giảm hoặc làm mất sự liên kết của một kháng thể sẽ làm giảm hoặc làm mất sự liên kết của kháng thể còn lại. Hai kháng thể được cho là bỏ "epitop chồng lên nhau" nếu chỉ một nhóm nhỏ đột biến axit amin làm giảm hoặc làm mất sự liên kết của một kháng thể sẽ làm giảm hoặc làm mất sự liên kết của kháng thể còn lại.

Để xác định một kháng thể có cạnh tranh liên kết với (hoặc cạnh tranh chéo để liên kết với) kháng thể kháng activin A so sánh hay không, phương pháp liên kết được mô tả ở trên được thực hiện theo hai hướng: theo hướng thứ nhất, kháng thể so sánh được liên kết với protein activin A (hoặc heterodime chứa tiểu đơn vị β A) trong điều kiện bão hòa, sau đó đánh giá mức độ liên kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử activin A. Theo hướng thứ hai, kháng thể thử nghiệm được liên kết với activin A trong điều kiện bão hòa, sau đó đánh giá mức độ liên kết của kháng thể so sánh với activin A. Nếu theo cả hai hướng, chỉ kháng thể (bão hòa) thứ nhất có thể liên kết với activin A, thì kết luận rằng kháng thể thử nghiệm và kháng thể so sánh cạnh tranh liên kết với activin A (ví dụ, xem kiểu thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 4 ở đây, trong đó kháng thể thử nghiệm kháng activin A được đưa vào đầu của bộ cảm biến, sau đó đầu này được ngâm trong dung dịch chứa kháng thể kháng activin A so sánh đã được liên kết trước với activin A). Như sẽ được hiểu rõ bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này, kháng thể cạnh tranh liên kết với kháng thể so sánh có thể không nhất thiết phải liên kết với cùng một

epitop như kháng thể so sánh, nhưng có thể ngăn cản về mặt không gian sự liên kết của kháng thể so sánh bằng cách liên kết với epitop chồng lên nhau hoặc epitop liền kề.

Kháng thể kháng activin A theo sáng chế có thể liên kết với epitop trên activin A nằm trong hoặc nằm gần vị trí liên kết với thụ thể activin typ II, ức chế trực tiếp sự tương tác giữa activin A và thụ thể activin typ II, và ức chế gián tiếp sự tương tác giữa activin A và thụ thể activin typ I. Kháng thể kháng activin A theo sáng chế có thể liên kết với epitop trên activin A nằm trong hoặc nằm gần vị trí liên kết với thụ thể activin typ I và ức chế trực tiếp sự tương tác giữa activin A và thụ thể activin typ I. Theo một phương án theo sáng chế, kháng thể kháng activin A theo sáng chế liên kết với activin A ở hoặc ở gần vị trí liên kết thụ thể activin typ I không ức chế sự tương tác giữa activin A và thụ thể activin A typ II.

Điều chế kháng thể của người

Phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng, kể cả kháng thể đơn dòng đầy đủ của người là đã biết trong lĩnh vực này. Phương pháp bất kỳ đã biết này có thể được sử dụng theo sáng chế để tạo ra kháng thể của người liên kết đặc hiệu với activin A của người.

Bằng cách sử dụng phương pháp VELOCIMMUNE™ chẳng hạn hoặc phương pháp bất kỳ đã biết khác để tạo ra kháng thể đơn dòng đầy đủ của người, kháng thể thể khả năng có ái lực cao với activin A của người trước hết được phân lập có vùng biến đổi của người và vùng hằng định của chuột. Như trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây, kháng thể được xác định và lựa chọn theo các đặc tính mong muốn bao gồm ái lực, độ chọn lọc, epitop, v.v.. Nếu cần, vùng hằng định của chuột được thay bằng vùng hằng định mong muốn của người, ví dụ IgG1 hoặc IgG4 kiểu đại hoặc được cải biến, để tạo ra kháng thể kháng activin A đầy đủ của người. Mặc dù vùng hằng định được chọn có thể thay đổi theo mục đích cụ thể, đặc tính liên kết kháng nguyên với ái lực cao và tính đặc hiệu đích nằm trong vùng biến đổi. Trong một số trường hợp nhất định, kháng thể kháng activin A đầy đủ của người được phân lập trực tiếp từ các tế bào B dương tính với kháng nguyên.

Tương đương sinh học

Kháng thể kháng activin A và đoạn kháng thể theo sáng chế bao gồm các protein có trình tự axit amin thay đổi so với các trình tự axit amin của kháng thể được mô tả

nhưng giữ được khả năng liên kết với activin A của người. Các kháng thể và đoạn kháng thể này bao gồm một hoặc nhiều đoạn thêm, xóa, hoặc thay thế axit amin so với trình tự gốc, nhưng có hoạt tính sinh học gần như tương đương với hoạt tính sinh học của kháng thể đã mô tả. Tương tự, trình tự ADN mã hóa kháng thể kháng activin A theo sáng chế bao gồm các trình tự chứa một hoặc nhiều đoạn thêm, xóa, hoặc thay thế nucleotit so với trình tự được bộc lộ, nhưng mã hóa kháng thể kháng activin A hoặc đoạn kháng thể gần như tương đương sinh học với kháng thể kháng activin A hoặc đoạn kháng thể theo sáng chế. Ví dụ về các trình tự ADN và axit amin này được bàn luận ở trên.

Hai protein liên kết kháng nguyên hoặc hai kháng thể được coi là tương đương sinh học nếu chúng là các chất tương đương hoặc thay thế về mặt dược lý có tốc độ và mức độ hấp thu không khác nhau đáng kể khi được sử dụng ở cùng một liều mol trong điều kiện thử nghiệm tương tự, hoặc một liều duy nhất hoặc nhiều liều. Một số kháng thể sẽ được coi là chất tương đương hoặc chất thay thế về mặt dược lý nếu chúng là tương đương về mức độ hấp thu nhưng không tương đương về tốc độ hấp thu và vẫn có thể được coi là tương đương sinh học do sự khác nhau về tốc độ hấp thu này là có chủ ý và được thể hiện trên nhãn sản phẩm, là không cần thiết để đạt được nồng độ dược chất hữu hiệu trong cơ thể khi sử dụng thường xuyên, và được cho là không quan trọng trong y học đối với sản phẩm thuốc cụ thể được nghiên cứu.

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

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu bệnh nhân có thể được đổi thuốc một hoặc nhiều lần giữa sản phẩm so sánh và sản phẩm sinh học mà không làm tăng nguy cơ tác dụng có hại, kể cả sự thay đổi đáng kể tính sinh miễn dịch về mặt lâm sàng, hoặc sự giảm hiệu quả so với việc điều trị liên tục mà không đổi thuốc này.

Theo một phương án, hai protein liên kết kháng nguyên là tương đương sinh học nếu chúng đều tác dụng theo cơ chế hoặc các cơ chế tác dụng chung cho điều kiện hoặc các điều kiện sử dụng, trong phạm vi các cơ chế này là đã biết.

Tương đương sinh học có thể được chứng minh bằng phương pháp *in vivo* và *in vitro*. Phương pháp xác định tương đương sinh học bao gồm ví dụ, (a) thử nghiệm *in*

vivo ở người hoặc động vật có vú khác, trong đó nồng độ kháng thể hoặc sản phẩm chuyển hóa của nó được xác định trong máu, huyết tương, huyết thanh, hoặc dịch sinh học khác theo hàm số của thời gian; (b) thử nghiệm *in vitro* có tương quan với và có tính dự đoán hợp lý dữ liệu về độ sinh khả dụng *in vivo* ở người; (c) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc động vật có vú khác trong đó hiệu quả được lý giải tính thích hợp của kháng thể (hoặc đích của nó) được xác định theo hàm số của thời gian; và (d) thử nghiệm lâm sàng được kiểm soát chặt chẽ để xác định độ an toàn, hiệu quả, hoặc độ sinh khả dụng hoặc tương đương sinh học của kháng thể.

Các biến thể tương đương sinh học của kháng thể kháng activin A theo sáng chế có thể được thiết kế, ví dụ, bằng cách tạo ra sự thay thế các gốc hoặc trình tự khác nhau hoặc xóa các gốc hoặc trình tự cuối mạch hoặc trong mạch không cần thiết đối với hoạt tính sinh học. Ví dụ, các gốc cystein không cần thiết đối với hoạt tính sinh học có thể được xóa hoặc thay bằng các axit amin khác để ngăn sự tạo thành liên kết cầu disulfua không cần thiết hoặc không đúng trong phân tử khi hồi tính. Theo các phương án khác, các kháng thể tương đương sinh học có thể bao gồm các biến thể kháng thể kháng activin A chứa các thay đổi axit amin làm biến đổi đặc tính glycosyl hóa của kháng thể, ví dụ, các đột biến làm loại trừ hoặc loại bỏ sự glycosyl hóa.

Tính chọn lọc loài và khả năng phản ứng chéo giữa các loài

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng activin A liên kết với activin A của người nhưng không liên kết với activin A của loài khác. Sáng chế cũng bao gồm kháng thể kháng activin A liên kết với activin A của người và liên kết với activin A của một hoặc nhiều loài không phải người. Ví dụ, kháng thể kháng activin A theo sáng chế có thể liên kết với activin A của người và có thể liên kết với hoặc không liên kết với, nếu có, một hoặc nhiều activin A của chuột nhắt, chuột, chuột lang, chuột đồng, chuột nhảy, lợn, mèo, chó, thỏ, dê, cừu, bò, ngựa, lạc đà, khỉ *Cynomolgus*, khỉ đuôi sóc, khỉ *rezut* hoặc hắc tinh tinh. Theo một số phương án làm ví dụ nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng activin A: liên kết đặc hiệu với activin A của người (ví dụ, activin A hoặc heterodime chứa tiểu đơn vị βA) và activin A của khỉ *Cynomolgus* (ví dụ, *Macaca fascicularis*).

Thế liên hợp miễn dịch

Sáng chế bao gồm kháng thể đơn dòng kháng activin A được liên hợp với gốc có tác dụng điều trị ("thể liên hợp miễn dịch"), như chất độc tế bào, dược chất hóa trị liệu, chất ức chế miễn dịch hoặc chất đồng vị phóng xạ. Chất độc tế bào bao gồm chất bất kỳ có hại cho tế bào. Ví dụ về chất độc tế bào và chất hóa trị liệu thích hợp để tạo thành thể liên hợp miễn dịch là đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, WO 05/103081).

Kháng thể đa giá

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể một giá, hai giá hoặc đa giá. Kháng thể đa giá có thể đặc hiệu với các epitop khác nhau của một polypeptit đích hoặc có thể chứa các vùng liên kết kháng nguyên đặc hiệu với nhiều hơn một polypeptit đích. Ví dụ, xem tài liệu: Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60-69 (1991); Kufer *et al.*, Trends Biotechnol. 22:238-244 (2004). Kháng thể kháng activin A 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 đoạn kháng thể có thể được liên kết về mặt chức năng (ví dụ, bằng liên kết hóa học, dung hợp có tính di truyền, liên kết không cộng hóa trị hoặc theo cách khác) với một hoặc nhiều phân tử khác, như kháng thể hoặc đoạn kháng thể khác để tạo ra kháng thể hai giá hoặc kháng thể đa giá có tính đặc hiệu liên kết thứ hai. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể hai giá, trong đó một nhánh globulin miễn dịch là đặc hiệu với activin A của người hoặc đoạn của nó, và nhánh globulin miễn dịch còn lại là đặc hiệu với đích điều trị thứ hai hoặc được tiếp hợp với gốc có hoạt tính điều trị. Theo một phương án, sáng chế bao gồm kháng thể hai giá chứa một nhánh globulin miễn dịch đặc hiệu với activin A của người hoặc đoạn của nó, và nhánh globulin miễn dịch còn lại đặc hiệu với GDF8.

Một dạng kháng thể hai giá làm ví dụ có thể được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế liên quan đến việc sử dụng vùng G_H3 của globulin miễn dịch thứ nhất (Ig) và vùng C_H3 của Ig thứ hai, trong đó các vùng C_H3 của Ig thứ nhất và thứ hai này khác nhau ở ít nhất một axit amin, và trong đó ít nhất một sự khác nhau về axit amin làm giảm mức độ liên kết của kháng thể hai giá với protein A so với kháng thể hai giá không có sự khác biệt về axit amin này (ví dụ, xem patent Mỹ số 8,586,713). Theo một phương án, vùng C_H3 của Ig thứ nhất liên kết với protein A và vùng C_H3 của Ig thứ hai chứa đột biến làm giảm hoặc loại bỏ sự liên kết với protein A như cải biến gen H95R (theo cách đánh số exon của IMGT; H435R theo cách đánh số của EU). C_H3 thứ hai có thể còn chứa cải biến gen Y96F (theo IMGT; Y436F theo EU). Các cải biến khác có thể được phát hiện

trong C_H3 thứ hai bao gồm: D16E, L18M, NMs, K52N, V57M, và V82I (theo IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, và V422I theo EU) trong trường hợp kháng thể IgG1; N44S, K52N, và V82I (IMGT; N384S, K392N, và V422I theo EU) trong trường hợp kháng thể IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, V82I và L105P (theo IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, giá được mô tả ở trên được dự định thuộc phạm vi sáng chế.

Các dạng kháng thể hai giá làm ví dụ khác có thể được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, dạng kháng thể hai giá trên cơ sở scFv hoặc kháng thể dime, thể dung hợp IgG-scFv, vùng biến đổi kép (DVD)-Ig, Quadroma, cấu trúc đầu nút trong lỗ, chuỗi nhẹ thông thường (ví dụ, chuỗi nhẹ thông thường có cấu trúc đầu nút trong lỗ, v.v.), CrossMab, CrossFab, protein dung hợp (SEED), khóa kéo leuxin, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG tác dụng kép, và dạng hai giá Mab² (ví dụ, xem tài liệu: Klein *et al.*, mAbs 4:6, 1-11 (2012), và các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong đó). Kháng thể hai giá cũng có thể được thiết kế bằng cách sử dụng sự liên hợp peptit/axit nucleic, ví dụ, trong đó axit amin không có trong tự nhiên có khả năng phản ứng hóa học trực giao được sử dụng để tạo ra thể liên hợp kháng thể- oligonucleotit đặc hiệu vị trí, sau đó thể liên hợp này tự lắp ráp thành phức chất multime có thành phần, hóa trị và dạng hình học xác định, (ví dụ, xem tài liệu: Kazane *et al.*, J Am Chem Soc. 135(1):340-346 (2013)).

Dược phẩm điều trị và sử dụng

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể kháng activin A hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế. Dược phẩm theo sáng chế được bào chế cùng với chất mang, tá dược thích hợp, và các chất khác để làm tăng khả năng vận chuyển thuốc, cung cấp thuốc, dung nạp thuốc, và thông số tương tự. Nhiều dạng bào chế thích hợp có thể được tìm thấy trong lĩnh vực bào chế mà tất cả các nhà hóa dược đã biết: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Các dạng bào chế này bao gồm, ví dụ, bột, bột nhão, pomat, thạch, sáp, dầu, lipit, nang chứa lipit (cation hoặc anion) (như LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), thể tiếp hợp ADN, bột nhão hấp thụ khan, nhũ tương dầu trong nước và nước trong dầu, nhũ tương polyetylen glycol dạng rắn (các polyetylen glycol có trọng lượng phân tử khác nhau), gel bán rắn, và hỗn hợp bán rắn chứa polyetylen glycol dạng rắn. Cũng xem tài

liệu: Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol 52:238-311 (1998).

Liều lượng kháng thể sử dụng cho bệnh nhân có thể thay đổi tùy thuộc vào tuổi và tầm vóc của bệnh nhân, bệnh cần điều trị, thể trạng, đường sử dụng, và yếu tố tương tự. Liều được ưu tiên thường được tính theo thể trọng hoặc diện tích bề mặt cơ thể. Nếu kháng thể theo sáng chế được sử dụng để điều trị tình trạng hoặc bệnh liên quan đến hoạt tính của activin A ở bệnh nhân là người lớn, có thể có lợi nếu sử dụng kháng thể theo sáng chế qua đường tĩnh mạch, thường là ở liều duy nhất nằm trong khoảng từ 0,01 đến khoảng 20 mg/kg thể trọng, tốt hơn nữa là khoảng 0,02 đến khoảng 7, 0,03 đến khoảng 5, hoặc 0,05 đến khoảng 3 mg/kg thể trọng. Tùy thuộc vào mức độ nặng của bệnh, tần suất và thời gian điều trị có thể được điều chỉnh. Liều hữu hiệu và chế độ sử dụng kháng thể kháng activin A có thể được xác định bằng thực nghiệm; ví dụ, sự tiến triển của bệnh nhân có thể được theo dõi bằng cách đánh giá định kỳ, và liều lượng được điều chỉnh tương ứng. Ngoài ra, việc điều chỉnh liều giữa các loài có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này (ví dụ, Mordenti *et al.*, Pharmaceut Res 8:1351 (1991)).

Các hệ cung cấp thuốc khác nhau là đã biết và có thể được dùng để sử dụng được phẩm theo sáng chế, ví dụ, bao nang trong liposom, vi hạt, vi nang, tế bào tái tổ hợp có thể biểu hiện kháng thể hoặc protein trị liệu khác theo sáng chế, nhập nội bào trung gian bởi thụ thể (ví dụ, xem tài liệu: Wu et al., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)). Kháng thể và các thành phần có hoạt tính điều trị khác theo sáng chế có thể được cung cấp bằng kỹ thuật trị liệu gen. Phương pháp cung cấp thuốc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cung cấp thuốc trong chân bì, trong cơ, trong màng bụng, tĩnh mạch, dưới da, trong mũi, dưới màng cứng, và đường miệng. Dược phẩm có thể được sử dụng bằng đường thông thường bất kỳ, ví dụ bằng cách truyền hoặc tiêm liều lớn, bằng cách hấp thụ qua biểu mô hoặc lớp lót niêm mạc da (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và ruột v.v..) và có thể được sử dụng cùng với các chất có hoạt tính sinh học khác. Có thể sử dụng toàn thân hoặc sử dụng khu trú.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được cung cấp qua đường dưới da hoặc tĩnh mạch bằng kim và bơm tiêm chuẩn. Ngoài ra, liên quan đến việc cung cấp dược phẩm dưới da, dụng cụ cung cấp thuốc dạng bút dễ dàng sử dụng để cung cấp dược phẩm theo sáng chế. Dụng cụ cung cấp thuốc dạng bút này có thể được tái sử dụng hoặc dùng một lần. Nói

chung, dụng cụ cung cấp thuốc dạng bút có thể tái sử dụng thường có hộp chứa dược phẩm có thể thay thế. Khi toàn bộ dược phẩm trong hộp đã được sử dụng và hộp đã hết dược phẩm, hộp rỗng này có thể được bỏ đi dễ dàng và thay bằng hộp chứa dược phẩm mới. Do đó, dụng cụ cung cấp thuốc dạng bút có thể được tái sử dụng. Trong dụng cụ cung cấp thuốc dạng bút dùng một lần, không có hộp thuốc thay thế. Đúng hơn là dụng cụ cung cấp thuốc dạng bút dùng một lần được nạp sẵn dược phẩm trong khoang chứa của dụng cụ này. Khi khoang chứa không còn dược phẩm, toàn bộ dụng cụ được bỏ đi.

Nhiều dụng cụ cung cấp thuốc dạng bút và bơm tự tiêm có thể tái sử dụng được dùng để cung cấp dược phẩm theo sáng chế qua đường dưới da. Một số ví dụ về chúng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Vương quốc Anh), DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Thụy Sĩ), bút HUMALOG MIX 75/25™, bút HUMALOG™, bút HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Đan Mạch), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Đan Mạch), bút BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, và OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Đức). Một số ví dụ về dụng cụ cung cấp thuốc dạng bút dùng một lần dùng để cung cấp dược phẩm theo sáng chế qua đường dưới da bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bút SOLOSTAR™ (Sanofi- Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), và KWIKPEN™ (Eli Lilly), bơm tự tiêm SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Đức), EPIPEN (Dey, L.P.), và bút HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL).

Trong một số trường hợp, dược phẩm theo sáng chế có thể được cung cấp trong hệ giải phóng có kiểm soát. Theo một phương án, bơm có thể được sử dụng (xem tài liệu của Langer nêu trên; S e f t on, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987)). Theo một phương án khác, polyme có thể được sử dụng; xem tài liệu: Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Theo một phương án khác nữa, hệ giải phóng có kiểm soát có thể được đưa vào gần nơi cần cung cấp dược phẩm, do đó chỉ cần một phần liều dùng toàn thân (ví dụ, xem tài liệu: Goodson, 1984, Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, trang 115-138). Các hệ giải phóng có kiểm soát khác được bàn luận trong phần tổng quan của

tài liệu: Langer, Science 249:1527-1533 (1990).

Dược phẩm để tiêm có thể bao gồm các dạng liều để tiêm tĩnh mạch, dưới da, trong da và trong cơ, truyền nhỏ giọt, v.v.. Các dược phẩm để tiêm này có thể được bào chế bằng các phương pháp đã biết rõ. Ví dụ, dược phẩm để tiêm có thể được bào chế bằng cách hòa tan, tạo hỗn dịch hoặc nhũ hóa kháng thể hoặc muối của nó được mô tả ở trên trong môi trường nước vô trùng hoặc môi trường dầu thường được sử dụng để tiêm. Để làm môi trường nước để tiêm, nước muối sinh lý, dung dịch đẳng trương chứa glucoza và các chất phụ trợ khác, v.v.. có thể được sử dụng kết hợp với chất hòa tan thích hợp như rượu (ví dụ, etanol), rượu đa chức (ví dụ, propylen glycol, polyetylen glycol), chất hoạt động bề mặt không ion [ví dụ, polysorbat 80, HCO-50 (sản phẩm cộng của polyoxyetylen (50mol) và dầu thầu dầu hydro hóa)] v.v.. Để làm môi trường dầu, dầu vừng, dầu đậu nành, v.v.. được sử dụng, chúng có thể được sử dụng kết hợp với chất hòa tan như benzyl benzoat, rượu benzylic, v.v.. Tốt hơn nếu thuốc tiêm bào chế được này được nạp vào ampun thích hợp.

Có lợi nếu dược phẩm để sử dụng qua đường miệng hoặc sử dụng ngoài đường tiêu hóa được mô tả ở trên được bào chế thành dạng liều đơn vị thích hợp để điều chỉnh thích hợp liều hoạt chất. Dạng liều đơn vị này bao gồm, ví dụ, viên nén, viên tròn, viên nang, thuốc tiêm (ampun), thuốc đạn, v.v.. Lượng kháng thể nêu trên trong dược phẩm thường nằm trong khoảng từ 5 đến 500mg cho một liều đơn vị; đặc biệt là ở dạng thuốc tiêm, tốt hơn nếu lượng kháng thể nêu trên nằm trong khoảng từ 5 đến 100mg và 10 đến 250mg đối với các dạng liều khác.

Sử dụng kháng thể để điều trị

Ngoài các tác dụng khác, các kháng thể theo sáng chế có thể dùng để điều trị, phòng ngừa và/hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn bất kỳ liên quan đến hoặc trung gian bởi sự biểu hiện, sự truyền tín hiệu hoặc hoạt tính của activin A, hoặc có thể điều trị bằng cách ức chế sự tương tác giữa activin A và thụ thể activin A (ví dụ, ActRIIA, ActRIIB, thụ thể activin typ I, v.v..) hoặc theo cách khác ức chế hoạt tính của activin A và/hoặc sự truyền tín hiệu activin A. Ví dụ, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh hoặc tình trạng có thể được chữa khỏi, làm thuyên giảm hoặc cải thiện bằng cách làm tăng sức mạnh của cơ và/hoặc khối lượng cơ và/hoặc chức năng của cơ ở đối tượng, hoặc bằng cách làm thay đổi có lợi quá trình trao đổi chất (xử lý hydrat cacbon, lipid và

protein) bằng cách liên kết đặc hiệu với activin A và không liên kết với các phối tử ActRIIB khác, hoặc bằng cách liên kết đặc hiệu với activin A và GDF8 và không liên kết với các phối tử ActRIIB khác. Ví dụ, sáng chế mô tả phương pháp làm tăng sức mạnh của cơ và/hoặc khối lượng cơ và/hoặc chức năng của cơ ở đối tượng, hoặc để điều trị bệnh hoặc rối loạn đặc trưng bởi sự giảm khối lượng cơ hoặc sức mạnh cơ ở đối tượng, bằng cách cho đối tượng này sử dụng protein liên kết đặc hiệu activin A. Sáng chế còn mô tả phương pháp làm tăng sức mạnh của cơ và/hoặc khối lượng cơ và/hoặc chức năng của cơ ở đối tượng, hoặc để điều trị bệnh hoặc rối loạn đặc trưng bởi sự giảm khối lượng cơ hoặc sức mạnh cơ ở đối tượng, bằng cách cho đối tượng này sử dụng protein liên kết đặc hiệu với activin A và protein liên kết đặc hiệu GDF8. Protein liên kết đặc hiệu activin A và/hoặc protein liên kết đặc hiệu GDF8 bất kỳ được bộc lộ hoặc nói tới ở đây có thể được sử dụng theo các khía cạnh này của sáng chế. Ví dụ, phương pháp điều trị được mô tả theo sáng chế bao gồm việc cho đối tượng sử dụng kháng thể kháng activin A và/hoặc kháng thể kháng GDF8.

Do đó, trong các phương pháp điều trị được mô tả ở đây, kháng thể kháng activin A có thể được sử dụng dưới dạng đơn trị liệu (tức là dưới dạng chất điều trị duy nhất) hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung (ví dụ, kháng thể kháng GDF8), các ví dụ khác về chúng được mô tả ở chỗ khác trong bản mô tả này.

Trong các phương pháp bao gồm việc cho đối tượng sử dụng protein liên kết đặc hiệu với activin A và protein liên kết đặc hiệu GDF8, protein liên kết đặc hiệu với activin A và protein liên kết đặc hiệu với GDF8 có thể được sử dụng cho đối tượng đồng thời hoặc gần như đồng thời, ví dụ, theo một liều điều trị duy nhất, hoặc theo hai liều riêng biệt được sử dụng đồng thời hoặc cách nhau dưới khoảng 5 phút. Theo cách khác, protein liên kết đặc hiệu với activin A và protein liên kết đặc hiệu với GDF8 có thể được sử dụng cho đối tượng lần lượt, ví dụ, theo các liều điều trị riêng biệt cách nhau trên 5 phút.

Sáng chế còn mô tả phương pháp làm tăng sức mạnh của cơ và/hoặc khối lượng cơ và/hoặc chức năng của cơ ở đối tượng, hoặc để điều trị bệnh hoặc rối loạn đặc trưng bởi sự giảm khối lượng cơ hoặc sức mạnh cơ ở đối tượng, bằng cách cho đối tượng này sử dụng phân tử liên kết kháng nguyên chứa vùng liên kết đặc hiệu activin A và vùng liên kết đặc hiệu GDF8. Phân tử liên kết kháng nguyên bất kỳ được bộc lộ hoặc nói tới ở đây

có thể được sử dụng theo khía cạnh này của sáng chế. Ví dụ, phương pháp điều trị theo sáng chế bao gồm việc cho đối tượng sử dụng kháng thể hai giá chứa vùng biến đổi thứ nhất bao gồm cặp vùng HCVR/LCVR liên kết đặc hiệu với activin A và vùng biến đổi thứ hai bao gồm cặp vùng HCVR/LCVR liên kết đặc hiệu với GDF8.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng cùng với một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung, bao gồm, ví dụ, chất ức chế yếu tố sinh trưởng, chất ức chế miễn dịch, chất kháng viêm, chất ức chế chuyển hóa, chất ức chế enzym, và chất độc tế bào/kìm tế bào. (Các) chất điều trị bổ sung này có thể được sử dụng trước, đồng thời với, hoặc sau khi sử dụng protein liên kết đặc hiệu activin A và GDF8 theo sáng chế.

Bệnh, rối loạn và tình trạng làm ví dụ có thể được điều trị bằng dược phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở chứng mất mô cơ, chứng suy mòn (tự phát hoặc do bệnh khác, ví dụ, bệnh ung thư, bệnh suy thận mạn tính, hoặc bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính), tổn thương cơ, chấn thương cơ, hao mòn cơ và teo cơ, ví dụ, teo cơ hoặc hao mòn cơ gây bởi hoặc liên quan đến việc không sử dụng cơ, ví dụ, bất động, nằm liệt giường, tổn thương, điều trị nội khoa hoặc can thiệp phẫu thuật (ví dụ, gãy cổ xương đùi, thay khớp háng, thay khớp gối, và các tổn thương khác ở khớp, gân hoặc dây chằng như đứt dây chằng chéo trước (anterior cruciate ligament: ACL) và/hoặc đứt dây chằng bên giữa (medial collateral ligament: MCL), v.v.), loạn dưỡng cơ (ví dụ, tăng trương lực cơ Duchenne, cơ Becker, cơ chi-đai, cơ mặt-vai-cánh tay (FSHD, còn được gọi là bệnh Landouzy-Déjérine), loạn dưỡng cơ Emery-Dreifuss, loạn dưỡng cơ mắt-hầu, đầu xa bẩm sinh v.v.), bệnh cơ do glucocorticoid gây ra, phục hồi sau đột quỵ (ví dụ, phục hồi liệt nhẹ nửa người sau đột quỵ) hoặc cần thở máy. Dược phẩm theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để điều trị, phòng ngừa hoặc làm thuyên giảm các bệnh như bệnh ung thư, bệnh béo phì, bệnh đái tháo đường, bệnh viêm khớp, bệnh xơ cứng rải rác, loạn dưỡng cơ, bệnh xơ cứng cột bên teo cơ, bệnh Parkinson, bệnh loãng xương, bệnh viêm xương khớp, bệnh thừa xương, và hội chứng chuyển hóa (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở bệnh đái tháo đường, bệnh béo phì, rối loạn dinh dưỡng, teo cơ quan, bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính, và chứng chán ăn). Các bệnh, rối loạn và tình trạng khác có thể được phòng ngừa, điều trị và/hoặc làm thuyên giảm bằng cách sử dụng dược phẩm theo sáng chế bao gồm bệnh nhiễm khuẩn, bệnh suy tim mạn tính, u tế bào ưa crôm lạnh tính và ác tính, u xơ tử cung, tiền sản giật, sẹo lồi và sẹo phì đại, và bệnh tăng áp lực động mạch phổi.

Cải thiện độ đặc hiệu liên kết và hoạt tính

Sáng chế mô tả phương pháp làm tăng sức mạnh của cơ và/hoặc khối lượng cơ và/hoặc chức năng của cơ ở đối tượng, hoặc để điều trị bệnh hoặc rối loạn đặc trưng bởi sự giảm khối lượng cơ hoặc sức mạnh cơ ở đối tượng, hoặc để điều trị bệnh hoặc rối loạn gây bởi, thúc đẩy bởi hoặc làm trầm trọng bởi hoạt tính của activin A, mà không gây ra các tác dụng có hại liên quan đến việc sử dụng các phân tử liên kết với nhiều phối tử ActRIIB (ví dụ, 3 hoặc hoặc nhiều phối tử ActRIIB). Nói cách khác, các phương pháp sử dụng kháng thể kháng activin A hoặc protein liên kết kháng nguyên của chúng (ví dụ, trong đó kháng thể kháng activin A chỉ liên kết đáng kể với activin A) có thể điều trị bệnh hoặc rối loạn mà không gây ra các tác dụng có hại hoặc không mong muốn như đã thấy với các phân tử liên kết với nhiều phối tử ActRIIB. Ví dụ, phân tử sử dụng trên lâm sàng này được gọi là ACE-031 (Acceleron Pharma, Inc., Cambridge, MA) là một multimer bao gồm phần ngoại bào của ActRIIB được dung hợp với vùng Fc của IgG (phân tử này còn được gọi ở đây là "ActRIIB-Fc"). ActRIIB-Fc liên kết với activin A cũng như các phối tử ActRIIB khác như activin B, GDF8, GDF11, BMP9, BMP10, và TGF β , và được biết là gây ra các tác dụng có hại khác nhau khi được sử dụng cho người. Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện được rằng việc ức chế đặc hiệu activin A và GDF8 (ví dụ, bằng cách sử dụng kháng thể kháng activin A và kháng thể kháng GDF8), trong khi không ức chế các phối tử, ActRIIB khác như activin B, GDF11, BMP9, BMP10, và TGF β , sẽ làm tăng khối lượng cơ ít nhất là tương đương với mức tăng quan sát được khi sử dụng ActRIIB-Fc, mà không gây ra các tác dụng có hại liên quan đến chất liên kết như ActRIIB-Fc.

Điều trị kết hợp và dược phẩm

Sáng chế bao gồm dược phẩm và chế phẩm điều trị chứa kháng thể kháng activin A bất kỳ được mô tả ở đây kết hợp với một hoặc nhiều hoạt chất điều trị bổ sung, và phương pháp điều trị bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị sử dụng hỗn hợp này. Sáng chế còn bao gồm dược phẩm và chế phẩm điều trị chứa kháng thể kháng activin A bất kỳ được mô tả ở đây kết hợp với một hoặc nhiều hoạt chất điều trị bổ sung, và phương pháp điều trị bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị sử dụng hỗn hợp này. Ví dụ, kháng thể kháng activin A theo sáng chế cũng có thể được sử dụng và/hoặc đồng bào chế kết hợp với chất kháng virus, chất kháng sinh, thuốc giảm đau, corticosteroid, steroid, oxy, chất

chống oxy hóa, chất tạo chelat với kim loại, IFN-gama, và/hoặc NSAID. Kháng thể kháng activin A theo sáng chế cũng có thể được sử dụng như một phần của phác đồ điều trị bao gồm việc xạ trị và/hoặc hóa trị thông thường (ví dụ, trong phương pháp điều trị bệnh ung thư hoặc ức chế sự phát triển của khối u). Hoạt chất điều trị bổ sung bất kỳ nêu trên có thể được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng activin A bất kỳ theo sáng chế để điều trị bệnh hoặc rối loạn bất kỳ trong đó việc sử dụng kháng thể kháng activin A là có lợi, bao gồm, ví dụ, chứng mất mô cơ, chứng suy mòn, tổn thương cơ, hao mòn cơ và teo cơ. Hoạt chất điều trị bổ sung bất kỳ nêu trên cũng có thể được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng activin A bất kỳ theo sáng chế cùng với chất ức chế GDF8 (ví dụ, kháng thể kháng GDF8).

(Các) hoạt chất điều trị bổ sung này có thể được sử dụng cho đối tượng trước khi sử dụng kháng thể kháng activin A theo sáng chế. Ví dụ, thành phần thứ nhất có thể được cho là sử dụng "trước" thành phần thứ hai nếu thành phần thứ nhất được sử dụng 1 tuần trước khi, 72 giờ trước khi, 60 giờ trước khi, 48 giờ trước khi, 36 giờ trước khi, 24 giờ trước khi, 12 giờ trước khi, 6 giờ trước khi, 5 giờ trước khi, 4 giờ trước khi, 3 giờ trước khi, 2 giờ trước khi, 1 giờ trước khi, 30 phút trước khi, 15 phút trước khi, 10 phút trước khi, 5 phút trước khi, hoặc dưới 1 phút trước khi việc sử dụng thành phần thứ hai. Theo các phương án khác, (các) hoạt chất điều trị bổ sung có thể được sử dụng cho đối tượng sau khi sử dụng kháng thể kháng activin A theo sáng chế. Ví dụ, thành phần thứ nhất có thể được cho là sử dụng "sau" thành phần thứ hai nếu thành phần thứ nhất được sử dụng sau khi sử dụng thành phần thứ hai 1 phút, 5 phút, 10 phút, 15 phút, 30 phút, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ, 6 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ, 60 giờ, 72 giờ. Theo các phương án khác nữa, (các) hoạt chất điều trị bổ sung có thể được sử dụng cho đối tượng đồng thời với khi sử dụng kháng thể kháng activin A theo sáng chế. Việc sử dụng "đồng thời" nhằm mục đích của sáng chế bao gồm việc cho đối tượng sử dụng kháng thể kháng activin A và hoạt chất điều trị bổ sung theo một dạng liều duy nhất, hoặc theo các dạng liều riêng biệt cách nhau 30 phút hoặc dưới 30 phút. Nếu được sử dụng trong các dạng liều riêng biệt, mỗi dạng liều có thể được sử dụng qua cùng một đường sử dụng (ví dụ, cả kháng thể kháng activin A và hoạt chất điều trị bổ sung có thể được sử dụng qua đường tĩnh mạch, dưới da, trong dịch kính, v.v.); theo cách khác, mỗi dạng liều có thể được sử dụng qua đường khác nhau (ví dụ, kháng thể kháng activin A có thể được sử dụng khu trú (ví dụ, trong dịch kính) và hoạt chất điều trị bổ sung có thể được sử dụng

toàn thân). Trong trường hợp bất kỳ, việc sử dụng các thành phần này trong một dạng liều duy nhất, trong các dạng liều riêng biệt qua cùng một đường sử dụng, hoặc trong các dạng liều riêng biệt qua các đường sử dụng khác nhau đều được cho là "sử dụng đồng thời" nhằm mục đích của sáng chế. Nhằm mục đích của sáng chế, việc sử dụng kháng thể kháng activin A "trước", "đồng thời với" hoặc "sau khi" sử dụng hoạt chất điều trị bổ sung (như các thuật ngữ được định nghĩa ở trên) được cho là việc sử dụng kháng thể kháng activin A "kết hợp với" hoạt chất điều trị bổ sung).

Sáng chế bao gồm dược phẩm trong đó kháng thể kháng activin A theo sáng chế được đồng bào chế với một hoặc nhiều hoạt chất điều trị bổ sung như được mô tả ở đây.

Liều lượng

Nói chung, lượng hoạt chất (ví dụ, kháng thể kháng activin A, kháng thể kháng GDF8 được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng activin A, hoặc kháng thể hai giá liên kết đặc hiệu với activin A và GDF8) có thể được sử dụng cho đối tượng là lượng hữu hiệu điều trị. Như được sử dụng ở đây, cụm từ "lượng hữu hiệu điều trị" để chỉ liều protein liên kết đặc hiệu kháng nguyên và/hoặc phân tử liên kết kháng nguyên làm tăng một hoặc nhiều thông số sau có thể phát hiện được: thể trọng, khối lượng cơ (ví dụ, khối lượng cơ cẳng chân trước [TA], khối lượng cơ cơ bụng chân [GA], khối lượng cơ bốn đầu [Quad] v.v.), sức mạnh của cơ, và/hoặc chức năng của cơ. Ví dụ, "lượng hữu hiệu điều trị" của protein liên kết đặc hiệu với activin A và/hoặc protein liên kết đặc hiệu GDF8 bao gồm, ví dụ, lượng protein liên kết đặc hiệu activin A và/hoặc protein liên kết đặc hiệu GDF8 mà khi sử dụng cho đối tượng thử nghiệm sẽ làm tăng khối lượng cơ TA hoặc cơ GA ít nhất 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% hoặc nhiều hơn 60% so với đối tượng được điều trị bằng chất đối chứng, ví dụ, như được thể hiện trong Ví dụ 7 ở đây.

Trong trường hợp kháng thể theo sáng chế (ví dụ, kháng thể kháng activin A, kháng thể kháng GDF8 được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng activin A, hoặc kháng thể hai giá liên kết đặc hiệu với activin A và GDF8), lượng hữu hiệu điều trị của kháng thể tương ứng có thể nằm trong khoảng từ 0,05mg đến khoảng 600mg; ví dụ, khoảng 0,05mg, khoảng 0,1mg, khoảng 1,0mg, khoảng 1,5mg, khoảng 2,0mg, khoảng 10mg, khoảng 20mg, khoảng 30mg, khoảng 40mg, khoảng 50mg, khoảng 60mg, khoảng 70mg, khoảng 80mg, khoảng 90mg, khoảng 100mg, khoảng 110mg, khoảng

120mg, khoảng 130mg, khoảng 140mg, khoảng 150mg, khoảng 160mg, khoảng 170mg, khoảng 180mg, khoảng 190mg, khoảng 200mg, khoảng 210mg, khoảng 220mg, khoảng 230mg, khoảng 240mg, khoảng 250mg, khoảng 260mg, khoảng 270mg, khoảng 280mg, khoảng 290mg, khoảng 300mg, khoảng 310mg, khoảng 320mg, khoảng 330mg, khoảng 340mg, khoảng 350mg, khoảng 360mg, khoảng 370mg, khoảng 380mg, khoảng 390mg, khoảng 400mg, khoảng 410mg, khoảng 420mg, khoảng 430mg, khoảng 440mg, khoảng 450mg, khoảng 460mg, khoảng 470mg, khoảng 480mg, khoảng 490mg, khoảng 500mg, khoảng 510mg, khoảng 520mg, khoảng 530mg, khoảng 540mg, khoảng 550mg, khoảng 560mg, khoảng 570mg, khoảng 580mg, khoảng 590mg, khoảng 600mg, khoảng 610mg, khoảng 620mg, khoảng 630mg, khoảng 640mg, khoảng 650mg, khoảng 660mg, khoảng 670mg, khoảng 680mg, khoảng 690mg, khoảng 700mg, khoảng 710mg, khoảng 720mg, khoảng 730mg, khoảng 740mg, khoảng 750mg, khoảng 760mg, khoảng 770mg, khoảng 780mg, khoảng 790mg, khoảng 800mg, khoảng 810mg, khoảng 820mg, khoảng 830mg, khoảng 840mg, khoảng 850mg, khoảng 860mg, khoảng 870mg, khoảng 880mg, khoảng 890mg, khoảng 900mg, khoảng 910mg, khoảng 920mg, khoảng 930mg, khoảng 940mg, khoảng 950mg, khoảng 960mg, khoảng 970mg, khoảng 980mg, khoảng 990mg, hoặc khoảng 1000mg.

Lượng kháng thể theo sáng chế (ví dụ, kháng thể kháng activin A, kháng thể kháng GDF8 được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng activin A, hoặc kháng thể hai giá liên kết đặc hiệu với activin A và GDF8) trong các liều riêng biệt có thể được thể hiện bằng số miligam kháng thể cho 1 kilogam thể trọng bệnh nhân (tức là mg/kg). Ví dụ, kháng thể kháng activin A, kháng thể kháng GDF8 và/hoặc kháng thể hai giá kháng activin A/kháng GDF8 theo sáng chế có thể được sử dụng cho bệnh nhân ở liều nằm trong khoảng từ 0,0001 đến khoảng 50 mg/kg thể trọng bệnh nhân (ví dụ, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6,0 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8,0 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9,0 mg/kg, 9,5 mg/kg, 10,0 mg/kg, 10,5 mg/kg, 11,0 mg/kg, 11,5 mg/kg, 12,0 mg/kg, 12,5 mg/kg, 13,0 mg/kg, 13,5 mg/kg, 14,0 mg/kg, 14,5 mg/kg, 15,0 mg/kg, 15,5 mg/kg, 16,0 mg/kg, 16,5 mg/kg, 17,0 mg/kg, 17,5 mg/kg, 18,0 mg/kg, 18,5mg/kg, 19,0 mg/kg, 19,5 mg/kg, 20,0 mg/kg, v.v..).

Dược phẩm theo sáng chế có thể chứa lượng bằng nhau của protein liên kết đặc hiệu activin A và protein liên kết đặc hiệu GDF8. Theo cách khác, lượng protein liên kết

đặc hiệu activin A trong dược phẩm có thể nhỏ hơn hoặc lớn hơn lượng protein liên kết đặc hiệu GDF8. Bằng cách thử nghiệm thông thường, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có thể xác định lượng thích hợp của các thành phần riêng biệt trong dược phẩm theo sáng chế cần thiết để tạo ra tác dụng điều trị mong muốn.

Chế độ sử dụng

Theo một số phương án nhất định theo sáng chế, nhiều liều hoạt chất (ví dụ, kháng thể kháng activin A, kháng thể kháng GDF8 được sử dụng kết hợp với kháng thể kháng activin A, dược phẩm chứa hỗn hợp của kháng thể kháng activin A và hoạt chất điều trị bổ sung bất kỳ nêu ở đây, bao gồm, ví dụ, kháng thể kháng GDF8, hoặc kháng thể hai giá liên kết đặc hiệu với activin A và GDF8) có thể được sử dụng cho đối tượng trong một khoảng thời gian xác định. Các phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm lần lượt cho đối tượng sử dụng nhiều liều hoạt chất theo sáng chế. Như được sử dụng ở đây, "việc sử dụng lần lượt" để chỉ rằng mỗi liều hoạt chất được sử dụng cho đối tượng ở thời điểm khác nhau, ví dụ, vào các ngày khác nhau cách nhau một khoảng thời gian định trước (ví dụ, vài giờ, vài ngày, vài tuần hoặc vài tháng). Sáng chế mô tả các phương pháp bao gồm việc lần lượt cho bệnh nhân sử dụng một liều hoạt chất đầu tiên, sau đó sử dụng một hoặc nhiều liều hoạt chất thứ hai, và tùy ý một hoặc nhiều liều hoạt chất thứ ba.

Thuật ngữ "liều ban đầu", "liều thứ hai" và "liều thứ ba" để chỉ trình tự theo thời gian của việc sử dụng hoạt chất, ví dụ, kháng thể kháng activin A theo sáng chế hoặc hỗn hợp theo sáng chế, ví dụ, kháng thể kháng activin A và kháng thể kháng GDF8. Do đó, "liều ban đầu" là liều được sử dụng khi bắt đầu chế độ điều trị (còn được gọi là "liều cơ sở"); "các liều thứ hai" là các liều được sử dụng sau liều ban đầu; và "các liều thứ ba" là các liều được sử dụng sau các liều thứ hai. Các liều ban đầu, thứ hai và thứ ba này có thể đều chứa lượng hoạt chất giống nhau, ví dụ, kháng thể kháng activin A, nhưng nói chung có thể khác nhau về tần suất sử dụng. Tuy nhiên, theo một số phương án nhất định, lượng hoạt chất, ví dụ, kháng thể kháng activin A, trong các liều ban đầu, liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba là khác nhau (ví dụ, được điều chỉnh tăng hoặc giảm thích hợp) trong quá trình điều trị. Theo một số phương án nhất định, hai hoặc nhiều liều (ví dụ, 2, 3, 4, hoặc 5 liều) được sử dụng khi bắt đầu chế độ điều trị để làm "liều tải", sau đó là các liều được sử dụng với tần suất ít hơn (ví dụ, "liều duy trì").

Theo một số phương án nhất định làm ví dụ của sáng chế, mỗi liều thứ hai và/hoặc thứ ba được sử dụng sau liều ngay trước đó 1 đến 26 tuần (ví dụ, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ tuần, hoặc nhiều tuần hơn). Thuật ngữ "liều ngay trước đó" như được sử dụng ở đây trong trình tự nhiều lần sử dụng để chỉ liều kháng thể kháng activin A được sử dụng cho bệnh nhân trước khi sử dụng chính liều tiếp theo trong trình tự này mà không có các liều xen giữa.

Phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế có thể bao gồm việc cho bệnh nhân sử dụng số lượng bất kỳ của liều thứ hai và/hoặc liều thứ ba của hoạt chất theo sáng chế, ví dụ, kháng thể kháng activin A. Ví dụ, theo một số phương án nhất định, chỉ một liều thứ hai duy nhất được sử dụng cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều liều thứ hai (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn 8 liều thứ hai) được sử dụng cho bệnh nhân. Tương tự, theo một số phương án nhất định, chỉ một liều thứ ba duy nhất được sử dụng cho bệnh nhân. Theo các phương án khác, hai hoặc nhiều liều thứ ba (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc nhiều hơn 8 liều thứ ba) được sử dụng cho bệnh nhân.

Theo các phương án cần sử dụng nhiều liều thứ hai, mỗi liều thứ hai có thể được sử dụng ở tần suất giống như các liều thứ hai còn lại. Ví dụ, mỗi liều thứ hai có thể được sử dụng cho bệnh nhân 1 đến 2 tuần hoặc 1 đến 2 tháng sau liều ngay trước đó. Tương tự, theo các phương án cần sử dụng nhiều liều thứ ba, mỗi liều thứ ba có thể được sử dụng ở tần suất giống như các liều thứ ba còn lại. Ví dụ, mỗi liều thứ ba có thể được sử dụng cho bệnh nhân 2 đến 12 tuần sau liều ngay trước đó. Theo một số phương án của sáng chế, tần suất mà ở đó các liều thứ hai và/hoặc thứ ba được sử dụng cho bệnh nhân có thể thay đổi trong thời gian điều trị. Tần suất sử dụng cũng có thể được điều chỉnh trong thời gian điều trị bởi bác sĩ điều trị phụ thuộc vào yêu cầu của từng bệnh nhân sau khi khám lâm sàng.

Sáng chế bao gồm các chế độ sử dụng trong đó 2 đến 6 liều tải được sử dụng cho bệnh nhân ở tần suất thứ nhất (ví dụ, một tuần một lần, hai tuần một lần, ba tuần một lần, một tháng một lần, hai tháng một lần, v.v.), sau đó sử dụng hai hoặc nhiều liều duy trì cho bệnh nhân với tần suất ít hơn. Ví dụ, theo khía cạnh này theo sáng chế, nếu liều tải được sử dụng ở tần suất một tháng một lần thì liều duy trì có thể được sử dụng cho bệnh

nhân sáu tuần một lần, hai tháng một lần, ba tháng một lần v.v..).

Sử dụng kháng thể để chẩn đoán

Kháng thể kháng activin A theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để phát hiện và/hoặc xác định activin A, hoặc tế bào biểu hiện activin A trong mẫu, ví dụ dùng cho mục đích chẩn đoán. Ví dụ, kháng thể kháng activin A, hoặc đoạn của nó, có thể được sử dụng để chẩn đoán tình trạng hoặc bệnh đặc trưng bởi sự biểu hiện activin A khác thường (ví dụ, biểu hiện quá mức, biểu hiện dưới mức, không biểu hiện v.v..). Thử nghiệm chẩn đoán activin A làm ví dụ có thể bao gồm cho mẫu thu được từ bệnh nhân tiếp xúc với kháng thể kháng activin A theo sáng chế, trong đó kháng thể kháng activin A này được đánh dấu bằng chất đánh dấu phát hiện được hoặc phân tử thông báo. Theo cách khác, kháng thể kháng activin A không được đánh dấu có thể được sử dụng trong các ứng dụng chẩn đoán kết hợp với kháng thể thứ hai, chính kháng thể này được đánh dấu bằng chất đánh dấu phát hiện được. Chất đánh dấu phát hiện được hoặc phân tử thông báo có thể là chất đồng vị phóng xạ, như ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , hoặc ^{125}I ; gốc phát huỳnh quang hoặc gốc phát quang hóa học như florescein isothiocyanat, hoặc rodamin; hoặc enzym như phosphatase kiềm, beta-galactosidaza, peroxidaza cây củ cải cay, hoặc luxiferaza. Các thử nghiệm cụ thể làm ví dụ có thể được sử dụng để phát hiện hoặc xác định activin A trong mẫu bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay: RIA), và thử nghiệm phân loại tế bào được hoạt hóa huỳnh quang (fluorescence-activated cell sorting: FACS).

Các mẫu có thể được sử dụng trong các thử nghiệm chẩn đoán activin A theo sáng chế bao gồm mẫu mô hoặc mẫu dịch bất kỳ thu được từ bệnh nhân chứa lượng phát hiện được của protein activin A, hoặc đoạn của nó, trong điều kiện bình thường hoặc điều kiện bệnh lý. Nói chung, lượng activin A trong mẫu cụ thể thu được từ người khỏe mạnh (ví dụ, bệnh nhân không bị bệnh hoặc tình trạng liên quan đến mức hoặc hoạt tính activin A bất thường) sẽ được xác định để thiết lập mức activin A gốc, hoặc mức activin A chuẩn. Sau đó, mức activin A gốc này có thể được so sánh với mức activin A xác định được trong các mẫu thu được từ những người nghi ngờ mắc bệnh hoặc tình trạng liên quan đến activin A.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được đưa ra để cung cấp nội dung bộc lộ và mô tả đầy đủ cho người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này về cách điều chế được phẩm theo sáng chế và phương pháp sử dụng được phẩm này, và không được dự định làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Đã cố gắng đảm bảo độ chính xác của các con số sử dụng (ví dụ, lượng, nhiệt độ v.v..) nhưng sai số và độ lệch thực nghiệm nào đó cần được tính đến. Nếu không được chỉ rõ theo cách khác, phần là phần trọng lượng, trọng lượng phân tử là trọng lượng phân tử trung bình, nhiệt độ được tính theo độ Xenxiut, và áp suất là bằng hoặc gần bằng áp suất khí quyển.

Ví dụ 1. Tạo ra kháng thể của người kháng activin A

Chất sinh miễn dịch chứa protein activin A (dimer inhibin- β A) được sử dụng trực tiếp cùng với chất phụ trợ để kích thích đáp ứng miễn dịch cho chuột VELOCIMMUNE® chứa ADN mã hóa vùng biến đổi của chuỗi nhẹ kappa và chuỗi nặng của globulin miễn dịch của người. Phản ứng miễn dịch kháng thể được theo dõi bằng thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu với activin A. Khi đạt được phản ứng miễn dịch cần thiết, tế bào lách được thu hoạch và dung hợp với tế bào u tủy của chuột nhất để duy trì khả năng sống của chúng và tạo ra các dòng tế bào lai. Các dòng tế bào lai này được sàng lọc và lựa chọn để xác định các dòng tế bào tạo ra kháng thể đặc hiệu activin A. Bằng cách sử dụng kỹ thuật này, đã thu được một số kháng thể thể khảm kháng activin A (tức là tức là các kháng thể có vùng biến đổi của người và vùng hằng định của chuột nhất). Kháng thể làm ví dụ thu được theo cách này là H2aM10965N. Sau đó, vùng biến đổi của người thu được từ kháng thể thể khảm này được tạo dòng vào vùng hằng định của người để tạo ra kháng thể kháng activin A đầy đủ của người như được mô tả ở đây.

Kháng thể kháng activin A cũng được phân lập trực tiếp từ các tế bào B dương tính với kháng nguyên mà không dung hợp với tế bào u tủy như được mô tả trong US 2007/0280945A1. Bằng cách sử dụng phương pháp này, sẽ thu được một số kháng thể kháng thể kháng activin A đầy đủ của người (tức là các kháng thể có vùng biến đổi của người và vùng hằng định của người); các kháng thể làm ví dụ được tạo ra theo cách này được ký hiệu như sau: H4H10423P, H4H10429P, H4H10430P, H4H10432P2, H4H10440P2, H4H10442P2, H4H10436P2, và H4H10446P2.

Một số đặc tính sinh học của kháng thể kháng activin A làm ví dụ được tạo ra theo phương pháp nêu trong Ví dụ này được mô tả chi tiết trong các Ví dụ nêu dưới đây.

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

Bảng 1 đưa ra cặp trình tự axit amin của vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể kháng activin A và ký hiệu nhận dạng kháng thể tương ứng của chúng. Ký hiệu nhận dạng của trình tự axit nucleic tương ứng được nêu trong Bảng 2.

Bảng 1: Ký hiệu nhận dạng của trình tự axit amin

Ký hiệu kháng thể	Trình tự nhận biết số							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H10423P	2	4	6	8	10	12	14	16
H4H10424P	18	20	22	24	26	28	30	32
H4H10426P	34	36	38	40	42	44	46	48
H4H10429P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4H10430P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4H10432P2	82	84	86	88	90	92	94	96
H4H10433P2	98	100	102	104	90	92	94	96
H4H10436P2	106	108	110	112	90	92	94	96
H4H10437P2	114	116	118	120	90	92	94	96
H4H10438P2	122	124	126	128	90	92	94	96
H4H10440P2	130	132	134	136	90	92	94	96
H4H10442P2	138	140	142	144	146	148	150	152
H4H10445P2	154	156	158	160	146	148	150	152
H4H10446P2	162	164	166	168	146	148	150	152
H4H10447P2	170	172	174	176	146	148	150	152
H4H10448P2	178	180	182	184	146	148	150	152
H4H10452P2	186	188	190	192	146	148	150	152
H4H10468P2	194	196	198	200	146	148	150	152
H2aM10965N	202	204	206	208	210	212	214	216

Bảng 2: ký hiệu nhận dạng trình tự axit nucleic

	Trình tự nhận biết số							
Ký hiệu kháng thể	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H10423P	1	3	5	7	9	11	13	15
H4H10424P	17	19	21	23	25	27	29	31
H4H10426P	33	35	37	39	41	43	45	47
H4H10429P	49	51	53	55	57	59	61	63
H4H10430P	65	67	69	71	73	75	77	79
H4H10432P2	81	83	85	87	89	91	93	95
H4H10433P2	97	99	101	103	89	91	93	95
H4H10436P2	105	107	109	111	89	91	93	95
H4H10437P2	113	115	117	119	89	91	93	95
H4H10438P2	121	123	125	127	89	91	93	95
H4H10440P2	129	131	133	135	89	91	93	95
H4H10442P2	137	139	141	143	145	147	149	151
H4H10445P2	153	155	157	159	145	147	149	151
H4H10440P2	161	163	165	167	145	147	149	151
H4H10447P2	169	171	173	175	145	147	149	151
H4H10448P2	177	179	181	183	145	147	149	151
H4H10452P2	185	187	189	191	145	147	149	151
H4H10468P2	193	195	197	199	145	147	149	151
H2aM10965N	201	203	205	207	209	211	213	215

Các kháng thể thường được gọi ở đây theo danh pháp sau: tiền tố Fc (ví dụ, "H1M," "H2aM," "H4H"), sau đó là ký hiệu nhận dạng bằng số (ví dụ, "10423," "10424," hoặc "10426" như được thể hiện trong các Bảng 1 và 2), sau đó là hậu tố "P", "P2" hoặc "N". Do đó, theo danh pháp này, kháng thể có thể được ký hiệu ở đây là "H4H10423P", "H4H10432P2", "H2aM10965N" v.v.. Tiền tố H1M, H2M và H4H trên ký hiệu kháng thể được sử dụng ở đây để chỉ isotyp vùng Fc cụ thể của kháng thể. Ví dụ, kháng thể "H2aM" có vùng Fc của IgG2a của chuột, trong khi kháng thể "H4H" có vùng Fc của IgG4 của người. Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rõ, một kháng thể có isotyp vùng Fc cụ thể có thể được biến đổi thành kháng thể có isotyp

vùng Fc khác (ví dụ, kháng thể có vùng Fc của IgG2a của chuột có thể được biến đổi thành kháng thể có IgG4 của người v.v.), nhưng trong trường hợp bất kỳ, các vùng biến đổi (kể cả vùng CDR) - được thể hiện bằng các ký hiệu nhận dạng bằng số trong Bảng 1 - sẽ vẫn giống nhau, và đặc tính liên kết được cho là giống nhau hoặc gần giống nhau không phụ thuộc vào bản chất của vùng Fc.

Cấu trúc kháng thể đối chứng sử dụng trong các ví dụ sau đây

Các phân tử kháng thể đối chứng kháng activin A được sử dụng trong các Ví dụ sau đây nhằm mục đích so sánh. Kháng thể đối chứng được ký hiệu ở đây là đối chứng 1 là kháng thể kháng activin A của người có trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ "A1" như nêu trong US 8,309,082. Kháng thể đối chứng 2 là kháng thể kháng thụ thể activin typ II B của người (anti-ActR2B mAb) được ký hiệu là MOR8159 trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2012/0237521 A1. Kháng thể đối chứng 3 là kháng thể đơn dòng kháng activin A của chuột, là sản phẩm của R&D Systems, Minneapolis, MN (mã số trong catalog là MAB3381). Kháng thể đối chứng 4 là phân tử dung hợp thụ thể activin typ IIB-Fc (vùng ngoại bào dễ tan của thụ thể activin RIIB được tạo ra với protein dung hợp IgG1 Fc đầu C của người (E23-P133 của NP_001097, sau đó là nhóm liên kết Gly- Ser, sau đó là protein dung hợp IgG1 Fc đầu C của người), trình tự của chúng là trình tự nhận biết số 227.

Ví dụ 3. Sự liên kết của kháng thể với activin A của người được xác định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt

Ái lực liên kết và hằng số động học của sự liên kết của kháng nguyên với kháng thể đơn dòng kháng activin A tinh khiết được chọn của người được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt thời gian thực (Biacore T200 hoặc Biacore 4000, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) ở nhiệt độ 25°C và 37°C. Các kháng thể được ký hiệu bằng vùng Fc của chuột (tiền tố H2aM) hoặc vùng Fc của người (tiền tố H4H) được bắt giữ trên các bề mặt cảm biến kháng Fc tương ứng của chúng (kiểu bắt giữ mAb). Kháng thể kháng activin A được bắt giữ trên bề mặt kháng thể đa dòng của dê kháng IgG của chuột (GE Healthcare, #BR-1008-38) hoặc kháng thể đơn dòng của chuột kháng IgG của người (GE Healthcare, #BR-1008-39) được tạo ra nhờ liên kết trực tiếp amin với chip cảm biến Biacore CM5. Các thử nghiệm động học được thực hiện bằng cách sử dụng HBS-EP (10mM HEPES, 150mM NaCl,

3mM EDTA, 0,05% chất hoạt động bề mặt P20, ở độ pH=7,4) hoặc PBS-P (10mM natri phosphat, 2,7mM KCl, 137mM NaCl, 0,02% NaN₃, 0,05% chất hoạt động bề mặt P20, độ pH=7,4), để làm dung dịch đệm thử nghiệm và dung dịch đệm chứa mẫu. Tỷ lệ liên kết kháng nguyên-kháng thể được xác định bằng cách bơm các nồng độ khác nhau (pha loãng 4 lần trong khoảng từ 50 đến 0,2nM) của activin A (R&D Systems, # 338-AC-050/CF), activin B (R&D Systems, # 659-AB-025/CF), activin AB (R&D Systems, # 1006-AB-005), activin AC (R&D Systems, # 4879-AC/CF), hoặc inhibin E (Novus Biologicals, #H00083729-P01) trên bề mặt kháng thể bị bắt giữ. Quá trình liên kết kháng thể-kháng nguyên được theo dõi trong thời gian 240 giây trong khi quá trình phân ly trong dung dịch đệm được theo dõi trong thời gian 600 giây. Hằng số tốc độ động học liên kết và phân ly được xác định bằng cách xử lý và làm khớp dữ liệu bằng chương trình phần mềm Scrubber phiên bản 2.0c. Hằng số phân ly cân bằng của liên kết (K_D) và thời gian bán hủy phân ly ($t_{1/2}$) được tính từ các hằng số tốc độ động học như sau: K_D (M) = k_d/k_a và $t_{1/2}$ (phút) = $[\ln 2/(60 \cdot k_d)]$. Các thông số liên kết động học của các kháng thể đơn dòng kháng activin A khác nhau được thể hiện trong các bảng từ 3 đến 10. (NB = không quan sát được sự liên kết trong điều kiện thử nghiệm được sử dụng; NT = không thử nghiệm).

Bảng 3: Đặc trưng liên kết của kháng thể kháng activin A với activin A ở nhiệt độ 25°C

Kháng thể	Lượng mAb được bắt giữ (RU $\pm$ SE)	ActivinA-20nM (RU)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Mol)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10423P	86,2 $\pm$ 0,7	19,4	3,33E+06	1,09E-04	3,26E-11	106,4
H4H10424P	337	82	3,14E+06	7,19E-04	2,29E-10	16
H4H10426P	81	23	1,18E+07	7,00E-04	5,95E-11	16
H4H10429P	115,2 $\pm$ 1	24,9	7,82E+06	6,39E-05	8,17E-12	180,8
H4H10430P	90,3 $\pm$ 4,2	19,4	4,75E+07	1,67E-04	3,52E-12	69
H4H10432P2	109,6 $\pm$ 1,2	20,7	1,57E+07	5,00E-05	$\leq 3,18E-12$	≥ 231
H4H10433P2	102	16	1,42E+07	5,77E-04	4,06E-11	20
H4H10436P2	113,6 $\pm$ 0,6	23,2	8,85E+06	1,68E-04	1,90E-11	68,7
H4H10437P2	167	30	1,58E+07	2,13E-03	1,34E-10	5

Kháng thể	Lượng mAb được bắt giữ (RU $\pm$ SE)	ActivinA-20nM (RU)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Mol)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10438P2	124	25	1,20E+07	5,88E-04	4,92E-11	20
H4H10440P2	79,2 $\pm$ 0,7	12,9	3,76E+06	9,28E-05	2,47E-11	124,5
H4H10442P2	139,3 $\pm$ 1	31,3	1,10E+07	5,00E-05	$\leq$ 4,55E-12	$\geq$ 231
H4H10445P2	149	43	2,40E+06	5,00E-05	$\leq$ 2,08E-11	$\geq$ 231
H4H10446P2	104,6 $\pm$ 0,7	24,1	1,29E+07	5,00E-05	$\leq$ 3,88E-12	$\geq$ 231
H4H10447P2	164	43	2,36E+06	5,00E-05	$\leq$ 2,12E-11	$\geq$ 231
H4H10448P2	244	64	4,76E+06	5,00E-05	$\leq$ 1,05E-11	$\geq$ 231
H4H10452P2	191	55	4,69E+06	5,00E-05	$\leq$ 1,07E-11	$\geq$ 231
H4H10468P2	93 $\pm$ 0,1	21,7	7,86E+06	5,00E-05	$\leq$ 6,36E-12	$\geq$ 231
H2aM10965N	393	76	1,48E+06	1,10E-03	7,45E-10	10
Đối chứng 1	84,7 $\pm$ 0,3	15,9	7,26E+06	9,92E-05	1,37E-11	116,4

Đối với các giá trị k_d được in nghiêng, không quan sát thấy sự phân ly của chất phân tích trong các điều kiện thử nghiệm này, và do đó k_d được cố định ở 5,0E-0,5s⁻¹.

Bảng 4: Đặc trưng liên kết của kháng thể kháng activin A với activin A ở nhiệt độ 37°C

Kháng thể	Lượng mAb được bắt giữ (RU $\pm$ SE)	ActivinA-20nM (RU)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Mol)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10423P	101 $\pm$ 1,4	25,2	3,95E+06	5,00E-05	$\leq$ 1,26E-11	$\geq$ 231
H4H10424P	231	58	4,59E+06	3,64E-03	7,94E-10	3
H4H10426P	71	21	1,61E+07	1,98E-03	1,23E-10	6
H4H10429P	150,8 $\pm$ 5,3	31,4	1,33E+07	5,00E-05	$\leq$ 3,75E-12	$\geq$ 231
H4H10430P	109,3 $\pm$ 1,3	25,0	3,80E+07	1,51E-04	3,97E-12	76,5
H4H10432P2	141,8 $\pm$ 1,6	25,1	2,30E+07	5,00E-05	$\leq$ 2,18E-12	$\geq$ 231
H4H10433P2	85	12	2,00E+07	1,07E-03	5,37E-11	11
H4H10436P2	139,8 $\pm$ 1,4	29,4	1,49E+07	5,00E-05	$\leq$ 3,35E-12	$\geq$ 231
H4H10437P2	115	20	2,04E+07	4,68E-03	2,29E-10	2
H4H10438P2	99	18	1,87E+07	2,38E-03	1,27E-10	5

Kháng thể	Lượng mAb được bắt giữ (RU $\pm$ SE)	ActivinA-20nM (RU)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Mol)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10440P2	98,6 $\pm$ 1,1	15,3	6,37E+06	3,28E-04	5,15E-11	35,2
H4H10442P2	181 $\pm$ 2,5	40,5	1,44E+07	5,00E-05	$\leq$ 3,48E-12	$\geq$ 231
H4H10445P2	120	36	4,33E+06	5,00E-05	$\leq$ 1,15E-11	$\geq$ 231
H4H1044ÓP2	137,2 $\pm$ 1,7	31,5	1,54E+07	5,00E-05	$\leq$ 3,25E-12	$\geq$ 231
H4H10447P2	126	36	4,69E+06	5,00E-05	$\leq$ 1,07E-11	$\geq$ 231
H4H10448P2	175	49	7,86E+06	5,00E-05	$\leq$ 6,36E-12	$\geq$ 231
H4H10452P2	146	43	7,94E+06	5,00E-05	$\leq$ 6,30E-12	$\geq$ 231
H4H10468P2	98,7 $\pm$ 0,7	24,5	1,22E+07	5,00E-05	$\leq$ 4,10E-12	$\geq$ 231
H2aM10965N	435	80	2,35E+06	4,15E-03	1,77E-09	3
Đối chứng 1	93,9 $\pm$ 0,7	18,0	8,99E+06	5,00E-05	$\leq$ 5,56E-12	$\geq$ 231

Đối với các giá trị k_d được in nghiêng, không quan sát thấy sự phân ly của chất phân tích trong các điều kiện thử nghiệm này, và do đó k_d được cố định ở 5,0E-0,5s⁻¹.

Bảng 5: Đặc trưng liên kết của kháng thể kháng activin A với activin B ở nhiệt độ 25°C

Kháng thể	Lượng mAb được bắt giữ (RU $\pm$ SE)	50nM Ag được liên kết (RU)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Mol)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10423P	83,1 $\pm$ 0,6	4,7	4,89E+05	3,02E-02	6,18E-08	0,4
H4H10429P	112,3 $\pm$ 0,7	26,4	3,49E+06	L31E-02	3,75E-09	0,9
H4H10432P2	104,4 $\pm$ 1,8	5,1	NB	NB	NB	NB
H4H10436P2	110,8 $\pm$ 3,9	32,8	9,52E+06	5,28E-04	5,54E-11	21,9
H4H10440P2	75,7 $\pm$ 0,8	18,8	1,06E+06	1,16E-03	1,09E-09	10,0
H4H10442P2	136 $\pm$ 0,7	3,4	NB	NB	NB	NB
H4H10430P	88 $\pm$ 0,5	3,9	NB	NB	NB	NB
H4H10446P2	101,5 $\pm$ 0,4	3,6	NB	NB	NB	NB
H4H10468P2	92,5 $\pm$ 0,2	6,2	NB	NB	NB	NB
Đối chứng 1	84,1 $\pm$ 0,3	6,4	NB	NB	NB	NB

Bảng 6: Đặc trưng liên kết của kháng thể kháng activin A với activin B ở nhiệt độ 37°C

Kháng thể	Lượng mAb được bắt giữ (RU $\pm$ SE)	50nM Ag được liên kết (RU)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Mol)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10423P	96 $\pm$ 1,2	4,4	NB	NB	NB	NB
H4H10429P	142,8 $\pm$ 1,3	25,3	3,43E+06	3,43E-02	9,98E-09	0,3
H4H10432P2	134,1 $\pm$ 1,7	5,1	NB	NB	NB	NB
H4H10436P2	132 $\pm$ 1,4	38,1	9,78E+06	1,36E-03	1,39E-10	8,5
H4H10440P2	94 $\pm$ 4,5	20,9	1,28E+06	4,19E-03	3,29E-09	2,8
H4H10442P2	173,1 $\pm$ 1,4	4,4	NB	NB	NB	NB
H4H10430P	105,8 $\pm$ 1,3	3,6	NB	NB	NB	NB
H4H10446P2	131,4 $\pm$ 1,2	3,8	NB	NB	NB	NB
H4H10468P2	95,5 $\pm$ 1	3,4	NB	NB	NB	NB
Đối chứng 1	90,2 $\pm$ 0,9	2,7	NB	NB	NB	NB

Bảng 7: Đặc trưng liên kết của kháng thể kháng activin A với activin AB ở nhiệt độ 25°C

Kháng thể	Lượng mAb được bắt giữ (RU $\pm$ SE)	50nM Ag được liên kết (RU)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Mol)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10423P	81,3 $\pm$ 0,5	14,7	6,13E+05	2,03E-02	3,31E-08	0,6
H4H10429P	110,7 $\pm$ 0,5	40,0	4,53E+06	1,03E-04	2,28E-11	111,7
H4H10432P2	101,2 $\pm$ 1,6	38,3	4,00E+06	2,27E-03	5,68E-10	5,1
H4H10436P2	107,5 $\pm$ 0,3	28,2	7,66E+06	2,61E-04	3,41E-11	44,2
H4H10440P2	73,7 $\pm$ 0,4	15,5	2,97E+06	5,26E-04	1,77E-10	22,0
H4H10442P2	133,3 $\pm$ 0,6	34,6	5,53E+06	1,77E-03	3,20E-10	6,5
H4H10430P	86,9 $\pm$ 0,5	33,0	1,17E+07	2,17E-04	1,85E-11	53,3
H4H10446P2	99,8 $\pm$ 0,4	31,9	4,99E+06	4,06E-03	8,15E-10	2,8
H4H10468P2	92,1 $\pm$ 0,2	34,7	3,76E+06	2,09E-03	5,56E-10	5,5
Đối chứng 1	83,5 $\pm$ 0,6	31,1	3,44E+06	2,83E-04	8,22E-11	40,9

Bảng 8: Đặc trưng liên kết của kháng thể kháng activin A với activin AB ở nhiệt độ

37°C

Kháng thể	Lượng mAb được bắt giữ (RU $\pm$ SE)	50nM Ag được liên kết (RU)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Mol)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10423P	90,8 $\pm$ 1,2	21,7	8,80E+05	2,13E-02	2,42E-08	0,5
H4H10429P	137,7 $\pm$ 1,2	50,0	6,47E+06	4,88E-04	7,55E-11	23,6
H4H10432P2	127,7 $\pm$ 1,3	44,4	5,40E+06	5,92E-03	1,10E-09	2,0
H4H10436P2	126,8 $\pm$ 0,8	33,9	1,03E+07	4,58E-04	4,43E-11	25,2
H4H10440P2	88,9 $\pm$ 1,7	17,7	5,20E+06	1,63E-03	3,14E-10	7,1
H4H10442P2	166,5 $\pm$ 1,7	45,9	9,17E+06	4,25E-03	4,64E-10	2,7
H4H10430P	101,6 $\pm$ 1,2	41,0	1,01E+07	5,41E-04	5,35E-11	21,3
H4H10446P2	126,6 $\pm$ 1,2	41,5	6,08E+06	8,17E-03	1,34E-09	1,4
H4H10468P2	92,2 $\pm$ 0,8	34,5	5,03E+06	4,43E-03	8,80E-10	2,6
Đối chứng 1	86,4 $\pm$ 0,6	29,3	3,77E+06	7,38E-04	1,96E-10	15,7

Bảng 9: Đặc trưng liên kết của kháng thể kháng activin A với activin AC ở nhiệt độ

25°C

Kháng thể	Lượng mAb được bắt giữ (RU $\pm$ SE)	50nM Ag được liên kết (RU)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Mol)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10423P	79,9 $\pm$ 0,4	-0,8	NB	NB	NB	NB
H4H10429P	108,9 $\pm$ 0,5	28,0	9,13E+05	9,10E-05	9,97E-11	126,9
H4H10432P2	101,6 $\pm$ 0,7	34,9	6,29E+05	1,87E-03	2,98E-09	6,2
H4H10436P2	106,7 $\pm$ 0,4	30,1	6,98E+05	1,56E-03	2,24E-09	7,4
H4H10440P2	73,5 $\pm$ 0,4	11,8	5,13E+05	2,27E-04	4,42E-10	50,8
H4H10442P2	132,5 $\pm$ 3,1	18,6	1,31E+06	2,05E-03	1,57E-09	5,6
H4H10430P	85,1 $\pm$ 0,3	23,6	1,23E+06	1,09E-02	8,86E-09	1,1
H4H10446P2	96,9 $\pm$ 0,5	12,6	1,04E+06	1,22E-02	1,18E-08	0,9
H4H10468P2	91,4 $\pm$ 0,3	17,2	7,98E+05	5,92E-03	7,41E-09	2,0
Đối chứng 1	82,5 $\pm$ 0,3	22,3	5,58E+05	2,25E-03	4,03E-09	5,1

Bảng 10: Đặc trưng liên kết của kháng thể kháng activin A với activin AC ở nhiệt độ 37°C

Kháng thể	Lượng mAb được bắt giữ (RU $\pm$ SE)	50nM Ag được liên kết (RU)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (Mol)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H10423P	85,9 $\pm$ 1,1	0,0	NB	NB	NB	NB
H4H10429P	132,6 $\pm$ 1,2	35,7	1,34E+06	6,20E-04	4,62E-10	18,6
H4H10432P2	123,8 $\pm$ 1,4	34,6	7,22E+05	9,02E-03	E25E-08	1,3
H4H10436P2	122,9 $\pm$ 1,3	32,6	8,81E+05	3,31E-03	3,75E-09	3,5
H4H10440P2	86,6 $\pm$ 2,7	13,3	7,18E+05	7,55E-04	1,05E-09	15,3
H4H10442P2	160,1 $\pm$ 1,5	21,4	1,46E+06	5,99E-03	4,10E-09	1,9
H4H10430P	96,8 $\pm$ 1	25,3	1,20E+06	2,00E-02	1,67E-08	0,6
H4H10446P2	120,3 $\pm$ 1	14,4	9,59E+05	2,16E-02	2,25E-08	0,5
H4H10468P2	88,4 $\pm$ 0,8	10,7	7,19E+05	1,24E-02	1,73E-08	0,9
Đối chứng 1	83,2 $\pm$ 0,9	15,6	6,51E+05	6,52E-03	E00E-08	1,8

Như được thể hiện trong các Bảng 3 và 4, kháng thể kháng activin A theo sáng chế liên kết với activin A với chỉ số K_D nằm trong khoảng từ nhỏ hơn 3,18pM (tức là $\leq 3,18E-12$) đến 745pM (tức là $7,45E-10$) ở nhiệt độ 25°C và với chỉ số K_D nằm trong khoảng từ nhỏ hơn 2,18pM (tức là $\leq 2,18E-12$) đến 1,77nM ($1,77E-09$) ở nhiệt độ 37°C. Như được thể hiện trong các Bảng 5 và 6, một số kháng thể kháng activin A (tức là H4H10432P2, H4H10442P2, H4H10430P2, H4H10446P2, và H4H10468P2) không có sự liên kết có thể xác định được với activin B ở nhiệt độ 25°C hoặc 37°C. Một số kháng thể có sự liên kết có thể xác định được với activin AB với chỉ số K_D nằm trong khoảng từ 18,5pM (tức là $1,85E-11$) đến 33,1nM (tức là $3,31E-08$) ở nhiệt độ 25°C (Bảng 7) và từ 44,3pM (tức là $4,43E-11$) đến 24,2nM (tức là $2,42E-08$) ở nhiệt độ 37°C (Bảng 8). Một số kháng thể có sự liên kết có thể xác định được với activin AC với chỉ số K_D nằm trong khoảng từ 99,7pM (tức là $9,97E-11$) đến 11,8nM (tức là $1,18E-08$) ở nhiệt độ 25°C (Bảng 9) và từ 462pM (tức là $4,62E-10$) đến 22,5nM (tức là $2,25E-08$) ở nhiệt độ 37°C (Bảng 10). Ngoài ra, không kháng thể kháng activin A được thử nghiệm nào theo sáng chế có sự liên kết có thể xác định được với inhibin E (dữ liệu không được thể hiện).

Ví dụ 4. sự liên kết của kháng thể với các thành viên thuộc họ TGF-beta được xác

định bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt

Các kháng thể mAb kháng activin A được thử nghiệm về khả năng phản ứng liên kết chéo với nhóm các thành viên thuộc họ TGF-beta. Để thử nghiệm liên kết, thiết bị Biacore 4000 được sử dụng. Kháng thể H4H10429P, H4H10430P, H4H10436P2, FI4H10442P2, H4FI10446P2; kháng thể đối chứng 4 (protein có vùng ngoại bào hòa tan ActR2B được tạo ra có đuôi Fc của IgG1 đầu C của người (ActR2B-hFc; trình tự nhận biết số 227)); và kháng thể đối chứng isotyp được bắt giữ trên chip cảm biến sinh học Biacore CM4, chip này trước hết được tạo dẫn xuất bằng cách liên kết amin với kháng thể đơn dòng của chuột kháng Fc của người (GE, Catalog# BR-1008-39). Tất cả các thử nghiệm liên kết trên thiết bị Biacore được thử nghiệm trong dung dịch đệm thử nghiệm HBS-T (0,01M HEPES, độ pH=7,4, 0,5M NaCl, 3mM EDTA, 0,5mg/ml albumin huyết thanh bò, 0,05% thể tích chất hoạt động bề mặt P20). Các phối tử là thành viên của họ TGF-beta của người là sản phẩm của R&D systems (Activin A, #338-AC; activin B, #659-AB; activin AB, #1066-AB; activin AC, #4879-AC; BPM2, #355-BM; hBMP4, #314-BP; hBMP6, #507-BP; hBMP7, #354-BP; hBMP9, #3209-BP; hBMP10, #2926-BP; hGDF8, #788-G8; hGDF11, #1958-GD). Tất cả các thử nghiệm liên kết được thực hiện ở nhiệt độ 37°C. Mức độ bắt giữ nằm trong khoảng từ 60 - 200 đơn vị cộng hưởng (resonance unit: RU) đã thu được đối với mỗi kháng thể hoặc thụ thể hòa tan. Các phối tử thuộc họ TGF-beta được bơm trên bề mặt kháng thể đã bắt giữ ở nồng độ nằm trong khoảng từ 3,1nM đến 200nM. Chỉ số liên kết của các mẫu phân tích 200nM được thể hiện trong Bảng 11.

Bảng 11: Sự liên kết của kháng thể đơn dòng kháng activin A với phối tử thuộc họ TGF- β của người ở nhiệt độ 37°C

	Phản ứng liên kết (số đơn vị cộng hưởng) của 200nM phối tử thuộc họ TGF-beta được tiêm trên bề mặt cảm biến kháng thể được bắt giữ							
Phối tử thuộc họ TGF- beta được thử nghiệm	H4H10429P	H4H10430P	H4H10436P2	H4H10442P2	H4H10446P2	H4H8925C	Đối chứng 4 (ActR2B-hFc) (Đối chứng isotyp)	mAb đối chứng isotyp
Activin A	56,8	69,1	56,5	63,9	53,2	67,6	70,9	-0,1
Activin B	51,5	0,4	60,1	-1,8	2,6	0,3	68,0	1,9
Activin AB	76,5	95,0	54,3	65,2	66,7	102,0	59,5	-0,1

	Phản ứng liên kết (số đơn vị cộng hưởng) của 200nM phối tử thuộc họ TGF-beta được tiêm trên bề mặt cảm biến kháng thể được bắt giữ							
Phối tử thuộc họ TGF- beta được thử nghiệm	H4H10429P	H4H10430P	H4H10436P2	H4H10442P2	H4H10446P2	H4H8925C	(Đối chứng) (ActR2B-hFc) (Đôi chứng) Đôi chứng 4	mAb đối chứng isotyp
Activin AC	43,1	34,8	55,6	14,2	15,2	32,5	59,4	-0,1
hBMP2	3,6	-1,7	14,9	-2,3	3,3	-4,0	36,9	-1,0
hBMP4	1,1	-0,6	19,3	-0,7	0,8	-0,5	26,4	0,4
hBMP6	4,6	5,7	4,0	1,1	5,3	4,8	86,3	5,1
hBMP7	9,2	6,4	13,6	1,5	5,7	4,5	64,2	4,3
hBMP9	33,4	-0,6	11,7	0,0	-0,3	-0,1	32,3	-1,0
hBMP10	32,4	0,3	22,5	-0,7	0,5	0,0	34,2	0,3
GDF8	-0,4	-0,1	-0,5	0,5	0,7	-0,1	25,8	0,5
GDF11	1,6	3,0	0,0	1,0	1,8	3,3	24,2	3,0

Phản ứng liên kết quan sát được của các kháng thể kháng activin A được bắt giữ với các phối tử thuộc họ TGF-beta được tiêm ở nồng độ 200nM có thể được so sánh với phản ứng liên kết của kháng thể đối chứng âm (mAb đối chứng isotyp), đây là thước đo mức độ liên kết không đặc hiệu ở mức nền, và được so sánh với phản ứng liên kết của ActR2B-hFc, protein này được quan sát là liên kết với toàn bộ nhóm các thành viên thuộc họ TGF-beta được thử nghiệm và do đó dùng làm protein liên kết phối tử đối chứng dương (Bảng 11). Từ việc so sánh này, đã phát hiện được rằng một số kháng thể (ví dụ, H4H10430, H4H10442, H4H20446) liên kết với activin A, activin AB, activin AC nhưng không liên kết đáng kể với activin B hoặc với các phối tử BMP hoặc GDF. Cũng đã phát hiện được rằng một số kháng thể liên kết với khả năng phản ứng chéo rộng hơn với các phối tử thuộc họ TGF-beta khác. Ví dụ, H4H10429P liên kết đáng kể với activin A, activin B, activin AB, activin AC và cả với BMP9 và BMP10. H4H10436P2 liên kết đáng kể với activin A, activin B, activin AB, activin AC, BMP2, BMP4, BMP7, BMP9, và BMP 10. Từ các dữ liệu này, đã thấy rằng các kháng thể có độ đặc hiệu liên kết khác nhau với các phối tử thuộc họ TGF-beta có thể thu được sau khi tạo miễn dịch cho chuột bằng phối tử activin A.

Ví dụ 5. Phân tích khả năng cạnh tranh chéo của kháng thể kháng activin A

Thử nghiệm về khả năng cạnh tranh chéo được thực hiện để đánh giá khả năng của nhóm gồm 9 kháng thể (H4H10446P2, H4H10468P2, H4H10442P2, H4H10423P, H4H10430P, H4H10429P, H4H10432P2, H4H10436P2 và H4H10440P2) cạnh tranh với nhau để liên kết với activin A của người. Hai kháng thể đối chứng isotyp và hai kháng thể kháng activin A đối chứng, kháng thể đối chứng 1 (kháng thể kháng activin A của người có trình tự vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ "A1" như nêu trong US 8,309,082) và đối chứng 3 (MAB3381, sản phẩm của R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) cũng được sử dụng trong thử nghiệm này. Tất cả các thử nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ 25°C với tốc độ lắc đĩa vi chuẩn là 1000 vòng/phút trong dung dịch đệm Octet HBST (0,01 M HEPES, độ pH=7,4, 0,15M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% thể tích chất hoạt động bề mặt P20, 0,1mg/ml BSA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất (ForteBio Corp., Menlo Park, CA). Nói một cách ngắn gọn, một lượng kháng thể kháng activin A để tạo ra phản ứng liên kết bằng khoảng 1,8nm được bắt giữ vào các đầu của cảm biến Octet đã phủ kháng thể kháng Fc của người (ForteBio, # 18-0015) bằng cách nhúng các đầu này trong 5 phút trong dung dịch chứa 10µg/ml mỗi kháng thể kháng activin A. Các vị trí liên kết kháng thể kháng hFc còn lại bất kỳ trên các đầu này được phong bế bằng cách ủ các đầu này trong dung dịch chứa 50ug/ml kháng thể không thích hợp trong 5 phút. Sau đó, các đầu cảm biến này được nhúng trong các lỗ chứa dung dịch activin A 50nM (R&D Systems, # 338-AC/CF) đã được liên kết trước với 1µM kháng thể kháng activin A thứ hai. Sự liên kết của kháng thể kháng activin A thứ hai /dung dịch activin A với đầu cảm biến đã được phủ kháng thể kháng activin A được theo dõi trong 5 phút ở tốc độ 1000 vòng/phút. Phản ứng liên kết phức chất mAb/activin A với đầu cảm biến được phủ kháng thể kháng activin A được so sánh và tính cạnh tranh/không cạnh tranh của các kháng thể đơn dòng kháng activin A khác nhau được xác định. Kết quả được thể hiện trên Fig.1.

Trên Fig. 1, các phản ứng liên kết cạnh tranh được thể hiện bằng cách tô màu đen hoặc màu xám nhạt và cho thấy rằng các cặp kháng thể tương ứng cạnh tranh với nhau để liên kết với activin A. Các ô màu xám nhạt có phông chữ màu đen thể hiện phản ứng liên kết tự cạnh tranh giữa các kháng thể giống nhau. Các ô màu đen có phông chữ màu trắng thể hiện các kháng thể cạnh tranh để liên kết với activin A theo cả hai hướng, không phụ thuộc vào bậc của liên kết. Các ô màu xám đậm có phông chữ màu đen thể hiện kết quả của kháng thể đối chứng isotyp (tức là không liên kết), cho thấy không có

sự liên kết của kháng thể đối chứng isotyp với phức chất kháng thể kháng activin A-activin A (khi kháng thể đối chứng isotyp được liên kết với đầu cảm ứng Octet) hoặc không có sự liên kết của kháng thể đối chứng isotyp với activin A (khi kháng thể đối chứng isotyp are được sử dụng làm kháng thể thứ hai trong các lỗ chứa activin A). Ô màu trắng có phông chữ màu đen thể hiện không có sự cạnh tranh giữa các kháng thể, điều này gợi ý kháng thể có các epitop liên kết khác biệt trên activin A.

Bốn kháng thể là H4H10446P2, H4H10468P2, H4H10442P2, và H4H10423P, cạnh tranh hai hướng với nhau để liên kết với activin A. Ngoài ra, bốn kháng thể này không cạnh tranh liên kết với kháng thể đối chứng 1 hoặc kháng thể đối chứng 3. Ba trong số bốn kháng thể kháng activin A này là H4F110446P2, FI4H10468P2, và H4H10442P2 không cạnh tranh chéo với các kháng thể activin A còn lại bất kỳ. Một trong số bốn kháng thể này (F14H10423P) cũng cạnh tranh hai hướng với FI4H10430P để liên kết với activin A. Năm kháng thể là H4H10430P, H4H10429, H4H10432P2, H4H10436P2, và H4H10440P2 cạnh tranh hai hướng với nhau để liên kết với activin A, cũng như với kháng thể đối chứng 1 và đối chứng 3. Bốn trong số năm kháng thể này (tức là H4H10429, H4H10432P2, H4H10436P2, và H4H10440P2) không cạnh tranh chéo với các kháng thể activin A còn lại bất kỳ, trong khi H4H10423P cũng cạnh tranh chéo với H4H10430P như nêu trên.

Kết quả của Ví dụ này cho thấy rằng kháng thể kháng activin A theo sáng chế có thể được chia thành hai "nhóm" khác nhau dựa vào đặc trưng liên kết epitop: nhóm 1 bao gồm H4H10423P, H4H10446P2, H4H10468P2 và H4H10442P2. Nhóm 2 bao gồm H4H10429, H4H10430P, H4H10432P2, H4H10436P2, và H4H10440P2. Ngoài ra, một kháng thể của mỗi nhóm, tức là H4H10423P và H4H10430P, cạnh tranh chéo với nhau. Kết quả của Ví dụ này gợi ý rằng kháng thể thuộc nhóm 1 liên kết với các vùng trên activin A khác với kháng thể thuộc nhóm 2.

Ví dụ 6. Ước chế sự hoạt hóa thụ thể trung gian bởi activin A và sự truyền tín hiệu phức chất SMAD bằng kháng thể kháng activin A

Để xác định rõ hơn đặc tính của kháng thể kháng activin A theo sáng chế, thử nghiệm sinh học được phát triển để phát hiện sự hoạt hóa thụ thể activin typ IIA và IIB (ActRIIA và ActRIIB tương ứng) và sau đó phosphoryl hóa và hoạt hóa thụ thể activin typ I. Sự tương tác giữa ActRIIA và ActRIIB và activin dẫn tới sự cảm ứng các quá trình

khác nhau của tế bào bao gồm điều hòa quá trình sinh trưởng, di căn tế bào ung thư và biệt hóa tế bào gốc của phôi (Tsuchida, K. *et al.*, Cell Commun Signal 7:15 (2009)). Sự phosphoryl hóa và hoạt hóa thụ thể typ I này dẫn tới sự phosphoryl hóa các protein SMAD 2 và 3, các protein này tạo thành phức chất SMAD hoạt hóa dẫn tới sự điều hòa phiên mã gen.

Để phát hiện sự hoạt hóa con đường truyền tín hiệu phức chất SMAD thông qua sự liên kết của activin với thụ thể activin typ II, dòng tế bào sacom cơ vân A204 của người (ATCC, # HTB-82) được chuyển nhiễm plasmit chứa gen thông báo Smad 2/3-luxiferaza (CAGAx12-Luc; Dennler, 1998) để tạo ra dòng tế bào A204/CAGAx12-Luc. Tế bào A204/CAGAx12-Luc được duy trì trong McCoy's 5A (Irvine Scientific, # 9090) có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (fetal bovine serum: FBS), penixilin/streptomycin/glutamin và 250 pg/ml G418. Để thử nghiệm sinh học, tế bào A204/CAGAx12-Luc được cấy vào các đĩa thử nghiệm có 96 lỗ ở mật độ 10000 tế bào/lỗ trong môi trường nghèo huyết thanh, 0,5%FBS và OPTIMEM (Invitrogen, #31985-070), và ủ ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂ qua đêm. Để xác định đáp ứng liều phối tử, activin A (R&D Systems, #338-AC), activin B (R&D Systems, #659-AB), activin AB (R&D Systems, #1066-AB) và activin AC (R&D Systems, #4879-AC/CF) được pha loãng hàng loạt ở tỷ lệ 1:3 từ 100 đến 0,002nM và bổ sung vào tế bào bằng cách bắt đầu với mẫu đối chứng không chứa activin. Activin A, activin B, activin AB, và activin AC được quan sát là hoạt hóa dòng tế bào A204/CAGAx12-Luc với EC₅₀ bằng 99pM, 47pM, 19pM, và 4,4nM tương ứng. Để xác định tác dụng ức chế, kháng thể được pha loãng hàng loạt ở tỷ lệ 1:3 bắt đầu từ 100 đến 0,002nM, 1000 đến 0,02nM, hoặc 300 đến 0,005nM bao gồm cả mẫu đối chứng chứa kháng thể đối chứng isotyp thích hợp hoặc không chứa kháng thể và được bổ sung vào tế bào với nồng độ không đổi là 100pM activin A, 50pM activin B, 30pM activin AB hoặc 4nM activin AC. Kháng thể đối chứng 4 (ActRIIB-hFc; trình tự nhận biết số 227) cũng được sử dụng làm kháng thể đối chứng phong bế dương trong thử nghiệm này. Sau khi ủ trong 5,5 giờ ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂, cơ chất OneGlo (Promega, # E6051) được bổ sung vào và sau đó hoạt tính luxiferaza được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị Victor X (Perkin Elmer). Kết quả được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp hồi quy không tuyến tính (logic 4 thông số) bằng chương trình phần mềm Prism 5 (GraphPad).

Như được thể hiện trong Bảng 12, kháng thể kháng activin A theo sáng chế có tác

dụng ức chế 100pM activin A với IC_{50} nằm trong khoảng từ 39pM đến 3,5nM, trong khi kháng thể đối chứng 1 có tác dụng ức chế với IC_{50} bằng 83pM. Một nhóm nhỏ kháng thể kháng activin A theo sáng chế được thử nghiệm về tác dụng ức chế activin B, AB, và AC. Bốn trong số 9 kháng thể được thử nghiệm có tác dụng ức chế 50pM activin B với IC_{50} nằm trong khoảng từ 130pM đến 100nM. Năm kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm về tác dụng ức chế activin B chỉ ức chế ở nồng độ kháng thể cao, trong khi kháng thể đối chứng 1 không có tác dụng ức chế activin B có thể xác định được. Tám kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm có tác dụng ức chế 30pM activin AB với IC_{50} nằm trong khoảng từ 100pM đến 8,2nM, trong khi kháng thể đối chứng 4 có tác dụng ức chế với IC_{50} bằng 540pM. Một kháng thể là H4H10423P chỉ có tác dụng ức chế yếu đối với activin AB. 7 trong số 8 kháng thể được thử nghiệm có tác dụng ức chế 4nM activin AC với IC_{50} nằm trong khoảng từ 580pM đến 6,5nM, trong khi kháng thể đối chứng 4 có tác dụng ức chế với IC_{50} bằng 1,1nM. Một kháng thể là H4H10423P không có tác dụng ức chế đối với activin AC. Cả hai đối chứng âm là IgG của chuột (đối chứng isotyp mlgG) và IgG của người (đối chứng isotyp hlgG) đều không ức chế sự hoạt hóa các thụ thể này bởi phối tử.

Bảng 12: Ức chế activin A, activin B, activin AB, và activin AC bằng kháng thể kháng activin A (IC_{50} [M])

Nồng độ không đổi	Activin A	Activin B	Activin AB	Activin AC
Kháng thể				
H4H10423P	2,0E-10		Ức chế yếu	Không ức chế
H4H10424P	7,6E-10			
H4H10426P	2,3E-10			
H4H10429P	1,6E-10	7,9E-08	2,9E-10	5,8E-10
H4H10430P	6,1E-11	ức chế ở nồng độ cao	1,0E-10	9,3E-10
H4H10432P2	1,1E-10	ức chế ở nồng độ cao	8,0E-10	2,8E-09
H4H10433P2	1,5E-10	1,0E-07		
H4H10436P2	2,0E-10	1,3E-10	1,4E-10	1,3E-09
H4H10437P2	2,9E-10	ức chế ở nồng độ cao		
H4H10438P2	2,6E-10			
H4H10440P2	2,8E-10	5,2E-09	4,3E-10	7,5E-10

H4H10442P2	5,0E-11		2,2E-09	6,5E-09
H4H10445P2	5,3E-11			
H4H10446P2	4,7E-11	ức chế ở nồng độ cao	8,2E-09	5,6E-09
H4H10447P2	7,8E-11			
H4H10448P2	4,0E-11			
H4H10452P2	5,8E-11			
H4H10468P2	3,9E-11	ức chế ở nồng độ cao	2,3E-09	3,4E-09
H2aM10965N	3,5E-09			
Đối chứng isotyp mIgG	Không ức chế			
Đối chứng isotyp hIgG	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế
Đối chứng 1	8,3E-11	Không ức chế	5,4E-10	1,1E-09

Thử nghiệm sinh học sử dụng tế bào A204/CAGAx12-Luc cũng có thể được kích thích bằng GDF8 (R&D Systems, Cat # 788-G8/CF) và GDF11 (R&D Systems, Cat # 1958-GD-010/CF). Để thử nghiệm tác dụng ức chế chức năng của các phối tử này bằng kháng thể kháng activin A, thử nghiệm này được thực hiện bằng cách sử dụng điều kiện được mô tả ở trên nhưng dùng GDF8 hoặc GDF11 thay cho phối tử hoạt hóa, thu được EC₅₀ bằng 188pM và 84pM tương ứng. Trong thử nghiệm này, sự hoạt hóa bởi nồng độ không đổi là 0,50nM GDF8 hoặc 0,40nM GDF11 được ức chế hoàn toàn bằng kháng thể đối chứng 4 với IC₅₀ bằng 298pM và 214pM tương ứng. Khi sử dụng nồng độ phối tử không đổi giống hệt này, không quan sát được tác dụng ức chế GDF8 hoặc GDF11 bởi các kháng thể kháng activin A là H4H10446P2 và H4H10430P, được thử nghiệm ở nồng độ kháng thể lên tới 100nM. Vào một ngày khác, các kháng thể kháng activin A là H4H10429P và H4H10436P2 được thử nghiệm về tác dụng ức chế trong thử nghiệm này khi có mặt nồng độ không đổi là 250pM GDF8 hoặc 250pM GDF11, và không quan sát thấy tác dụng ức chế sau khi ủ tế bào với kháng thể kháng activin A thử nghiệm ở nồng độ tới 150 nM; chỉ GDF8 và GDF11 trong thử nghiệm này có EC₅₀ tương ứng là 124pM và 166pM. Các dữ liệu này cho thấy rằng các kháng thể kháng activin A là H4H10446P2, H4H10430P, H4H10429P và H4H10436P2 không ức chế chức năng của GDF8 hoặc GDF11.

Ví dụ 7. Kích thích tình trạng phì đại cơ xương bằng cách sử dụng kháng thể kháng activin A

Tình trạng phì đại cơ xương gây bởi việc sử dụng chất đối kháng đặc hiệu myostatin, kháng thể kháng GDF8 là H4EQ657N2 (US 2011-0293630 A1), hoặc hỗn hợp của H4H1657N2 và kháng thể kháng activin A khác được đánh giá ở chuột CB17 SCID. Mức độ phì đại được xác định so với khi điều trị bằng kháng thể đối chứng phù hợp isotyp. Các thử nghiệm này cũng bao gồm việc điều trị bằng kháng thể có vùng ngoại bào của ActRIIB của người được tạo ra với vùng Fc đầu C của IgG1 của người (kháng thể đối chứng 4, trình tự nhận biết số 227). Kháng thể đối chứng 4 đã được cho thấy ở trên là gây ra tình trạng phì đại cơ *in vivo* và còn liên kết với và ức chế hoạt tính của nhiều phối tử thuộc họ TGF-beta (Souza, TA *et al.* Mol Endocrinol 22:2689-702 (2008); Lee, SJ *et al.* Proc Natl Acad Sci U.S.A. 102(50):18117-22 (2005)).

Tổng cộng tám kháng thể kháng activin A theo sáng chế và kháng thể đối chứng 1 được thử nghiệm kết hợp với H4H1657N2 hoặc thử nghiệm một mình trong tám thử nghiệm, được so sánh với các nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp, kháng thể đối chứng 4, H4H1657N2 sử dụng một mình, hoặc kháng thể đối chứng 2 (kháng thể kháng activin RIIB có vùng VH/VL của kháng thể MOR08159 được mô tả trong US 2010/0272734 A1). Đối với các thử nghiệm này, chuột đực CB17 SCID (Taconic, #CB17SC-M) khoảng 10 tuần tuổi được chia đều theo thể trọng thành 6 nhóm gồm 5 con. Các nhóm chuột được điều trị trong mỗi thử nghiệm như được mô tả trong Bảng 13.

Bảng 13: kháng thể và kháng thể đối chứng được thử nghiệm trong các thử nghiệm phì đại cơ *in vivo*

Thử nghiệm #	Các mẫu được thử nghiệm	Liều 1	Thời gian sử dụng liều 1	Liều 2	Thời gian sử dụng liều 2
1	Đối chứng isotyp	10mg/kg	ngày 0, 3, và 7	8mg/kg	ngày 14
	H4H1657N2	10mg/kg.	ngày 0, 3, và 7	8mg/kg	ngày 14
	Đối chứng 4	10mg/kg	ngày 0, 3, và 7	8mg/kg	ngày 14
	H4H10423P+ H4H1657N2	10mg/kg+10 mg/kg	ngày 0, 3, và 7	8mg/kg+8m g/kg	ngày 14
	H4H10432P2+ H4H1657N2	10mg/kg+10 mg/kg	ngày 0, 3, và 7	8mg/kg+8m g/kg	ngày 14
	H4H10442P2+ H4H1657N2	10mg/kg+10 mg/kg	ngày 0, 3, và 7	8mg/kg+8m g/kg	ngày 14
2	Đối chứng isotyp	10mg/kg	ngày 0, 3, và 7	8mg/kg	ngày 14

Thử nghiệm #	Các mẫu được thử nghiệm	Liều 1	Thời gian sử dụng liều 1	Liều 2	Thời gian sử dụng liều 2
	H4H1657N2	10mg/kg	ngày 0, 3, và 7	8mg/kg	ngày 14
	Đối chứng 4	10mg/kg	ngày 0, 3, và 7	8mg/kg	ngày 14
	H4H10429P+H4H1657N2	10mg/kg+10mg/kg	ngày 0, 3, và 7	8mg/kg+8mg/kg	ngày 14
	H4H10436P2+H4H1657N2	10mg/kg+10mg/kg	ngày 0, 3, và 7	8mg/kg+8mg/kg	ngày 14
	H4H10440P2+H4H1657N2	10mg/kg+10mg/kg	ngày 0, 3, và 7	8mg/kg+8mg/kg	ngày 14
3	Đối chứng isotyp	10mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14	N/A	
	H4H1657N2	10mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
	Đối chứng 4	10mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
	H4H10446P2+H4H1657N2	10mg/kg+10mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
	H4H10430P+H4H1657N2	10mg/kg+10mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
4	Đối chứng isotyp	25mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14	N/A	
	H4H1657N2	10mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
	H4H10430P	10mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
	H4H10430P+H4H1657N2	2mg/kg+10mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
	H4H10430P+H4H1657N2	10mg/kg+10mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
	H4H10430P+H4H1657N2	25mg/kg+10mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
5	Đối chứng isotyp	25mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14	N/A	
	H4H1657N2	10mg/kg:	ngày 0, 3, 7, và 14		
	H4H10446P2	10mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
	H4H10446P2+H4H1657N2	2mg/kg+10mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
	H4H10446P2+H4H1657N2	10mg/kg+10mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
	H4H10446P2+H4H1657N2	25mg/kg+10mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		

Thử nghiệm #	Các mẫu được thử nghiệm	Liều 1	Thời gian sử dụng liều 1	Liều 2	Thời gian sử dụng liều 2
6	Đối chứng isotyp	10mg/kg	ngày 0, 3, 7, 14, và 21	N/A	
	H4H1657N2	10mg/kg	ngày 0, 3, 7, 14, và 21		
	Đối chứng 4	10mg/kg	ngày 0, 3, 7, 14, và 21		
	Đối chứng 1	10mg/kg	ngày 0, 3, 7, 14, và 21		
	Đối chứng 1 + H4H1657N2	10mg/kg+10 mg/kg	ngày 0, 3, 7, 14, và 21		
7	Đối chứng isotyp	10mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14	N/A	
	Đối chứng 4	10mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
	Đối chứng 2	25mg/kg,	ngày 0, 3, 7, và 14		
	H4H10430P+ H4H1657N2	10mg/kg+10 mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
	H4H10446P2+ H4H1657N2	10mg/kg+10 mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
8	Đối chứng isotyp	25mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14	N/A	
	H4H1657N2	10mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
	Đối chứng 4	25mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
	Đối chứng 2	25mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
	H4H10423P+ H4H1657N2	25mg/kg+10 mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		
	H4H10430P+ H4H1657N2	25mg/kg+10 mg/kg	ngày 0, 3, 7, và 14		

Đối với các thử nghiệm 1-5, 7, và 8, mỗi kháng thể và kháng thể đối chứng 4 được sử dụng dưới da ở liều 10 mg/kg hai lần trong tuần thử nghiệm đầu tiên (ngày 0 và 3) và một lần ở liều 10 mg/kg mỗi protein trong tuần thứ 2 (ngày 7). Liều cuối cùng của kháng thể hoặc kháng thể đối chứng 4 trong tuần thứ ba (ngày 14) được sử dụng dưới da ở liều 8mg/kg đối với các thử nghiệm #1 và #2 hoặc ở liều 10mg/kg đối với các thử nghiệm từ #3 đến #8 (Bảng 13). Vào ngày 21, chuột được chết êm ái và tổng thể trọng của mỗi con chuột được xác định. Đối với thử nghiệm 6, kháng thể được sử dụng như đối với các thử nghiệm 1-5 trên đây nhưng việc điều trị được kéo dài tới ngày 28 với việc tiêm bổ sung vào ngày 21. Cơ cẳng chân trước (TA) và cơ bụng chân (GA) của mỗi con chuột được phẫu tích và cân. Trọng lượng mô được chuẩn hóa tới thể trọng ban đầu, và sự thay đổi

trọng lượng trung bình theo tỷ lệ phần trăm so với trọng lượng trung bình của nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp được tính. Kết quả nêu tóm tắt trong các bảng 14 đến 21 được thể hiện bằng sự tăng trung bình theo tỷ lệ phần trăm so với nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp $\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình.

Bảng 14: Mức độ thay đổi trọng lượng cơ và thể trọng theo tỷ lệ phần trăm so với nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp, thử nghiệm 1

	Đối chứng isotyp	H4H1657N2	Đối chứng 4	H4H10423P + H4H1657N2	H4H10432P2 + H4H1657N2	H4H10442P2 + H4H1657N2
Liều	10mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg + 10 mg/kg	10 mg/kg + 10 mg/kg	10 mg/kg + 10 mg/kg
Thể trọng	0,00 $\pm$ 0,91	10,99 $\pm$ 0,48	18,45 $\pm$ 0,89	13,36 $\pm$ 1,10	12,84 $\pm$ 0,98	12,09 $\pm$ 0,78
Cơ TA	0,00 $\pm$ 1,15	19,54 $\pm$ 2,67	45,80 $\pm$ 1,47	32,03 $\pm$ 2,12	24,83 $\pm$ 2,95	40,76 $\pm$ 2,59
Cơ GA	0,00 $\pm$ 0,89	26,46 $\pm$ 3,63	31,91 $\pm$ 1,40	27,58 $\pm$ 1,61	26,39 $\pm$ 1,87	30,62 $\pm$ 2,32

Như đã thấy trong bảng 14, trong thử nghiệm thứ nhất, kháng thể đối chứng 4 gây tình trạng phì đại đáng kể ở tất cả các cơ được xét nghiệm, với mức tăng trọng lượng cơ TA là $45,80 \pm 1,47\%$, và mức tăng trọng lượng cơ GA là $31,91 \pm 1,4\%$ so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp. Việc chỉ điều trị bằng H4H1657N2 cũng gây phì đại ở cơ TA (trọng lượng cơ tăng $19,54 \pm 2,67\%$) và cơ GA (trọng lượng cơ tăng $26,46 \pm 3,63\%$), nhưng nó có hiệu quả thấp hơn so với kháng thể đối chứng 4. Hỗn hợp của H4H1657N2 + H4H10442P2 làm tăng tương tự trọng lượng cơ TA ($40,76 \pm 2,59\%$) và trọng lượng cơ GA ($30,62 \pm 2,32\%$) so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng 4. Việc điều trị bằng hỗn hợp của H4H1657N2/H4H10423P và H4H1657N2/H4H10432P2 không làm tăng trọng lượng cơ TA trung bình ở mức bằng với mức tăng khi điều trị bằng H4H1657N2/H4H10442P hoặc kháng thể đối chứng 4.

Bảng 15: Mức độ thay đổi trọng lượng cơ và thể trọng theo tỷ lệ phần trăm so với nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp, thử nghiệm 2

	Đối chứng isotyp	H4H1657N2	Đối chứng 4	H4H10429P + H4H1657N2	H4H10436P2 + H4H1657N2	H4H10440P2 + H4H1657N2
Liều	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg + 10 mg/kg	10 mg/kg + 10 mg/kg	10 mg/kg + 10 mg/kg

Thể trọng	0,00 ± 2,53	4,12 ± 2,19	11,22 ± 1,71	7,17 ± 1,57	7,89 ± 0,37	1,89 ± 1,39
Cơ TA	0,00 ± 3,59	16,70 ± 2,73	43,47 ± 2,37	34,14 ± 2,55	29,31 ± 1,59	14,55 ± 2,22
Cơ GA	0,00 ± 3,54	18,54 ± 3,48	29,24 ± 2,22	26,24 ± 3,11	26,55 ± 2,41	15,65 ± 2,66

Như đã thấy trong Bảng 15, trong thử nghiệm thứ hai, kháng thể đối chứng 4 gây tình trạng phì đại ở tất cả các cơ được xét nghiệm, với mức tăng trọng lượng cơ TA trung bình là $43,47 \pm 2,37\%$ và mức tăng trọng lượng cơ GA trung bình là $29,24 \pm 2,22\%$ so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp. Trong thử nghiệm này, việc chỉ điều trị bằng H4H1657N2 cũng làm tăng trọng lượng trung bình của cơ TA và cơ GA ($16,7 \pm 2,73\%$ và $18,54 \pm 3,48\%$ tương ứng) so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp, nhưng các mức tăng trung bình này là thấp hơn so với mức tăng quan sát được đối với nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng 4. Việc điều trị kết hợp bằng H4H1657N2/H4H10429P và H4H1657N2/H4H10436P2 làm tăng trọng lượng cơ TA trung bình ($34,14 \pm 2,55\%$ và $29,31 \pm 1,59\%$ tương ứng) và trọng lượng cơ GA trung bình ($26,24 \pm 3,11\%$ và $26,55 \pm 2,41\%$ tương ứng), mức tăng này nằm giữa các mức tăng quan sát được đối với riêng H4H1657N2 hoặc kháng thể đối chứng 4. Hỗn hợp H4H1657N2/H4H10440P2 không làm tăng trọng lượng cơ TA hoặc cơ GA trung bình bằng với mức tăng tạo bởi hai hỗn hợp còn lại trong thử nghiệm này hoặc mức tăng tạo bởi việc điều trị bằng kháng thể đối chứng 4.

Bảng 16: Mức độ thay đổi trọng lượng cơ và thể trọng theo tỷ lệ phần trăm so với nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp, thử nghiệm 3

	Đối chứng isotyp	H4H1657N2	Đối chứng 4	H4H10446P2 + H4H1657N2	H4H10430P+ H4H1657N2
Liều	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg + 10 mg/kg	10 mg/kg + 10 mg/kg
Thể trọng	0,00 ± 2,00	1,43 ± 1,14	18,92 ± 3,53	10,90 ± 2,51	8,88 ± 1,58
Cơ TA	0,00 ± 2,13	14,19 ± 3,19	39,90 ± 3,58	40,01 ± 3,67	28,30 ± 3,27
Cơ GA	0,00 ± 1,62	15,73 ± 0,58	34,01 ± 2,87	31,29 ± 2,60	21,55 ± 2,30

Như đã thấy trong Bảng 16, trong thử nghiệm thứ ba, kháng thể đối chứng 4 gây tình trạng phì đại ở tất cả các cơ được xét nghiệm, với mức tăng trọng lượng cơ TA trung bình là $39,90 \pm 3,58\%$ và mức tăng trọng lượng cơ GA trung bình là $34,01 \pm 2,87\%$ so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp. Việc chỉ điều trị bằng H4H1657N2 cũng làm tăng trọng lượng cơ TA trung bình ($14,19 \pm 3,19\%$) và trọng lượng cơ GA trung bình ($15,73 \pm 0,58\%$) so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối

chứng isotyp, nhưng các mức tăng trung bình này là thấp hơn so với mức tăng quan sát được đối với nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng 4. Việc điều trị kết hợp bằng H4H1657N2/H4H10446P2 làm tăng trọng lượng cơ TA trung bình ($40,01 \pm 3,67\%$) và trọng lượng cơ GA trung bình ($31,29 \pm 2,60\%$) ở mức tương đương với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng 4. Việc điều trị kết hợp bằng H4H1657N2/H4H10430P làm tăng trọng lượng cơ TA trung bình ($28,30 \pm 3,27\%$) và trọng lượng cơ GA trung bình ($21,55 \pm 2,30\%$) ở mức nằm trong khoảng các mức tăng quan sát được đối với khi chỉ điều trị bằng H4H1657N2 và khi điều trị bằng hỗn hợp H4H1657N2/H4H10446P2.

Bảng 17: Mức độ thay đổi trọng lượng cơ và thể trọng theo tỷ lệ phần trăm so với nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp, thử nghiệm 4

	Đối chứng isotyp	H4H1657N2	H4H10430P	H4H10430P + H4H1657N2	H4H10430P + H4H1657N2	H4H10430P + H4H1657 N2
Liều	25 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	2 mg/kg + 10mg/kg	10 mg/kg + 10 mg/kg	25mg/kg + 10 mg/kg
Thể trọng	$0,00 \pm 0,57$	$9,89 \pm 0,98$	$4,20 \pm 1,00$	$14,53 \pm 0,80$	$12,61 \pm 1,81$	$13,78 \pm 1,58$
Cơ TA	$0,00 \pm 3,04$	$21,05 \pm 2,64$	$7,83 \pm 2,74$	$39,02 \pm 3,55$	$40,20 \pm 2,48$	$44,92 \pm 5,70$
Cơ GA	$0,00 \pm 2,71$	$22,85 \pm 2,28$	$8,86 \pm 1,24$	$27,57 \pm 1,26$	$22,46 \pm 5,03$	$30,22 \pm 2,97$

Như đã thấy trong Bảng 17, trong thử nghiệm thứ 4, H4H1657N2 gây tình trạng phì đại ở các cơ được xét nghiệm, với mức tăng trọng lượng cơ TA trung bình là $21,05 \pm 2,64\%$ và mức tăng trọng lượng cơ GA trung bình là $22,85 \pm 2,28\%$ so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp. Trong thử nghiệm này, việc chỉ điều trị bằng H4H10430P làm tăng nhẹ trọng lượng cơ so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp nhưng các giá trị này là không có ý nghĩa thống kê. Việc điều trị kết hợp bằng H4H1657N2 và H4H10430P ở liều 10mg/kg và 2mg/kg tương ứng làm tăng trọng lượng cơ TA trung bình ($39,02 \pm 3,55\%$) và trọng lượng cơ GA trung bình ($27,57 \pm 1,26\%$), mức tăng ở cơ TA này là lớn hơn so với mức tăng quan sát được đối với khi chỉ điều trị bằng H4H1657N2 hoặc H4H10430P. Việc điều trị kết hợp bằng H4H1657N2 và H4H10430P ở liều 10mg/kg và 10mg/kg tương ứng làm tăng trọng lượng cơ TA trung bình ($40,20 \pm 2,48\%$) và trọng lượng cơ GA trung bình ($22,46 \pm 5,03\%$), mức tăng ở cơ TA là lớn hơn so với mức tăng quan sát được đối với khi chỉ điều trị bằng H4H1657N2 hoặc H4H10430P. Việc điều trị kết hợp bằng H4H1657N2 và H4H10430P ở liều 10mg/kg và 25mg/kg tương ứng làm tăng trọng lượng cơ TA trung bình ($44,92 \pm 5,70\%$)

Bảng 18: Mức độ thay đổi trọng lượng cơ và thể trọng theo tỷ lệ phần trăm so với nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp, thử nghiệm 5

	Đối chứng isotyp	H4H1657N2	H4H10446P2	H4H10446P2 + H4H1657N2	H4H10446P2 + H4H1657N2	H4H10446P2 + H4H1657N2
Liều	25 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	2 mg/kg + 10mg/kg	10 mg/kg + 10 mg/kg	25mg/kg + 10 mg/kg
Thể trọng	0,00±1,23	10,94 ± 1,03	0,29 ±1,33	14,26 ± 1,45	12,61 ± 1,26	16,31 ± 2,04
Cơ TA	0,00±2,20	25,40 ± 1,35	3,70 ±1,67	51,29 ± 4,20	49,64 ± 4,08	49,79 ± 5,46
Cơ GA	0,00±2,92	22,82 ± 1,97	2,70 ± 1,06	39,24 ± 3,08	35,56 ± 3,39	35,14 ± 3,49

Như đã thấy trong Bảng 18, trong thử nghiệm thứ 5, H4H1657N2 gây tình trạng phì đại ở các cơ được xét nghiệm, với mức tăng trọng lượng cơ TA trung bình là $25,4 \pm 1,35\%$ và mức tăng trọng lượng cơ GA trung bình là $22,82 \pm 1,97\%$ so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp. Trong thử nghiệm này, việc chỉ điều trị bằng H4H10446P2 gây tình trạng phì đại cơ ở mức thấp với mức tăng trọng lượng cơ TA trung bình là $3,70 \pm 1,67\%$ và mức tăng trọng lượng cơ GA trung bình là $2,70 \pm 1,06\%$ so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp. Việc điều trị kết hợp bằng H4H1657N2 và H4H10446P2 ở liều 10mg/kg và 2mg/kg tương ứng làm tăng trọng lượng cơ TA trung bình ($51,29 \pm 4,20\%$) và trọng lượng cơ GA trung bình ($39,24 \pm 3,08\%$), mức tăng này là cao hơn mức tăng quan sát được đối với khi chỉ điều trị bằng H4H1657N2 hoặc H4H10446P2. Việc điều trị kết hợp bằng H4H1657N2 và H4H10446P2, mỗi kháng thể này ở liều 10mg/kg, làm tăng trọng lượng cơ TA trung bình ($49,64 \pm 4,08\%$) và trọng lượng cơ GA trung bình ($35,56 \pm 3,39\%$), mức tăng này là cao hơn mức tăng quan sát được đối với khi chỉ điều trị bằng H4H1657N2 hoặc H4H10446P2. Việc điều trị kết hợp bằng H4H1657N2 và H4H10446P2 ở liều 10mg/kg và 25mg/kg tương ứng làm tăng trọng lượng cơ TA trung bình ($49,79 \pm 5,46\%$) và trọng lượng cơ GA trung bình ($35,14 \pm 3,49\%$), mức tăng này là cao hơn mức tăng quan sát được đối với khi chỉ điều trị bằng H4H1657N2 hoặc H4H10446P2.

Bảng 19: Mức độ thay đổi trọng lượng cơ và thể trọng theo tỷ lệ phần trăm so với nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp, thử nghiệm 6

	Đối chứng isotyp	Đối chứng 4	H4H1657N2	Đối chứng 1	Đối chứng 1 + H4H1657N2
Liều	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg + 10 mg/kg

Thể trọng	0,00±0,51	17,04 ± 2,90	8,92 ±1,26	3,52 ±0,86	15,84 ±0,75
Cơ TA	0,00±2,15	47,34 ± 2,63	17,21 ± 2,97	4,54 ± 2,25	30,06 ±5,51
Cơ GA	0,00±1,71	32,17 ± 3,81	21,57 ± 1,90	2,72 ±1,30	30,72 ±3,64

Như đã thấy trong Bảng 19, trong thử nghiệm thứ 6, kháng thể đối chứng 4 gây tình trạng phì đại ở tất cả các cơ được xét nghiệm, với mức tăng trọng lượng cơ TA trung bình là $47,34 \pm 2,63\%$ và mức tăng trọng lượng cơ GA trung bình là $32,17 \pm 3,81\%$ so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp. Trong thử nghiệm này, việc chỉ điều trị bằng H4H1657N2 cũng làm tăng trọng lượng trung bình của cơ TA và cơ GA ở mức $17,21 \pm 2,97\%$ và $21,57 \pm 1,90\%$ tương ứng so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp, nhưng các mức tăng trung bình này là thấp hơn so với mức tăng quan sát được đối với nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng 4. Trong thử nghiệm này, việc chỉ điều trị bằng kháng thể đối chứng 1 gây tình trạng phì đại cơ ở mức thấp với mức tăng trọng lượng cơ TA trung bình là $4,54 \pm 2,25\%$ và mức tăng trọng lượng cơ GA trung bình là $2,72 \pm 1,30\%$ so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp. Việc điều trị kết hợp bằng H4H1657N2 và kháng thể đối chứng 1 ở liều 10mg/kg và 10mg/kg tương ứng làm tăng trọng lượng cơ TA trung bình ($30,06 \pm 5,51\%$) và trọng lượng cơ GA trung bình ($30,72 \pm 3,64\%$), mức tăng này là cao hơn mức tăng quan sát được đối với khi chỉ điều trị bằng H4H1657N2 hoặc kháng thể đối chứng 1.

Bảng 20: Mức độ thay đổi trọng lượng cơ và thể trọng theo tỷ lệ phần trăm so với nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp, thử nghiệm 7

	Đối chứng isotyp	Đối chứng 4	Đối chứng 2	H4H10430P+ H4H1657N2	H4H10446P2+ H4H1657N2
Liều	10mg/kg	10 mg/kg	25 mg/kg	10 mg/kg + 10 mg/kg	10 mg/kg + 10 mg/kg
Thể trọng	0,00±0,90	8,17 ±3,30	19,18 ± 1,75	10,55 ±1,48	11,67 ±0,98
Cơ TA	0,00±2,30	34,43 ± 5,92	36,75 ± 3,88	33,13 ±2,02	41,28 ±2,76
Cơ GA	0,00±2,01	14,86 ± 3,65	26,41 ± 3,16	22,82 ±1,34	29,21 ±2,62

Như đã thấy trong Bảng 20, trong thử nghiệm thứ 7, kháng thể đối chứng 4 gây tình trạng phì đại ở tất cả các cơ được xét nghiệm, với mức tăng trọng lượng cơ TA trung bình là $34,43 \pm 5,92\%$ và mức tăng trọng lượng cơ GA trung bình là $14,86 \pm 3,65\%$ so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp. Trong thử nghiệm này, việc chỉ điều trị bằng kháng thể đối chứng 2 gây tình trạng phì đại ở các cơ được xét nghiệm, với mức tăng trọng lượng cơ TA trung bình là $36,75 \pm 3,88\%$ và mức tăng trọng lượng cơ

GA trung bình là $26,41 \pm 3,16\%$ so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp. Việc điều trị kết hợp bằng H4H1657N2 và H4H10430P ở liều 10mg/kg và 10mg/kg tương ứng làm tăng trọng lượng cơ TA trung bình ($33,13 \pm 2,02\%$) và trọng lượng cơ GA trung bình ($22,82 \pm 1,34\%$), mức tăng này nằm giữa các mức tăng quan sát được đối với khi chỉ điều trị bằng ActRIIB-Fc và chỉ điều trị bằng kháng thể đối chứng 2. Việc điều trị kết hợp bằng H4H1657N2 và H4H10446P2 ở liều 10mg/kg và 10mg/kg tương ứng làm tăng trọng lượng cơ TA trung bình ($41,28 \pm 2,76\%$) và trọng lượng cơ GA trung bình ($29,21 \pm 2,62\%$).

Bảng 21: Mức độ thay đổi trọng lượng cơ và thể trọng theo tỷ lệ phần trăm so với nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp, thử nghiệm 8

	Đối chứng isotyp	Đối chứng 4	H4H1657N2	Đối chứng 2	H4H10423P + H4H1657N2	H4H10430P + H4H1657N2
Liều	25 mg/kg	25 mg/kg	10 mg/kg	25 mg/kg	25 mg/kg + 10 mg/kg	25 mg/kg + 10 mg/kg
Thể trọng	$0,00 \pm 0,64$	$19,81 \pm 0,90$	$8,64 \pm 1,30$	$21,56 \pm 1,29$	$10,45 \pm 1,40$	$15,45 \pm 1,18$
Cơ TA	$0,00 \pm 2,72$	$53,74 \pm 5,31$	$18,44 \pm 2,30$	$39,90 \pm 1,69$	$36,33 \pm 3,67$	$43,83 \pm 1,56$
Cơ GA	$0,00 \pm 0,76$	$39,39 \pm 4,56$	$21,17 \pm 1,72$	$25,87 \pm 2,72$	$28,18 \pm 3,11$	$31,24 \pm 1,90$

Như đã thấy trong Bảng 21, trong thử nghiệm thứ 8, kháng thể đối chứng 4 gây tình trạng phì đại ở tất cả các cơ được xét nghiệm, với mức tăng trọng lượng cơ TA trung bình là $53,74 \pm 5,31\%$ và mức tăng trọng lượng cơ GA trung bình là $39,39 \pm 4,56\%$ so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp. Trong thử nghiệm này, việc chỉ điều trị bằng H4H1657N2 cũng làm tăng trọng lượng trung bình của cơ TA và GA ở mức $18,44 \pm 2,30\%$ và $21,17 \pm 1,72\%$ tương ứng so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp, nhưng các mức tăng trung bình này là thấp hơn so với mức tăng quan sát được đối với nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng 4. Trong thử nghiệm này, việc chỉ điều trị bằng kháng thể đối chứng 2 gây tình trạng phì đại ở các cơ được xét nghiệm, với mức tăng trọng lượng cơ TA trung bình là $39,90 \pm 1,69\%$ và mức tăng trọng lượng cơ GA trung bình $25,87 \pm 2,72\%$ so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp. Việc điều trị kết hợp bằng H4H1657N2 và H4H10423P ở liều 10mg/kg và 25mg/kg tương ứng làm tăng trọng lượng cơ TA trung bình ($36,33 \pm 3,67\%$) và trọng lượng cơ GA trung bình ($28,18 \pm 3,11\%$) so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp. Việc điều trị kết hợp bằng H4H1657N2 và H4H10430P ở liều 10mg/kg và 25mg/kg tương ứng làm tăng trọng lượng cơ TA trung bình ($43,83 \pm 1,56\%$) và trọng

lượng cơ GA trung bình ($31,24 \pm 1,90\%$), mức tăng này nằm giữa các mức tăng quan sát được đối với khi chỉ điều trị bằng kháng thể đối chứng 4 và chỉ điều trị bằng kháng thể đối chứng 2.

Các thử nghiệm này cho thấy rằng việc sử dụng kháng thể kháng activin A cùng với chất ức chế myostatin có thể làm tăng hơn nữa tình trạng phì đại cơ xương tới mức cao hơn đáng kể so với khi chỉ điều trị bằng chất ức chế myostatin ở liều lượng và tần suất tiêm được thử nghiệm.

Ví dụ 8. Ức chế sự liên kết với activin A bằng cách sử dụng kháng thể kháng activin A

Khả năng của kháng thể kháng activin A được chọn ức chế sự tương tác của activin A với các thụ thể của nó là ActRIIB và ActRIIA, cũng như chất đối kháng nội sinh của nó là Follistatin được xác định bằng cách sử dụng thiết bị Biacore 3000. Đối với thử nghiệm này, kháng thể đối chứng 4 (ActRIIB của người được biểu hiện cùng với đuôi Fc đầu C của người (SEQ ID:227)), ActRIIA của người được biểu hiện cùng với đuôi Fc đầu C của người (hActRIIA-Fc; R&D Systems, # 340-R2-100), hoặc Follistatin-288 (R&D Systems, #5836-FS-025) được liên kết amin với bề mặt cảm biến Biacore CM5. Activin A (R&D Systems, #338-AC) ở nồng độ cố định bằng 5nM một mình hoặc trộn với kháng thể kháng activin A là hActRIIA-Fc, hActRIIB-Fc, hoặc kháng thể đối chứng isotyp ở nồng độ cuối bằng 60nM (lượng dư mol gấp 12 lần so với activin A) được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Hỗn hợp kháng thể-activin A được tiêm lên bề mặt kháng thể đối chứng 4 liên kết amin, hActRIIA-Fc, hoặc Follistatin-288 ở tốc độ dòng 20 μ L/phút. Tín hiệu liên kết (RU) được xác định ở thời điểm 150 giây sau khi bắt đầu tiêm, và tín hiệu này được trừ đi giá trị RU đo được của bề mặt so sánh đối chứng âm để xác định tín hiệu liên kết đặc hiệu. Tỷ lệ phần trăm liên kết với activin A tự do trên bề mặt thụ thể hoặc chất đối kháng với sự có mặt của mỗi kháng thể kháng activin A được tính theo tỷ lệ của tín hiệu liên kết đặc hiệu quan sát được chia cho tín hiệu liên kết đặc hiệu của 5nM activin A khi không có mặt của kháng thể.

Bảng 22: Ức chế sự liên kết của activin A với Follistatin bởi kháng thể kháng activin A

Bề mặt follistatin-288 (3000RU bị bắt giữ)-chuẩn hóa theo activin A (% RU liên kết khi có/không có chất ức chế)

Đối chứng isotyp (-)	100
Đối chứng 4 (hActRIIB-hFc)	100
hActRIIA-hFc 1	100
Đối chứng 3	100
Đối chứng 1	100
H4H10423P	100
H4H10436P2	100
H4H10429P	100
H4H10440P2	100
H4H10430P	100
H4H10446P2	100
H4H10442P2	100
Nồng độ mAb/protein (nM)	0
0,94	73
1,88	46
3,75	6
7,5	3
15	3
30	3
60	3

Như đã thấy trong Bảng 22, 6 trong số 7 kháng thể kháng activin A theo sáng chế được thử nghiệm và cả kháng thể đối chứng 1 và đối chứng 3 đều ức chế sự liên kết của activin A với Follistatin-288. Một kháng thể theo sáng chế là F14H10423P không ức chế sự liên kết của activin A với Follistatin-288. Kháng thể đối chứng 4 và hActRIIA-Fc ức chế sự liên kết của activin A với Follistatin-288 ở nồng độ cao hơn.

Bảng 23: Ức chế sự liên kết của activin A với hActRIIA-Fc bởi kháng thể kháng activin A

Bề mặt hActRIIA-hFc (8000RU bị bắt giữ)-chuẩn hóa theo activin A (% RU liên kết khi có/không có chất ức chế)																							
Đối chứng isotyp (-)	100	Đối chứng 4 (hActRIIB-hFc)	100	hActRIIA-hFc	100	Đối chứng 3	100	Đối chứng 1	100	H4H10423P	100	H4H10436P2	100	H4H10429P	100	H4H10440P2	100	H4H10430P	100	H4H10446P2	100	Nồng độ mAb/protein (nM)	0,00
109	276	236	207	82	112	75	87	75	66	55	114	16	19	19	52	62	81	111	114	100	0,94		
112	266	222	190	66	114	55	66	66	114	114	114	16	19	66	52	62	81	111	114	100	1,88		
110	231	188	139	28	111	16	19	17	19	19	114	16	19	17	52	62	81	111	114	100	3,75		

Bề mặt hActRIIA-hFc (8000RU bị bắt giữ)-chuẩn hóa theo activin A (% RU liên kết khi có/không có chất ức chế)

Đối chứng isotyp (-)	Đối chứng 4 (hActRIIB-hFc)	hActRIIA-hFc	Đối chứng 3	Đối chứng 1	H4HI10423P	H4HI10436P2	H4HI10429P	H4HI10440P2	H4HI10430P	H4HI10446P2	H4HI10442P2	Nồng độ mAb/protein (nM)
115	160	128	32	1	110	2	1	6	3	94	105	7,50
116	51	50	1	1	112	2	1	4	2	108	113	15
118	2	5	1	1	114	2	1	3	2	98	117	30
119	1	3	0	2	116	2	1	3	2	118	118	60

Như đã thấy trong Bảng 23, 4 trong số 7 kháng thể kháng activin A theo sáng chế được thử nghiệm và cả kháng thể đối chứng 1 và đối chứng 3 đều có tác dụng ức chế sự liên kết của hActRIIA-Fc với activin A. Ba kháng thể theo sáng chế là FI4HI10442P2, H4FI10446P2, và H4FI10423P không ức chế sự liên kết của activin A với hActRIIA-Fc. Kháng thể đối chứng 4 và hActRIIA-Fc ức chế sự liên kết của activin A với hActRIIA-Fc.

Bảng 24: Ức chế sự liên kết của activin A với hActRIIB-Fc bằng kháng thể kháng activin A

Bề mặt hActRIIB-hFc (đối chứng 4) (4000RU bị bắt giữ)-chuẩn hóa theo activin A (% RU liên kết khi có/không có chất ức chế)												
Đối chứng isotyp	Đối chứng 4 (hActRIIB-hFc)	hActRIIA-hFc	Đối chứng 3	Đối chứng 1	H4HI10423P	H4HI10436P2	H4HI10429P	H4HI10440P2	H4HI10430P	H4HI10446P2	H4HI10442P2	Nồng độ mAb/protein
100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0,00
105	149	131	135	85	93	80	87	79	80	107	110	0,94
105	148	129	133	69	78	60	67	58	62	105	106	1,88
104	144	127	120	31	47	19	19	19	20	76	88	3,75
107	130	113	33	2	42	3	2	7	4	95	103	7,50
110	51	56	2	2	42	2	2	4	3	115	115	15
111	3	5	1	2	41	3	2	4	3	89	122	30

Bề mặt hActRIIB-hFc (đối chứng 4) (4000RU bị bắt giữ)-chuẩn hóa theo activin A (% RU liên kết khi có/không có chất ức chế)												
Nồng độ mAb/protein	H4H10442P2	H4H10446P2	H4H10430P	H4H10440P2	H4H10429P	H4H10436P2	H4H10423P	Đối chứng 1	Đối chứng 3	hActRIIA-hFc	Đối chứng 4 (hActRIIB-hFc)	Đối chứng isotyp
60	124	129	3	4	3	4	41	3	2	5	2	115

Như đã thấy trong Bảng 24, 4 trong số 7 kháng thể kháng activin A theo sáng chế được thử nghiệm và cả kháng thể đối chứng 1 và đối chứng 3 đều có tác dụng ức chế sự liên kết của activin A với hActRIIB-Fc. Hai kháng thể theo sáng chế là H4H10442P2 và H4H10446P2 không ức chế sự liên kết của activin A với hActRIIB-Fc. Một kháng thể theo sáng chế là H4H10423P có khả năng ức chế một phần sự liên kết của activin A với hActRIIB-Fc ở nồng độ cao hơn của kháng thể được thử nghiệm. Cả hActRIIB-Fc lẫn hActRIIA-Fc đều có tác dụng ức chế sự liên kết của activin A với hActRIIB-Fc.

Ví dụ 9. Tác dụng của H4H1657N2 đến khối lượng cơ và chất lượng tập luyện

Tác dụng của kháng thể kháng GDF8 H4H1657N2 đến khối lượng cơ và chất lượng tập luyện được đánh giá ở chuột đực C57BL/6 nhiều tuổi (19 tháng tuổi).

Chuột đực chia ngẫu nhiên thành bốn nhóm (n=6-8 con/nhóm), nhóm tập luyện hoặc nhóm không tập luyện sử dụng liều H4H1657N2 hoặc kháng thể đối chứng isotyp (10mg/kg) qua đường dưới da, hai lần hàng tuần trong 21 ngày (6 lần tiêm). Chuột trong nhóm tập luyện được thực hiện chế độ tập luyện bao gồm một phiên tập luyện một ngày, bao gồm 20 phút tập trên cối xay guồng Exer 6M (Columbus Instruments, Columbus, OH) ở tốc độ 10m/phút với độ nghiêng 5°C, năm ngày một tuần trong ba tuần liên tiếp. Vào cuối thời gian điều trị ba tuần, khả năng chịu đựng được xác định trong cả bốn nhóm sử dụng thử nghiệm tĩnh trạng kiệt sức bằng cối xay guồng. Dữ liệu được phân tích bằng thử nghiệm ANOVA hai chiều, sau đó bằng kiểm định Tukey HSD. Trọng lượng cơ được đưa ra dưới dạng trọng lượng được chuẩn hóa (tức là trọng lượng cơ được chuẩn hóa theo thể trọng được xác định khi bắt đầu thử nghiệm). Kết quả đối với cơ bốn đầu được đưa ra trong bảng 25 dưới dạng mức độ thay đổi trọng lượng cơ trung bình theo tỷ lệ % của mỗi nhóm ($\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình) so với nhóm sử dụng kháng thể đối chứng isotyp.

Bảng 25: Mức độ thay đổi trọng lượng cơ bốn đầu

	Đối chứng isotyp (Không tập) luyện)	H4H1657N2 (Không tập luyện)	Kháng thể đối chứng isotyp + tập luyện	H4H1657N2 ± tập luyện
Trọng lượng cơ bốn đầu	0,00 ± 2,72	15,77 ± 2,73	9,85 ± 3,57	17,66 ± 3,24

% thay đổi so với nhóm sử dụng kháng thể đối chứng isotyp. Giá trị trung bình db SEM được đưa ra.

Như đã thấy trong Bảng 25, việc điều trị bằng H4H1657N2 làm tăng đáng kể khối lượng cơ bốn đầu ($p < 0,01$ có ý nghĩa so với kháng thể đối chứng isotyp đối với cả hai nhóm sử dụng H4H1657N2). Sự tăng trọng lượng cơ chi sau (cơ TA, GA) được thấy ở chuột nhiều tuổi có tập luyện (17,4%, 12,5% tương ứng) và không tập luyện (14,1%, 11,6% tương ứng) so với chuột sử dụng kháng thể đối chứng isotyp. Sự tăng nhẹ trọng lượng cơ được quan sát giữa các chuột nhiều tuổi có tập luyện và không tập luyện được sử dụng kháng thể đối chứng isotyp, nhưng sự tăng này là không có ý nghĩa thống kê (Bảng 25).

Tác dụng của việc điều trị bằng H4H1657N2 đối với khả năng chịu đựng tập luyện cũng được kiểm tra ở chuột đực C57BL/6 19 tháng tuổi (Bảng 26).

Bảng 26: Thử nghiệm về khả năng chịu đựng

	Đối chứng isotyp (Không tập luyện)	H4H1657N2 (Không tập luyện)	Đối chứng isotyp + tập luyện	H4H1657N2 + tập luyện
Thời gian chạy cho đến khi kiệt sức (phút)	27,94 ± 4,12	28,54 ± 6,10	50,26 ± 8,56	73,23 ± 4,68
Khoảng cách chạy cho đến khi kiệt sức (m)	428,42 ± 71,91	535,99 ± 155,61	930,06 ± 179,78	1366,65 ± 95,91

Ở chuột nhiều tuổi có tập luyện, H4H1657N2 cũng làm tăng đáng kể khả năng chịu đựng như được xác định bằng thời gian chạy trên cối xay guồng (73,2 phút so với 50,2 phút) và khoảng cách chạy (1,33km so với 0,93km) so với nhóm sử dụng kháng thể đối chứng isotyp (Bảng 26). Tuy nhiên, ở chuột không tập luyện, H4H1657N2 không làm tăng đáng kể khả năng chịu đựng so với nhóm sử dụng kháng thể đối chứng isotyp.

Như trong thử nghiệm về trọng lượng cơ, H4H1657N2 làm tăng đáng kể khả năng chịu đựng được xác định bằng thời gian và khoảng cách chạy cối xay guồng chỉ ở chuột có tập luyện mà không làm tăng khả năng chịu đựng ở chuột không tập luyện. Các kết

quả này cho thấy rằng H4H1657N2 làm tăng hiệu quả hoạt động thể lực khi kết hợp với tập luyện.

Ví dụ 10. Tác dụng của H4H1657N2 đối với khối lượng cơ xương và lực đẳng cự ở chuột

Khả năng của H4H1657N2 gây phì đại cơ xương được đánh giá *in vivo* ở chuột đực C57BL/6 chín tuần tuổi.

Liều dùng dưới da lặp lại của H4H1657N2 hoặc kháng thể đối chứng isotyp, ở liều 10 hoặc 30 mg/kg, được sử dụng hai lần hàng tuần trong 3 tuần (n=6). Việc điều trị bằng H4H1657N2 trong 21 ngày làm tăng thể trọng ở mức $4,7 \pm 2,3\%$ (n.s.) và $7,1 \pm 1,5\%$ (n.s.) tương ứng so với chuột sử dụng kháng thể đối chứng isotyp ở liều tương đương.

Trọng lượng mỗi cơ tăng lên so với khi sử dụng kháng thể đối chứng isotyp (10mg/kg & 30mg/kg) như sau: cơ cẳng chân trước ($19,4 \pm 4,9\%^{**}$ & $20,6 \pm 1,5\%^{**}$), cơ bụng chân: ($14,9 \pm 2,9\%^{**}$ & $25,3 \pm 1,9\%^{***}$), và cơ bốn đầu ($17,7 \pm 3,6\%^{*}$ & $26,2 \pm 3,8\%^{**}$). (tất cả các phân tích bắt đầu bằng phân tích ANOVA một chiều kết hợp với kiểm định Tukey sau phân tích phương sai [* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. = không khác biệt về mặt thống kê].)

Sự tăng khối lượng cơ cẳng chân trước (TA) đi kèm với sự tăng lực đẳng cự *ex vivo* cho thấy khả năng duy trì cả chức năng của cơ và khối lượng cơ. Chuột đã được điều trị trước bằng liều lặp lại dưới da của H4H1657N2 hoặc kháng thể đối chứng isotyp (ở liều 10 mg/kg sử dụng hai lần hàng tuần trong 3 tuần, n= 6 con chuột/nhóm) được gây mê và duy trì trong môi trường khí Isofluran trong khi cơ TA được cắt và cho vào bể Ringer lactat oxy hóa được duy trì ở nhiệt độ không đổi bằng 25°C. Đầu trên của cơ TA được buộc chặt vào cột thẳng đứng nhúng trong bể trong khi dây chằng đầu xa được buộc vào cánh tay đòn 305C (Cambridge Systems). Chiều dài tối ưu được xác định bằng cách kéo duỗi nhẹ cơ TA và sau đó thử nghiệm lực tạo ra bằng cách kích thích ở tần số 1Hz ở điện áp tối thiểu. Cơ TA được kéo căng và kích thích nhiều lần cho đến khi lực giảm đi và tiếp đó được giãn tới vị trí trước đó. Điện áp được tăng dần trong loạt kích thích 1Hz để đạt được lực đầu ra cực đại. Khi chiều dài và điện áp tối ưu được xác định, cơ TA được kích thích trong 400 mili giây ở tần số tăng dần (40-100Hz) để xác định lực co cứng cực đại. Cơ TA được nghỉ trong 2 phút sau mỗi lần kích thích co cứng cơ.

Cơ TA của chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp ở liều 10mg/kg và 30 mg/kg trong 21 ngày tạo ra lực co cứng cơ cực đại trung bình bằng $892,6 \pm 37$ và $906,1 \pm 37,8$ tương ứng. Cơ TA của chuột được điều trị bằng H4H1657N2 tạo ra lực co cứng cơ cực đại trung bình bằng $1041,3 \pm 31,7$ và $1003,3 \pm 35,7$ mN tương ứng. Các lực này thể hiện sự tăng 16,7%* (10mg/kg) và 10,7% n.s (30mg/kg) của lực co cứng cơ cực đại trung bình so với chuột điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp (Fig.2A). Tác dụng chung của việc điều trị bằng H4H1657N2 đối với lực co cứng cơ cực đại là khác biệt về mặt thống kê so với chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp ở cả liều 10mg/kg và 30mg/kg (10mg/kg được thể hiện trên Fig.2B). (Fig.2A: phân tích thống kê bằng ANOVA một chiều kết hợp với kiểm định Tulcey sau phân tích phương sai [$p < 0,05$; n.s. = không khác biệt về mặt thống kê]. Fig.2B: phân tích thống kê bằng ANOVA hai chiều và kiểm định Sidaks sau phân tích phương sai [$p > 0,0001$].)

Ví dụ 11. H4H1657N2 có tác dụng cải thiện khả năng hồi phục sau teo cơ do treo chân sau (Hind Limb Suspension: HLS)

Tác dụng của H4H1657N2 đối với khối lượng cơ xương trong giai đoạn phục hồi sau teo cơ do treo chân sau trong 7 ngày được đánh giá ở chuột đực C57BL/6 một năm tuổi.

Vào ngày 0, 18 con chuột được treo đuôi lên sao cho cả hai chân sau không thể chạm đất trong thời gian 7 ngày. Chuột được nhốt trong các lồng đặc biệt và được ăn thức ăn và uống nước thoải mái. Đồng thời một nhóm gồm 6 con chuột khác được nhốt trong lồng bình thường và được dùng làm đối chứng (chuột đối chứng không treo chân sau). Vào ngày 7, chuột đã treo đuôi được hạ xuống và chia ngẫu nhiên thành ba nhóm (n=6 con mỗi nhóm) theo tỷ lệ phần trăm giảm thể trọng trong thời gian treo chân sau. Vào ngày 7, trọng lượng cơ của nhóm đối chứng không treo chân sau và một nhóm treo chân sau (nhóm HLS) được ghi lại để đánh giá tỷ lệ phần trăm teo cơ do treo chân sau. Hai nhóm treo chân sau còn lại (n=6 con mỗi nhóm) được để hồi phục trong 8 ngày (tức là từ ngày 7 đến ngày 15 của thử nghiệm) trong lồng bình thường và được điều trị dưới da bằng H4H1657N2 hoặc kháng thể đối chứng isotyp với liều 10mg/kg vào ngày 7 và 10 (tức là sau khi hồi phục 0 ngày và 3 ngày) (HLS+7Rec+H4H1657N2 và HLS+7Rec+kháng thể đối chứng isotyp tương ứng). Vào ngày 15 (tức là sau khi hồi phục trong 8 ngày), trọng lượng cơ được ghi lại để đánh giá tỷ lệ phần trăm hồi phục sau khi teo cơ do treo chân sau.

Như đã thấy trên Fig.3B, bảy ngày treo chân sau làm giảm đáng kể khối lượng của cả cơ cẳng chân trước (TA) và cơ bụng chân (GA) (nhóm HLS) so với nhóm đối chứng không treo chân sau (mức giảm -13,7%* và -14,8%* tương ứng). Sau khi hồi phục trong 8 ngày, nhóm HLS+7Rec+kháng thể đối chứng isotyp vẫn bị giảm khối lượng cơ TA và GA (mức giảm -6,3% và -7,5%) so với nhóm đối chứng không treo chân sau, trong khi nhóm HLS+7Rec+H4H1657N2 có sự tăng khối lượng cơ (mức tăng 4,7% và 5%) so với nhóm không treo chân sau.

Khi so sánh hai nhóm hồi phục (tức là nhóm HLS+7Rec+H4H1657N2 so với nhóm HLS+7Rec+kháng thể đối chứng isotyp), tác dụng của H4H1657N2 đối với khối lượng cơ TA và GA không khác biệt về mặt thống kê so với tác dụng quan sát được với nhóm điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp. Tuy nhiên, mặc dù khối lượng cơ của nhóm HLS+7Rec+kháng thể đối chứng isotyp không khác biệt về mặt thống kê với nhóm treo chân sau hoặc nhóm đối chứng không treo chân sau, nhóm HLS+7Rec+H4H1657N2 có khối lượng cơ TA và GA cao hơn về mặt thống kê so với nhóm treo chân sau. (Tất cả các phân tích thống kê bắt đầu bằng ANOVA một chiều kết hợp với kiểm định Tulcey sau phân tích phương sai [* $p < 0,05$ so với không treo chân sau; ## $p < 0,01$ so với treo chân sau]).

Ví dụ 12. ức chế sự hoạt hóa thụ thể BMP typ I và II bằng kháng thể kháng activin A và ActRIIB-Fc

Protein tạo hình thái xương (bone morphogenetic protein: BMP) thuộc về siêu họ TGF- β và tham gia vào việc điều chỉnh nhiều quá trình sinh lý bằng cách hoạt hóa phức chất thụ thể trên bề mặt tế bào bao gồm thụ thể BMP typ I và II. Sự hoạt hóa thụ thể dẫn tới sự phosphoryl hóa protein SMAD và hoạt hóa quá trình phiên mã các gen phản ứng lại phối tử.

Thử nghiệm sinh học được phát triển để phát hiện sự điều chỉnh quá trình truyền tín hiệu BMP trong tế bào W-20-17, dòng tế bào chất nền tủy xương của chuột đã được chứng minh là phản ứng lại BMP2. Tế bào được thao tác di truyền để biểu hiện ổn định gen thông báo luciferaza (tức là yếu tố phản ứng BMP (BRE(2X)-luciferaza-IRES-GFP)), và chọn mức biểu hiện GFP cao. Dòng tế bào ổn định thu được được gọi là W-20-17/BRE-luc và được duy trì trong 10% FBS, DMEM, Pen/Strep, và 200 μ g/ml G418. Các tế bào này được sử dụng để xác định mức độ hoạt hóa BMP và mức độ ức chế sự

hoạt hóa này bởi kháng thể kháng activin A và ActRIIB-hFc (kháng thể đối chứng 4, trình tự nhận biết số 227).

Khả năng của bốn kháng thể kháng activin A và kháng thể ActRIIB-hFc ức chế sự truyền tín hiệu BMP được đánh giá bằng cách sử dụng dòng tế bào W-20-17/BRE-luc. Đối với thử nghiệm sinh học này, tế bào W-20-17/BRE-luc được cấy vào các đĩa thử nghiệm 96 lỗ ở mật độ 10000 tế bào/lỗ và ủ ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂ qua đêm. Ngày tiếp theo, BMP2, BMP4, BMP6, BMP9 hoặc BMP10 được pha loãng hàng loạt ở tỷ lệ 1:3 và được bổ sung vào tế bào với lượng nằm trong khoảng từ 100nM đến 0,002nM (bao gồm mẫu đối chứng không chứa BMP để xác định đáp ứng liều). Đối với tác dụng ức chế BMP bởi kháng thể kháng activin A hoặc ActRIIB-hFc, các kháng thể hoặc ActRIIB-hFc được pha loãng hàng loạt ở tỷ lệ 1:3 ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1000nM đến 0,02nM (bao gồm mẫu không chứa kháng thể, chứa kháng thể đối chứng, hoặc đối chứng âm của ActRIIB-hFc (tức là protein không liên quan có đuôi hFc, “protein đối chứng”)) và được bổ sung vào tế bào cùng với 100pM BMP2, 100pM BMP4, 10nM BMP6, 800pM BMP9 hoặc 4nM BMP10 như đã nêu. Hoạt tính của luxiferaza được phát hiện sau khi ủ trong 5,5 giờ ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂ bằng thiết bị Victor X (Perkin Elmer) và kết quả được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp hồi quy không tuyến tính (hàm logic 4 thông số) nhờ chương trình phần mềm Prism 5 (GraphPad).

Như đã thấy trong Bảng 27 dưới đây, H4H10446P2 và H4H10430P không ức chế BMP bất kỳ được thử nghiệm, trong khi các kháng thể kháng activin A khác được thử nghiệm (H4H10429 và H4H10436P2) và ActRIIB-hFc đều ức chế một số BMP ở mức độ nhất định. H4H10429P có tác dụng ức chế BMP9 và BMP10 với IC₅₀ bằng 8,1nM và 3,5nM tương ứng, nhưng không ức chế BMP2, BMP4 và BMP6. H4H10436P2 có tác dụng ức chế yếu đối với BMP2 và BMP4 ở nồng độ cao nhất của kháng thể và ức chế BMP 10 với IC₅₀ >100nM, nhưng không có tác dụng ức chế bất kỳ đối với BMP6 và BMP9. ActRIIB-hFc có tác dụng ức chế BMP9 và BMP10 với IC₅₀ bằng 2nM và 1nM nhưng không ức chế BMP2, BMP4, và BMP6. Các phân tử đối chứng (tức là kháng thể đối chứng isotyp (mAb đối chứng) và protein không liên quan có đuôi hFc (protein đối chứng)) đều không ức chế BMP bất kỳ, trong khi một mình BMP2, BMP4, BMP6, BMP9, hoặc BMP10 (tức là không chứa kháng thể hoặc protein có đuôi hFc) có tác dụng hoạt hóa tế bào W-20-17/BRE-luc với EC₅₀ bằng 34pM, 63pM, 4,5nM, 260pM, và

2,5nM tương ứng.

Bảng 27. Tác dụng ức chế BMP bởi kháng thể kháng activin A và ActRIIb-hFc trong tế bào W-20-17/BRE-luc

Phối tử	BMP2	BMP4	BMP6	BMP9	BMP10
EC50 [M]	3,4E-11	6,3E-11	4,5E-09	2,6E-10	2,5E-09
BMP không đổi	100pM	100pM	10nM	800pM	4nM
Kháng thể	IC50[M]	IC50 [M]	IC50[M]	IC50 [M]	IC50 [M]
H4H10446P2	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế
H4H10430P	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế
H4H10429P	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế	8,1E-09	3,5E-09
H4H10436P2	ức chế yếu (ức chế 31% ở 10M)	ức chế yếu (ức chế 51% ở 10M)	Không ức chế	Không ức chế	> 1,0E-07
ActRIIB-hFc	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế	2,0E-09	1,0E-09
mAb đối chứng	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế
Protein đối chứng	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế	Không ức chế

Ví dụ 13. Điều trị bằng kháng thể kháng activin A H4H10446P2 làm giảm bệnh xơ hóa thận in vivo

Tác dụng của kháng thể kháng activin A đặc hiệu theo sáng chế là H4H10446P2 đối với bệnh xơ hóa thận được xác định trên mô hình chuột bị tắc niệu quản một bên (unilateral ureteral obstruction: UUO) trong bệnh xơ hóa thận. Mô hình UUO được phát triển bằng cách thắt hoàn toàn niệu quản trái trong khi giữ nguyên chức năng thận phải. Nói một cách ngắn gọn, UUO được thực hiện ở chuột trong điều kiện gây mê bằng ketamin/xylazin, nhờ đó niệu quản trái được tiếp cận bằng vết rạch bên sườn và thắt hai chỗ cách nhau 5mm ở đầu gần một phần ba của niệu quản bằng chỉ tơ loại 5-0. Phẫu thuật giả được thực hiện theo cách tương tự nhưng không thắt niệu quản. Trên mô hình này, bệnh xơ hóa nặng xuất hiện ở thận trong vòng 14 ngày sau khi UUO, bệnh này được đánh giá bằng cách xác định mức collagen ở thận bằng cách xác định trực tiếp lượng hydroxyprolin trong mẫu, phương pháp này được gọi là phương pháp hydroxyprolin. Hydroxyprolin là thành phần đặc trưng của collagen, và chiếm khoảng 14,4% thành phần

axit amin của collagen trong phần lớn các mô của động vật có vú (Cochrane *et al.*, J Am Soc Nephrol 16:3623-30 (2005)). Để xác định lượng collagen bằng phương pháp hydroxyprolin, trước hết các mẫu thận đông lạnh được làm khô qua đêm bằng buồng chân không. Các mẫu mô thận khô được làm đồng nhất trong dung dịch NaCl/NaHCO₃ được làm lạnh bằng nước đá và tiếp đó thủy phân bằng cách sử dụng dung dịch HCl 6M. Sau đó, các mẫu được làm khô bằng cách sử dụng thiết bị ly tâm chân không, và sau đó được hydrat hóa lại bằng dung dịch HCl 0,1M. Hydroxyprolin trong các mẫu hydrat hóa lại này được oxy hóa bằng 300mM cloramin T (Sigma, # 857319) và chất phản ứng Ehrlich [3,5M p-dimetylaminobenzaldehyt (FW: 149,19, Sigma, # 39070) trong dung dịch axit perchloric 60% (Sigma, # 311413)] được bổ sung vào để làm hiện màu. Cuối cùng, bằng cách sử dụng phổ quang kế, năng suất hấp thụ của các mẫu được xác định ở 558nm và kết quả này được so sánh với chất chuẩn hydroxyprolin (Sigma, # H5534) có nồng độ đã biết để xác định lượng hydroxyprolin của thận. Sau đó, lượng hydroxyprolin xác định được nhân với 6,94 để xác định lượng collagen. 14 ngày sau khi phẫu thuật UUO, trọng lượng thận khô giảm đi do tổn thương tế bào nhu mô. Phẫu thuật giả (n = 10) hoặc phẫu thuật UUO (n = 20) được thực hiện trên chuột đực C57BL/6 16 tuần tuổi (Taconic farms, Inc.). Chuột đã phẫu thuật UUO được chia thành hai nhóm. Mỗi nhóm UUO được tiêm dưới da H4H10446P2 (40 mg/kg, n = 10) hoặc kháng thể đối chứng isotyp (40 mg/kg, n = 10), kháng thể này không liên kết với một protein bất kỳ đã biết của chuột khi bắt đầu một ngày trước khi phẫu thuật và vào ngày 1, 3, 6, 8, 10, và 13 sau khi phẫu thuật. Chuột được phẫu thuật giả được sử dụng chất dẫn thuốc (PBS vô trùng) trong thời gian này bằng cách sử dụng chế độ điều trị giống như nhóm UUO. Toàn bộ chuột bị giết vào ngày 14 sau khi phẫu thuật. Trọng lượng thận được xác định, và thận được đông lạnh nhanh bằng nitơ lỏng và duy trì ở -80°C cho đến khi lượng collagen được xác định. Lượng collagen của thận được xác định bằng phương pháp hydroxyprolin, và được biểu thị bằng tổng lượng collagen của thận (μg) hoặc lượng collagen của thận được chuẩn hóa theo trọng lượng thận (μg/mg trọng lượng khô). Phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng phân tích ANOVA một chiều kết hợp với kiểm định Turkey so sánh nhiều lần. Kết quả bao gồm lượng collagen toàn phần ở thận, lượng collagen ở thận được chuẩn hóa, và trọng lượng thận khô của mỗi nhóm điều trị được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± SEM trong bảng 28 dưới đây.

Bảng 28. Lượng collagen toàn phần ở thận, lượng collagen ở thận được chuẩn hóa, và

trọng lượng thận khô của mỗi nhóm (giá trị trung bình $\pm$ SEM)

Nhóm điều trị	Lượng collagen toàn phần ở thận (μg)	Lượng collagen ở thận được chuẩn hóa ($\mu\text{g}/\text{mg}$ trọng lượng mô khô)	Trọng lượng thận khô (g)
Sham + chất dẫn thuốc	$429,6 \pm 25,93$	$8,16 \pm 0,29$	$0,0524 \pm 0,002$
UUO + kháng thể đối chứng isotyp	$980,7 \pm 50,48$	$25,07 \pm 0,86$	$0,0396 \pm 0,0027$
UUO + H4H10446P2	$730,7 \pm 48,02$	$17,48 \pm 0,79$	$0,0422 \pm 0,0029$

Như đã thấy trong Bảng 28, cả lượng collagen toàn phần ở thận và lượng collagen ở thận được chuẩn hóa theo trọng lượng thận đều tăng đáng kể ở chuột phẫu thuật UUO so với chuột được phẫu thuật giả. Chuột phẫu thuật UUO được điều trị bằng H4H10446P2 có sự giảm đáng kể cả lượng collagen toàn phần ở thận và lượng collagen ở thận được chuẩn hóa theo trọng lượng thận (mức giảm khoảng 45% lượng collagen do xơ hóa) so với chuột UUO được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp, cho thấy kháng thể kháng activin A làm giảm bệnh xơ hóa thận. Chuột phẫu thuật UUO được điều trị bằng H4H10446P2 có sự tăng trọng lượng thận khô so với chuột phẫu thuật UUO được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp, cho thấy sự bảo toàn tế bào nhu mô ở chuột được điều trị bằng kháng thể kháng activin A.

Ví dụ 14. Tác dụng của EMH10446P2 đối với thể trọng và khối lượng cơ ở chuột biểu hiện quá mức activin A

Để đánh giá hiệu quả của H4H10446P2 trong việc trung hòa lượng activin A gia tăng ở chuột, activin A được biểu hiện quá mức ở chuột C57BL/6 (10 tuần tuổi) bằng cách tiêm nhờ lực thủy động (hydrodynamic delivery: HDD) cấu trúc ADN mã hóa activin A có chiều dài đầy đủ. Chuột được chia ngẫu nhiên thành ba nhóm ($n=5-6$ con/nhóm); một nhóm được tiêm hỗn hợp nước muối /2,5 μg cấu trúc ADN đối chứng với sự có mặt của kháng thể đối chứng isotyp, và hai nhóm được tiêm hỗn hợp nước muối/2,5 μg cấu trúc ADN chứa activin A với sự có mặt của kháng thể đối chứng isotyp hoặc H4H10446P2. Cấu trúc ADN được tiêm vào ngày 0, và kháng thể được sử dụng vào ngày 0 và 4 ở liều 2,5 mg/kg (2 lần tiêm) trong 7 ngày. Trọng lượng cơ được ghi dưới dạng trọng lượng đã chuẩn hóa (tức là trọng lượng cơ được chuẩn hóa theo thể trọng đo được khi bắt đầu thử nghiệm). Kết quả đo thể trọng được thể hiện dưới dạng

mức độ thay đổi trung bình so với thể trọng ban đầu. Kết quả đo đối với cơ cẳng chân trước (TA) và cơ bụng chân (GA) như được thể hiện trên Fig.4 dưới dạng mức độ thay đổi trung bình theo tỷ lệ phần trăm của mỗi nhóm ($\pm$ sai số chuẩn của giá trị trung bình) so với nhóm được tiêm HDD cấu trúc ADN đối chứng + kháng thể đối chứng isotyp. Dữ liệu được phân tích bằng ANOVA một chiều hoặc hai chiều, sau đó bằng kiểm định Tukey HSD.

Như đã thấy trên Fig.4, bảy ngày sau khi tiêm HDD, việc sử dụng activin A cho chuột được điều trị bằng kháng thể đối chứng isotyp làm giảm đáng kể thể trọng ($-10,81 \pm 2,46\%$) và trọng lượng cơ cẳng chân và cơ bụng chân (mức giảm là $-13,96 \pm 1,85\%$ và $-10,34 \pm 1,51\%$ tương ứng) ($p < 0,01$ có ý nghĩa so với kháng thể đối chứng isotyp). Việc sử dụng activin A ở chuột được điều trị bằng H4H10446P2 làm giảm đáng kể thể trọng (mức giảm $-1,49 \pm 1,98\%$) và trọng lượng cơ cẳng chân và cơ bụng chân khi kết thúc thời gian điều trị bảy ngày (mức giảm là $-2,57 \pm 1,26\%$ và $-1,77 \pm 2,42\%$ tương ứng).

Sáng chế không chỉ giới hạn phạm vi ở các phương án cụ thể được mô tả ở đây. Thực vậy, các cải biến khác nhau của sáng chế ngoài các cải biến được mô tả ở đây sẽ trở nên rõ ràng đối với chuyên gia trong lĩnh vực này từ phần mô tả nêu trên và các hình vẽ kèm theo. Các cải biến này được dự định thuộc phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết đặc hiệu Activin A với hằng số cân bằng phân ly liên kết (K_D) nhỏ hơn khoảng 5 pM như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này chứa: (a) các vùng xác định tính bổ trợ (complementarity determining region: CDR) của HCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 162; và (b) các CDR của LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 146.
2. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này liên kết đặc hiệu Activin A với K_D nhỏ hơn khoảng 4 pM như đo được trong thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt ở 25°C.
3. Kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này phong bế liên kết của ít nhất một thụ thể Activin A với Activin A.
4. Kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này phong bế liên kết của Activin A với thụ thể Activin A với giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 80 pM như được đo bằng thử nghiệm liên kết thụ thể/phối tử *in vivo* ở 25°C.
5. Kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 4, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này phong bế liên kết của Activin A với thụ thể Activin A với giá trị IC_{50} nhỏ hơn khoảng 60 pM như được đo bằng thử nghiệm liên kết thụ thể/phối tử *in vivo* ở 25°C.
6. Kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này phong bế sự hoạt hóa của ít nhất một Activin A bởi Activin A, trong đó thụ thể Activin A được chọn từ nhóm bao gồm thụ thể Activin typ IIA (ActRIIA), thụ thể Activin typ IIB (ActRIIB), và thụ thể Activin typ I.
7. Kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 6, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này phong bế không đáng kể liên kết của Activin A với thụ thể Activin typ II.

8. Kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này liên kết đặc hiệu với Activin A với hằng số cân bằng kết hợp liên kết (K_a) nhỏ hơn khoảng 500 nM.
9. Kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này ức chế liên kết của Activin A với thụ thể Activin A được chọn từ nhóm gồm thụ thể Activin typ IIA (ActRIIA), thụ thể Activin typ IIB (ActRIIB), và thụ thể Activin typ I.
10. Kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 1, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này ức chế sự hoạt hóa qua trung gian của Activin A quá trình truyền tín hiệu phức hợp SMAD.
11. Kháng thể đã 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 cạnh tranh liên kết với Activin A với kháng thể tham chiếu chứa cặp trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng (heavy chain variable region: HCVR)/vùng biến đổi chuỗi nhẹ (light chain variable region: LCVR) được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2/10, 138/146, và 194/146.
12. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1 và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.
13. Dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên theo điểm 1, chất đối kháng GDF8, và chất mang hoặc chất pha loãng dược dụng.
14. Dược phẩm theo điểm 13, trong đó chất đối kháng GDF8 được chọn từ nhóm bao gồm protein dung hợp ức chế GDF8, kháng thể kháng GDF8 và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể kháng GDF8.
15. Dược phẩm theo điểm 14, trong đó chất đối kháng GDF8 là kháng thể kháng GDF8 mảnh liên kết kháng nguyên chứa các HCDR của HCVR có trình tự SEQ ID NO:217 và các LCDR của LCVR có trình tự SEQ ID NO:221.
16. Dược phẩm theo điểm 14, trong đó chất đối kháng GDF8 là kháng thể kháng GDF8 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên chứa:
 - a) ba HCDR có trình tự SEQ ID NO:218, SEQ ID NO:219, và SEQ ID NO:220, và
 - b) ba LCDR có trình tự SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:223, và SEQ ID NO:224.
17. Kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu Activin A, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này chứa: (a) các CDR

của HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 162; và (b) các CDR của LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 146.

18. Kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 17, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này chứa CDR của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 162/146.

19. Kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 18, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên này chứa các miền HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 tương ứng có trình tự nêu trong: SEQ ID NO: 164-166-168-148-150-152.

20. Kháng thể đã phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu Activin A, trong đó kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó chứa: (a) HCVR có trình tự axit amin SEQ ID NO: 162; và (b) LCVR có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 146.

		1 μ M mAb + 50 nM hActivin A												
α -Activin A	mAb lượng bắt giữ (nm)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (+)	13 (-)
H4H10446P2	1,66 $\pm$ 0,26	0,32	0,36	0,39	0,33	1,39	1,61	1,68	1,61	1,67	0,83	1,21	0,47	0,26
H4H10468P2	1,65 $\pm$ 0,27	0,33	0,39	0,40	0,41	1,41	1,68	1,73	1,66	1,70	1,08	0,79	0,44	0,28
H4H10442P2	1,73 $\pm$ 0,30	0,35	0,36	0,39	0,27	1,33	1,55	1,59	1,44	1,50	0,99	0,99	0,45	0,26
H4H10423P	1,62 $\pm$ 0,25	0,51	0,58	0,59	0,22	0,28	1,48	1,32	1,49	1,31	0,60	0,79	0,39	0,26
H4H10430P	1,67 $\pm$ 0,23	1,55	1,84	1,76	0,33	0,27	0,62	0,26	0,31	0,31	0,20	-0,03	0,49	0,27
H4H10429P	1,71 $\pm$ 0,29	1,24	1,37	1,40	1,39	0,65	0,32	0,26	0,34	0,29	0,16	-0,01	0,39	0,24
H4H10432P2	1,54 $\pm$ 0,45	1,36	1,58	1,63	1,32	0,28	0,32	0,27	0,29	0,27	0,15	-0,05	0,30	0,14
H4H10436P2	1,66 $\pm$ 0,45	1,22	1,32	1,39	1,41	0,28	0,36	0,23	0,30	0,27	0,16	-0,04	0,28	0,24
H4H10440P2	1,44 $\pm$ 0,35	1,17	1,37	1,40	1,22	0,29	0,41	0,27	0,32	0,28	0,13	-0,05	0,28	0,11
Đối chứng 1	1,33 $\pm$ 0,14	1,37	1,37	1,30	1,14	0,24	0,24	0,13	0,20	0,25	0,15	-0,05	0,27	0,12
Đối chứng 3	0,78 $\pm$ 0,10	0,69	0,35	0,15	0,58	0,06	0,01	0,01	0,00	0,08	-0,02	0,24	0,15	0,33
Đối chứng isotyp	1,48 $\pm$ 0,27	0,22	0,25	0,23	0,18	0,22	0,22	0,14	0,20	0,23	0,26	0,02	0,15	0,02
Đối chứng isotyp	1,18 $\pm$ 0,09	0,12	0,02	0,01	0,02	0,05	0,00	0,00	0,01	0,05	0,03	0,20	0,02	0,24

Fig.1

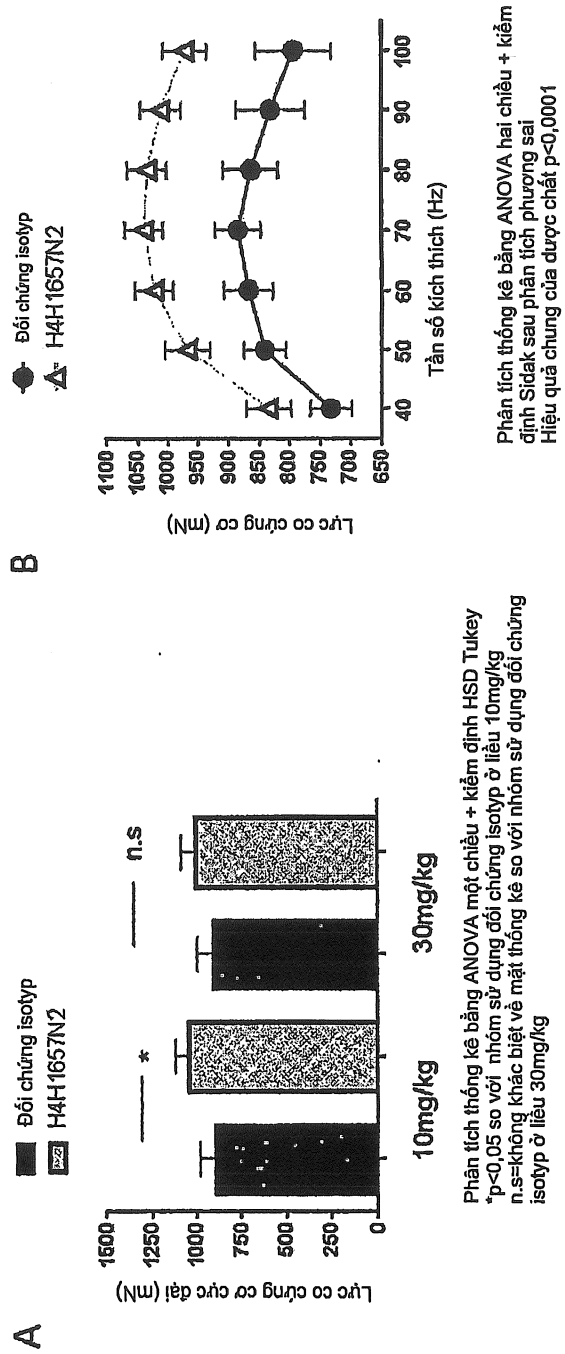


Fig.2

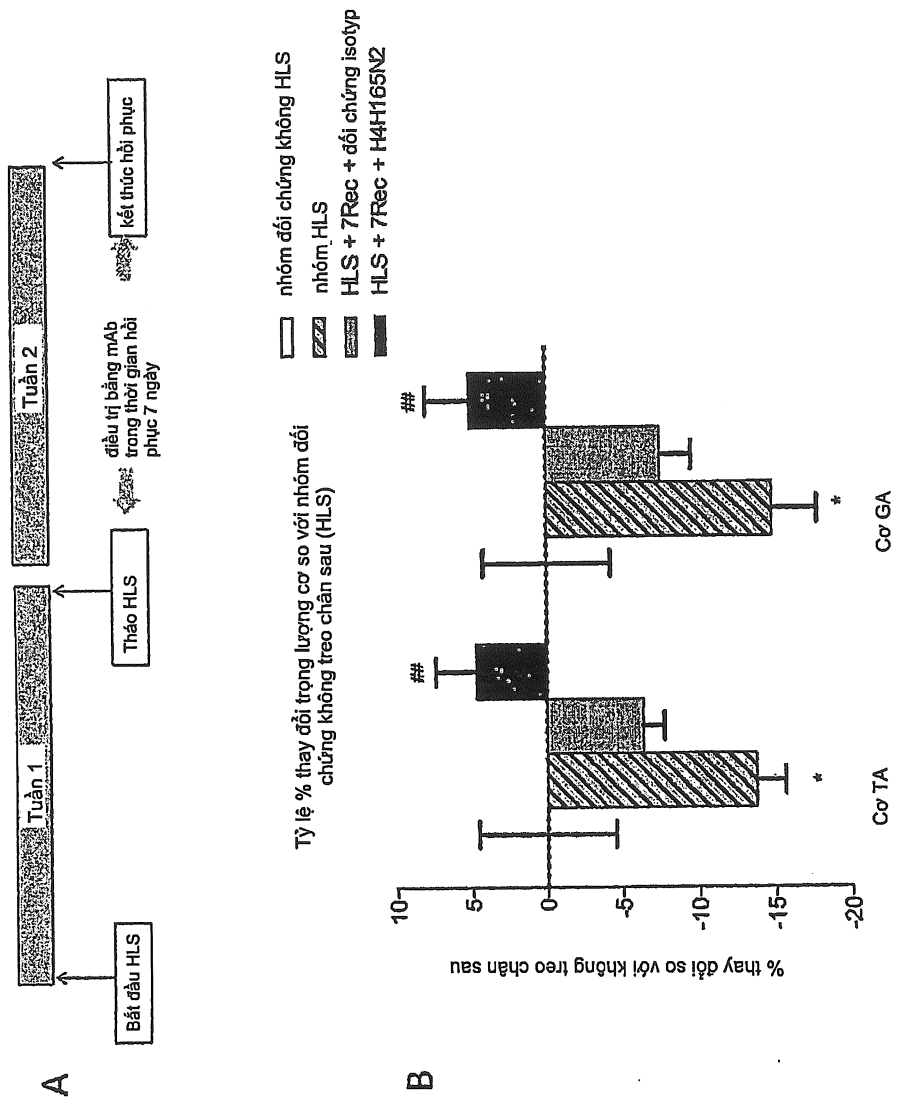


Fig.3

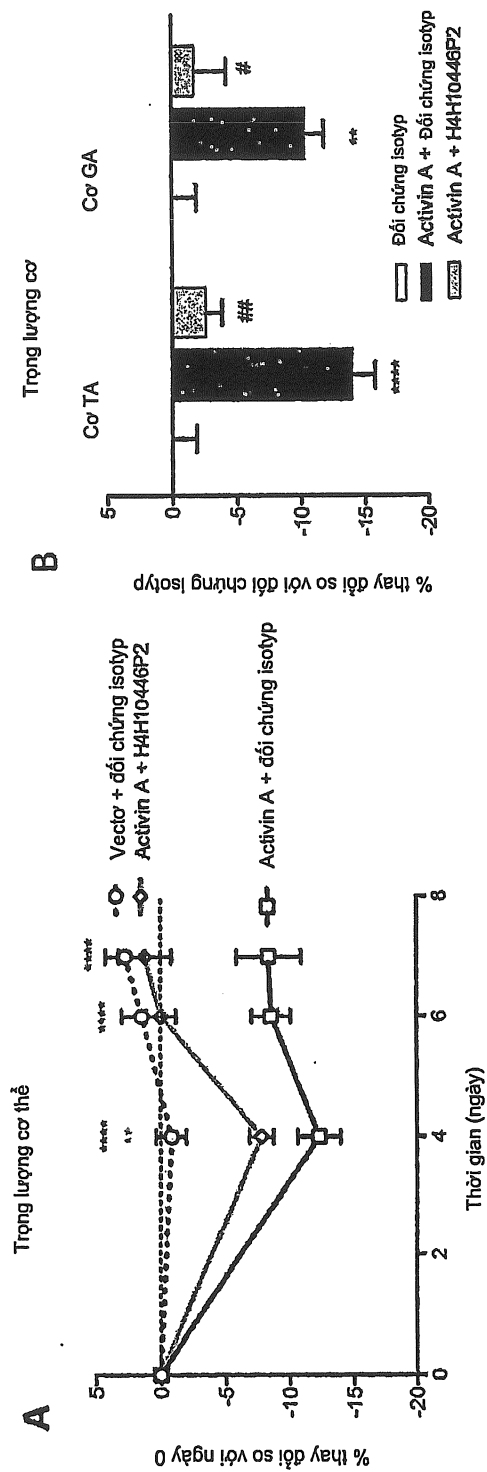


Fig.4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP LIÊN KẾT VỚI ACTIVIN A VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

<130> 8525-WO

<140> Đã xác nhận

<141> được nộp kèm với

<150> 61/859,926

<151> 2013-07-30

<150> 61/864,036

<151> 2013-08-09

<150> 61/911,834

<151> 2013-12-04

<150> 61/913,855

<151> 2013-12-09

<160> 228

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 1

```
caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctgctgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
acctgtgcc a tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctgcttgag ttggatcagg 120
cagtcccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat attacagggc caactggttt 180
aatgattatg cactttctgt gaaaagtcga ataaccatca acccagtcac atccacgaac 240
cactttctcc tgcagctgca ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300
agagaagggg ctctgggata ctactttgac tcctggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
tcctca
```

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 2

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Gln
1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
```

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

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 3
 ggggacagtg tctctagcaa cagtgcctgct

30

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 4
 Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala
 1 5 10

<210> 5
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 5
 acatattaca gggccaactg gtttaat

27

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 6

Thr Tyr Tyr Arg Ala Asn Trp Phe Asn
 1 5

<210> 7

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 7

gcaagagaag gggctctggg atactacttt gactcc

36

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 8

Ala Arg Glu Gly Ala Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser
 1 5 10

<210> 9

<211> 339

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 9

gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagtc aagtgtttta tacagctcca acaataagaa ttatttagct 120
 tggtagcaac agaaaccagg gcagcctcct acactgctca tttactgggc atctaccggg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggcgga agatgtggca atttattact gtcaccaata ttttattact 300
 ccactcactt tcggcggagg gaccaaggtg gagatcaaa 339

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 10

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

Lys

<210> 11
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 11
 caaagtgttt tatacagctc caacaataag aattat

36

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 12
 Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
 1 5 10

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 13
 tgggcatct

9

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 14

Trp Ala Ser
1

<210> 15
<211> 27
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 15
caccaatatt ttattactcc actcact

27

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 16
His Gln Tyr Phe Ile Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 17
<211> 378
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 17
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatacaat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacggtgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagcccgg 300
aattacgata ttttgactgg ttattataac ctcggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
acggtcaccg tctcctca 378

<210> 18
<211> 126
<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	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Asn	Ala	Asp	Ser	Val
		50				55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	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	Arg	Ala	Arg	Asn	Tyr	Asp	Ile	Leu	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Leu	Gly
			100					105					110		
Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115					120					125			

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 19
 ggattcacct 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
 atatggtatg atggaagtaa taaa

24

<210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 22

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

<210> 23
<211> 57
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 23
gcgagagccc ggaattacga tattttgact gggtattata acctcgggtat ggacgtc 57

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 24
Ala Arg Ala Arg Asn Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Tyr Asn Leu Gly
1 5 10 15
Met Asp Val

<210> 25
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 25
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca acagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
agggttcagcg gcagtggtatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt acccgtagac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 26
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 Gly Ile Arg Asn Asp

			20					25				30					
Leu	Gly	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	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	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
65					70					75					80		
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	His	Asn	Ser	Tyr	Pro	Tyr		
			85						90					95			
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys							
			100					105									

<210> 27
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 27
 cagggcatta gaaatgat

18

<210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 28
 Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 29
 gctgcatcc

9

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 30
 Ala Ala Ser

1

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 31
 ctacagcata atagttaccc gtacact

27

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 32
 Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 33
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 33
 gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaaac ttggtacagt ctggcaggtc cctgagactc 60
 tcctgtacag cctctggatt cgcctttgat gattttgccca tgcactgggt ccggcaagtt 120
 ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atagtgatac catcggctat 180
 gcggactctg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca acgcccagaa ctccctgttt 240
 ctgcaaattgg acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgt aaaagatatg 300
 gttcgggggac ttataggcta ctactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360
 gtcaccgtct cctca 375

<210> 34
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 34
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asn Leu Val Gln Ser Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ala Phe Asp Asp Phe
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

		35					40					45					
Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	Asn	Ser	Asp	Thr	Ile	Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val		
	50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Gln	Asn	Ser	Leu	Phe		
65					70				75					80			
Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Val	Lys	Asp	Met	Val	Arg	Gly	Leu	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met		
			100					105					110				
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120					125					

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 35
 ggattcgcct ttgatgattt tgcc

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 36
 Gly Phe Ala Phe Asp Asp Phe Ala
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 37
 attagttgga atagtgatac catc

24

<210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 38
 Ile Ser Trp Asn Ser Asp Thr Ile

1

5

<210> 39
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 39
 gtaaaagata tgggttcgggg acttataggc tactactact acggtatgga cgtc 54

<210> 40
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 40
 Val Lys Asp Met Val Arg Gly Leu Ile Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
 1 5 10 15
 Asp Val

<210> 41
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 41
 gaaatagtgt tgacgcagtc tccagccatc ctgtctttgt ctccagggga aagagccatc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtatattac acctacttat cctggtacca acagacacct 120
 ggccgggctc ccaggctcct catctatgag acatccagca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcattg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagtag cctagagcct 240
 gaagattttg cattttatta ctgtcagcac cgtagcgact ggcctccac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 42
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 42
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Ile Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Thr Tyr
 20 25 30

```

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

```

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 43
 cagagtattt acacctac

18

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 44
 Gln Ser Ile Tyr Thr Tyr
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 45
 gagacatcc

9

<210> 46
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 46
 Glu Thr Ser
 1

<210> 47
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 47
 cagcaccgta gcgactggcc tcccact

27

<210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 48
 Gln His Arg Ser Asp Trp Pro Pro Thr
 1 5

<210> 49
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 49
 caggtgcagc tgggtggagtc gggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgtag cgtctggatt caccgtcagt agttatggca ttcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg gactggagtg ggtgtcagtt atatggtatg atggaagaaa taaagactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacggtgtat 240
 ttggaaatga aaggcctgag agccgaggac acggctcttt attattgtgc gagagacaaa 300
 actgggggatt ttgactcctg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc a 351

<210> 50
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 50
 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 Val Ala Ser Gly Phe Thr Val 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
 Ser Val Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val

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

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 51
 ggattcaccg tcagtagtta tggc

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

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

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 53
 atatggtatg atggaagaaa taaa

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 54
 Ile Trp Tyr Asp Gly Arg Asn Lys
 1 5

<210> 55
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 55
 gcgagagaca aaactgggga ttttgactcc 30

<210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 56
 Ala Arg Asp Lys Thr Gly Asp Phe Asp Ser
 1 5 10

<210> 57
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 57
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggtga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gaacattaac agctttttaa gttggtatca gcagaaacca 120
 ggaaaagccc ctaagttcct gatctatgat gcttccagta tacaaagtgg ggccccatcg 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagtt ccccgttcac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 58
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 58
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Ser Phe
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Ser Ile Gln Ser Gly Ala 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	Ser	Pro	Phe
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 59
 cagaacatta acagcttt

18

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 60
 Gln Asn Ile Asn Ser Phe
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 61
 gatgcttcc

9

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 62
 Asp Ala Ser
 1

<210> 63
 <211> 27

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 63
 caacagagtt acagttcccc gttcact

27

<210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 64
 Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Phe Thr
 1 5

<210> 65
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 65
 gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
 tcctgtaaag cctctggatt cgcctttgat gatttcgcca tgcactgggt ccggcaagct 120
 ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attgtttgga acagtgggtga cataggctat 180
 gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaactga atagtctgag aactgaggac acggccttgt atttctgtgt aaaagatatg 300
 gttcggggac ttatgggctt caactattac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360
 gtcaccgtct cctca 375

<210> 66
 <211> 125
 <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 Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ala Phe Asp Asp Phe
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Val Trp Asn Ser Gly Asp Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Leu	Arg	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Phe	Cys
				85					90					95	
Val	Lys	Asp	Met	Val	Arg	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Met
			100					105					110		
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
		115					120					125			

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 67
 ggattcgcct ttgatgattt cgcc

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 68
 Gly Phe Ala Phe Asp Asp Phe Ala
 1 5

<210> 69
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 69
 attgttttga acagtgggtga cata

24

<210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 70
 Ile Val Trp Asn Ser Gly Asp Ile
 1 5

<210> 71
 <211> 54

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 71

gtaaaagata tggttcgggg acttatgggc ttcaactatt acggtatgga cgtc 54

<210> 72

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 72

Val	Lys	Asp	Met	Val	Arg	Gly	Leu	Met	Gly	Phe	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Met
1				5					10					15	
Asp	Val														

<210> 73

<211> 321

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 73

gaaattgtgt	tgacgcagtc	tccagccacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	60
ctctcctgca	gggccagtca	aactatttagt	acttatattag	tctggtaccg	acagagacct	120
ggccaggctc	ccagtctcct	catttatgat	gcatccaaca	gggccactga	catcccagcc	180
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagac	ttcactctca	ccatcagcag	ccttgagcct	240
gaagattttg	cagtttatta	ctgtcagcag	cgtagcaact	ggccgatcac	cttcggccaa	300
gggacacgac	tggagattaa	a				321

<210> 74

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 74

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

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

<210> 75
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 75
 caaactatta gtacttat

18

<210> 76
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 76
 Gln Thr Ile Ser Thr Tyr
 1 5

<210> 77
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 77
 gatgcatcc

9

<210> 78
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 78
 Asp Ala Ser
 1

<210> 79
 <211> 27
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 79

cagcagcgta gcaactggcc gatcacc

27

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 80

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr

1

5

<210> 81

<211> 369

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 81

```

gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgacactc 60
tcctgtgcag tctctggatt cacctttgat gatcatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagtgtga atagtgtgaag tataggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcacgac tccagagaca acgccaagac ctccctctat 240
ctgcaaataga acagtctgag agttgacgac acggccttat attactgtgt gcaagattta 300
aacgatattt tgactggtta tccccctctt gacttttggg gccagggaac cctggtcacc 360
gtctctca

```

<210> 82

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 82

```

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

```

				85					90					95			
Val	Gln	Asp	Leu	Asn	Asp	Ile	Leu	Thr	Gly	Tyr	Pro	Leu	Phe	Asp	Phe		
			100						105					110			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120										

<210> 83
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 83
 ggattcacct ttgatgatca tgcc

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 84
 Gly Phe Thr Phe Asp Asp His Ala
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 85
 attagttgga atagtgtgaag tata

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 86
 Ile Ser Trp Asn Ser Val Ser Ile
 1 5

<210> 87
 <211> 48
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 87

gtgcaagatt taaacgatat ttgactgggt tatccccctct ttgacttt

48

<210> 88

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 88

Val	Gln	Asp	Leu	Asn	Asp	Ile	Leu	Thr	Gly	Tyr	Pro	Leu	Phe	Asp	Phe
1				5					10					15	

<210> 89

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 89

gacatccaga	tgacccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	gggcaagtca	gagcattagc	agctatttaa	attggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaagctcct	gatctatgct	gcatccagtt	tgcaaagtgg	gggtcccgtca	180
aggttcagtg	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	tctgcaacct	240
gaagattttg	caacttacta	ctgtcaacag	agttacagta	cccctccgat	caccttcggc	300
caagggacac	gactggagat	taaa				324

<210> 90

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 90

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> 91
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 91
 cagagcatta gcagctat

18

<210> 92
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 92
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 93
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 93
 gctgcatcc

9

<210> 94
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 94
 Ala Ala Ser
 1

<210> 95
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 95

caacagagtt acagtacccc tccgatcacc

30

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 96

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 97

<211> 369

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 97

gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagg ctggcaggtc cctaagactc 60
tcctgtgaag cctctggatt cacctttgat gattatggca tgcactgggt ccggcaaggt 120
ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atagtggtaa catagactat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagac ctccctgtat 240
ctgcaaataa acagtctgaa aactgacgac acggccttgt atttctgtgc aaaagatgct 300
gtgggggttta actggaacta ctttctcttt gactactggg gccagggaac cctgggtcacc 360
gtctcctca 369

<210> 98

<211> 123

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 98

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

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

<210> 99
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 99
ggattcacct ttgatgatta tggc

24

<210> 100
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 100
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly
1 5

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 101
attagttgga atagtggtaa cata

24

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

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 102
Ile Ser Trp Asn Ser Gly Asn Ile
1 5

<210> 103
<211> 48
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 103

gcaaaagatg ctgtgggggtt taactggaac tacttttctct ttgactac

48

<210> 104

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 104

Ala Lys Asp Ala Val Gly Phe Asn Trp Asn Tyr Phe Leu Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 105

<211> 351

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 105

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
acctgtgtag cgtctggatt caccgtcagt agttatggaa tgcactgggt ccgccaggcc 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atgttttatg atgaaagtaa aaaatattat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agtcgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatgaa 300
cagctcgact ttgaatactg gggccaggga accctgggtca ccgtctcctc a 351

<210> 106

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 106

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Thr Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Met Phe Tyr Asp Glu Ser Lys 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 Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Glu Gln Leu Asp Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 107
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 107
 ggattcaccg tcagtagtta tgga

24

<210> 108
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 108
 Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 109
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 109
 atgttttatg atgaaagtaa aaaa

24

<210> 110
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 110
 Met Phe Tyr Asp Glu Ser Lys Lys
 1 5

<210> 111
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 111
gcgagagatg aacagctcga ctttgaatac

30

<210> 112
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 112
Ala Arg Asp Glu Gln Leu Asp Phe Glu Tyr
1 5 10

<210> 113
<211> 369
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 113
gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcc tgcactgggt ccggcaagct 120
ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagtgtga atagtggtag cataggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagatata 300
atgggggaact gggactactt ctacgggatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
gtctcctca 369

<210> 114
<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

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

115

120

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 115
 ggattcacct ttgatgatta tgcc

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 116
 Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 117
 attagttgga atagtggtag cata

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 118
 Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile
 1 5

<210> 119
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 119
gcaaaaagata taatgggggaa ctgggactac ttctacggta tggacgtc 48

<210> 120
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 120
Ala Lys Asp Ile Met Gly Asn Trp Asp Tyr Phe Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 121
<211> 369
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 121
gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtacagc ctgggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gataatgcca tgcactgggt ccggcaacct 120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atagtggag cataggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtgc aaaagatata 300
aacgatattt tgactgggta tcctcttttt gattactggg gccaggggaa cctgggtcacc 360
gtctcctca 369

<210> 122
<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 122
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Asn
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Ile Asn Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Pro Leu Phe Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 123
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 123
 ggattcacct ttgatgataa tgcc

24

<210> 124
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 124
 Gly Phe Thr Phe Asp Asp Asn Ala
 1 5

<210> 125
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 125
 attagttgga atagtggaag cata

24

<210> 126
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 126
 Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile
 1 5

<210> 127
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 127
gcaaaaagata taaacgatat ttgactgggt taccctcttt ttgattac 48

<210> 128
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 128
Ala Lys Asp Ile Asn Asp Ile Leu Thr Gly Tyr Pro Leu Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 129
<211> 378
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 129
gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctacatt cacctttgat gattttgccca tgcaactgggt ccgtcaagct 120
ccaggggaagg gtctggagtg ggtctctctt attactgggg atgggtggtag cacatactat 180
gcagaccctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acagcaaaaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag aactgaggac accgccttgt attactgtgt aaaagattgg 300
tggatagcag ctggtccgga ctactactac tacgggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
acggtcaccg tctctca 378

<210> 130
<211> 126
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 130
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Thr Phe Thr Phe Asp Asp Phe
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Leu Ile Thr Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Pro Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Lys Asp Trp Trp Ile Ala Ala Arg Pro Asp Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

125

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 131
 acattcacct ttgatgattt tgcc

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 132
 Thr Phe Thr Phe Asp Asp Phe Ala
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 133
 attactgggg atggtggtag caca

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 134
 Ile Thr Gly Asp Gly Gly Ser Thr
 1 5

<210> 135
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 135
gtaaaagatt ggtggatagc agctcgccg gactactact actacgggat ggacgtc 57

<210> 136
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 136
Val Lys Asp Trp Trp Ile Ala Ala Arg Pro Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
1 5 10 15
Met Asp Val

<210> 137
<211> 378
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 137
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cctcggagac cctgtccatc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccctcagt agtcacttct ggacctggat ccggcagccc 120
ccaggaaagg gactggaatg gattggatat ctccattata gtgggggcac cagctacaac 180
ccctccctca agagtcgagt catcatatca gtggacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aaactgaact ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag agctagatcg 300
gggattactt ttgggggact tatcgtccct gggtcttttg atatctgggg ccaagggaca 360
atggtcaccg tctcttca 378

<210> 138
<211> 126
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 138
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser His
20 25 30
Phe Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Leu His Tyr Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Ile Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ala Arg Ser Gly Ile Thr Phe Gly Gly Leu Ile Val Pro Gly Ser

			100					105					110
Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115					120					125	

<210> 139
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 139
 ggtggctcct tcagtagtca cttc

24

<210> 140
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 140
 Gly Gly Ser Phe Ser Ser His Phe
 1 5

<210> 141
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 141
 ctccattata gtgggggcac c

21

<210> 142
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 142
 Leu His Tyr Ser Gly Gly Thr
 1 5

<210> 143
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 143

gcgagagcta gatcggggat tacttttggg ggacttatcg tccctgggtc ttttgatc 60

<210> 144

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 144

Ala	Arg	Ala	Arg	Ser	Gly	Ile	Thr	Phe	Gly	Gly	Leu	Ile	Val	Pro	Gly
1				5					10					15	
Ser	Phe	Asp	Ile												
			20												

<210> 145

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 145

gaaatagttt	tgacacagag	tcccggcaca	ctgtcactct	ctcccgggga	aagagccacc	60
ttgtcatgta	gagcaagtca	gtcagtctct	agctcttata	tcgcctggta	ccagcagaag	120
ccgggacagg	cccctagact	gctgatctac	ggggcaagtt	ccagggccac	cggaatcccc	180
gaccggttca	gtggaagcgg	aagcggaacc	gattttactt	tgacgatttc	tagactggag	240
ccagaggatt	tcgccgttta	ctattgtcaa	cagtacggaa	gcagcccgtg	gacgtttggc	300
cagggcacga	aggtagaaat	caag				324

<210> 146

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 146

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> 147
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 147
 cagtcagtcct ctagctctta t

<210> 148
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 148
 Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 149
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 149
 ggggcaagt

<210> 150
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 150
 Gly Ala Ser
 1

<210> 151
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

21

9

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 151

caacagtacg gaagcagccc gtggacg

27

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 152

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1

5

<210> 153

<211> 378

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 153

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
atattgttctg tctctggtgg ctccttcagt agtcacttct ggagttggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtg gattgggtat gtcctttaca gtggggggcac caattacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaatca gttcttcctg 240
aaactgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgattatt actgtgagag agctatatcg 300
gggattacgt ttgggggaat tatcgtccct gggtcttttg atatctgggg ccaagggaca 360
atggtcaccg tctcttca                                     378

```

<210> 154

<211> 126

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 154

```

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

```

			100					105					110
Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser
		115					120					125	

<210> 155
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 155
 ggtggctcct tcagtagtca cttc

24

<210> 156
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 156
 Gly Gly Ser Phe Ser Ser His Phe
 1 5

<210> 157
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 157
 gtcctttaca gtggggggcac c

21

<210> 158
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 158
 Val Leu Tyr Ser Gly Gly Thr
 1 5

<210> 159
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 159

gcgagagcta tatcggggat tacgtttggg ggaattatcg tccctgggtc ttttgatac 60

<210> 160

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 160

Ala	Arg	Ala	Ile	Ser	Gly	Ile	Thr	Phe	Gly	Gly	Ile	Ile	Val	Pro	Gly
1				5					10					15	
Ser	Phe	Asp	Ile												
			20												

<210> 161

<211> 378

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 161

caggtgcagc	tgccaggagtc	gggcccagga	ctggtgaagc	cctcggagac	cctgtccctc	60
acctgcactg	tctctgggtg	ctccttcagt	agtcacttct	ggagctggat	ccggcagccc	120
ccagggaagg	gactggagtg	gattggatat	atcttataca	ctggggggcac	cagcttcaac	180
ccctccctca	agagtcgagt	ctccatgtca	gtggggcacgt	ccaagaacca	gttctccctg	240
aaattgagct	ctgtgaccgc	tgccggacacg	gccgtatat	actgtgagag	agctagatcg	300
gggataacgt	ttacgggtat	tatcgtccct	ggctcttttg	atatctgggg	ccaagggaca	360
atggtcaccg	tctcttca					378

<210> 162

<211> 126

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 162

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

Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Ala	Arg	Ser	Gly	Ile	Thr	Phe	Thr	Gly	Ile	Ile	Val	Pro	Gly	Ser
			100					105					110		
Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115					120					125			

<210> 163
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 163
 ggtggctcct tcagtagtca cttc

24

<210> 164
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 164
 Gly Gly Ser Phe Ser Ser His Phe
 1 5

<210> 165
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 165
 atcttataca ctgggggcac c

21

<210> 166
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 166
 Ile Leu Tyr Thr Gly Gly Thr
 1 5

<210> 167
 <211> 60

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 167

gcgagagcta gatcggggat aacgtttacg ggtattatcg tccctggctc ttttgatata 60

<210> 168

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 168

Ala Arg Ala Arg Ser Gly Ile Thr Phe Thr Gly Ile Ile Val Pro Gly
1 5 10 15Ser Phe Asp Ile
20

<210> 169

<211> 378

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 169

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acttgttctg tctctggtgg ctccttcagt agtcacttct ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtg gattggatat atccattaca gtggggggcac caattacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctt 240
aaactgactt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgattatt actgtgagag agctatatcg 300
gggattacgt ttgggggaat gatcgctccct gggtcttttg atgtctgggg cgaagggaca 360
atggtcaccg tctcttca 378

<210> 170

<211> 126

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 170

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

50					55					60					
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
65					70					75					80
Lys	Leu	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Ala	Ile	Ser	Gly	Ile	Thr	Phe	Gly	Gly	Met	Ile	Val	Pro	Gly	Ser
			100					105					110		
Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Glu	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115					120					125			

<210> 171
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 171
 ggtggctcct tcagtagtca cttc

24

<210> 172
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 172
 Gly Gly Ser Phe Ser Ser His Phe
 1 5

<210> 173
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 173
 atccattaca gtgggggcac c

21

<210> 174
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 174
 Ile His Tyr Ser Gly Gly Thr
 1 5

<210> 175
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 175
 gcgagagcta tatcggggat tacgtttggg ggaatgatcg tccctgggtc ttttgatgtc 60

<210> 176
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 176
 Ala Arg Ala Ile Ser Gly Ile Thr Phe Gly Gly Met Ile Val Pro Gly
 1 5 10 15
 Ser Phe Asp Val
 20

<210> 177
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 177
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg caccttcagt agtcacttct ggagctggat ccggcagccc 120
 ccaggaaagg gactggagtg gattggatat atcttttaca ctgggggcac caaccacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca atagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aaactgacct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgagag agctagatcg 300
 gggattacgt ttgggggagc tatcgccctt ggttcttttg atatctgggg ccaagggaca 360
 atggtcaccg tctcttca 378

<210> 178
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 178
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser His
 20 25 30

Phe	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Tyr	Ile	Phe	Tyr	Thr	Gly	Gly	Thr	Asn	His	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys
	50					55					60				
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
65					70					75					80
Lys	Leu	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
			85					90						95	
Arg	Ala	Arg	Ser	Gly	Ile	Thr	Phe	Gly	Gly	Val	Ile	Val	Pro	Gly	Ser
			100					105					110		
Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115					120					125			

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 179
 ggtggcacct tcagtagtca cttc

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 180
 Gly Gly Thr Phe Ser Ser His Phe
 1 5

<210> 181
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 181
 atcttttaca ctgggggcac c

21

<210> 182
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 182

Ile Phe Tyr Thr Gly Gly Thr
1 5

<210> 183
<211> 60
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 183
gcgagagcta gatcggggat tacgtttggg ggagttatcg tccctgggtc ttttgatatac 60

<210> 184
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 184
Ala Arg Ala Arg Ser Gly Ile Thr Phe Gly Gly Val Ile Val Pro Gly
1 5 10 15
Ser Phe Asp Ile
20

<210> 185
<211> 378
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 185
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaaac cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctctttcagc agtcacttct ggaactggat ccggcagtc 120
ccaggaggag gactggaatg gattggatat atctattaca gtggggggcac caactataac 180
ccctccttca agagtcgagt caccatgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aaactgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtttt actgtgagag agctagatcg 300
gggataacgt ttggggggagt tctcgtccct gggtcttttg atatttgggg ccaagggaca 360
atggtcaccg tctcttca 378

<210> 186
<211> 126
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 186
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1		5		10		15									
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Ser	His
			20					25					30		
Phe	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Phe	Lys
	50					55					60				
Ser	Arg	Val	Thr	Met	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
65					70					75					80
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Phe	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Ala	Arg	Ser	Gly	Ile	Thr	Phe	Gly	Gly	Val	Leu	Val	Pro	Gly	Ser
			100					105					110		
Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115					120					125			

<210> 187
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 187
 ggtgggtcct tcagcagtca cttc

24

<210> 188
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 188
 Gly Gly Ser Phe Ser Ser His Phe
 1 5

<210> 189
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 189
 atctattaca gtggggggcac c

21

<210> 190
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 190

Ile Tyr Tyr Ser Gly Gly Thr
1 5

<210> 191

<211> 60

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 191

gcgagagcta gatcggggat aacgtttggg ggagttctcg tccctgggtc ttttgatatt 60

<210> 192

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 192

Ala	Arg	Ala	Arg	Ser	Gly	Ile	Thr	Phe	Gly	Gly	Val	Leu	Val	Pro	Gly
1				5				10						15	
Ser	Phe	Asp	Ile												
			20												

<210> 193

<211> 378

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 193

caggtgcagc	tcgaggagtc	gggcccagga	ctggtgaagc	cttcggagac	cctgtccctc	60
acctgcactg	tctctggtgg	ctccttcagt	agtcacttct	ggagctggat	ccggcagccc	120
ccaggaaagg	gactggagtg	gattgggtat	atctattaca	gtgggggcac	ccactacaac	180
ccctccctcg	agagtcgagt	caccatatca	gtagacacgt	ccaagaacca	gttctccctg	240
aaactgaact	ctgtgaccgc	tgcggaacac	gccgtttatt	actgtgagag	agctagatcg	300
gggattactt	ttgggggact	tatcgtcctt	gggtcttttg	atatctgggg	ccaagggaca	360
atggtcaccg	tctcttca					378

<210> 194

<211> 126

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 194

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser His
 20 25 30
 Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Gly Thr His Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Arg Ser Gly Ile Thr Phe Gly Gly Leu Ile Val Pro Gly Ser
 100 105 110
 Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 195

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 195

ggtggctcct tcagtagtca cttc

24

<210> 196

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 196

Gly Gly Ser Phe Ser Ser His Phe
 1 5

<210> 197

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 197

atctattaca gtgggggcac c

21

<210> 198

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 198

Ile Tyr Tyr Ser Gly Gly Thr
1 5

<210> 199

<211> 60

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 199

gcgagagcta gatcggggat tacttttggg ggacttatcg tccctgggtc ttttgatatac 60

<210> 200

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 200

Ala	Arg	Ala	Arg	Ser	Gly	Ile	Thr	Phe	Gly	Gly	Leu	Ile	Val	Pro	Gly
1				5				10					15		
Ser	Phe	Asp	Ile												
			20												

<210> 201

<211> 375

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 201

```

cgggtgcaac tgggtgcagtc tgggtctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaggg cttctggata catcttcacc agttatgata tcaattgggt gcgacaggcc 120
actggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atgaacccta ataatggtaa cacagcctat 180
acacagaagt tccagggcag agtcacatg accaggaaca cctccataag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaaaggga 300
ttactatggg tcgggaaggt attagggtag ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360
gtcaccgtct cctca                                     375

```

<210> 202

<211> 125

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 202

Arg	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Asp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Thr	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Trp	Met	Asn	Pro	Asn	Asn	Gly	Asn	Thr	Ala	Tyr	Thr	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asn	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Lys	Gly	Leu	Leu	Trp	Phe	Gly	Lys	Leu	Leu	Gly	Tyr	Gly	Met
			100					105					110		
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
		115					120					125			

<210> 203

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 203

ggatacatct tcaccagtta tgat

24

<210> 204

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 204

Gly	Tyr	Ile	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asp
1					5		

<210> 205

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 205

atgaacccta ataatggtaa caca

24

<210> 206
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 206
 Met Asn Pro Asn Asn Gly Asn Thr
 1 5

<210> 207
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 207
 gcgagaaagg gattactatg gttcgggaag ttattaggggt acggtatgga cgtc 54

<210> 208
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 208
 Ala Arg Lys Gly Leu Leu Trp Phe Gly Lys Leu Leu Gly Tyr Gly Met
 1 5 10 15
 Asp Val

<210> 209
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 209
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccttg gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat caaa 324

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

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 210

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> 211

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 211

cagagtgtta gcagcagcta c

21

<210> 212

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 212

Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr
1				5		

<210> 213

<211> 9

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 213

ggtgcatcc

9

<210> 214

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 214
 Gly Ala Ser
 1

<210> 215
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 215
 cagcagtatg gtagctcacc ttggacg

27

<210> 216
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 216
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 217
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 217
 Glu Val Gln Val Leu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val 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 Gly Ala Trp Lys Met Ser Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln

	100		105		110
Gly	Thr	Thr	Val	Ile	Val
	115			Ser	Ser
				120	

<210> 218
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 218
 Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr Ala
 1 5

<210> 219
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 219
 Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Ala
 1 5

<210> 220
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 220
 Ala Lys Asp Gly Ala Trp Lys Met Ser Gly Leu Asp Val
 1 5 10

<210> 221
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 221
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ile Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

<210> 222
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 222
 Gln Asp Ile Ser Asp Tyr
 1 5

<210> 223
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 223
 Thr Thr Ser
 1

<210> 224
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 224
 Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Pro Leu Thr
 1 5

<210> 225
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 225
 Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys
 1 5 10 15
 Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile
 20 25 30

```

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

```

<210> 226
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 226
Met Pro Leu Leu Trp Leu Arg Gly Phe Leu Leu Ala Ser Cys Trp Ile
 1              5              10              15
Ile Val Arg Ser Ser Pro Thr Pro Gly Ser Glu Gly His Ser Ala Ala
    20              25              30
Pro Asp Cys Pro Ser Cys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Lys Asp Val Pro
    35              40              45
Asn Ser Gln Pro Glu Met Val Glu Ala Val Lys Lys His Ile Leu Asn
    50              55              60
Met Leu His Leu Lys Lys Arg Pro Asp Val Thr Gln Pro Val Pro Lys
65              70              75              80
Ala Ala Leu Leu Asn Ala Ile Arg Lys Leu His Val Gly Lys Val Gly
    85              90              95
Glu Asn Gly Tyr Val Glu Ile Glu Asp Asp Ile Gly Arg Arg Ala Glu
    100              105              110
Met Asn Glu Leu Met Glu Gln Thr Ser Glu Ile Ile Thr Phe Ala Glu
    115              120              125
Ser Gly Thr Ala Arg Lys Thr Leu His Phe Glu Ile Ser Lys Glu Gly
    130              135              140
Ser Asp Leu Ser Val Val Glu Arg Ala Glu Val Trp Leu Phe Leu Lys
145              150              155              160
Val Pro Lys Ala Asn Arg Thr Arg Thr Lys Val Thr Ile Arg Leu Phe
    165              170              175
Gln Gln Gln Lys His Pro Gln Gly Ser Leu Asp Thr Gly Glu Glu Ala
    180              185              190
Glu Glu Val Gly Leu Lys Gly Glu Arg Ser Glu Leu Leu Ser Glu
    195              200              205
Lys Val Val Asp Ala Arg Lys Ser Thr Trp His Val Phe Pro Val Ser
    210              215              220
Ser Ser Ile Gln Arg Leu Leu Asp Gln Gly Lys Ser Ser Leu Asp Val
225              230              235              240
Arg Ile Ala Cys Glu Gln Cys Gln Glu Ser Gly Ala Ser Leu Val Leu
    245              250              255
Leu Gly Lys Lys Lys Lys Glu Glu Gly Glu Gly Lys Lys Lys
    260              265              270
Gly Gly Gly Glu Gly Gly Ala Gly Ala Asp Glu Glu Lys Glu Gln Ser
    275              280              285
His Arg Pro Phe Leu Met Leu Gln Ala Arg Gln Ser Glu Asp His Pro
    290              295              300
His Arg Arg Arg Arg Arg Gly Leu Glu Cys Asp Gly Lys Val Asn Ile
305              310              315              320
Cys Cys Lys Lys Gln Phe Phe Val Ser Phe Lys Asp Ile Gly Trp Asn

```

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

<210> 227

<211> 340

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 227

Glu	Ala	Glu	Thr	Arg	Glu	Cys	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Ala	Asn	Trp	Glu	Leu		
1				5				10					15				
Glu	Arg	Thr	Asn	Gln	Ser	Gly	Leu	Glu	Arg	Cys	Glu	Gly	Glu	Gln	Asp		
			20					25					30				
Lys	Arg	Leu	His	Cys	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Asn	Ser	Ser	Gly	Thr	Ile		
	35					40					45						
Glu	Leu	Val	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Leu	Asp	Asp	Phe	Asn	Cys	Tyr	Asp		
50					55					60							
Arg	Gln	Glu	Cys	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Asn	Pro	Gln	Val	Tyr	Phe	Cys		
65				70					75						80		
Cys	Cys	Glu	Gly	Asn	Phe	Cys	Asn	Glu	Arg	Phe	Thr	His	Leu	Pro	Glu		
				85				90						95			
Ala	Gly	Gly	Pro	Glu	Val	Thr	Tyr	Glu	Pro	Pro	Pro	Thr	Ala	Pro	Ser		
			100					105					110				
Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu		
	115					120						125					
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu		
	130					135					140						
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser		
145					150				155						160		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu		
				165				170						175			
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr		
		180						185					190				
Tyr	Arg	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn			
	195					200					205						
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro		
	210					215					220						
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln		
225					230					235					240		
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val		
				245				250						255			
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val		
			260					265					270				

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 275 280 285
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 290 295 300
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 305 310 315 320
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 325 330 335
 Ser Pro Gly Lys
 340

<210> 228
 <211> 407
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 228
 Met Asp Gly Leu Pro Gly Arg Ala Leu Gly Ala Ala Cys Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Gly Trp Leu Gly Pro Glu Ala Trp Gly Ser Pro Thr Pro
 20 25 30
 Pro Pro Thr Pro Ala Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gly Ser Pro
 35 40 45
 Gly Gly Ser Gln Asp Thr Cys Thr Ser Cys Gly Gly Phe Arg Arg Pro
 50 55 60
 Glu Glu Leu Gly Arg Val Asp Gly Asp Phe Leu Glu Ala Val Lys Arg
 65 70 75 80
 His Ile Leu Ser Arg Leu Gln Met Arg Gly Arg Pro Asn Ile Thr His
 85 90 95
 Ala Val Pro Lys Ala Ala Met Val Thr Ala Leu Arg Lys Leu His Ala
 100 105 110
 Gly Lys Val Arg Glu Asp Gly Arg Val Glu Ile Pro His Leu Asp Gly
 115 120 125
 His Ala Ser Pro Gly Ala Asp Gly Gln Glu Arg Val Ser Glu Ile Ile
 130 135 140
 Ser Phe Ala Glu Thr Asp Gly Leu Ala Ser Ser Arg Val Arg Leu Tyr
 145 150 155 160
 Phe Phe Ile Ser Asn Glu Gly Asn Gln Asn Leu Phe Val Val Gln Ala
 165 170 175
 Ser Leu Trp Leu Tyr Leu Lys Leu Leu Pro Tyr Val Leu Glu Lys Gly
 180 185 190
 Ser Arg Arg Lys Val Arg Val Lys Val Tyr Phe Gln Glu Gln Gly His
 195 200 205
 Gly Asp Arg Trp Asn Met Val Glu Lys Arg Val Asp Leu Lys Arg Ser
 210 215 220
 Gly Trp His Thr Phe Pro Leu Thr Glu Ala Ile Gln Ala Leu Phe Glu
 225 230 235 240
 Arg Gly Glu Arg Arg Leu Asn Leu Asp Val Gln Cys Asp Ser Cys Gln
 245 250 255
 Glu Leu Ala Val Val Pro Val Phe Val Asp Pro Gly Glu Glu Ser His
 260 265 270
 Arg Pro Phe Val Val Val Gln Ala Arg Leu Gly Asp Ser Arg His Arg
 275 280 285
 Ile Arg Lys Arg Gly Leu Glu Cys Asp Gly Arg Thr Asn Leu Cys Cys
 290 295 300
 Arg Gln Gln Phe Phe Ile Asp Phe Arg Leu Ile Gly Trp Asn Asp Trp
 305 310 315 320

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