



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0036820

(51)⁸ C07K 16/00; A61K 39/395; C12P 21/08; (13) B
C07K 16/28; A61K 39/00

-
- (21) 1-2018-01648 (22) 11/10/2016
(86) PCT/US2016/056465 11/10/2016 (87) WO/2017/066204 20/04/2017
(30) 62/240,021 12/10/2015 US; 62/359,757 08/07/2016 US; 62/375,495 16/08/2016 US;
62/393,143 12/09/2016 US
(45) 25/09/2023 426 (43) 26/11/2018 368A
(73) REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, New York 10591-6707, United States of
America
(72) Jesper GROMADA (DK); Panayiotis STEVIS (US); Judith ALTAREJOS (CA).
(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)
-

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

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết với thụ thể leptin (LEPR), và dược phẩm chứa kháng thể này. Theo các phương án nhất định, sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết với LEPR và hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu LEPR. Theo các phương án khác, sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết với LEPR và làm tăng độ nhạy của LEPR với kháng nguyên. Theo một số phương án, sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết với LEPR khi có mặt và không có mặt của leptin. Theo một số phương án, sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể gây ra quá trình truyền tín hiệu ở tế bào biểu hiện thể đột biến LEPR mà có quá trình truyền tín hiệu thiếu hụt hoặc suy giảm khi có mặt của leptin. Kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế là hữu ích để điều trị chứng rối loạn chuyển hóa lipid và các bệnh và các rối loạn khác liên quan đến hoặc gây ra bởi sự thiếu hụt leptin hoặc tính kháng leptin.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể liên kết với thụ thể leptin người (human leptin receptor - LEPR), và phương pháp chẩn đoán và điều trị bệnh bằng cách sử dụng kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Leptin là hormon polypeptit được biểu hiện chủ yếu bởi mô mỡ và liên quan đến sự điều hòa quá trình trao đổi chất, cân bằng năng lượng và hấp thu thức ăn. Hoạt động của leptin được trung gian bởi sự tương tác với, và sự truyền tín hiệu qua, thụ thể leptin. Thụ thể leptin, (còn được gọi là "LEPR," "WSX," "thụ thể OB," "OB-R," và "CD295") là thụ thể xuyên màng đơn thuộc họ thụ thể xytokin lớp I với miền ngoại bào lớn (818 axit amin). Việc thiếu hụt leptin, kháng leptin, và đột biến làm suy yếu tín hiệu/thiếu hụt tín hiệu LEPR, liên quan đến bệnh béo phì, bệnh đái đường typ 2, bệnh rối loạn mỡ máu, chứng rối loạn chuyển hóa lipid, bệnh gan nhiễm mỡ, bệnh gan nhiễm mỡ do rượu và không do rượu, chứng kháng insulin nặng, hội chứng Leprechaunism/Donohue, hội chứng Rabson-Mendenhall, và các biến chứng có liên quan. Các phương pháp điều trị bệnh hướng đến tính kháng leptin, chứng thiếu hụt leptin, và chứng giảm leptin huyết (ví dụ, chứng rối loạn chuyển hóa lipid) chủ yếu tập trung vào việc cung cấp leptin bổ sung hoặc chất tương tự leptin cho những người bị bệnh này. Tuy nhiên, các phương pháp như vậy nói chung có hiệu quả hạn chế, đặc biệt đối với các cá thể kháng leptin, và thường có các tác dụng phụ bất lợi. Do đó, trong lĩnh vực này cần có phương pháp khác để điều trị tính kháng leptin và các tình trạng bệnh khác liên quan đến chứng thiếu hụt leptin hoặc chứng giảm leptin huyết.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà liên kết với thụ thể leptin người (human leptin receptor - LEPR). Kháng thể theo sáng chế là kháng thể chủ vận; tức là liên kết kháng thể kháng LEPR theo sáng chế với LEPR dẫn đến, không kể những thứ khác, hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu thụ thể leptin ở tế bào. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế không cạnh tranh với leptin để

liên kết với LEPR. Kháng thể theo sáng chế có ích, ví dụ, để bắt chước, thay thế, hoặc bổ trợ hoạt tính sinh học bình thường của leptin ở đối tượng. Vì vậy, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế rất có ích trong điều trị các bệnh và các rối loạn liên quan đến tính kháng leptin và chứng thiếu hụt leptin.

Kháng thể theo sáng chế có thể có chiều dài đầy đủ (ví dụ, kháng thể IgG1 hoặc IgG4) hoặc có thể chỉ là mảnh liên kết kháng nguyên (ví dụ, mảnh Fab, F(ab')₂ hoặc scFv), và có thể được biến đổi để tạo ra tác động về mặt chức năng, ví dụ, để loại bỏ các chức năng tác động dư thừa (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

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

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

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

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với LEPR, chứa cặp trình tự axit amin HCVR và LCVR (HCVR/LCVR) chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong Bảng 1 bắt cặp với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR được liệt kê trong Bảng 1. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó, chứa cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chứa trong

kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LEPR minh họa được liệt kê trong Bảng 1. Theo một số phương án, cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2/10, 18/10, 26/10, 34/10, 42/10, 50/10, 58/66, 74/66 và 82/66.

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

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

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

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

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

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với LEPR, chứa CDR3 chuỗi nhẹ (LCDR3) có trình tự axit amin được

chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR3 được liệt kê trong Bảng 1 hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

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

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với LEPR, chứa bộ sáu CDR (tức là HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3) được chứa trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LEPR minh họa được liệt kê trong Bảng 1. Theo một số phương án, bộ trình tự axit amin HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14, 16; 20, 22, 24, 12, 14, 16; 28, 30, 32, 12, 14, 16; 36, 38, 40, 12, 14, 16; 44, 46, 48, 12, 14, 16; 52, 54, 56, 12, 14, 16; 60, 62, 64, 68, 70, 72; 76, 78, 80, 68, 70, 72; và 84, 86, 88, 68, 70, 72.

Theo phương án liên quan, sáng chế đề xuất kháng thể, hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với LEPR, chứa bộ sáu CDR (tức là HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3) được chứa trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR như được xác định bởi kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LEPR minh họa được liệt kê trong Bảng 1. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với LEPR, chứa bộ trình tự axit amin HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, và LCDR3 được chứa trong cặp trình tự axit amin HCVR/LCVR được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 2/10, 18/10, 26/10, 34/10, 42/10, 50/10, 58/66, 74/66 và 82/66. Phương pháp và kỹ thuật để xác định CDR trong trình tự axit amin HCVR và LCVR đã được biết đến trong lĩnh

vực kỹ thuật và có thể được sử dụng để xác định CDR trong trình tự axit amin HCVR và/hoặc LCVR cụ thể được đề cập trong bản mô tả này. Ví dụ về quy ước có thể được sử dụng để xác định các ranh giới của CDR bao gồm, ví dụ, định nghĩa Kabat, định nghĩa Chothia, và định nghĩa AbM. Nói chung, định nghĩa Kabat dựa trên sự biến đổi của trình tự, định nghĩa Chothia dựa trên vị trí của các vùng cấu trúc móc, và định nghĩa AbM là sự điều chỉnh giữa các phương pháp Kabat và Chothia. Xem, ví dụ, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); and Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Cơ sở dữ liệu công khai cũng sẵn cũng giúp xác định trình tự CDR trong kháng thể.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể kháng LEPR hoặc các mảnh của nó. Ví dụ, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong Bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCVR được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR được liệt kê trong Bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCVR được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR1 được liệt kê trong Bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCDR1 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR2 được liệt kê trong Bảng 1; theo một số phương án, phân tử

axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCDR2 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCDR3 được liệt kê trong Bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCDR3 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR1 được liệt kê trong Bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCDR1 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR2 được liệt kê trong Bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCDR2 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCDR3 được liệt kê trong Bảng 1; theo một số phương án, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCDR3 được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá HCVR, trong đó HCVR chứa bộ ba CDR (tức là HCDR1, HCDR2, HCDR3), trong đó bộ trình tự axit amin HCDR1, HCDR2, HCDR3 như được xác định bởi kháng thể bất kỳ trong số các kháng

thể kháng LEPR minh họa được liệt kê trong Bảng 1.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá LCVR, trong đó LCVR chứa bộ ba CDR (tức là LCDR1, LCDR2, LCDR3), trong đó bộ trình tự axit amin LCDR1, LCDR2, LCDR3 như được xác định bởi kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LEPR minh họa được liệt kê trong Bảng 1.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá cả HCVR và LCVR, trong đó HCVR chứa trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR được liệt kê trong Bảng 1, và trong đó LCVR chứa trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin LCVR được liệt kê trong Bảng 1. Theo một số phương án, phân tử axit nucleic bao gồm trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic HCVR được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%, và trình tự polynucleotit được chọn từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit nucleic LCVR được liệt kê trong Bảng 2, hoặc trình tự gần như tương tự của nó có độ tương đồng về trình tự ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98% hoặc ít nhất là 99%. Theo một số phương án, theo khía cạnh này của sáng chế, phân tử axit nucleic mã hóa HCVR và LCVR, trong đó cả HCVR lẫn LCVR đều bắt gốc từ cùng một kháng thể kháng LEPR được liệt kê trong Bảng 1.

Sáng chế cũng đề xuất vector biểu hiện tái tổ hợp có khả năng biểu hiện polypeptit bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của kháng thể kháng LEPR. Ví dụ, sáng chế bao gồm vector biểu hiện tái tổ hợp chứa phân tử bất kỳ trong số các phân tử axit nucleic nêu trên, tức là phân tử axit nucleic mã hoá trình tự bất kỳ trong số các trình tự HCVR, LCVR, và/hoặc CDR như được nêu trong Bảng 1. Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là tế bào chủ mà các vector này đã được đưa vào, cũng như phương pháp tạo ra kháng thể hoặc các mảnh của nó bằng cách nuôi cấy tế bào chủ trong các điều kiện cho phép tạo ra kháng thể hoặc mảnh kháng thể, và thu hồi kháng thể và mảnh kháng thể được tạo ra như vậy.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể người tái tổ hợp hoặc mảnh của nó liên kết đặc hiệu với LEPR và chất mang dược dụng. Theo khía cạnh liên quan, sáng chế đề xuất dược phẩm là tổ hợp gồm kháng thể kháng LEPR và chất trị liệu thứ hai. Theo một phương án, chất trị liệu thứ hai là chất bất kỳ

được kết hợp một cách có lợi với kháng thể kháng LEPR.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị để làm tăng cường hoặc kích thích quá trình truyền tín hiệu LEPR bằng cách sử dụng kháng thể kháng LEPR hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế. Phương pháp điều trị theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm việc cho đối tượng cần điều trị bệnh dùng lượng hữu hiệu có tác dụng điều trị của dược phẩm chứa kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế. Rối loạn được điều trị là bệnh hoặc tình trạng bệnh bất kỳ mà được cải thiện, thuyên giảm, ức chế hoặc ngăn ngừa bằng cách kích thích hoặc hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu LEPR, hoặc bằng cách khác có tác dụng giống hoạt tính tự nhiên của leptin *in vitro* hoặc *in vivo*.

Các phương án khác sẽ trở nên rõ ràng khi xem xét phần Mô tả chi tiết sáng chế tiếp theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện liên kết với LEPR nhị phân ở người với leptin người khi có mặt của nồng độ kháng thể kháng LEPR thử nghiệm hoặc phân tử đối chứng gia tăng, như đo được bằng ELISA (hấp thu ở 450nm).

Các Fig. 2A-2C minh họa mức độ truyền tín hiệu LEPR trong tế bào HEK293 biểu hiện hoặc LEPR dạng đại (vòng tròn), thể đột biến LEPR thiếu hụt khả năng truyền tín hiệu (A409E, hình vuông), hoặc thể đột biến LEPR suy giảm khả năng truyền tín hiệu (P316T, hình tam giác). Quá trình truyền tín hiệu LEPR được biểu diễn bằng tỷ lệ pSTAT3-Y705/STAT3, đo được bằng phép đo tỷ trọng từ phương pháp tách chiết được tạo ra từ các tế bào được xử lý bằng nồng độ leptin gia tăng (Fig. 2A), H4H16650 (Fig. 2B), hoặc H4H16679 (Fig. 2C).

Fig. 3 thể hiện mức hấp thu thức ăn trung bình hằng ngày của chuột thiếu hụt leptin được định liều bằng kháng thể đối chứng có kiểu tương đương tại 3 mg/kg, hoặc kháng thể LEPR được chọn từ H4H16650P2, H4H16679P2, H4H17319P2 hoặc H4H17321P2 ở 3 mg/kg.

Fig. 4 thể hiện phần trăm mức thay đổi trung bình thể trọng của chuột được định liều bằng kháng thể isotyp đối chứng ở 3 mg/kg, hoặc kháng thể LEPR được chọn từ H4H16650P2, H4H16679P2, H4H17319P2 hoặc H4H17321P2 ở 3 mg/kg.

Fig. 5 thể hiện khối lượng chất béo trung bình đối với các con chuột trong mỗi nhóm xử lý bằng kháng thể được định lượng bằng μ CT 1 ngày trước khi (cột không được kẻ đậm) và 6 ngày sau khi xử lý bằng kháng thể (cột được kẻ đậm) được biểu diễn bằng giá trị trung bình $\pm$ SEM.

Fig. 6 thể hiện phần trăm mức thay đổi thể trọng của chuột được cho ăn 30 mg/kg của kháng thể được chọn từ H4H18482P2, H4H18487P2, H4H18492P2 hoặc nhóm đối chứng isotyp.

Các Fig. 7A-7B. Fig. 7A thể hiện khối lượng chất béo của chuột trước khi định liều bằng kháng thể kháng LEPR H4H18482P2, H4H18487P2 hoặc H4H18492P2. Fig. 7B thể hiện khối lượng chất béo của chuột được xử lý bằng 30 mg/kg H4H18482P2, H4H18487P2 hoặc H4H18492P2.

Fig. 8. thể hiện LEPR hoạt hóa của khi được thử nghiệm kháng thể kháng LEPR (Mf) ở dòng tế bào IMR-32/STAT3-luc/Mf LEPR.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi sáng chế được mô tả, cần phải hiểu rằng sáng chế này không bị giới hạn ở các phương pháp và điều kiện thí nghiệm cụ thể được mô tả, vì các phương pháp và điều kiện này có thể thay đổi. Cũng cần hiểu rằng thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể và không nhằm mục đích giới hạn, vì phạm vi của sáng chế này sẽ chỉ bị giới hạn ở các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Trừ khi được chỉ ra theo cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế có liên quan. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "khoảng", khi được sử dụng để chỉ giá trị bằng số được nêu một cách cụ thể, có nghĩa là giá trị này có thể thay đổi so với giá trị được nêu không quá 1%. Ví dụ, như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ "khoảng 100" bao gồm 99 và 101 và tất cả các giá trị trong khoảng này (ví dụ 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, v.v.).

Mặc dù các phương pháp và nguyên liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với phương pháp và nguyên liệu được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng

trong thực tế hoặc thí nghiệm của sáng chế, các phương pháp và nguyên liệu được ưu tiên được mô tả dưới đây.

Định nghĩa

Cụm từ “thụ thể leptin,” “LEPR,” và các cụm từ tương tự, như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ thụ thể leptin người, chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:113 (cũng xem số truy nhập UniProtKB/Swiss-Prot P48357). Các tên thay thế khác cho LEPR được sử dụng trong tài liệu khoa học bao gồm “thụ thể OB”, “OB-R,” và “CD295.” LEPR cũng dùng để chỉ “WSX” (xem, ví dụ, patent Mỹ số 7,524,937). Cụm từ “LEPR” bao gồm cả phân tử LEPR đơn phân và đa phân (ví dụ, nhị phân). Như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ “LEPR người đơn phân” nghĩa là protein LEPR hoặc mảnh của nó không chứa hoặc không có bất kỳ miền đa phân hóa nào và tồn tại trong các điều kiện bình thường dưới dạng phân tử LEPR đơn lẻ mà không có kết nối vật lý trực tiếp với phân tử LEPR khác. Phân tử LEPR đơn phân minh họa là phân tử được gọi trong bản mô tả này là “hLEPR.mmh” chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:114 (xem, ví dụ, Ví dụ 3, trong bản mô tả này). Như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ “LEPR người nhị phân” nghĩa là cấu trúc bao gồm hai phân tử LEPR được nối với nhau thông qua cầu nối, liên kết cộng hóa trị, liên kết không cộng hóa trị, hoặc thông qua miền đa phân hóa như miền kháng thể Fc. Phân tử LEPR nhị phân minh họa là phân tử được gọi trong bản mô tả này là “hLEPR.mFc” chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:115 (xem, ví dụ, Ví dụ 3, trong bản mô tả này), hoặc phân tử được gọi trong bản mô tả này là “hLEPR.hFc” chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:116. Như được sử dụng trong bản mô tả này, các cụm từ như “kháng thể kháng LEPR,” “kháng thể liên kết đặc hiệu với LEPR,” “protein liên kết đặc hiệu với LEPR,” và các cụm từ tương tự, trừ khi có quy định khác, dùng để chỉ phân tử liên kết với LEPR người có chiều dài đầy đủ, LEPR người đơn phân, LEPR người nhị phân, hoặc các cấu trúc khác bao gồm hoặc chỉ bao gồm miền ngoại bào LEPR.

Tất cả các tài liệu tham khảo đề cập đến protein, polypeptit và các mảnh protein trong bản mô tả này được dự định để chỉ phiên bản protein, polypeptit hoặc các mảnh protein tương ứng ở người, trừ khi được quy định cụ thể là từ loài không phải là người. Do đó, cụm từ “LEPR” nghĩa là LEPR người, trừ khi được quy định là từ loài không

phải người, ví dụ, "LEPR chuột," "LEPR khỉ," v.v.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ "LEPR biểu hiện trên bề mặt tế bào" nghĩa là một hoặc nhiều protein LEPR, hoặc miền ngoại bào của nó, mà được biểu hiện trên bề mặt của tế bào *in vitro* hoặc *in vivo*, sao cho ít nhất một phần của protein LEPR được tiếp xúc với phía ngoại bào của màng tế bào và có thể tiếp cận với phần liên kết với kháng nguyên của kháng thể. "LEPR biểu hiện trên bề mặt tế bào" có thể bao gồm hoặc chỉ bao gồm protein LEPR được biểu hiện trên bề mặt của tế bào mà biểu hiện một cách bình thường (ví dụ, ở trạng thái nguyên thể hoặc kiểu dại) protein LEPR. Theo cách khác, "LEPR biểu hiện trên bề mặt tế bào" có thể bao gồm hoặc chỉ bao gồm protein LEPR được biểu hiện trên bề mặt của tế bào mà không biểu hiện một cách bình thường LEPR người trên bề mặt của nó nhưng đã được thiết kế di truyền nhân tạo để biểu hiện LEPR trên bề mặt của nó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các cụm từ như "kháng thể kháng LEPR," hoặc "kháng thể liên kết với thụ thể leptin người," bao gồm cả kháng thể hóa trị một có tính đặc hiệu đơn, cũng như kháng thể đặc hiệu kép bao gồm nhánh thứ nhất liên kết với LEPR và nhánh thứ hai liên kết với kháng nguyên thứ hai (đích), trong đó nhánh kháng LEPR bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự HCVR/LCVR hoặc nêu trong Bảng 1 trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "kháng thể", như được sử dụng trong bản mô tả này, nghĩa là phân tử liên kết với kháng nguyên hoặc phức hợp phân tử bất kỳ bao gồm ít nhất một vùng xác định bổ trợ (CDR) liên kết đặc hiệu hoặc tương tác với kháng nguyên cụ thể (ví dụ, LEPR). Thuật ngữ "kháng thể" bao gồm phân tử globulin miễn dịch gồm bốn chuỗi polypeptit, hai chuỗi nặng (H) và hai chuỗi nhẹ (L) liên kết với nhau bằng các liên kết disulfua, cũng như các đa phân của chúng (ví dụ, IgM). Mỗi chuỗi nặng bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nặng (được viết tắt trong bản mô tả này là HCVR hoặc V_H) và vùng hằng định của chuỗi nặng. Vùng hằng định của chuỗi nặng bao gồm ba miền, C_{H1} , C_{H2} và C_{H3} . Mỗi chuỗi nhẹ bao gồm vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (được viết tắt trong bản mô tả này là LCVR hoặc V_L) và vùng hằng định của chuỗi nhẹ. Vùng hằng định của chuỗi nhẹ bao gồm một miền (C_{L1}). Các vùng V_H và V_L có thể được chia tiếp thành các vùng siêu biến, được gọi là vùng xác định bổ trợ (complementarity determining region - CDR), xen kẽ với các vùng được bảo toàn nhiều hơn, được gọi là

vùng khung (FR). Mỗi V_H và V_L gồm ba CDR và bốn FR, được sắp xếp từ đầu amino đến đầu cacboxy theo trình tự sau: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Theo các phương án khác của sáng chế, các FR của kháng thể kháng LEPR (hoặc phần liên kết với kháng nguyên của chúng) có thể tương đồng với trình tự của dòng mầm ở người, hoặc có thể được biến đổi tự nhiên hoặc nhân tạo. Trình tự liên ứng axit amin có thể được xác định dựa trên các phân tích kép của hai hoặc nhiều CDR.

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

Ví dụ không giới hạn về mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm: (i) mảnh Fab; (ii) mảnh $F(ab')_2$; (iii) mảnh Fd; (iv) mảnh Fv; (v) phân tử Fv (scFv) đơn chuỗi; (vi) mảnh dAb; và (vii) đơn vị nhận diện tối thiểu (minimal recognition unit) bao gồm các gốc axit amin tương đồng với vùng siêu biến của kháng thể (ví dụ, vùng xác định bổ trợ (CDR) được phân lập như peptit CDR3), hoặc peptit FR3-CDR3-FR4 ràng buộc. Các phân tử được thiết kế di truyền khác, như các kháng thể đặc hiệu miền, kháng thể đơn miền, kháng thể loại bỏ miền, kháng thể khảm, kháng thể ghép CDR, diabody, triabody, tetrabody, minibody, nanobody (ví dụ, nanobody hóa trị một, nanobody hóa trị hai, v.v.), thuốc miễn dịch mô đun nhỏ (SMIP), và miền IgNAR biến đổi từ cá mập, cũng nằm trong phạm vi của cụm từ "mảnh liên kết kháng nguyên," như được sử dụng

trong bản mô tả này.

Mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể sẽ thường bao gồm ít nhất một miền biến đổi. Miền biến đổi có thể có kích thước hoặc thành phần axit amin bất kỳ và thường sẽ chứa ít nhất một CDR, mà gần hoặc trong khung với một hoặc nhiều trình tự khung. Trong mảnh liên kết kháng nguyên có miền V_H liên quan đến miền V_L miền, các miền V_H và V_L có thể được bố trí tương xứng với một vùng khác trong cấu hình thích hợp bất kỳ. Ví dụ, vùng biến đổi có thể là nhị phân và chứa V_H - V_H , V_H - V_L hoặc V_L - V_L nhị phân. Theo cách khác, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa miền V_H hoặc V_L đơn phân.

Theo một số phương án, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể có thể chứa ít nhất một miền biến đổi được liên kết cộng hóa trị với ít nhất một miền hằng định. Cấu trúc không giới hạn về miền biến đổi và miền hằng định có thể có trong mảnh liên kết 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 . Theo cấu hình bất kỳ của miền biến đổi và miền hằng định, bao gồm ví dụ bất kỳ về cấu hình được liệt kê trên đây, miền biến đổi và miền hằng định có thể được liên kết trực tiếp với nhau hoặc có thể được liên kết bằng vùng bản lề hoặc vùng liên kết một phần hoặc hoàn toàn. Vùng bản lề có thể bao gồm ít nhất 2 (ví dụ, 5, 10, 15, 20, 40, 60 hoặc nhiều) axit amin mà tạo ra liên kết linh hoạt hoặc bán linh hoạt giữa miền biến đổi và/hoặc miền hằng định liên kề trong một phân tử polypeptit. Ngoài ra, mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm nhị phân cùng loại hoặc nhị phân khác loại (hoặc các multimer khác) có cấu hình bất kỳ trong số các cấu hình miền biến đổi và miền hằng định nêu trên liên kết không cộng hóa trị với nhau và/hoặc với một hoặc nhiều miền V_H hoặc V_L đơn phân (ví dụ, bằng (các) liên kết disulfua).

Đối với phân tử kháng thể hoàn chỉnh, mảnh liên kết kháng nguyên có thể là đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Mảnh liên kết kháng nguyên đa đặc hiệu của kháng thể thường chứa ít nhất hai miền biến đổi khác nhau, trong đó mỗi miền biến đổi có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng nguyên khác hoặc với quyết định kháng nguyên khác trên cùng một kháng nguyên. Dạng kháng thể đa đặc hiệu bất

kỳ, bao gồm dạng kháng thể đặc hiệu kép minh họa được đề cập trong bản mô tả này, có thể phù hợp để dùng trong trường hợp của mảnh liên kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường sẵn có trong lĩnh vực kỹ thuật này.

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

Kháng thể theo sáng chế có thể, theo một số phương án, là kháng thể tái tổ hợp ở người. Thuật ngữ "kháng thể tái tổ hợp ở người", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dự định để bao gồm tất cả các kháng thể người được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được 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 chủ (được mô tả tiếp dưới đây), kháng thể được phân lập từ thư viện kháng thể tổ hợp, tái tổ hợp ở người (được mô tả tiếp dưới đây), kháng thể được phân lập từ động vật (ví dụ, chuột) mà chuyển gen cho các gen globulin miễn dịch ở người (xem ví dụ, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) hoặc kháng thể được điều chế, được biểu hiện, được tạo ra hoặc được phân lập bằng cách bất kỳ khác bất kỳ bao gồm ghép mảnh trình tự gen globulin miễn dịch ở người vào trình tự ADN khác. Các kháng thể tái tổ hợp ở người như vậy có vùng biến đổi và vùng hằng định có nguồn gốc từ trình tự globulin miễn dịch dòng mầm ở người. Theo một số phương án, tuy nhiên, kháng thể tái tổ hợp ở người này được đột biến *in vitro* (hoặc, khi động vật chuyển gen cho trình tự Ig ở người được sử dụng, đột biến soma *in vivo*) và do đó trình tự axit amin của các vùng V_H và V_L của kháng thể tái tổ hợp là các trình tự mà, mặc dù có nguồn gốc từ và liên quan đến trình tự dòng mầm ở người, có thể không tồn tại trong tự nhiên

trong kho dòng mầm kháng thể người *in vivo*.

Sáng chế bao gồm kháng thể có một hoặc nhiều đột biến ở vùng bản lề, CH_2 hoặc CH_3 có thể là điều mong muốn, ví dụ, trong việc tạo ra, để cải thiện hiệu suất dạng kháng thể mong muốn.

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể được phân lập. "Kháng thể được phân lập," như được sử dụng trong bản mô tả này, nghĩa là kháng thể mà được xác định và được tách và/hoặc được thu hồi từ ít nhất một thành phần của môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, kháng thể mà được tách hoặc lấy ra từ ít nhất một thành phần của sinh vật, hoặc từ mô hoặc tế bào trong đó kháng thể có trong tự nhiên hoặc được tạo ra một cách tự nhiên, là "kháng thể được phân lập" theo sáng chế. Kháng thể được phân lập cũng bao gồm kháng thể *in situ* trong tế bào tái tổ hợp. Kháng thể được phân lập là kháng thể được xử lý bởi ít nhất một bước tinh chế hoặc phân lập. Theo các phương án nhất định, kháng thể được phân lập có thể hầu như không chứa nguyên liệu tế bào và/hoặc hóa chất khác.

Sáng chế bao gồm các biến thể của kháng thể kháng LEPR được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm một hoặc nhiều sự thế, chèn và/hoặc mất axit amin trong khung và/hoặc vùng CDR của miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng so với trình tự dòng mầm tương ứng mà từ đó kháng thể được tạo ra. Các đột biến này có thể được xác định một cách dễ dàng bằng cách so sánh trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này với trình tự dòng mầm sẵn có từ, ví dụ, cơ sở dữ liệu trình tự kháng thể công khai. Sáng chế bao gồm kháng thể, và mảnh liên kết kháng nguyên của nó, có nguồn gốc từ trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này, trong đó một hoặc nhiều axit amin trong một hoặc nhiều khung và/hoặc vùng CDR bị đột biến thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm mà từ đó kháng thể được tạo ra, hoặc thành (các) gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác ở người, hoặc thành sự thay thế axit amin bảo toàn của (các) gốc trong dòng mầm tương ứng (các thay đổi trình tự này được gọi chung trong bản mô tả này là "đột biến dòng mầm"). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, bắt đầu với trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được đề cập trong bản mô tả này, có thể dễ dàng tạo ra lượng lớn kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm riêng lẻ hoặc tổ hợp của chúng. Theo một số phương án, tất cả các gốc

trong khung và/hoặc CDR trong miền V_H và/hoặc V_L đều bị đột biến trở lại thành gốc được tìm thấy trong trình tự dòng mầm ban đầu mà từ đó kháng thể được tạo ra. Theo các phương án khác, chỉ có các gốc nhất định được gây đột biến trở lại thành trình tự dòng mầm ban đầu, ví dụ, chỉ có các gốc đột biến được tìm thấy trong 8 axit amin đầu tiên của FR1 hoặc trong 8 axit amin cuối cùng của FR4, hoặc chỉ có các gốc đột biến được tìm thấy trong CDR1, CDR2 hoặc CDR3. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều gốc trong khung và/hoặc vùng CDR được đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác (tức là trình tự dòng mầm khác với trình tự dòng mầm mà từ đó kháng thể ban đầu được tạo ra). Hơn nữa, kháng thể theo sáng chế có thể chứa tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều đột biến dòng mầm trong khung và/hoặc vùng CDR, ví dụ, trong đó các gốc riêng lẻ nhất định được đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng mầm cụ thể trong khi các gốc nhất định khác khác với trình tự dòng mầm ban đầu được duy trì hoặc được đột biến thành gốc tương ứng của trình tự dòng mầm khác. Khi thu được, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên mà chứa một hoặc nhiều đột biến dòng mầm có thể được kiểm tra một cách dễ dàng cho một hoặc nhiều đặc tính mong muốn như, cải thiện độ đặc hiệu liên kết, tăng ái lực liên kết, cải thiện hoặc tăng đặc tính sinh học đối kháng hoặc chủ vận (trong trường hợp có thể), giảm tính sinh miễn dịch, v.v.. Kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên thu được theo cách này nằm trong phạm vi của sáng chế.

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

Đối với polypeptit, thuật ngữ "gần như tương tự" hoặc "về cơ bản tương tự" có nghĩa là hai trình tự peptit, khi được sắp thẳng hàng tùy ý, như bằng các chương trình GAP hoặc BESTFIT sử dụng khoảng trống mặc định, có độ tương đồng trình tự ít nhất 95%, tốt hơn nữa nếu ít nhất 98% hoặc 99%. Tốt hơn là, các vị trí gốc không giống hệt khác nhau bởi 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 thế bằng gốc axit amin khác có chuỗi bên (nhóm R) có đặc tính hóa học tương tự (ví dụ, tính tích điện hoặc tính kỵ nước). Nói chung, sự thay thế axit amin bảo toàn về cơ bản sẽ không làm thay đổi các tính năng của protein. Trong trường hợp khi hai hoặc nhiều trình tự axit amin khác nhau bởi sự

thay thế bảo toàn, phần trăm độ tương đồng trình tự hoặc mức tương tự có thể được điều chỉnh hướng lên để hiệu chỉnh về bản chất bảo toàn của sự thay thế. Phương pháp thực hiện việc điều chỉnh này đã được biết đến bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Xem, ví dụ, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Ví dụ về các nhóm axit amin có chuỗi bên có đặc tính hóa học tương tự bao gồm (1) chuỗi bên béo: glyxin, alanin, valin, leuxin và isoleuxin; (2) chuỗi bên hydroxyl béo: serin và threonin; (3) chuỗi bên chứa amit: asparagin và glutamin; (4) chuỗi bên thơm: phenylalanin, tyrosin, và tryptophan; (5) chuỗi bên có tính bazơ: lysin, arginin, và histidin; (6) chuỗi bên có tính axit: aspartat và glutamat, và (7) chuỗi bên chứa lưu huỳnh là cystein và methionin. Nhóm thể axit amin bảo toàn được ưu tiên là: valin-leuxin-isoleuxin, phenylalanin-tyrosin, lysin-arginin, alanin-valin, glutamat-aspartat, và asparagin-glutamin. Ngoài ra, sự thể bảo toàn là sự thay đổi bất kỳ có giá trị dương tính trong ma trận logarit PAM250 của hàm hợp lý được bộc lộ trong Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-1445. Sự thể "tương đối bảo toàn" là sự thay đổi bất kỳ có giá trị không âm trong ma trận hợp lý logarit PAM250 của hàm hợp lý.

Sự tương tự về trình tự đối với các polypeptit, mà còn gọi là độ tương đồng về trình tự, thường được xác định bằng cách sử dụng phần mềm phân tích trình tự. Phần mềm phân tích protein đối chiếu trình tự tương tự bằng cách sử dụng giá trị về mức tương tự dùng cho thay thế, loại bỏ và biến đổi khác, bao gồm thay thế axit amin bảo toàn. Ví dụ, phần mềm GCG bao gồm các chương trình như Gap và Bestfit có thể được sử dụng với các thông số mặc định để xác định tính đồng nhất trình tự hoặc độ tương đồng trình tự giữa các polypeptit có mối quan hệ mật thiết, như các polypeptit tương đồng từ loài sinh vật khác nhau hoặc giữa protein kiểu đại và thể đột biến của nó. Xem, ví dụ, GCG Phiên bản 6.1. Trình tự polypeptit còn được so sánh bằng cách sử dụng FASTA bằng cách sử dụng thông số mặc định hoặc thông số yêu cầu, chương trình trong GCG Phiên bản 6,1. FASTA (ví dụ, FASTA2 và FASTA3) tạo ra thông tin về sắp thẳng hàng và phần trăm độ tương đồng trình tự của các vùng trùng lặp tốt nhất giữa trình tự truy vấn và trình tự tra cứu (Pearson (2000) *supra*). Thuật toán khác được ưu tiên khi so sánh trình tự theo sáng chế với cơ sở dữ liệu chứa lượng lớn trình tự từ các sinh vật khác nhau là chương trình máy tính BLAST, đặc biệt là BLASTP hoặc TBLASTN, bằng cách sử dụng các thông số mặc định. Xem, ví dụ, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 và Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.*

25:3389-402.

Kháng thể kháng LEPR chứa biến thể Fc

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

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

Kháng thể kháng LEPR theo sáng chế có thể chứa miền Fc đã biến đổi có chức năng tác động giảm đi. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "miền Fc đã biến đổi có chức năng tác động giảm" nghĩa là vùng Fc bất kỳ của globulin miễn dịch đã được biến đổi, gây đột biến, làm cắt, v.v., so với miền Fc kiểu dại, có trong tự nhiên sao cho phân tử chứa Fc biến đổi giảm mức nghiêm trọng hoặc mức độ của ít nhất một hiệu

ứng được chọn từ nhóm bao gồm tiêu diệt tế bào (ví dụ, ADCC và/hoặc CDC), hoạt hóa bổ thể, thực bào và opsoni hóa, so với phân tử so sánh chứa phiên bản vùng Fc kiểu đại, có trong tự nhiên. Theo một số phương án, "miền Fc biến đổi có chức năng tác động giảm" là miền Fc có liên kết với thụ thể Fc (ví dụ, FcγR) giảm hoặc suy yếu.

Theo một số phương án, theo sáng chế, miền Fc biến đổi là biến thể Fc IgG1 hoặc biến thể Fc IgG4 chứa sự thay thế ở vùng bản lề. Ví dụ, Fc biến đổi để dùng trong ngữ cảnh của sáng chế có thể bao gồm biến thể Fc IgG1 có ít nhất một axit amin của vùng bản lề Fc IgG1 được thay thế bằng axit amin tương ứng từ vùng bản lề Fc IgG2. Theo cách khác, Fc biến đổi để dùng trong ngữ cảnh của sáng chế có thể bao gồm biến thể Fc IgG4 có ít nhất một axit amin của Fc IgG4 vùng bản lề được thay thế bằng axit amin tương ứng từ vùng bản lề Fc IgG2. Ví dụ không giới hạn về vùng Fc biến đổi có thể được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế là như được nêu trong Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2014/0243504, toàn bộ nội dung của tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách tham chiếu đến toàn bộ, cũng như bất kỳ biến thể tương đương chứng năng của vùng Fc đã biến đổi nêu trong đó.

Miền Fc biến đổi và việc biến đổi Fc khác có thể được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế bao gồm biến đổi bất kỳ trong số các biến đổi như được thể hiện trong US 2014/0171623; US 8,697,396; US 2014/0134162; WO 2014/043361, được kết hợp vào đây bằng cách tham chiếu đến toàn bộ. Các phương pháp tạo cấu trúc kháng thể hoặc các protein dung hợp liên kết với kháng nguyên khác bao gồm miền Fc biến đổi như được mô tả trong bản mô tả này đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật.

Đặc tính sinh học của kháng thể

Sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với LEPR ở người và hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu LEPR. Kháng thể như vậy trong bản mô tả này còn được gọi là "kháng thể chủ vận." Trong phạm vi của sáng chế, "sự hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu LEPR" nghĩa là sự kích thích hiệu ứng nội bào mà thường là kết quả của sự tương tác của leptin với LEPR ở tế bào biểu hiện LEPR. Theo một số phương án, "sự hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu LEPR" nghĩa là sự hoạt hóa phiên mã STAT3, có thể được dò bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ mà có thể đo hoặc xác định, trực tiếp hoặc gián tiếp, hoạt tính STAT3, ví dụ, bằng cách sử dụng phiên bản STAT3 gắn nhãn được biểu hiện ở dòng tế bào chỉ thị. Ví dụ, sáng chế bao

gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó mà hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu LEPR trong thử nghiệm về gen báo cáo trên cơ sở tế bào, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm trên cơ sở tế bào như được xác định trong Ví dụ 7 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Thử nghiệm về gen báo cáo trên cơ sở tế bào dò sự hoạt hóa LEPR, như thử nghiệm được nêu trong Ví dụ 7 trong bản mô tả này, có thể tạo ra tín hiệu có thể phát hiện được được biểu diễn bằng giá trị EC_{50} (tức là nồng độ kháng thể cần để tạo ra mức truyền tín hiệu nửa cực đại) và/hoặc phần trăm mức truyền tín hiệu cực đại quan sát được khi có mặt của leptin. Theo các phương án nhất định minh họa theo sáng chế, kháng thể kháng LEPR được đề xuất hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu LEPR với giá trị EC_{50} nhỏ hơn khoảng 12,0 nM trong thử nghiệm về gen báo cáo trên cơ sở tế bào, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 7 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo các phương án nhất định minh họa theo sáng chế, kháng thể kháng LEPR được đề xuất hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu LEPR có phần trăm mức hoạt hóa cực đại so với việc truyền tín hiệu leptin lớn hơn khoảng 65% trong thử nghiệm về gen báo cáo trên cơ sở tế bào, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 7 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với LEPR đơn phân ở người với ái lực cao. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng LEPR liên kết với LEPR đơn phân ở người (ví dụ, hLEPR.mmh, SEQ ID NO:114) với K_D nhỏ hơn khoảng 150 nM như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C hoặc 37°C, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 3 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LEPR được đề xuất liên kết với LEPR đơn phân ở người tại nhiệt độ 25°C với K_D nhỏ hơn khoảng 150 nM, nhỏ hơn khoảng 140 nM, nhỏ hơn khoảng 130 nM, nhỏ hơn khoảng 120 nM, nhỏ hơn khoảng 110 nM, nhỏ hơn khoảng 100 nM, nhỏ hơn khoảng 90 nM, nhỏ hơn khoảng 80 nM, nhỏ hơn khoảng 70 nM, nhỏ hơn khoảng 60 nM, nhỏ hơn khoảng 50 nM, nhỏ hơn khoảng 40 nM, nhỏ hơn khoảng 30 nM, nhỏ hơn khoảng 20 nM, nhỏ hơn khoảng 10 nM, nhỏ hơn khoảng 9 nM, nhỏ hơn khoảng 8 nM, nhỏ hơn khoảng 7 nM, nhỏ hơn khoảng 6 nM, nhỏ hơn khoảng 5 nM, nhỏ hơn khoảng 4 nM, nhỏ hơn khoảng 3 nM, nhỏ hơn khoảng 2 nM, nhỏ hơn khoảng 1 nM, nhỏ hơn khoảng 900 pM, nhỏ hơn khoảng 800 pM, nhỏ hơn

khoảng 700 pM, nhỏ hơn khoảng 600 pM, nhỏ hơn khoảng 500 pM, nhỏ hơn khoảng 400 pM, hoặc nhỏ hơn khoảng 300 pM, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 3 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với LEPR đơn phân ở người (ví dụ, hLEPR.mmh, SEQ ID NO:114) có thời gian bán phân ly ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 50 phút như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C hoặc 37°C, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 3 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LEPR được đề xuất liên kết với LEPR đơn phân ở người tại nhiệt độ 25°C với $t_{1/2}$ lớn hơn khoảng 50 phút, lớn hơn khoảng 55 phút, lớn hơn khoảng 60 phút, lớn hơn khoảng 65 phút, hoặc lớn hơn nữa, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 3 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với LEPR nhị phân ở người (ví dụ, hLEPR.mFc, SEQ ID NO:115) với ái lực cao. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng LEPR liên kết với LEPR nhị phân ở người với K_D nhỏ hơn khoảng 1,5 nM như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C hoặc 37°C, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 3 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LEPR được đề xuất liên kết với LEPR nhị phân ở người tại nhiệt độ 25°C với K_D nhỏ hơn khoảng 150 nM, nhỏ hơn khoảng 130 nM, nhỏ hơn khoảng 110 nM, nhỏ hơn khoảng 80 nM, nhỏ hơn khoảng 70 nM, nhỏ hơn khoảng 60 nM, nhỏ hơn khoảng 50 nM, nhỏ hơn khoảng 40 nM, nhỏ hơn khoảng 30 nM, nhỏ hơn khoảng 20 nM, hoặc nhỏ hơn khoảng 10 nM, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 3 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với LEPR nhị phân ở người (ví dụ, hLEPR.mFc, SEQ ID NO:115) với thời gian bán phân ly ($t_{1/2}$) lớn hơn khoảng 10 phút như được xác định bằng cộng hưởng

plasmon bề mặt tại nhiệt độ 25°C hoặc 37°C, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 3 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng LEPR được đề xuất liên kết với LEPR nhị phân ở người tại nhiệt độ 25°C với $t_{1/2}$ lớn hơn khoảng 10, dài hơn khoảng 15 phút, lớn hơn khoảng 20 phút, lớn hơn khoảng 25 phút, lớn hơn khoảng 30 phút, lớn hơn khoảng 40 phút, lớn hơn khoảng 50 phút, lớn hơn khoảng 60 phút, lớn hơn khoảng 70 phút, hoặc lớn hơn nữa, như được xác định bằng cộng hưởng plasmon bề mặt, ví dụ, bằng cách sử dụng dạng thử nghiệm như được xác định trong Ví dụ 3 trong bản mô tả này, hoặc thử nghiệm gần như tương tự.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với LEPR trong phức hợp với leptin người ("LEPR trong phức hợp với leptin người" có thể cũng được gọi bằng cụm từ "leptin:LEPR"). Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó có khả năng liên kết với phức hợp đã được tạo ra sơ bộ chứa hLEPR và leptin người. Nghĩa là, theo các phương án nhất định, sự tương tác giữa kháng thể kháng LEPR và LEPR không bị ức chế bởi sự có mặt của leptin trong phức hợp với LEPR; tương tự, sự tương tác giữa leptin và LEPR, theo khía cạnh này của sáng chế, không bị ức chế bởi sự có mặt của kháng thể kháng LEPR. Dạng thử nghiệm minh họa để xác định liệu kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có liên kết với LEPR trong phức hợp với leptin người được nêu trong Ví dụ 4 trong bản mô tả này.

Tương tự, sáng chế cũng bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với LEPR và không phong bế sự tương tác LEPR:leptin. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó có khả năng liên kết với LEPR, nhờ đó tạo ra phức hợp kháng thể:LEPR, trong đó phức hợp kháng thể:LEPR thu được có thể tương tác với leptin để tạo ra phức hợp ba thành phần bao gồm kháng thể, LEPR và leptin. Dạng thử nghiệm minh họa để xác định liệu kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có khả năng liên kết với LEPR theo cách để không phong bế hoặc gây cản trở sự tương tác giữa LEPR và leptin được nêu trong Ví dụ 5 trong bản mô tả này.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với LEPR biểu hiện trên bề mặt tế bào khi có mặt và/hoặc không có mặt của leptin

người. LEPR biểu hiện trên bề mặt tế bào nghĩa là LEPR hoặc một phần của nó (ví dụ, phần ngoại bào của LEPR) được biểu hiện trên bề mặt của tế bào, hoặc ở dòng tế bào tự nhiên hoặc ở dòng tế bào đã được thiết kế di truyền, để kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có khả năng liên kết với phân tử LEPR. Theo một số phương án, LEPR biểu hiện trên bề mặt tế bào bao gồm phức hợp tái tổ hợp chứa miền ngoại bào của LEPR được nối với tế bào qua nhãn dán hoặc mấu (ví dụ, mấu GPI như được minh họa trong Ví dụ 6 trong bản mô tả này). Theo khía cạnh này của sáng chế, kháng thể được đề xuất có khả năng liên kết với LEPR biểu hiện trên bề mặt tế bào khi không có mặt của leptin, và cũng có khả năng liên kết với LEPR biểu hiện trên bề mặt tế bào khi có mặt của leptin (tức là trong các điều kiện mà leptin có khả năng liên kết với leptin biểu hiện trên bề mặt tế bào). Tức là theo các phương án nhất định, sự tương tác giữa kháng thể kháng LEPR và LEPR biểu hiện trên bề mặt tế bào không bị ức chế bởi sự có mặt của leptin trong phức hợp với LEPR biểu hiện trên bề mặt tế bào. Kháng thể theo khía cạnh này của sáng chế có khả năng tạo ra phức hợp ba thành phần trên bề mặt của tế bào bao gồm kháng thể, LEPR biểu hiện trên bề mặt tế bào và leptin. Dạng thử nghiệm minh họa để xác định liệu kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó có khả năng liên kết với LEPR biểu hiện trên bề mặt tế bào khi có mặt và không có mặt của leptin người được nêu trong Ví dụ 6 trong bản mô tả này.

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

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

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể kháng LEPR bao gồm các biến thể của trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được đề cập trong bản mô tả này có một hoặc nhiều thay thế bảo toàn. Ví dụ, sáng chế bao gồm kháng thể kháng LEPR có trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR có, ví dụ, 10 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, v.v. thay thế axit amin bảo toàn so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự axit amin HCVR, LCVR, và/hoặc CDR được nêu trong Bảng 1. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng

LEPR chứa biến thể trình tự axit amin HCVR, LCVR và/hoặc CDR so với trình tự được nêu trong Bảng 1 (ví dụ, bao gồm thay thế axit amin bảo toàn), trong đó kháng thể biến thể như vậy có một hoặc nhiều chức năng và/hoặc đặc tính của kháng thể kháng LEPR minh họa được đề cập trong bản mô tả này.

Miền ngoại bào của LEPR ở người chứa miền tương đồng thụ thể xytokin đầu N (CRH-1), miền giống globulin miễn dịch (Ig), và miền CRH thứ hai (CRH-2) dùng để chỉ miền liên kết leptin (LBD). (Carpenter *et al.* (2012) *Structure* 20:487-97). Hơn nữa, LEPR có cùng kích thước và tổ chức của miền ngoại bào tương đồng và tương tự lớn nhất với yếu tố kích thích tạo cụm bạch cầu hạt (GCSF) và glycoprotein 130 (gp130). (Haniu *et al.* (1998) *J Biol Chem* 273(44): 28691-699).

Thuật ngữ "quyết định kháng nguyên" dùng để chỉ quyết định tính kháng nguyên mà tương tác với vị trí liên kết kháng nguyên đặc hiệu trong vùng biến đổi của kháng thể phân tử đã biết như paratop. Một Kháng nguyên có thể có nhiều hơn một quyết định kháng nguyên. Do đó, kháng thể khác nhau có thể liên kết với các vùng khác nhau trên kháng nguyên và có thể có hiệu quả sinh học khác nhau. Quyết định kháng nguyên có thể có cấu trúc bậc một hoặc bậc ba. Quyết định kháng nguyên có cấu trúc bậc ba được tạo ra bằng cách đặt liên kề về mặt không gian các axit amin từ các đoạn khác nhau của chuỗi polypeptit thẳng. Quyết định kháng nguyên có cấu trúc bậc một là quyết định kháng nguyên được tạo ra bằng cách gắn các gốc axit amin liên kề trong chuỗi polypeptit. Trong một số trường hợp nhất định, quyết định kháng nguyên có thể bao gồm các gốc sacarit, nhóm phosphoryl, hoặc nhóm sulfonyl trên kháng nguyên.

Sáng chế bao gồm kháng thể kháng LEPR tương tác với một hoặc nhiều quyết định kháng nguyên được tìm thấy trong axit amin M1-D839 của LEPR ở người (SEQ ID NO: 113). Như được thể hiện trong Ví dụ 11, 201 peptit từ LEPR ở người có khả năng hấp thu dotêri vào hóa chất giảm một cách đáng kể khi được liên kết với kháng thể H4H16650P2. Peptit tương ứng với axit amin 162-169 (axit amin LYVLPEVL của LEPR ở người, SEQ ID NO: 113) và 170-191 (axit amin EDSPLVPQKGSF của LEPR ở người, SEQ ID NO: 113) có tốc độ dotêri hóa chậm hơn khi được liên kết với H4H16650P2, cho thấy rằng kháng thể này liên kết ít nhất hai quyết định kháng nguyên LEPR ở người có trình tự LYVLPEVL hoặc EDSPLVPQKGSF (axit amin 162-169 hoặc 170-191, tương ứng, trong SEQ ID NO: 113).

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

Các kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để xác định axit amin trong quyết định kháng nguyên được nhận diện bởi kháng thể cụ thể. Ví dụ về các kỹ thuật bao gồm, ví dụ, phân tích đột biến quét alanin, phân tích thẩm tách peptit, và phân tích phân tách peptit. Ngoài ra, các phương pháp như cắt quyết định kháng nguyên, chiết quyết định kháng nguyên và biến đổi hóa học kháng nguyên có thể được dùng (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Phương pháp khác có thể được sử dụng để xác định axit amin trong polypeptit mà kháng thể tương tác với nó là phương pháp trao đổi hydro/đotêri được phát hiện bằng khối phổ. Nói chung, phương pháp trao đổi hydro/đotêri bao gồm bước đánh dấu protein đang quan tâm bằng đotêri, sau đó liên kết kháng thể với protein đã đánh dấu bằng đotêri. Tiếp theo, phức hợp protein/kháng thể được chuyển vào nước để thực hiện quá trình trao đổi hydro-đotêri ở tất cả các gốc ngoại trừ gốc được bảo vệ bởi kháng thể (mà vẫn được đánh dấu bằng đotêri). Sau quá trình phân ly của kháng thể, protein đích được xử lý bằng phân cắt proteaza và phân tích khối phổ, nhờ đó hiển thị các gốc được đánh dấu bằng đotêri mà tương ứng với axit amin cụ thể mà kháng thể tương tác. Xem, ví dụ, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Phân tích tinh thể học tia X của kháng thể trong phức hợp với kháng nguyên của nó cũng có thể được sử dụng để xác định axit amin trong polypeptit mà kháng thể tương tác.

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

gồm kháng thể kháng LEPR mà cạnh tranh để liên kết với LEPR có kháng thể bất kỳ trong số các ví dụ cụ thể về kháng thể được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, kháng thể chứa trình tự axit amin bất kỳ trong số các trình tự axit amin như được nêu trong Bảng 1 trong bản mô tả này).

Có thể xác định được liệu kháng thể có thể liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như, hoặc cạnh tranh để liên kết với, kháng thể kháng LEPR tham chiếu bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được minh họa trong bản mô tả này. Ví dụ, để xác định xem kháng thể thử nghiệm liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như kháng thể kháng LEPR tham chiếu theo sáng chế, kháng thể tham chiếu được cho phép liên kết với protein LEPR. Sau đó, khả năng liên kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử LEPR được xác định. Nếu kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với LEPR sau khi liên kết bão hòa với kháng thể kháng LEPR tham chiếu, có thể kết luận được rằng kháng thể thử nghiệm liên kết với quyết định kháng nguyên khác ngoài kháng thể kháng LEPR tham chiếu. Mặt khác, nếu kháng thể thử nghiệm không thể liên kết với phân tử LEPR sau khi liên kết bão hòa với kháng thể kháng LEPR tham chiếu, thì kháng thể thử nghiệm có thể liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như quyết định kháng nguyên được liên kết bởi kháng thể kháng LEPR tham chiếu theo sáng chế. Sau đó, thử nghiệm thông thường bổ sung (ví dụ, gây đột biến peptit và phân tích tính liên kết) có thể được thực hiện để xác định liệu việc không quan sát thấy sự liên kết của kháng thể thử nghiệm là do liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như kháng thể tham chiếu hoặc nếu sự phong bế về mặt không gian (hoặc hiện tượng khác) gây ra việc không quan sát thấy sự liên kết. Các thử nghiệm dạng này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng ELISA, RIA, Biacore, đếm tế bào theo dòng chảy hoặc thử nghiệm liên kết kháng thể định tính-định lượng bất kỳ khác sẵn có trong lĩnh vực. Theo các phương án nhất định theo sáng chế, hai kháng thể liên kết với cùng một (hoặc trùng khớp) quyết định kháng nguyên nếu, ví dụ, vượt quá 1, 5, 10, 20 hoặc 100 lần của một kháng thể ức chế liên kết kháng thể kia ít nhất là 50% nhưng tốt hơn là 75%, 90% hoặc thậm chí là 99% như được xác định trong thử nghiệm liên kết cạnh tranh (xem, ví dụ, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990:50:1495-1502). Ngoài ra, hai kháng thể được coi là liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên nếu gần như tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên mà làm giảm hoặc ngăn chặn việc liên kết của ppyk kháng thể, làm giảm hoặc

ngăn chặn việc liên kết của kháng thể kia. Hai kháng thể được coi là có "quyết định kháng nguyên trùng khớp" nếu chỉ có các nhóm nhỏ của đột biến axit amin làm giảm hoặc ngăn chặn việc liên kết của một kháng thể, làm giảm hoặc ngăn chặn việc liên kết của kháng thể kia.

Để xác định xem kháng thể cạnh tranh để liên kết (hoặc cạnh tranh chéo để liên kết) với kháng thể kháng LEPR tham chiếu, phương pháp liên kết được mô tả trên đây được thực hiện theo hai hướng: theo hướng thứ nhất, kháng thể tham chiếu được cho liên kết với protein LEPR trong điều kiện bão hòa, sau đó xác định việc liên kết của kháng thể thử nghiệm với phân tử LEPR. Theo hướng thứ hai, kháng thể thử nghiệm được cho liên kết với phân tử LEPR trong điều kiện bão hòa, sau đó xác định việc liên kết của kháng thể tham chiếu với phân tử LEPR. Nếu, trong cả hai hướng này, chỉ có kháng thể thứ nhất (bão hòa) có khả năng liên kết với phân tử LEPR, thì kết luận được rằng kháng thể thử nghiệm và kháng thể tham chiếu cạnh tranh để liên kết với LEPR. Như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, kháng thể mà cạnh tranh để liên kết với kháng thể tham chiếu có thể không nhất thiết phải liên kết với cùng một quyết định kháng nguyên như kháng thể tham chiếu, nhưng có thể phong bế về mặt không gian đối với việc liên kết của kháng thể tham chiếu bằng cách liên kết quyết định kháng nguyên trùng khớp hoặc liên kề.

Điều chế kháng thể người

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

Bằng cách sử dụng kỹ thuật VELOCIMMUNE™, ví dụ, hoặc phương pháp tương tự bất kỳ đã biết khác để tạo ra kháng thể đơn dòng hoàn chỉnh ở người, kháng thể khả năng ái lực cao với LEPR được phân lập ban đầu có vùng biến đổi ở người và vùng hằng định của chuột. Như trong phần thử nghiệm dưới đây, kháng thể được xác định đặc tính và chọn cho đặc tính mong muốn bao gồm ái lực, hoạt tính phong bế phối tử, độ chọn lọc, quyết định kháng nguyên, v.v. Nếu cần, vùng hằng định của chuột được thay thế bằng vùng hằng định ở người mong muốn, ví dụ, IgG1 hoặc IgG4

kiểu đại hoặc được biến đổi, để tạo ra kháng thể kháng LEPR hoàn chỉnh ở người. Mặc dù vùng hằng định được chọn có thể thay đổi theo mục đích cụ thể, liên kết với kháng nguyên ái lực cao và đặc tính đặc hiệu đích là do vùng biến đổi tạo ra. Trong các trường hợp nhất định, kháng thể kháng LEPR hoàn chỉnh ở người được phân lập trực tiếp từ tế bào B dương tính với kháng nguyên.

Tương đương sinh học

Kháng thể kháng LEPR và mảnh kháng thể theo sáng chế bao gồm protein có trình tự axit amin thay đổi so với protein có trình tự axit amin của kháng thể được mô tả nhưng giữ được khả năng liên kết với LEPR ở người. Biến thể kháng thể và mảnh kháng thể này chứa một hoặc nhiều sự thêm, mất, hoặc thay thế axit amin so với trình tự bố mẹ, nhưng có hoạt tính sinh học gần như tương đương với hoạt tính sinh học của kháng thể được mô tả. Tương tự, trình tự ADN mã hoá kháng thể kháng LEPR theo sáng chế bao gồm trình tự chứa một hoặc nhiều sự thêm, mất, hoặc thay thế nucleotit so với trình tự theo sáng chế, nhưng mã hóa kháng thể kháng LEPR hoặc mảnh kháng thể gần như tương đương sinh học với kháng thể kháng LEPR hoặc mảnh kháng thể theo sáng chế. Ví dụ về các biến thể axit amin và trình tự ADN như vậy được mô tả trên đây.

Hai protein liên kết với kháng nguyên, hoặc kháng thể, được xem là tương đương sinh học nếu, ví dụ, chúng tương đương về mặt được dụng hoặc thay thế về lẫn nhau về mặt được dụng mà tốc độ và mức độ hấp thu không có sự khác nhau đáng kể khi được dùng ở cùng liều lượng mol trong các điều kiện thử nghiệm tương tự, hoặc liều đơn hoặc đa liều. Một số kháng thể sẽ được xem là tương đương hoặc thay thế lẫn nhau về mặt được dụng nếu chúng tương đương về mức độ hấp thụ nhưng khác nhau về tốc độ hấp thụ và có thể được xem là tương đương sinh học vì những khác biệt về tốc độ hấp thụ là do có chủ đích và được tạo ra trong quá trình đánh dấu, không cần thiết phải duy trì được nồng độ thuốc hữu hiệu trong cơ thể đối với, ví dụ, việc sử dụng mạn tính, và được xem là không khác nhau đáng kể về mặt được dụng đối với sản phẩm thuốc cụ thể được nghiên cứu.

Theo một phương án, hai protein liên kết với kháng nguyên là tương đương sinh học nếu không có sự khác nhau đáng kể về mặt lâm sàng đối với độ an toàn, độ tinh khiết và hiệu lực của chúng.

Theo một phương án, hai protein liên kết với kháng nguyên là tương đương sinh học nếu bệnh nhân có thể thay đổi một hoặc nhiều lần giữa sản phẩm tham chiếu và sản phẩm sinh học mà không làm tăng nguy cơ của các tác dụng bất lợi, bao gồm sự thay đổi đáng kể về mặt lâm sàng trong tính sinh miễn dịch, hoặc giảm hiệu quả, so với liệu pháp trị liệu liên tục mà không thực hiện sự thay đổi trên đây.

Theo một phương án, hai protein liên kết với kháng nguyên là tương đương sinh học nếu chúng đều tác động bằng cơ chế chung hoặc các cơ chế tác động đối với điều kiện hoặc các điều kiện sử dụng, trong phạm vi mà các cơ chế như vậy được biết đến.

Tính tương đương sinh học có thể được chứng minh bằng các phương pháp *in vivo* và *in vitro*. Các 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 của kháng thể hoặc chất chuyển hóa của nó được xác định trong máu, huyết tương, huyết thanh, hoặc dịch sinh học khác dưới dạng hàm theo thời gian; (b) thử nghiệm *in vitro* mà tương ứng với và được cho là phù hợp với dữ liệu độ sinh khả dụng *in vivo* ở người; (c) thử nghiệm *in vivo* ở người hoặc động vật có vú khác trong đó tác dụng dược lý cấp tính thích hợp của kháng thể (hoặc đích của nó) được xác định dưới dạng hàm theo thời gian; và (d) trong thử nghiệm lâm sàng để kiểm soát nhằm xác định tính an toàn, hiệu lực, hoặc độ sinh khả dụng hoặc tính tương đương sinh học của kháng thể.

Các biến thể tương đương sinh học của kháng thể kháng LEPR theo sáng chế có thể được tạo cấu trúc bằng cách, ví dụ, thay thế gốc hoặc trình tự khác nhau hoặc loại bỏ các gốc trình tự kết thúc hoặc trình tự bên trong không cần cho hoạt tính sinh học. Ví dụ, gốc cystein không cần thiết đối với hoạt tính sinh học có thể được loại bỏ hoặc được thay thế bằng axit amin khác để ngăn ngừa sự tạo thành các cầu nối disulfua trong phân tử không thích hợp hoặc không cần thiết do quá trình phục hồi đặc tính. Trong các trường hợp khác, kháng thể tương đương sinh học có thể bao gồm các biến thể kháng thể kháng LEPR chứa những thay đổi về axit amin, mà biến đổi đặc tính glycosyl hóa của kháng thể, ví dụ, các đột biến ngăn ngừa hoặc loại bỏ quá trình glycosyl hóa.

Tính chọn lọc loài và tính phản ứng chéo loài

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng LEPR liên

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

Kháng thể đa đặc hiệu

Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đơn đặc hiệu hoặc đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép). Kháng thể đa đặc hiệu có thể đặc hiệu đối với các quyết định kháng nguyên khác nhau của một polypeptit đích hoặc có thể chứa miền liên kết kháng nguyên đặc hiệu với nhiều hơn một polypeptit đích. Xem, ví dụ, Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer et al., 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244. Kháng thể kháng LEPR theo sáng chế có thể được liên kết với hoặc đồng biểu hiện với phân tử chức năng khác, ví dụ, peptit hoặc protein khác. Ví dụ, kháng thể hoặc mảnh của nó có thể được liên kết về mặt chức năng (ví dụ, bằng liên hợp hóa học, dung hợp gen, liên kết không cộng hóa trị hoặc bằng cách khác) với một hoặc nhiều phân tử khác, như kháng thể hoặc mảnh kháng thể khác, để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép hoặc đa đặc hiệu có tính đặc hiệu liên kết thứ cấp.

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

Ví dụ về dạng kháng thể đặc hiệu kép có thể được sử dụng trong phạm vi của sáng chế bao gồm việc sử dụng miền C_{H3} globulin miễn dịch (Ig) thứ nhất và miền C_{H3} Ig thứ hai, trong đó miền C_{H3} Ig thứ nhất và thứ hai khác nhau bởi ít nhất một axit

amin, và trong đó ít nhất một sai khác về axit amin làm giảm sự liên kết của kháng thể đặc hiệu kép với Protein A so với kháng thể đặc hiệu kép không có sự sai khác về axit amin này. Theo một phương án, miền C_{H3} Ig thứ nhất liên kết với Protein A và miền C_{H3} Ig thứ hai chứa đột biến làm giảm hoặc ngăn chặn sự liên kết với Protein A như biến đổi H95R (bằng cách đánh số IMGT exon; H435R bằng cách đánh số EU). C_{H3} thứ hai có thể còn chứa biến đổi Y96F (bằng cách đánh số IMGT; Y436F bằng cách đánh số EU). Các biến đổi khác nữa có thể được tìm thấy trong C_{H3} thứ hai bao gồm: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, và V82I (bằng cách đánh số IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, và V422I bằng cách đánh số EU) trong trường hợp của kháng thể IgG1; N44S, K52N, và V82I (IMGT; N384S, K392N, và V422I bằng cách đánh số EU) trong trường hợp của kháng thể IgG2; và Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, và V82I (bằng cách đánh số IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, và V422I bằng cách đánh số EU) trong trường hợp của kháng thể IgG4. Các biến đổi về dạng kháng thể đặc hiệu kép được mô tả trên đây đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Ví dụ khác về dạng đặc hiệu kép khác có thể được sử dụng trong phạm vi của sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, dạng đặc hiệu kép diabody hoặc trên cơ sở scFv, dung hợp IgG-scFv, miền biến đổi kép (DVD)-Ig, Quadroma, bấm vào lỗ (knobs-into-holes), chuỗi nhẹ thông thường (ví dụ, chuỗi nhẹ thông thường bấm vào lỗ, v.v.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, vùng khóa kéo leuxin, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG tác động kép, và dạng đặc hiệu kép Mab² (xem, ví dụ, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, và các tài liệu tham khảo được viện dẫn trong bản mô tả này, để xem xét các dạng nêu trên). Kháng thể đặc hiệu kép có thể còn được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng sự liên hợp peptit/axit nucleic, ví dụ, trong đó axit amin không có trong tự nhiên với khả năng phản ứng hóa học trực giao được sử dụng để tạo ra thể liên hợp kháng thể-oligonucleotit đặc hiệu vị trí mà sau đó có thể tự lắp vào trong phức hợp phân phân với thành phần, hóa trị và hình thái học xác định. (xem, ví dụ, Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [Epub: Dec. 4, 2012]).

Dược phẩm trị liệu và sử dụng

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể kháng LEPR hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế. Dược phẩm theo sáng chế được bào chế với chất

mang, tá dược, và các chất khác thích hợp giúp làm cải thiện sự chuyển vận, sự phân phối, độ dung nạp và các yếu tố tương tự. Rất nhiều dược phẩm thích hợp có thể được tìm thấy trong công thức bào chế đã biết đối với tất cả các nhà hóa dược: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Các dược phẩm này bao gồm, ví dụ, dạng bột, bột nhão, thuốc mỡ, dạng thạch, sáp, dầu, lipit, chất dẫn thuốc chứa lipit (cation hoặc anion) (như LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), thể liên hợp ADN, bột nhão hấp thu khan, nhũ tương dầu-trong-nước và nước-trong-dầu, nhũ tương cacbovac (polyetylen glycol có khối lượng phân tử khác nhau), gel bán rắn, và hỗn hợp bán rắn chứa cacbovac. Cũng xem Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52:238-311.

Liều lượng kháng thể được dùng cho bệnh nhân có thể thay đổi tùy thuộc vào độ tuổi và kích thước của bệnh nhân, bệnh cần điều trị, tình trạng bệnh, đường dùng, và các yếu tố tương tự. Liều lượng được ưu tiên thường được tính toán theo thể trọng hoặc diện tích bề mặt cơ thể. Ở bệnh nhân trưởng thành, thuận lợi nếu dùng trong tĩnh mạch kháng thể theo sáng chế thường ở liều đơn nằm trong khoảng từ 0,01 đến khoảng 20 mg/kg thể trọng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,02 đến khoảng 7, 0,03 đến khoảng 5, hoặc khoảng 0,05 đến khoảng 3 mg/kg thể trọng. Tùy thuộc vào mức nghiêm trọng của tình trạng bệnh, tần suất sử dụng và thời gian điều trị có thể được điều chỉnh. Liều hữu hiệu và phác đồ dùng kháng thể kháng LEPR có thể được xác định theo kinh nghiệm; ví dụ, tiến triển của bệnh nhân có thể được theo dõi bằng cách đánh giá theo định kỳ, và liều lượng được điều chỉnh theo đó. Ngoài ra, việc xác định khoảng liều lượng cho các loài khác nhau có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).

Hệ phân phối đã biết và có thể được sử dụng để dùng dược phẩm theo sáng chế, ví dụ, bao trong liposom, vi hạt, vi nang, tế bào tái tổ hợp có khả năng biểu hiện virus đột biến, nhập bào qua trung gian thụ thể (xem, ví dụ, Wu et al., 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Các phương pháp đưa dược phẩm vào cơ thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trong da, trong cơ, trong bụng, trong tĩnh mạch, dưới da, trong mũi, trên màng cứng, và qua đường miệng. Dược phẩm có thể được đưa vào cơ thể bằng đường dùng thông thường bất kỳ, ví dụ, bằng cách truyền hoặc tiêm nhanh một liều, bằng

cách hấp thu qua lớp biểu bì hoặc niêm mạc da (ví dụ, niêm mạc miệng, niêm mạc trực tràng và ruột, v.v.) và có thể được dùng cùng với các hoạt chất sinh học khác. Việc dùng có thể là toàn thân hoặc tại chỗ.

Dược phẩm theo sáng chế có thể được phân phối dưới da hoặc trong tĩnh mạch bằng ống tiêm và kim tiêm tiêu chuẩn. Ngoài ra, đối với việc phân phối dưới da, thiết bị phân phối dạng bút có sẵn có thể dễ dàng ứng dụng để phân phối dược phẩm theo sáng chế. Thiết bị phân phối dạng bút này có thể tái sử dụng hoặc dùng một lần. Thiết bị phân phối dạng bút tái sử dụng thường dùng hộp chứa có thể thay thế để chứa dược phẩm trong đó. Khi tất cả dược phẩm trong hộp chứa này đã dùng hết và hộp này rỗng, thì hộp chứa rỗng này có thể vứt bỏ một cách dễ dàng và được thay thế bằng hộp mới chứa dược phẩm. Thiết bị phân phối dạng bút có thể được tái sử dụng. Thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần thì không có hộp thay thế. Thay vào đó, thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần được nạp sẵn dược phẩm trong ngăn chứa của thiết bị. Khi ngăn chứa hết dược phẩm thì toàn bộ dụng cụ này bị vứt bỏ.

Nhiều thiết bị phân phối dạng bút và tiêm tự động tái sử dụng được dùng để phân phối dưới da dược phẩm theo sáng chế. Ví dụ về các thiết bị phân phối như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bút AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Anh), bút DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Thụy Sĩ), bút HUMALOG MIX 75/25™, bút HUMALOG™, bút HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, Ấn Độ), NOVOPEN™ I, II và III (Novo Nordisk, Copenhagen, Đan Mạch), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Đan Mạch), bút BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Mỹ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, và OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Đức), là tên của một số ít thiết bị phân phối. Ví dụ về thiết bị phân phối dạng bút dùng một lần được dùng để phân phối dưới da dược phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, bút SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), và KWIKPEN™ (Eli Lilly), dụng cụ tiêm tự động SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Đức), EPIPEN (Dey, L.P.), và bút HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), là tên của một số ít thiết bị phân phối.

Trong các trường hợp nhất định, dược phẩm có thể được phân phối trong hệ

giải phóng có kiểm soát. Theo một phương án, bơm có thể được sử dụng (xem Langer, nêu trên; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201). Theo phương án khác, vật liệu polyme có thể được sử dụng; xem, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), 1974, *CRC Pres.*, Boca Raton, Florida. Theo phương án khác nữa, hệ giải phóng có kiểm soát có thể được đặt ở vị trí lân cận với đích của dược phẩm, do đó chỉ cần một phần của liều toàn thân (xem, ví dụ, Goodson, 1984, in *Medical Applications of Controlled Release*, nêu trên, vol. 2, pp. 115-138). Các hệ giải phóng có kiểm soát khác được thảo luận trong bài báo của Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

Các dược phẩm tiêm có thể bao gồm dạng liều để tiêm tĩnh mạch, dưới da, trong da và trong cơ, truyền nhỏ giọt, v.v. Các dược phẩm tiêm này có thể được bào chế bằng các phương pháp đã biết công khai. Ví dụ, các dược phẩm tiêm có thể được bào chế, ví dụ, bằng cách hòa tan, tạo huyền phù hoặc nhũ hóa kháng thể hoặc muối của nó được mô tả trên đây trong môi trường nước vô trùng hoặc môi trường dầu được sử dụng thông thường để tiêm. Môi trường nước để tiêm bao gồm, ví dụ, dung dịch nước muối sinh lý, dung dịch đẳng trương chứa glucoza và các chất bổ trợ khác, v.v., có thể được sử dụng kết hợp với chất làm 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, polysorbate 80, sản phẩm cộng HCO-50 (polyoxyetylen (50 mol) của dầu thầu dầu hydro hóa)], v.v. Môi trường dầu có thể sử dụng bao gồm, ví dụ, dầu vừng, dầu đậu tương, v.v., có thể được sử dụng kết hợp với chất làm tan như benzyl benzoat, rượu benzylic, v.v. Tốt hơn là, dược phẩm tiêm được bào chế được nạp vào ống thuốc tiêm thích hợp.

Thuận lợi nếu, dược phẩm để dùng theo đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa được mô tả trên đây được bào chế thành các dạng liều trong liều đơn vị được làm thích hợp với liều chứa thành phần hoạt tính. Dạng liều lượng này ở dạng liều đơn vị bao gồm, ví dụ, viên nén, thuốc viên, viên nang, thuốc tiêm (ống thuốc tiêm), viên thuốc đạn, v.v. lượng kháng thể trên đây thường có mặt với lượng trong khoảng từ 5 đến khoảng 500 mg cho mỗi dạng liều ở dạng liều đơn vị; đặc biệt là dạng tiêm, tốt hơn là kháng thể nêu trên có mặt với lượng trong khoảng từ 5 đến khoảng 100 mg và trong khoảng từ 10 đến khoảng 250 mg đối với các dạng liều lượng khác.

Sử dụng kháng thể để trị liệu

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

Kháng thể theo sáng chế có hiệu quả, không kể những thứ khác, trong điều trị, ngăn ngừa và/hoặc làm thuyên giảm bệnh hoặc rối loạn bất kỳ liên quan đến hoặc do chứng thiếu hụt leptin, chứng kháng leptin, chứng giảm leptin huyết, hoặc bằng cách khác gây ra có thể được điều trị bằng cách kích thích hoặc hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu LEPR hoặc có tác dụng giống hoạt tính tự nhiên của leptin *in vitro* hoặc *in vivo*. Ví dụ, kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế có hiệu quả trong điều trị tình trạng rối loạn chuyển hóa lipid. Ví dụ về tình trạng rối loạn chuyển hóa lipid được điều trị bằng kháng thể và mảnh liên kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm, ví dụ, chứng rối loạn chuyển hóa lipid tổng quát bẩm sinh, chứng rối loạn chuyển hóa lipid tổng quát mắc phải, chứng rối loạn chuyển hóa lipid một phần có yếu tố di truyền, chứng rối loạn chuyển hóa lipid một phần mắc phải, chứng rối loạn chuyển hóa lipid ổ bụng, chứng mất mỡ cục bộ dưới da, chứng rối loạn chuyển hóa lipid cục bộ, và chứng rối loạn chuyển hóa lipid liên quan đến HIV.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể kháng LEPR và mảnh liên kết kháng nguyên của nó có hiệu quả trong việc khôi phục quá trình truyền tín hiệu leptin đến tế bào, mô và cơ quan biểu hiện một hoặc nhiều đột biến LEPR liên quan đến bệnh béo phì. Ví dụ, các thể đột biến LEPR nhất định đã được xác định là không có khả năng truyền tín hiệu hoặc truyền tín hiệu với mức suy giảm khi có mặt của leptin và liên quan đến bệnh béo phì và các rối loạn có liên quan. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thể đột biến LEPR không có khả năng truyền tín hiệu khi có mặt của leptin được gọi là “thể đột biến LEPR thiếu hụt khả năng truyền tín hiệu.” Đột biến LEPR thiếu hụt khả năng truyền tín hiệu minh họa là LEPR-A409E (Farooqi *et al.*, 2007, *N Engl J Med* 356(3): 237-247). Như được sử dụng trong bản mô tả này, thể đột biến LEPR có khả năng truyền tín hiệu giảm khi có mặt của leptin (so với LEPR dạng đại) được gọi là

“thể đột biến LEPR suy giảm khả năng truyền tín hiệu.” Đột biến LEPR suy giảm khả năng truyền tín hiệu minh họa là LEPR-P316T (Mazen *et al.*, 2011, *Mol Genet Metab* 102:461-464). Do đó, sáng chế bao gồm kháng thể kháng LEPR và mảnh liên kết kháng nguyên của nó có hiệu quả trong điều trị, ngăn ngừa và/hoặc làm thuyên giảm các bệnh và các rối loạn gây ra bởi hoặc liên quan đến một hoặc nhiều thể đột biến LEPR thiếu hụt khả năng truyền tín hiệu (ví dụ, A409E) và/hoặc suy giảm khả năng truyền tín hiệu (ví dụ, P316T).

Kháng thể kháng LEPR và mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo sáng chế cũng có hiệu quả điều trị hoặc ngăn ngừa một hoặc nhiều bệnh hoặc rối loạn được chọn từ nhóm bao gồm bệnh béo phì, hội chứng trao đổi chất, chứng thèm ăn do chế độ ăn uống, bệnh vô kinh dưới đồi chức năng, bệnh đái đường typ 1, bệnh đái đường typ 2, kháng insulin, chứng kháng insulin nặng bao gồm chứng kháng insulin nặng do đột biến thụ thể insulin, chứng kháng insulin nặng không phải do đột biến thụ thể insulin, chứng kháng insulin nặng gây ra bởi sự đột biến các con đường truyền tín hiệu bên dưới hoặc gây ra bởi các nguyên nhân khác, bệnh gan nhiễm mỡ do rượu và không do rượu, bệnh Alzheimer, chứng thiếu hụt leptin, chứng kháng leptin, chứng rối loạn chuyển hóa lipid, hội chứng Leprechaunism/Donohue, hội chứng Rabson-Mendenhall.

Trong phạm vi các phương pháp điều trị được đề cập trong bản mô tả này, kháng thể kháng LEPR có thể được dùng làm đơn trị liệu (tức là dưới dạng tác nhân trị liệu duy nhất) hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung (ví dụ về các tác nhân này được mô tả ở phần khác trong bản mô tả này).

Liệu pháp trị liệu kết hợp và dược phẩm

Sáng chế bao gồm dược phẩm và chế phẩm điều trị chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng LEPR được đề cập trong bản mô tả này kết hợp với một hoặc nhiều thành phần hoạt tính bổ sung có tác dụng điều trị bệnh, và các phương pháp điều trị bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị bệnh dùng các hỗn hợp như vậy.

Kháng thể kháng LEPR theo sáng chế có thể được tạo ra đồng thời với và/hoặc được dùng kết hợp với một hoặc nhiều thành phần hoạt tính bổ sung có tác dụng điều trị bệnh, như, ví dụ, dược phẩm được kê đơn để điều trị bệnh béo phì, chứng tăng cholesterol huyết, chứng tăng lipid huyết, bệnh đái đường typ 2, bệnh đái đường typ 1, chứng mất kiểm soát bệnh béo phì, chứng vô sinh, v.v. Ví dụ về các thành phần

hoạt tính có tác dụng điều trị các bệnh bổ sung bao gồm, ví dụ, leptin tái tổ hợp ở người (ví dụ, metreleptin [MYALEPT]), chất ức chế PCSK9 (ví dụ, kháng thể kháng PCSK9 [alirocumab, evolocumab, bococizumab, lodelcizumab, ralpancizumab, v.v.]), statin (atorvastatin, rosuvastatin, cerivastatin, pitavastatin, fluvastatin, simvastatin, lovastatin, pravastatin, v.v.), ezetimib, insulin, biến thể insulin, chất kích thích sự tiết insulin, metformin, sulfonilure, chất ức chế chất đồng chuyển vận natri glucoza 2 (SGLT2) (ví dụ, dapagliflozin, canagliflozin, empagliflozin, v.v.), chất chủ vận/chất tương tự GLP-1 (ví dụ, extendin-4, exenatit, liraglutit, lixisenatit, albiglutit, dulaglutit, v.v.), chất ức chế glucagon (GCG) (ví dụ, kháng thể kháng GCG), chất ức chế thụ thể glucagon (GCGR) (ví dụ, kháng thể kháng GCGR, chất đối kháng GCGR phân tử nhỏ, oligonucleotit đối nghĩa đặc hiệu GCGR, aptame kháng GCGR [ví dụ, Spiegelme], v.v.), chất ức chế protein giống angiopoietin (ANGPTL) (ví dụ, kháng thể kháng ANGPTL3, kháng thể kháng ANGPTL4, kháng thể kháng ANGPTL8, v.v.), Phentermine, Orlistat, Topiramat, Bupropion, Topiramat/Phentermine, Bupropion/Naltrexon, Bupropion/Zonisamit, Pramlintit/Metreleptin, Lorcaserin, Cetilistat, Tesofensin, Velneperit, v.v.

Các thành phần hoạt tính bổ sung có tác dụng điều trị bệnh, ví dụ, chất bất kỳ trong số các chất nêu trên hoặc các dẫn xuất của chúng, có thể được dùng ngay trước khi, đồng thời với, hoặc ngay sau khi dùng kháng thể kháng LEPR theo sáng chế; (nhằm mục đích của sáng chế, phác đồ dùng như vậy được xem là việc dùng kháng thể kháng LEPR "kết hợp với" thành phần hoạt tính có tác dụng điều trị bệnh bổ sung). Sáng chế bao gồm được phẩm chứa kháng thể kháng LEPR theo sáng chế được bào chế đồng thời với một hoặc nhiều thành phần hoạt tính có tác dụng điều trị bệnh bổ sung như được đề cập trong bản mô tả này.

Phác đồ dùng

Theo các phương án nhất định theo sáng chế, các liều của kháng thể kháng LEPR (hoặc được phẩm chứa tổ hợp gồm kháng thể kháng LEPR và hoạt chất có tác dụng điều trị bổ sung trong số các hoạt chất trị liệu bổ sung bất kỳ được đề cập trong bản mô tả này) có thể được dùng cho đối tượng trong thời gian điều trị xác định. Phương pháp theo khía cạnh này của sáng chế bao gồm bước cho đối tượng sử dụng liên tiếp các liều kháng thể kháng LEPR theo sáng chế. Như được sử dụng trong bản

mô tả này, "sử dụng liên tiếp" có nghĩa là mỗi liều kháng thể kháng LEPR được dùng cho đối tượng ở nhiều thời điểm khác nhau, ví dụ, vào các ngày khác nhau được tách riêng bằng khoảng thời gian xác định trước (ví dụ, giờ, ngày, tuần hoặc tháng). Sáng chế đề cập đến các phương pháp bao gồm bước cho bệnh nhân dùng liều đơn đầu tiên của kháng thể kháng LEPR, tiếp theo là một hoặc nhiều liều thứ hai của kháng thể kháng LEPR, và tùy ý sau đó là một hoặc nhiều liều thứ ba của kháng thể kháng LEPR.

Các thuật ngữ "liều thứ nhất," "liều thứ hai," và "liều thứ ba," dùng để chỉ trình tự theo thời gian của việc dùng kháng thể kháng LEPR theo sáng chế. Do đó, "liều thứ nhất" là liều lượng được dùng ở thời điểm bắt đầu phác đồ điều trị (còn được gọi là "liều cơ sở," "liều nạp," "liều bắt đầu," và các dạng tương tự); "liều thứ hai" là liều được dùng sau liều thứ nhất; và "liều thứ ba" là liều được dùng sau liều thứ hai. Liều thứ nhất, thứ hai, và thứ ba có thể đều chứa cùng một lượng kháng thể kháng LEPR, nhưng thường có thể khác nhau về tần suất sử dụng. Tuy nhiên, theo một số phương án, lượng kháng thể kháng LEPR có mặt trong liều thứ nhất, thứ hai và/hoặc thứ ba thay đổi khác nhau (ví dụ, được điều chỉnh tăng lên hoặc giảm đi sao cho thích hợp) trong suốt quá trình điều trị. Theo một số phương án, hai hoặc nhiều (ví dụ, 2, 3, 4, hoặc 5) liều được dùng ở thời điểm bắt đầu phác đồ điều trị dưới dạng "liều nạp", tiếp theo là liều tiếp theo sử dụng trên cơ sở tần suất ít hơn (ví dụ, "liều lượng duy trì").

Sử dụng kháng thể trong chẩn đoán và phân tích

Kháng thể kháng LEPR theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để phát hiện và/hoặc đo LEPR hoặc tế bào biểu hiện LEPR trong mẫu, ví dụ, nhằm mục đích chẩn đoán. Ví dụ, kháng thể kháng LEPR, hoặc mảnh của nó, có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh hoặc tình trạng bệnh được đặc trưng bởi biểu hiện bất thường (ví dụ, biểu hiện quá mức, biểu hiện dưới mức, không biểu hiện, v.v.) của LEPR. Ví dụ về thử nghiệm chẩn đoán LEPR có thể bao gồm, ví dụ, cho mẫu, thu được từ bệnh nhân, tiếp xúc với kháng thể kháng LEPR theo sáng chế, trong đó kháng thể kháng LEPR được đánh dấu bằng chất đánh dấu có thể phát hiện được hoặc phân tử báo cáo. Ngoài ra, kháng thể kháng LEPR không được đánh dấu có thể được sử dụng chẩn đoán kết hợp với kháng thể thứ hai được tự được đánh dấu theo cách phát hiện được. Chất đánh dấu hoặc phân tử báo cáo có thể phát hiện được có thể là đồng vị phóng xạ, như ^3H , ^{14}C ,

^{32}P , ^{35}S , hoặc ^{125}I ; gốc huỳnh quang hoặc quang hóa như fluorescein isothiocyanat, hoặc rhodamin; hoặc enzym như alkaline phosphatase, beta-galactosidase, horseradish peroxidase, hoặc luciferase. Ví dụ về thử nghiệm cụ thể có thể được sử dụng để phát hiện hoặc xác định LEPR trong mẫu bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm phân loại tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACS), và kỹ thuật ghi hình cắt lớp phát positron (PET).

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

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau được đưa ra nhằm cung cấp cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này với phần bộc lộ và mô tả hoàn chỉnh về phương pháp bào chế và sử dụng được phẩm và phương pháp theo sáng chế, và không dự định giới hạn phạm vi ở những gì mà các tác giả sáng chế đề cập trong sáng chế của họ. Các nỗ lực đã được thực hiện để đảm bảo tính chính xác về các con số được sử dụng (ví dụ: số lượng, nhiệt độ, v.v.) nhưng sai số thực nghiệm và độ lệch là không thể tránh được. Trừ khi có quy định khác, phần là phần theo khối lượng, khối lượng phân tử là khối lượng phân tử trung bình, nhiệt độ là nhiệt độ Celsius, và áp suất là ở hoặc gần áp suất khí quyển.

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

Kháng thể kháng LEPR thu được bằng cách tạo miễn dịch chuột VELOCIMMUNE® (tức là chuột đã được thiết kế di truyền chứa AND mã hóa cho vùng biến đổi của chuỗi nhẹ kappa và chuỗi nặng của globulin miễn dịch người) với chất sinh miễn dịch chứa miền ngoại bào của LEPR. Đáp ứng miễn dịch của kháng thể

được quan sát bằng thử nghiệm miễn dịch đặc hiệu LEPR. Bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trên đây, kháng thể kháng LEPR ở người hoàn chỉnh được phân lập và tinh sạch.

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

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

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

Bảng 1: Mã nhận dạng trình tự axit amin

	SEQ ID NO:							
Tên kháng thể	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H16650P2	2	4	6	8	10	12	14	16
H4H16679P2	18	20	22	24	10	12	14	16
H4H17319P2	26	28	30	32	10	12	14	16
H4H17321P2	34	36	38	40	10	12	14	16
H4H18417P2	42	44	46	48	10	12	14	16
H4H18438P2	50	52	54	56	10	12	14	16
H4H18445P2	58	60	62	64	10	12	14	16
H4H18446P2	66	68	70	72	10	12	14	16
H4H18449P2	74	76	78	80	10	12	14	16
H4H18482P2	82	84	86	88	90	92	94	96
H4H18487P2	98	100	102	104	90	92	94	96
H4H18492P2	106	108	110	112	90	92	94	96

Bảng 2: Mã nhận dạng trình tự axit nucleic

	SEQ ID NO:							
Tên kháng thể	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H16650P2	1	3	5	7	9	11	13	15
H4H16679P2	17	19	21	23	9	11	13	15

	SEQ ID NO:							
Tên kháng thể	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H17319P2	25	27	29	31	9	11	13	15
H4H17321P2	33	35	37	39	9	11	13	15
H4H18417P2	41	43	45	47	9	11	13	15
H4H18438P2	49	51	53	55	9	11	13	15
H4H18445P2	57	59	61	63	9	11	13	15
H4H18446P2	65	67	69	71	9	11	13	15
H4H18449P2	73	75	77	79	9	11	13	15
H4H18482P2	81	83	85	87	89	91	93	95
H4H18487P2	97	99	101	103	89	91	93	95
H4H18492P2	105	107	109	111	89	91	93	95

Trong bản mô tả này, kháng thể thường được gọi theo danh pháp sau: tiền tố Fc (ví dụ, "H4H," "H1M," "H2M," v.v.), tiếp theo là số nhận dạng (ví dụ, "16650," "16679," v.v.), tiếp theo là hậu tố "P" hoặc "N". Do đó, theo danh pháp này, kháng thể có thể được gọi trong bản mô tả này là là, ví dụ, "H4H16650P2," "H4H16679P2," v.v. Tiền tố Fc trong kí hiệu kháng thể được sử dụng trong bản mô tả này (H4H, H1M và H2M) dùng để chỉ kiểu tương đương của vùng Fc cụ thể của kháng thể. Ví dụ, kháng thể "H4H" có Fc IgG4 ở người, trong khi đó kháng thể "H1M" có Fc IgG1 của chuột, (tất cả vùng biến đổi là ở người hoàn chỉnh được thể hiện bằng chữ 'H' thứ nhất trong ký hiệu kháng thể). Như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, kháng thể có kiểu tương đương của vùng Fc cụ thể có thể được chuyển đổi thành kháng thể có kiểu tương đương của vùng Fc khác (ví dụ, kháng thể có Fc IgG1 của chuột có thể được chuyển đổi thành kháng thể có IgG4 ở người, v.v.), nhưng trong trường hợp bất kỳ, miền biến đổi (bao gồm CDR) – được thể hiện bằng số nhận dạng trong các Bảng 1 và 2 – sẽ giữ nguyên không đổi, và các đặc tính liên kết được cho là giống nhau hoặc gần như tương tự bất kể bản chất của miền Fc.

“MAb so sánh” như được sử dụng trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dùng để chỉ Fab9F8 được mô tả trong Fazeli *et al.* (2006) J Immunol Methods 312:190-200 và Carpenter *et al.* (2012) Structure 20(3):487-97.

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

Giá trị hằng số phân ly cân bằng (Giá trị K_D) để LEPR liên kết với kháng thể đơn dòng kháng LEPR tinh sạch được xác định bằng cách sử dụng cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt thời gian thực sử dụng thiết bị Biacore 4000. Tất cả các nghiên cứu liên kết được thực hiện trong 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, và 0,05% thể tích/thể tích chất hoạt động bề mặt Tween-20, dung dịch đệm xử lý pH 7,4 (HBS-ET) ở 25°C và 37°C. Trước tiên, bề mặt cảm biến sinh học Biacore được tạo dẫn xuất bằng cách bắt cặp amin với kháng thể đơn dòng ở chuột kháng Fc người (GE, # BR-1008-39) để bắt giữ kháng thể đơn dòng kháng LEPR. Các nghiên cứu liên kết được thực hiện trên các chất phản ứng LEPR sau: miền ngoại bào LEPR ở người được biểu hiện bằng nhãn dán myc-myc-hexahistidin đầu C (hLEPR.mmh; SEQ ID NO: 114), miền ngoại bào LEPR của khí đuôi dài *Macaca fascicularis* được biểu hiện bằng nhãn dán myc-myc-hexahistidin đầu C (mfLEPR.mmh; SEQ ID NO: 117), miền ngoại bào LEPR ở người được biểu hiện bằng nhãn dán Fc IgG2a đầu C của chuột (hLEPR.mFc; SEQ ID NO: 115), miền ngoại bào LEPR của chuột được biểu hiện bằng nhãn dán myc-myc-hexahistidin đầu C (mLEPR.mmh; SEQ ID NO: 118) và miền ngoại bào LEPR của chuột cống được biểu hiện bằng nhãn dán myc-myc-hexahistidin đầu C (rLEPR.mmh; SEQ ID NO: 119). Nồng độ khác nhau của chất phản ứng LEPR đầu tiên được tạo ra trong dung dịch đệm xử lý HBS-ET (100nM – 3,7nM; pha loãng liên tiếp 3 lần) và được phun lên bề mặt bị chiếm giữ bởi kháng thể đơn dòng kháng LEPR bị bắt giữ kháng Fc người trong 4 phút ở tốc độ dòng là 30µL/phút, trong khi sự phân ly của kháng thể đơn dòng đã liên kết chất phản ứng LEPR được quan sát trong 10 phút trong dung dịch đệm xử lý HBS-ET. Hằng số tốc độ liên kết động học (k_a) và phân ly động học (k_d) được xác định bằng cách điều chỉnh sensorgram liên kết thời gian thực thành kiểu liên kết 1:1 có giới hạn truyền chất bằng cách sử dụng phần mềm điều chỉnh đường cong Scrubber 2,0c. Hằng số cân bằng phân ly liên kết (K_D) và thời gian bán phân ly ($t_{1/2}$) được tính toán từ hằng số tốc độ động học theo phương trình sau:

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

Thông số động học liên kết với hLEPR.mmh, mfLEPR.MMH hoặc

hLEPR.mFc, liên kết với kháng thể đơn dòng kháng LEPR khác theo sáng chế tại 25°C và 37°C được trình bày trong các Bảng 3 đến 8.

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

mAb được bắt giữ	Mức bắt giữ mAb (RU)	100nM hLEPR-MMH đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H16650P2	$167 \pm 0,3$	51	2,81E+04	2,23E-04	7,93E-09	52
H4H16679P2	$192 \pm 0,7$	39	2,34E+04	2,46E-04	1,05E-08	47
H4H18417P2	$163 \pm 0,4$	28	6,14E+04	7,90E-03	1,29E-07	1,5
H4H18438P2	$166 \pm 0,4$	22	3,00E+04	2,26E-03	7,54E-08	5,1
H4H18445P2	$194 \pm 1,1$	45	4,42E+04	4,78E-03	1,08E-07	2,4
H4H18446P2	$163 \pm 2,4$	16	1,81E+04	9,51E-04	5,25E-08	12
H4H18449P2	$176 \pm 1,3$	54	2,91E+04	2,35E-04	8,08E-09	49
H4H18482P2	$163 \pm 0,4$	47	6,31E+04	6,77E-03	1,07E-07	1,7
H4H18487P2	$190 \pm 1,2$	42	4,73E+04	7,03E-03	1,48E-07	1,6
H4H18492P2	$167 \pm 3,1$	87	8,10E+04	8,98E-04	1,11E-08	13
H4H17319P2	$200 \pm 0,4$	36	2,61E+04	5,29E-04	2,03E-08	22
H4H17321P2	$221 \pm 0,5$	32	2,36E+04	1,96E-04	8,31E-09	59
mAb đối chứng isotyp	$171 \pm 0,4$	4	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB chỉ ra rằng mức liên kết trong điều kiện thử nghiệm hiện tại không quan sát được.

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

mAb được bắt giữ	Mức bắt giữ mAb (RU)	100nM hLEPR-MMH đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H16650P2	$210 \pm 2,5$	77	4,85E+04	9,58E-04	1,98E-08	12
H4H16679P2	239 ± 2	61	3,84E+04	8,42E-04	2,19E-08	14

mAb được bắt giữ	Mức bắt giữ mAb (RU)	100nM hLEPR-MMH đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H18417P2	$206 \pm 3,2$	22	$7,70E+04$	$1,80E-02$	$2,33E-07$	0,6
H4H18438P2	$206 \pm 2,4$	32	$3,38E+04$	$5,76E-03$	$1,70E-07$	2,0
H4H18445P2	234 ± 2	38	$5,13E+04$	$1,68E-02$	$3,26E-07$	0,7
H4H18446P2	$188 \pm 3,4$	21	$2,12E+04$	$2,56E-03$	$1,21E-07$	4,5
H4H18449P2	$206 \pm 2,1$	73	$3,94E+04$	$8,15E-04$	$2,07E-08$	14
H4H18482P2	$188 \pm 0,8$	38	$9,53E+04$	$1,93E-02$	$2,03E-07$	0,6
H4H18487P2	$219 \pm 1,7$	30	$6,51E+04$	$1,86E-02$	$2,86E-07$	0,6
H4H18492P2	$192 \pm 2,2$	93	$1,17E+05$	$4,18E-03$	$3,59E-08$	2,8
H4H17319P2	$264 \pm 0,3$	44	$3,54E+04$	$3,41E-03$	$9,63E-08$	3,4
H4H17321P2	$290 \pm 0,4$	61	$2,95E+04$	$4,38E-04$	$1,48E-08$	26
mAb đối chứng isotyp	$193 \pm 1,5$	6	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB chỉ ra rằng mức liên kết trong điều kiện thử nghiệm hiện tại không quan sát được.

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

mAb được bắt giữ	Mức bắt giữ mAb (RU)	100nM mfLEPR.MMH đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H16650P2	$166 \pm 0,6$	93	$6,02E+04$	$1,37E-04$	$2,27E-09$	84
H4H16679P2	$191 \pm 0,7$	66	$4,37E+04$	$1,41E-04$	$3,22E-09$	82
H4H18417P2	$162 \pm 0,3$	33	$8,83E+04$	$1,23E-02$	$1,39E-07$	0,9
H4H18438P2	$166 \pm 0,6$	5	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18445P2	$193 \pm 0,6$	58	$5,90E+04$	$4,86E-03$	$8,24E-08$	2,4
H4H18446P2	$163 \pm 2,8$	23	$1,93E+04$	$1,12E-03$	$5,83E-08$	10
H4H18449P2	$175 \pm 0,5$	6	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18482P2	$163 \pm 0,8$	63	$1,01E+05$	$6,74E-03$	$6,66E-08$	1,7
H4H18487P2	$189 \pm 0,5$	59	$7,37E+04$	$6,79E-03$	$9,21E-08$	1,7

mAb được bắt giữ	Mức bắt giữ mAb (RU)	100nM mfLEPR.M MH đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H18492P2	$165 \pm 2,4$	52	$1,10E+05$	$1,20E-02$	$1,10E-07$	1,0
H4H17319P2	$213 \pm 0,5$	83	$4,00E+04$	$4,63E-04$	$1,16E-08$	25
H4H17321P2	$236 \pm 0,4$	75	$3,26E+04$	$1,33E-04$	$4,07E-09$	87
MAb đối chứng isotyp	$171 \pm 0,4$	0	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB chỉ ra rằng mức liên kết trong điều kiện thử nghiệm hiện tại không quan sát được.

*IC chỉ ra rằng mức liên kết quan sát được và không thể điều chỉnh được dữ liệu liên kết thời gian thực trong điều kiện thử nghiệm hiện tại.

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

mAb được bắt giữ	Mức bắt giữ mAb (RU)	100nM mfLEPR.M MH đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H16650P2	$204 \pm 1,7$	134	$1,22E+05$	$7,00E-04$	$5,76E-09$	16
H4H16679P2	$232 \pm 1,1$	104	$6,49E+04$	$6,77E-04$	$1,04E-08$	17
H4H18417P2	$202 \pm 1,3$	28	$1,22E+05$	$2,63E-02$	$2,17E-07$	0,4
H4H18438P2	$203 \pm 1,3$	7	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18445P2	$232 \pm 0,9$	48	$7,17E+04$	$1,90E-02$	$2,64E-07$	0,6
H4H18446P2	$188 \pm 2,9$	30	$2,53E+04$	$3,54E-03$	$1,40E-07$	3,3
H4H18449P2	202 ± 1	6	IC*	IC*	IC*	IC*
H4H18482P2	$187 \pm 1,2$	52	$1,52E+05$	$2,04E-02$	$1,34E-07$	0,6
H4H18487P2	$216 \pm 0,7$	44	$1,10E+05$	$1,95E-02$	$1,78E-07$	0,6
H4H18492P2	$191 \pm 1,4$	34	$2,34E+05$	$3,94E-02$	$1,69E-07$	0,3
H4H17319P2	$274 \pm 0,5$	113	$5,39E+04$	$3,24E-03$	$6,01E-08$	3,6
H4H17321P2	$304 \pm 0,7$	143	$4,97E+04$	$2,57E-04$	$5,18E-09$	45
MAb đối chứng isotyp	190 ± 1	1	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB chỉ ra rằng mức liên kết trong điều kiện thử nghiệm hiện tại không quan

sát được.

*IC chỉ ra rằng mức liên kết quan sát được và không thể điều chỉnh được dữ liệu liên kết thời gian thực trong điều kiện thử nghiệm hiện tại.

Bảng 7: Thông số động học liên kết của hLEPR.mFc liên kết với kháng thể đơn dòng LEPR ở 25°C.

mAb được bắt giữ	Mức bắt giữ mAb (RU)	100nM hLEPR-mFc đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H16650P2	$165 \pm 0,2$	102	1,06E+05	8,32E-05	7,85E-10	139
H4H16679P2	$190 \pm 1,2$	78	5,84E+04	9,68E-05	1,66E-09	119
H4H18417P2	$162 \pm 0,6$	90	1,40E+05	5,63E-04	4,04E-09	21
H4H18438P2	$165 \pm 1,2$	51	5,19E+04	2,44E-04	4,70E-09	47
H4H18445P2	$192 \pm 0,4$	76	1,22E+05	4,92E-04	4,03E-09	23
H4H18446P2	$162 \pm 2,8$	20	3,20E+04	2,08E-04	6,48E-09	56
H4H18449P2	$174 \pm 0,6$	116	7,05E+04	6,82E-05	9,64E-10	169
H4H18482P2	$162 \pm 0,5$	88	1,44E+05	4,91E-04	3,42E-09	24
H4H18487P2	$188 \pm 0,6$	85	1,06E+05	6,03E-04	5,70E-09	19
H4H18492P2	$166 \pm 3,2$	129	2,27E+05	1,39E-04	6,13E-10	83
H4H17319P2	$200 \pm 0,5$	69	4,77E+04	1,64E-04	3,45E-09	70
H4H17321P2	$221 \pm 0,4$	65	4,10E+04	8,93E-05	2,18E-09	129
MAb đối chứng isotyp	$170 \pm 0,7$	-2	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB chỉ ra rằng mức liên kết trong điều kiện thử nghiệm hiện tại không quan sát được.

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

mAb được bắt giữ	Mức bắt giữ mAb (RU)	100nM hLEPR-mFc đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H16650P2	$199 \pm 1,9$	145	1,57E+05	2,80E-04	1,79E-09	41
H4H16679P2	$229 \pm 2,3$	116	1,21E+05	3,10E-04	2,56E-09	37

mAb được bắt giữ	Mức bắt giữ mAb (RU)	100nM hLEPR-mFc đã liên kết (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (phút)
H4H18417P2	$199 \pm 1,1$	111	$1,85E+05$	$1,05E-03$	$5,64E-09$	11
H4H18438P2	$199 \pm 0,6$	82	$7,02E+04$	$5,98E-04$	$8,53E-09$	19
H4H18445P2	229 ± 2	104	$1,56E+05$	$6,08E-04$	$3,89E-09$	19
H4H18446P2	$186 \pm 2,5$	34	$4,27E+04$	$5,48E-04$	$1,28E-08$	21
H4H18449P2	$198 \pm 1,6$	148	$1,33E+05$	$1,68E-04$	$1,26E-09$	69
H4H18482P2	$185 \pm 1,3$	109	$1,89E+05$	$7,26E-04$	$3,84E-09$	16
H4H18487P2	$215 \pm 1,5$	99	$1,23E+05$	$6,06E-04$	$4,93E-09$	19
H4H18492P2	$189 \pm 1,8$	160	$4,33E+05$	$5,00E-04$	$1,16E-09$	23
H4H17319P2	$262 \pm 0,5$	100	$8,51E+04$	$6,52E-04$	$7,66E-09$	18
H4H17321P2	$289 \pm 0,4$	110	$5,53E+04$	$1,74E-04$	$3,15E-09$	66
MAb đối chứng isotyp	$188 \pm 0,8$	1	NB*	NB*	NB*	NB*

*NB chỉ ra rằng mức liên kết trong điều kiện thử nghiệm hiện tại không quan sát được.

Ở 25°C, kháng thể đơn dòng kháng LEPR đã liên kết với hLEPR-MMH với giá trị K_D nằm trong khoảng từ 7,93nM đến 148nM, như được trình bày trong Bảng 5. Ở 37°C, kháng thể đơn dòng kháng LEPR liên kết với hLEPR-MMH với giá trị K_D nằm trong khoảng từ 14,8nM đến 326nM, như được trình bày trong Bảng 4.

Mười trong số 12 kháng thể đơn dòng kháng LEPR theo sáng chế đã liên kết với mfLEPR-MMH. Ở 25°C, kháng thể đơn dòng kháng LEPR liên kết với mfLEPR-MMH với giá trị K_D nằm trong khoảng từ 2,27nM đến 139nM, như được trình bày trong Bảng 7. Ở 37°C, kháng thể đơn dòng kháng LEPR liên kết với mfLEPR-MMH với giá trị K_D nằm trong khoảng từ 5,18nM đến 264nM, như được trình bày trong Bảng 8.

Ở 25°C, kháng thể đơn dòng kháng LEPR liên kết với hLEPR-mFc với giá trị K_D nằm trong khoảng từ 613pM đến 5,7nM, như được trình bày trong Bảng 7. Ở 37°C, kháng thể đơn dòng kháng LEPR liên kết với hLEPR-mFc với giá trị K_D nằm trong khoảng từ 1,16nM đến 12,8nM, như được trình bày trong Bảng 8.

Không có kháng thể đơn dòng kháng LEPR nào trong số các kháng thể đơn dòng kháng LEPR theo sáng chế liên kết với mLEPR.MMH hoặc rLEPR.MMH ở 25°C hoặc ở 37°C (dữ liệu không được thể hiện).

Ví dụ 4. Kháng thể kháng LEPR theo sáng chế liên kết với LEPR khi có mặt của liên kết Leptin: LEPR

Sự phong bế kháng thể kháng LEPR tránh khỏi liên kết với LEPR nhờ leptin người được đánh giá bằng cách sử dụng thiết bị cảm biến sinh học cộng hưởng plasmon bề mặt thời gian thực trên thiết bị Biacore T200. Toàn bộ nghiên cứu được thực hiện trong 10mM HEPES pH 7,4, 150mM NaCl, 3mM EDTA, và 0,05% thể tích/thể tích chất hoạt động bề mặt Tween-20 (Dung dịch đệm xử lý HBS-ET) ở 25°C. Trước tiên, bề mặt cảm biến Biacore CM5 được tạo dẫn xuất bằng cách bắt cặp amin leptin người (R&D Systems, # 398-LP) sử dụng hóa học bề mặt EDC/NHS tiêu chuẩn. Phức hợp của LEPR ở người và leptin người, được tạo ra bằng cách phun 20nM miễn ngoại bào LEPR ở người được biểu hiện bằng nhãn dán myc-myc-hexahistidin đầu C (hLEPR-MMH; SEQ ID NO: xx), lên bề mặt cảm biến Biacore được cố định leptin người tại tốc độ dòng là 10µL/phút hoặc 25µL/phút trong 4 phút, để đạt được đáp ứng liên kết xấp xỉ 200RU. Để đánh giá liệu kháng thể liên kết với hLEPR-MMH có bị phong bế bởi leptin người hay không, 200nM kháng thể đơn dòng kháng LEPR được phun lên phức hợp hLEPR-MMH:leptin người đã được tạo ra trước đó, tại tốc độ dòng là 50µL/phút hoặc 25µL/phút trong 4 - 5 phút. Tất cả các kháng thể kháng LEPR theo sáng chế liên kết với phức hợp của hLEPR-MMH và leptin người ("Leptin:LEPR") với cường độ tín hiệu gần tương tự và quan sát thấy liên kết, được biểu diễn theo RU, được báo cáo trong Bảng 9. Kết quả này chỉ ra rằng leptin người không phong bế liên kết của hLEPR-MMH kháng thể kháng LEPR được thử nghiệm.

Bảng 9: Liên kết của kháng thể đơn dòng kháng LEPR với tiền phức hợp của hLEPR-MMH và leptin người.

Kháng thể	hLEPR-MMH đã liên kết (RU)	200nM mAb đã liên kết (RU)
H4H16650P2	196	81
H4H16679P2	195	90
H4H17319P2	196	92

Ví dụ 5. ELISA phong bế thụ thể leptin người

Đối với ELISA, leptin người (hLeptin; R&D Systems, # 398-LP-01M) được phủ ở nồng độ là 5 µg/mL trong PBS trên đĩa vi chuẩn độ 96 giếng qua đêm ở 4°C. Các vị trí liên kết không đặc hiệu sau đó được phong bế bằng cách sử dụng dung dịch 0,5% (khối lượng/thể tích) chứa BSA trong PBS. Một lượng không đổi 10nM chứa miền phần ngoại bào của protein LEPR mà được biểu hiện bởi nhãn dán Fc đầu C ở người (hLEPR.hFc; SEQ ID NO: 116) được chuẩn độ bằng kháng thể kháng LEPR, protein hLeptin, hoặc kháng thể isotyp đối chứng nằm trong khoảng từ 8,5pM đến 500nM trong dịch pha loãng liên tiếp. Sau đó, các phức hợp kháng thể-protein hoặc protein-protein này được ủ trong 1,5 giờ tại nhiệt độ trong phòng (room temperature - RT). Sau đó, các phức hợp được chuyển vào các đĩa vi chuẩn độ được phủ hLeptin và được ủ trong 2 giờ ở RT, các giếng này được rửa, và hLEPR.hFc liên kết với đĩa được phát hiện bằng kháng thể đa dòng kháng IgG ở người được liên hợp với peroxidaza củ cải ngựa (Jackson ImmunoResearch Inc, #109-035-098). Các mẫu được phát triển bằng dung dịch TMB (BD Biosciences, #555214; cơ chất A và B được trộn với tỷ lệ 1:1 theo hướng dẫn của nhà sản xuất) để tạo ra phản ứng đo màu và sau đó được trung hòa bằng axit sulfuric 1M trước khi đo độ hấp thụ ở 450nm trên đĩa đọc Victor X5.

Việc phân tích dữ liệu được thực hiện bằng cách sử dụng mô hình liều lượng-đáp ứng sigma trong phần mềm Prism™ (GraphPad). Phần trăm phong bế ở nồng độ tối đa của kháng thể thử nghiệm được tính toán làm chất chỉ thị về khả năng của kháng thể để phong bế liên kết của 10nM hLEPR.hFc với leptin người trên đĩa. Trong tính toán này, tín hiệu liên kết của 10nM hLEPR.hFc khi không có mặt kháng thể được dùng để chỉ mức liên kết 100% hoặc mức phong bế 0%; và tín hiệu cơ sở một mình dung dịch đệm khi không có mặt hLEPR.hFc được dùng để chỉ mức liên kết 0% hoặc mức phong bế 100%. Dữ liệu phong bế ở nồng độ kháng thể 500nM được tổng kết trong Bảng 10.

Như được trình bày trong Bảng 10, đã chứng minh được không có kháng thể kháng LEPR nào theo sáng chế có mức phong bế liên kết >28% của hLEPR.hFc với bề mặt được phủ hLeptin. Tuy nhiên, kháng thể so sánh và hLeptin, làm đối chứng dương, có thể phong bế được 99% mức liên kết của hLEPR.hFc với bề mặt được phủ hLeptin. Đã chứng minh được rằng kháng thể isotyp đối chứng không có mức phong

bể đo được ở các nồng độ lên đến 500nM.

Bảng 10: Phong bế liên kết của ELISA hLEPR.hFc với hLeptin bởi kháng thể kháng LEPR

Kháng thể	Mức phong bế 500nM Ab của 10nM hLEPR.hFc liên kết với hLeptin (% mức phong bế)
H4H18487P2	5
H4H18417P2	16
H4H18482P2	25
H4H18492P2	-3
H4H18445P2	28
H4H18446P2	-5
H4H18449P2	8
H4H18438P2	15
H4H16650P2	-7
H4H16679P2	7
H4H173319P2	9
H4H173321P2	6
Các mẫu đối chứng	
Kháng thể isotyp đối chứng	-3
Leptin người	99
Kháng thể đối chứng	99
IgG2a Isotyp đối chứng của chuột	32

Ví dụ 6. Mức liên kết tế bào bằng cách phân tích FACS với tế bào gắn HEK293/Mycx2-hLepR(ecto)-GPI

Thụ thể leptin, LEPR, là thụ thể xuyên màng đơn thuộc họ thụ thể xytokin lớp I (Tartaglia *et al.* (1997) *J Biol Chem* 7:272(10):6093-6). LEPR có thể liên kết với Leptin, protein được biểu hiện phần lớn bởi mô cơ mỡ có liên quan đến quá trình điều hòa mức hấp thu thức ăn và quá trình trao đổi chất (Friedman *et al.* (2014) *J Endocrinol* 223(1):T1-8).

Để đánh giá liên kết tế bào bởi kháng thể kháng LEPR, các dòng tế bào ổn định HEK293 được tạo ra. Một dòng tế bào, dưới đây được gọi là HEK293/hLEPR-GPI, đã

biểu hiện ổn định miền ngoại bào của LEPR ở người (axit amin 22-839 có số truy nhập # P48357 (SEQ ID NO:113), Isoform B) với nhãn dán myc-myc đầu N và trình tự peptit đầu C từ carboxypeptidaza M ở người tác động đến việc bổ sung GPI (Glycosylphosphatidylinositol) (Deddish *et al.* (1990) *J. Biological Chemistry* 265:25:15083-89) để protein có thể được gắn GPI với màng. Dòng tế bào HEK293 khác được tạo ra để biểu hiện ổn định LEPR ở người có chiều dài đầy đủ (axit amin 1-1165 có số truy nhập # P48357(SEQ ID NO:113), Isoform B) cùng với gen chỉ thị luciferaza (Stat3-luciferaza, Stat3-luc, SA Bioscience, #CLS-6028L), và dưới đây được gọi là HEK293/Stat3-luc/hLEPR-FL. Tế bào HEK293 chỉ có gen chỉ thị Stat3-luciferaza (HEK293/Stat3-luc) cũng được tạo ra dưới dạng dòng tế bào đối chứng.

Đối với việc phân tích FACS, tế bào HEK293 mẹ và các tế bào HEK293/hLEPR-GPI được phân tách và đặt vào các đĩa 96 giếng đáy hình chữ V ở nồng độ 5×10^5 tế bào/giếng trong PBS chứa 2% FBS (dung dịch đệm FACS). Để thử nghiệm về khả năng của kháng thể kháng hLEPR để liên kết với tế bào dưới tác động của sự có mặt của leptin, dung dịch đệm FACS có hoặc không có $1\mu\text{M}$ leptin người (R&D Systems, # 398-LP) được ủ với các tế bào này trong 30 phút ở 4°C , tiếp theo là bổ sung kháng thể kháng LEPR hoặc kháng thể đối chứng ở 10nM trong dung dịch đệm FACS. Sau đó, các tế bào này được ủ trong 30 phút ở 4°C , tiếp theo là rửa và sau đó ủ với $16\mu\text{g/mL}$ kháng thể thứ hai được liên hợp Alexa Fluor®-647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., # 109-547-003) trong 30 phút ở 4°C . Tiếp theo, các tế bào này được cố định bằng cách sử dụng BD CytoFix™ (Becton Dickinson, # 554655), được lọc, và phân tích trên máy đếm tế bào dòng chảy HyperCyt (Beckman Coulter). Các đối chứng một mình kháng thể thứ hai và không nhuộm được thử nghiệm về tất cả các dòng tế bào. Các kết quả này được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm ForeCyt (IntelliCyt) và FlowJo phiên bản 10 để xác định giá trị trung bình hình học của sự phát huỳnh quang đối với các tế bào còn sống. Sau đó, giá trị trung bình hình học của sự phát huỳnh quang cho mỗi mẫu được chuẩn hóa thành giá trị trung bình hình học của các tế bào không nhuộm để thu được sự liên kết tương đối cho mỗi điều kiện được gọi là “tỷ lệ liên kết”, và các tỷ lệ liên kết này được ghi lại với mỗi kháng thể thử nghiệm.

Như được trình bày trong Bảng 11, đã chứng minh được 9 kháng thể kháng LEPR theo sáng chế được thử nghiệm ở 10nM liên kết với các tế bào

HEK293/hLEPR-GPI với tỷ lệ liên kết nằm trong khoảng từ 824 đến 3374 lần khi không có Leptin. Kháng thể kháng LEPR cũng đã liên kết khi có mặt của 1 μ M Leptin với tỷ lệ liên kết là 398 và 4184 lần. Như được trình bày trong Bảng 11, đã chứng minh được kháng thể đối chứng được thử nghiệm ở 10nM liên kết với các tế bào HEK293/hLEPR-GPI với tỷ lệ liên kết là 2349 lần khi không có Leptin nhưng có mức liên kết với các tế bào kém hơn đáng kể khi có mặt 1 μ M Leptin với tỷ lệ liên kết là 112. Đã chứng minh được kháng thể kháng LEPR không có sự liên kết đáng kể bất kỳ với tế bào HEK293 mẹ ở các tỷ lệ liên kết khi có mặt và không có mặt 1 μ M Leptin nằm trong khoảng từ 1 đến 9 lần. Đã chứng minh được các mẫu kháng thể isotyp đối chứng và kháng thể thứ hai riêng lẻ cũng không có sự liên kết đáng kể với hoặc dòng tế bào khi có mặt hoặc không có mặt leptin, với tỷ lệ liên kết nằm trong khoảng từ 1 đến 6 lần.

Như được trình bày trong Bảng 12, đã chứng minh được bốn kháng thể theo sáng chế được thử nghiệm ở 70nM khi không có mặt leptin liên kết với các tế bào HEK293/hLEPR-GPI với tỷ lệ liên kết nằm trong khoảng từ 707 đến 1131 lần và với các tế bào HEK293/Stat3-luc/hLEPR-FL với tỷ lệ liên kết nằm trong khoảng từ 42 đến 51. Đã chứng minh được kháng thể kháng LEPR không có bất kỳ sự liên kết đáng kể bất kỳ với tế bào HEK293/Stat3-luc với tỷ lệ liên kết nằm trong khoảng từ 1 đến 8 lần. Đã chứng minh được các mẫu kháng thể isotyp đối chứng và các mẫu kháng thể thứ hai đơn lẻ cũng không liên kết đáng kể với dòng tế bào bất kỳ trong số các dòng tế bào được thử nghiệm, với tỷ lệ liên kết nằm trong khoảng từ 1 đến 2 lần.

Bảng 11: Liên kết của 10nM kháng thể kháng LEPR với HEK293/hLEPR-GPI và tế bào bố mẹ HEK293 +/- 1 μ M leptin người

	Tỷ lệ liên kết: Chuẩn hóa mẫu chưa được nhuộm của mỗi dòng tế bào				
	Không có Leptin bổ sung		1μM Leptin		Loại kháng thể
Kháng thể	HEK293 bố mẹ	HEK293/hLEPR-GPI	HEK293 bố mẹ	HEK293/hLEPR-GPI	
H4H16650P2	5	2420	4	3124	Chất chủ vận
H4H16679P2	5	2058	8	2223	Chất chủ vận
H4H18417P2	1	1835	2	2604	Chất tiềm năng

	Tỷ lệ liên kết: Chuẩn hóa mẫu chưa được nhuộm của mỗi dòng tế bào				
	Không có Leptin bổ sung		1μM Leptin		Loại kháng thể
H4H18438P2	2	1486	3	2414	Chất tiềm năng
H4H18445P2	2	2016	3	2488	Chất tiềm năng
H4H18449P2	5	3374	9	3113	Chất tiềm năng
H4H18482P2	1	1966	3	2704	Chất tiềm năng
H4H18487P2	1	2422	3	2670	Chất tiềm năng
H4H18492P2	3	2603	7	4184	Chất tiềm năng
Chất so sánh	6	2349	3	112	N/A
Kháng thể isotyp đối chứng	1	6	2	4	N/A
Kháng thể thứ hai đơn lẻ	1	3	2	3	N/A
Chưa được nhuộm	1	1	1	1	N/A

* Phân loại của kháng thể là “Chất chủ vận” hoặc “Chất tiềm năng” dựa trên một phần các kết quả quan sát được trong Ví dụ 7 và 8 trong bản mô tả này.

Bảng 12: Liên kết của 70nM kháng thể kháng LEPR với HEK293/hLEPR-GPI, HEK293/Stat3-hLEPR-FL, và tế bào bố mẹ HEK293/Stat3-luc

Kháng thể	Tỷ lệ liên kết: Chuẩn hóa mẫu chưa được nhuộm của mỗi dòng tế bào			Loại kháng thể
	HEK293/Stat3-luc	HEK293/hLEPR-GPI	HEK293/Stat3-luc hLEPR-FL	
H4H16650P2	6	707	42	Chất chủ vận
H4H16679P2	8	1078	51	Chất chủ vận
H4H17319P2	7	1131	47	Chất chủ vận
H4H17321P2	7	1126	46	Chất chủ vận
Kháng thể isotyp đối chứng	2	2	2	
Kháng thể thứ hai đơn lẻ	1	1	1	
Chưa được nhuộm	1	1	1	

Ví dụ 7. Kháng thể kháng LEPR theo sáng chế hoạt hóa quá trình tạo tín hiệu LEPR

khi có mặt hoặc không có mặt leptin

Thử nghiệm sinh học được phát triển để phát hiện sự hoạt hóa phiên mã STAT3 thông qua hoạt hóa LEPR bằng cách sử dụng dòng tế bào chỉ thị biểu hiện ổn định LEPR ở người có chiều dài đầy đủ (hLEPR; axit amin 1 đến 1165 có số truy nhập NP_002294.2) cùng với gen chỉ thị luciferaza (STAT3-Luc; Qiagen, # CLS-6028L) trong dòng tế bào IMR-32, dòng tế bào u nguyên bào thần kinh ở người. Dòng tế bào ổn định thu được, được gọi là IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR, được phân lập và duy trì trong môi trường MEM-Earl được bổ sung 10% FBS, NEAA, 1 μ g/mL Puromyxin, 100 μ g/mL Hygromyxin B và penixilin/Streptomycin/L-Glutamin (Môi trường hoàn chỉnh).

Thử nghiệm sinh học thu được được sử dụng để đo hiệu quả của kháng thể kháng LEPR theo sáng chế đối với quá trình truyền tín hiệu LEPR khi có mặt hoặc không có mặt leptin. Đối với thử nghiệm sinh học, tế bào IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR được đặt vào đĩa ở mật độ là 20.000 tế bào/100 μ l/giếng đối với loại 96 giếng trong môi trường đầy đủ, và ngày tiếp theo được thay thế bằng thể tích môi trường Opti-MEM thích hợp được bổ sung 1% BSA và 0,1% FBS (dung dịch đệm thử nghiệm) trong 30 phút. Để đo hiệu quả của kháng thể theo sáng chế khi không có mặt leptin, kháng thể kháng LEPR hoặc kháng thể isotyp đối chứng và leptin người (hLeptin; R&D Systems, #398-LP) được pha loãng liên tiếp nửa log đến các nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 100nM đến 300fM trong dung dịch đệm thử nghiệm, mà được thêm vào các tế bào này và tiếp theo là được ủ qua đêm ở 37°C trong 5% CO₂.

Để đo hiệu quả của kháng thể theo sáng chế khi có mặt leptin, nồng độ cố định của leptin người ở 200pM trong dung dịch đệm thử nghiệm được thêm vào các tế bào này, tiếp theo là bổ sung ngay kháng thể kháng LEPR hoặc kháng thể isotyp đối chứng mà được pha loãng liên tiếp nửa log đến các nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 100nM đến 300fM. Mẫu này được ủ trong qua đêm ở 37°C trong 5% CO₂. Tiếp theo, chất phản ứng cOneGlo (Promega, # E6051) được thêm vào các mẫu và hoạt tính luciferaza được đo trên thiết bị đọc đĩa Envision Multilable (Perkin Elmer) theo kiểu phát quang. Giá trị thiết bị ánh sáng tương đối (relative light unit - RLU) thu được và các kết quả này được phân tích bằng cách sử dụng dạng hồi quy phi tuyến tính bằng phần mềm GraphPad Prism (GraphPad). Giá trị RLU tối đa thu được từ đáp ứng liều

lượng hLeptin được xác định là mức hoạt hóa 100% trong thử nghiệm IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR.

Như được trình bày trong Bảng 13, trong nghiên cứu 1, đã chứng minh được rằng khi không có mặt của hLeptin, tất cả các kháng thể kháng LEPR được thử nghiệm kích thích yếu tế bào IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR với giá trị EC_{50} nằm trong khoảng từ 134pM đến 11,9nM và mức hoạt hóa tối đa nằm trong khoảng từ 5% đến 13% lần lượt tương ứng với mức hoạt hóa tối đa thu được từ đáp ứng liều lượng hLeptin. Trong nghiên cứu 2, khi không có mặt của hLeptin, đã chứng minh được rằng 4 kháng thể kháng LEPR được thử nghiệm kích thích tế bào IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR với giá trị EC_{50} nằm trong khoảng từ 61,9pM đến 206,9pM và mức hoạt hóa tối đa nằm trong khoảng từ 65% đến 68% lần lượt tương ứng với mức hoạt hóa tối đa thu được từ đáp ứng liều lượng hLeptin. Trong nghiên cứu 1, khi có mặt của 200pM hLeptin, đã chứng minh được rằng tất cả các kháng thể kháng LEPR được thử nghiệm kích thích tế bào IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR với giá trị EC_{50} nằm trong khoảng từ 20,2pM đến 523pM và mức hoạt hóa tối đa nằm trong khoảng từ 66% đến 107% lần lượt tương ứng với mức hoạt hóa tối đa thu được từ đáp ứng liều lượng hLeptin. Do các kháng thể này làm gia tăng quá trình truyền tín hiệu LEPR do leptin gây ra, các kháng thể này được phân loại thành “chất tiềm năng”, như được xác định trong bản mô tả này. Trong nghiên cứu 2, khi có mặt của 200pM hLeptin, đã chứng minh được rằng 4 kháng thể kháng LEPR được thử nghiệm kích thích tế bào IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR với giá trị EC_{50} nằm trong khoảng từ 51,9pM đến 257,3pM với mức hoạt hóa tối đa nằm trong khoảng từ 76% đến 88% là mức hoạt hóa tối đa thu được từ đáp ứng liều lượng hLeptin. Quá trình truyền tín hiệu LEPR không được gia tăng đáng kể bởi các kháng thể này khi có mặt của leptin. Đã chứng minh được rằng không có kháng thể isotyp đối chứng nào kích thích ở mức đo được bất kỳ tế bào IMR-32/STAT3-Luc/hLEPR trong thử nghiệm bất kỳ trong số các thử nghiệm này.

Bảng 13: Hoạt hóa hLEPR bởi kháng thể kháng LEPR

	IMR-32/LEPR khi không có mặt leptin người		IMR-32/LEPR khi có mặt 200pM leptin người	
Kháng thể	EC_{50} (M)	% mức hoạt hóa	EC_{50} (M)	% mức hoạt hóa

Nghiên cứu 1				
H4H18445P2	1,19E-08	5	4,10E-10	97
H4H18446P2	3,73E-10	6	3,42E-11	68
H4H18449P2	2,12E-10	13	5,23E-11	66
H4H18438P2	1,49E-09	5	2,02E-11	76
H4H18482P2	2,69E-10	7	1,69E-10	94
H4H18487P2	8,01E-10	6	4,10E-10	107
H4H18492P2	1,34E-10	5	2,74E-11	94
H4H18417P2	1,53E-10	5	5,23E-10	87
Nghiên cứu 2				
H4H16650P2	6,19E-11	68	5,19E-11	88
H4H16679P2	8,62E-11	65	7,37E-11	88
H4H17319P2	1,867E-10	68	1,914E-10	76
H4H17321P2	2,069E-10	66	2,573E-10	76

Ví dụ 8. Kháng thể kháng LEPR theo sáng chế hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu ở tế bào biểu hiện các thể đột biến LEPR thiếu hụt khả năng truyền tín hiệu hoặc suy giảm khả năng truyền tín hiệu

Thể đột biến LEPR đã được nhận diện có quá trình truyền tín hiệu gây ra bởi leptin bị thiếu hụt hoặc suy giảm và liên quan đến bệnh béo phì khởi phát sớm. Ví dụ, LEPR-A409E là protein LEPR đột biến gây ra sự thiếu hụt khả năng truyền tín hiệu không biến nạp các tín hiệu leptin vào STAT3; thể đột biến A409E được nhận diện ban đầu là nguyên nhân đơn gen của bệnh béo phì khởi phát sớm. (Farooqi *et al.*, 2007, *N Engl J Med* 356(3): 237-247). Cũng đã cho thấy LEPR-P316T là protein LEPR đột biến gây suy giảm khả năng truyền tín hiệu có liên quan đến bệnh béo phì khởi phát sớm. (Mazen *et al.*, 2011, *Mol Genet Metab* 102:461-464).

Trong ví dụ này, khả năng của kháng thể kháng LEPR theo sáng chế trong việc kích thích quá trình truyền tín hiệu LEPR ở các dòng tế bào biểu hiện thể đột biến LEPR thiếu hụt khả năng truyền tín hiệu hoặc suy giảm khả năng truyền tín hiệu được đánh giá. Cụ thể, các dòng tế bào chỉ thị (HEK293) được cấu trúc biểu hiện LEPR dạng đại, LEPR-A409E (thiếu hụt khả năng truyền tín hiệu) hoặc LEPR-P316T (suy giảm khả năng truyền tín hiệu). Các tế bào được xử lý chỉ bằng tá dược, leptin tái tổ

hợp ở người, IgG đối chứng, hoặc kháng thể chủ vận kháng LEPR theo sáng chế (H4H16650 hoặc H4H16679), và mức truyền tín hiệu LEPR (được đo bằng phương pháp dò thâm tách Tây sự biểu hiện của pSTAT3-Y705 so với sự biểu hiện của STAT3) được xác định.

Đã cho thấy kháng thể chủ vận kháng LEPR theo sáng chế (H4H16650 và H4H16679) trong các thử nghiệm này kích thích quá trình truyền tín hiệu LEPR ở tế bào biểu hiện thể đột biến LEPR-A409E hoặc thể đột biến LEPR-P316T (được đo bằng sự biểu hiện của STAT3) theo cách phụ thuộc liều lượng (Fig. 2, Bảng B và C). Ngược lại, việc xử lý bằng leptin chỉ gây ra quá trình truyền tín hiệu khiêm tốn ở tế bào biểu hiện thể đột biến LEPR-P316T, và không có quá trình truyền tín hiệu ở tế bào biểu hiện thể đột biến LEPR-A409E. (Fig. 2, Bảng A). Ngoài ra, không dò được quá trình truyền tín hiệu LEPR ở dòng tế bào bất kỳ trong số các dòng tế bào được xử lý bằng tá dược hoặc kháng thể IgG đối chứng (dữ liệu không được thể hiện). Các thể đột biến LEPR thiếu hụt khả năng truyền tín hiệu hoặc suy giảm khả năng truyền tín hiệu khác được thử nghiệm trong thử nghiệm này nhưng không được hoạt hóa bởi thể đột biến kháng LEPR (dữ liệu không được thể hiện), cho thấy rằng hiệu quả cứu hộ này có thể là hiệu quả phụ thuộc thể đột biến.

Các kết quả này của ví dụ này chỉ ra rằng kháng thể chủ vận kháng LEPR theo sáng chế có thể hữu ích để điều trị các bệnh và các rối loạn (ví dụ, bệnh béo phì khởi phát sớm) mà gây ra bởi hoặc liên quan đến các thể đột biến LEPR thiếu hụt khả năng truyền tín hiệu hoặc suy giảm khả năng truyền tín hiệu nhất định (ví dụ, LEPR-P316T hoặc LEPR-A409E).

Ví dụ 9: Sự cạnh tranh chéo bát tử (Octet) giữa các kháng thể đơn dòng kháng LEPR khác nhau.

Sự cạnh tranh liên kết giữa panen gồm các kháng thể đơn dòng kháng LEPR khác nhau được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm đo giao thoa lớp sinh học, không dán nhãn, thời gian thực trên tấm cảm biến sinh học Octet HTX (Pall ForteBio Corp.). Toàn bộ thử nghiệm được thực hiện ở 25°C trong dung dịch đệm chứa 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, và 0,05% thể tích/thể tích chất hoạt động bề mặt Tween-20, 1mg/mL BSA, pH7,4 (HBS-EBT) với đĩa đang lắc ở tốc độ 1000 vòng/phút. Để đánh giá liệu hai kháng thể có thể cạnh tranh với kháng thể kia để liên

kết với các quyết định kháng nguyên tương ứng của chúng trên LEPR tái tổ hợp ở người được biểu hiện bằng nhãn dán myc-myc-hexahistidin đầu C (hLEPR.mmh; SEQ ID NO: 114), khoảng 0,25nM hoặc 0,34nM hLEPR-MMH được bắt giữ trước tiên trên các đầu thiết bị cảm biến sinh học Octet được phủ kháng thể kháng penta-His (Fortebio Inc, # 18-5122) bằng cách nhúng các đầu thiết bị cảm biến sinh học này trong 5 phút trong các giếng chứa 20µg/mL hLEPR-MMH. Sau đó, các đầu thiết bị cảm biến sinh học đã bắt giữ kháng nguyên được bão hòa bằng kháng thể đơn dòng kháng LEPR thứ nhất (dưới đây được gọi là mAb-1) bằng cách nhúng vào các giếng chứa 50µg/mL dung dịch mAb-1 trong 210 giây. Tiếp theo, đầu thiết bị cảm biến sinh học được nhúng vào các giếng chứa 50µg/mL dung dịch kháng thể đơn dòng kháng LEPR thứ hai (dưới đây được gọi là mAb-2) trong 150 giây. Đầu thiết bị cảm biến sinh học được rửa trong dung dịch đệm HBS-EBT ở giữa mỗi bước của thử nghiệm. Thời gian thực đáp ứng liên kết được theo dõi trong suốt toàn bộ quá trình thử nghiệm và đáp ứng liên kết ở cuối mỗi bước được ghi lại. Đáp ứng của mAb-2 liên kết với hLEPR-MMH đã tạo phức sơ bộ với mAb-1 được so sánh và đặc tính cạnh tranh/không cạnh tranh của kháng thể đơn dòng kháng LEPR khác nhau được xác định như được trình bày trong Bảng 14 và Bảng 15.

Bảng 14: Cạnh tranh chéo giữa các kháng thể đơn dòng kháng LEPR

Kháng thể thứ nhất (mAb-1) liên kết với hLEPR-MMH được bắt giữ	Đã cho thấy kháng thể thứ hai (mAb-2) cạnh tranh với mAb-1
H4H18492P2	H4H18417P2
	H4H18438P2
H4H18417P2	H4H18492P2
	H4H18438P2
H4H18438P2	H4H18492P2
	H4H18417P2
H4H16650P2	H4H16679P2
H4H16679P2	H4H16650P2
H4H18445P2	H4H18482P2
	H4H18487P2
	H4H18446P2

Kháng thể thứ nhất (mAb-1) liên kết với hLEPR-MMH được bắt giữ	Đã cho thấy kháng thể thứ hai (mAb-2) cạnh tranh với mAb-1
H4H18446P2	H4H18482P2
	H4H18487P2
	H4H18445P2
H4H18482P2	H4H18445P2
	H4H18487P2
H4H18487P2	H4H18445P2
	H4H18482P2
H4H18449P2	Không
Kháng thể đối chứng	Không

Bảng 15: Cạnh tranh chéo giữa các kháng thể đơn dòng kháng LEPR

mAb-1	mAb-2 cạnh tranh với mAb-1
H4H17319P2	H4H17321P2
	H4H16650P2
	H4H16679P2
H4H17321P2	H4H17319P2
	H4H16650P2
	H4H16679P2
H4H16650P2	H4H17319P2
	H4H17321P2
	H4H16679P2
H4H16679P2	H4H17319P2
	H4H17321P2
	H4H16650P2

Ví dụ 10: Hiệu quả *in vivo* của kháng thể chủ vận LEPR H4H16650P2, H4H16679P2, H4H17319P2 và H4H17321P2 ở mô hình chuột thiếu hụt leptin có thể gây cảm ứng.

Hiệu quả của bốn kháng thể chủ vận kháng LEPR đặc hiệu theo sáng chế, H4H16650P2, H4H16679P2, H4H17319P2, và H4H17321P2 đối với mức hấp thu

thức ăn, thể trọng và tình trạng béo phì được xác định trong mô hình chuột thiếu hụt leptin có thể gây cảm ứng đã được thao tác di truyền $LEPR^{Hu/Hu}$, biểu hiện thụ thể leptin gồm trình tự miền ngoại bào LEPR ở người ở vị trí của trình tự miền ngoại bào LEPR của chuột. Mô hình thiếu hụt leptin được gây ra bởi quá trình phân phối ADN theo thủy động lực (hydrodynamic DNA delivery - HDD) của plasmid mã hoá miền ngoại bào LEPR được dán nhãn hFc của chuột (trong bản mô tả này dùng để chỉ mLEPR.hFc hoặc “Bẫy leptin”; SEQ ID NO: 120). Bẫy leptin khi được biểu hiện được tiết và liên kết leptin tuần hoàn. Sau khi HDD 50 μ g cấu trúc ADN mã hoá bẫy leptin, các con chuột có mức tiêu thụ thức ăn tăng và tình trạng béo phì và thể trọng cũng gia tăng.

Mức hấp thu thức ăn cơ bản hằng ngày được đo giữa các ngày 7 và 4 trước khi dùng bẫy leptin (các ngày -7 và -4). Vào ngày 0, 35 con chuột đực $LEPR^{Hu/Hu}$ 13 đến 17 tuần tuổi được đưa thành công vào HDD bằng bẫy leptin. Vào các ngày 6 và 13 sau khi HDD, lượng máu chảy sau hốc mắt được thu gom và thành phần của cơ thể chuột có tình trạng béo phì được định lượng bằng μ CT. Vào ngày 7 sau khi HDD, các con chuột được phân ngẫu nhiên vào các nhóm 5-7 con chuột trên cơ sở phần trăm thể trọng thay đổi từ ngày 0. Mỗi nhóm được tiếp nhận thuốc bằng cách tiêm dưới da đơn liều kháng thể isotyp đối chứng ở 3 mg/kg, H4H16650P2 ở 3 mg/kg, H4H16679P2 ở 3 mg/kg, H4H17319P2 ở 3 mg/kg, hoặc H4H17321 ở 3 mg/kg. Kháng thể isotyp đối chứng đã không liên kết protein đã biết bất kỳ của chuột. Đo mức hấp thu thức ăn và thể trọng của mỗi con chuột trong thời gian nghiên cứu. Fig. 3 tổng kết mức hấp thu thức ăn trung bình hằng ngày của mỗi nhóm xử lý. Trong Fig. 3, đường nét đứt thể hiện mức hấp thu thức ăn trung bình cơ bản trước khi tiêm HDD. Phần trăm mức thay đổi thể trọng từ ngày 0 được tính toán cho mỗi con chuột ở mỗi thời điểm. Fig. 4 tổng kết phần trăm mức thay đổi trung bình thể trọng của các con chuột trong mỗi nhóm được xử lý bằng kháng thể. Fig. 5 tổng kết khối lượng chất béo trung bình của các con chuột trong mỗi nhóm xử lý bằng kháng thể được định lượng bằng μ CT 1 ngày trước khi xử lý bằng kháng thể và 6 ngày sau khi xử lý bằng kháng thể. Tất cả các kết quả được biểu diễn bằng giá trị trung bình $\pm$ SEM.

Như được thể hiện trong các Fig. 3 và 4, sau khi HDD bằng bẫy leptin, đã quan sát được sự gia tăng tương tự về mức hấp thu thức ăn và phần trăm mức thay đổi thể trọng giữa các nhóm chuột trước khi xử lý bằng kháng thể. Như được thể hiện trong

Fig. 3, các con chuột được xử lý bằng kháng thể H4H16650P2 hoặc H4H16679P2 ở 3 mg/kg có sự giảm đáng kể về mức hấp thu thức ăn bắt đầu ở một ngày sau khi xử lý bằng kháng thể (ngày 8 sau khi HDD) và ở các thời điểm tiếp theo đo được so với các con chuột được tiêm kháng thể isotyp đối chứng. Các con chuột được xử lý bằng kháng thể H4H17319P2 hoặc H4H17321P2 ở 3 mg/kg có sự giảm đáng kể về mức hấp thu thức ăn ở thời điểm 2 ngày sau khi xử lý bằng kháng thể (ngày 9 sau khi HDD) và ở các thời điểm đo được tiếp theo khác so với các con chuột được tiêm kháng thể isotyp đối chứng. Như được thể hiện trong Fig. 4, các con chuột được xử lý bằng kháng thể H4H16650P2 ở 3 mg/kg có mức thay đổi phần trăm thể trọng giảm một cách đáng kể một ngày sau khi xử lý bằng kháng thể (ngày 8 sau khi HDD) và ở các thời điểm khác tiếp theo đo được so với các con chuột được tiêm kháng thể isotyp đối chứng. Một ngày sau khi xử lý bằng kháng thể, vào ngày 8, các con chuột được xử lý bằng nhóm đối chứng isotyp có mức tăng thể trọng là $21,16 \pm 1,27\%$ từ ngày 0, trong khi đó các con chuột được xử lý bằng H4H16650P2 có mức tăng thể trọng là $15,57 \pm 0,9\%$ từ ngày 0. Các con chuột được xử lý bằng kháng thể H4H16679P2, H4H17319P2 hoặc H4H17321P2 ở 3 mg/kg có mức thay đổi phần trăm thể trọng giảm một cách đáng kể hai ngày sau khi xử lý bằng kháng thể (ngày 9 sau khi HDD) và ở các thời điểm khác tiếp theo đo được so với các con chuột được tiêm kháng thể isotyp đối chứng. Vào ngày 9, mức thay đổi % thể trọng từ ngày 0 là $23,18 \pm 1,22$, $13,17 \pm 1,05$, $12,95 \pm 1,26$, $15,98 \pm 1,78$ và $15,83 \pm 2,01$ đối với các con chuột được xử lý lần lượt bằng nhóm đối chứng isotyp, H4H16650P2, H4H16679P2, H4H17319P2, hoặc H4H17321P2. Như được thể hiện trong Fig. 5, đã chứng minh được các con chuột được xử lý bằng kháng thể isotyp đối chứng ở 3 mg/kg có mức tăng thể trọng của chuột đáng kể 6 ngày sau khi xử lý bằng kháng thể (ngày 13 sau khi HDD) so với 1 ngày trước khi xử lý bằng kháng thể (ngày 6 sau khi HDD). Các con chuột được xử lý bằng kháng thể H4H16650P2, H4H16679P2, H4H17319P2, hoặc H4H17321P2 ở 3 mg/kg không có khối lượng mỡ sau khi xử lý bằng kháng thể so với xử lý sơ bộ bằng kháng thể. Sau 6 ngày xử lý (ngày 13 sau khi HDD), đã chứng minh được rằng các con chuột được xử lý bằng kháng thể H4H16650P2, H4H16679P2 hoặc H4H17319P2 ở 3 mg/kg có mức giảm thể trọng của chuột đáng kể so với các con chuột được xử lý bằng kháng thể isotyp đối chứng ở 3 mg/kg.

Ví dụ 11: Lập bản đồ quyết định kháng nguyên về liên kết của H4H16650P2 với thụ

thể leptin người (hLEPR.mmh) bằng cách trao đổi hydro đoteri.

Các thử nghiệm được thực hiện để xác định các gốc axit amin của hLEPR.mmh (axit amin M1-D839 có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 114) mà H4H16650P2 tương tác. Nhằm mục đích này, việc lập bản đồ quyết định kháng nguyên bằng cách trao đổi H/D với quang phổ khối được thực hiện. Phần mô tả chung về phương pháp trao đổi H/D được nêu trong, ví dụ, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; và Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Tiến trình thử nghiệm: Các thử nghiệm HDX-MS được thực hiện trên nền tích hợp Waters HDX/MS, bao gồm hệ Leaptac HDX PAL để dán nhãn đoteri, Waters Acquity M-Class (Quản lý dung môi phụ trợ - Auxiliary solvent manager)) để phân giải và tải mẫu, Waters Acquity M-Class (Quản lý dung môi μ Binary - μ Binary solvent manager) đối với gradient cột phân tích, và thiết bị quang phổ khối Synapt G2-Si để đo khối lượng peptit hệ tiêu hóa.

Dung dịch dán nhãn được điều chế trong 10 mM dung dịch đệm PBS trong D2O ở pD 7,0 (tương đương với pH 6,6). Để dán nhãn đoteri, 3,8 μ L hLEPR.mmh (8 pmol/ μ L) hoặc hLEPR.mmh được trộn sơ bộ với kháng thể với tỷ lệ phân tử gam 2:1 được ủ với 56,2 μ L dung dịch dán nhãn D2O ở các thời điểm khác nhau (ví dụ, mẫu đối chứng không được dán nhãn đoteri = 0 giây, được dán nhãn trong 1 phút và 20 phút). Quá trình đoteri hóa được làm lạnh đột ngột bằng cách chuyển 50 μ L mẫu vào 50 μ L dung dịch làm lạnh đột ngột đã được làm lạnh sơ bộ (0,2 M TCEP, 6 M guanidin clorua trong 100 mM dung dịch đệm phosphat, pH 2,5) và mẫu đã trộn được ủ ở 1,0°C trong hai phút. Sau đó, mẫu đã được làm lạnh đột ngột được bơm vào Waters HDX Manager để phân cắt trực tuyến bằng pepsin/protease XIII. Peptit đã phân cắt được bắt giữ vào tiền cột ACQUITY UPLC BEH C18 1,7- μ m, 2,1 $\times$ 5 mm VanGuard ở 0°C và rửa giải ra khỏi cột phân tích ACQUITY UPLC BEH C18 1,7- μ m, 1,0 $\times$ 50 mm trong thời gian tách gradien 9 phút 5%-40% B (pha động A: axit formic 0,1% trong nước, pha động B: 0,1% axit formic trong axetonitril). Thiết bị quang phổ khối được đặt ở điện áp hình nón 37 V, thời gian quét là 0,5 giây, và khoảng khối lượng/điện tích là 50-1700 Th.

Để nhận diện peptit từ LEPR ở người, dữ liệu LC-MSE từ mẫu không được dán

nhân đơteri được xử lý và tra cứu về cơ sở dữ liệu bao gồm LEPR ở người, pepsin, và các trình tự ngẫu nhiên của chúng nhờ phần mềm Waters ProteinLynx Global Server (PLGS). Peptit đã nhận diện được nhập vào phần mềm DynamX và được lọc bằng hai tiêu chí: 1) sản phẩm tối thiểu cho mỗi axit amin: 0,2, và 2) ngưỡng tệp tin sao chép: 3. sau đó, phần mềm DynamX xác định một cách tự động mức hấp thu đơteri của mỗi peptit trên cơ sở thời gian lưu giữ và độ chính xác khối lượng cao ($<10\text{ppm}$) qua nhiều thời điểm với 3 bản sao ở mỗi thời điểm.

Kết quả: Bằng cách sử dụng cột pepsin/proteaza XIII trực tuyến ngẫu hợp với việc thu thập dữ liệu MS^E , tổng số 201 peptit từ LEPR ở người được nhận diện bằng sao chép khi không có mặt hoặc có mặt của kháng thể, chiếm 70% độ bao phủ trình tự. Năm peptit có mức hấp thu đơteri hóa giảm một cách đáng kể (giá trị Δ trọng tâm $> 0,4$ dalton với giá trị $p < 0,05$) khi được liên kết với H4H16650P2 như được trình bày trong Bảng 16. Khối lượng peptit đã ghi lại tương ứng với giá trị trung bình của khối lượng MH^+ trọng tâm từ ba bản sao. Các peptit này, tương ứng với axit amin 162-169 (axit amin LYVLPEVL của LEPR ở người; SEQ ID NO: 113), và với axit amin 170-181 (axit amin EDSPLVPQKGSF của LEPR ở người; SEQ ID NO: 113), có tốc độ đơteri hóa thấp hơn khi được liên kết với H4H16650P2. Các gốc đã nhận diện này cũng tương ứng với các gốc axit 162-169 và 170-181 của LEPR ở người như được xác định bởi mục tra cứu Uniprot P48357 (SEQ ID NO. 113; thụ thể leptin người).

Bảng 16: Peptit của thụ thể leptin người có mức bảo vệ đáng kể khi liên kết với kháng thể H4H16650P2

Gốc	Đơteri hóa 1 phút			Đơteri hóa 20 phút		
	hLEPR.mmh	hLEPR.mmh + H4H16650P2	Δ	hLEPR.mmh	hLEPR.mmh + H4H16650P2	Δ
162-169	949,03 $\pm$ 0,03	947,99 $\pm$ 0,02	-1,04	949,23 $\pm$ 0,02	948,16 $\pm$ 0,02	-1,03
163-169	835,82 $\pm$ 0,03	834,79 $\pm$ 0,02	-1,03	836,03 $\pm$ 0,02	834,94 $\pm$ 0,02	-1,08
170-181	1310,02 $\pm$ 0,05	1309,12 $\pm$ 0,03	-0,89	1309,77 $\pm$ 0,02	1309,38 $\pm$ 0,02	-0,39

Ví dụ 12: Thử nghiệm hiệu quả *in vivo* của kháng thể tiềm năng LEPR ở các con chuột LEPR được làm tương thích với người.

Hiệu quả của ba chất tiềm năng kháng thể kháng LEPR đặc hiệu theo sáng chế, H4H18482P2, H4H18487P2 và H4H18492P2, đối với thể trọng và tình trạng béo phì được xác định ở chuột được thao tác di truyền đã được nuôi riêng biệt $LEPR^{Hu/Hu}$, biểu hiện thụ thể leptin gồm trình tự miền ngoại bào LEPR ở người ở vị trí của trình tự miền ngoại bào LEPR của chuột (mLEPR.hFc, SEQ ID NO: 120).

Vào ngày -19, thành phần của cơ thể chuột mắc tình trạng béo phì được định lượng bằng μ CT. Vào ngày 0, 48 con chuột cái $LEPR^{Hu/Hu}$ từ 14 đến 16 tuần tuổi được sắp xếp ngẫu nhiên vào 4 nhóm gồm 12 con chuột trên cơ sở thể trọng của chúng. Vào ngày 0 và 11, các con chuột từ mỗi nhóm được tiếp nhận đơn liều kháng thể isotyp đối chứng ở 30 mg/kg, H4H18482P2 ở 30 mg/kg, H4H18487P2 ở 30 mg/kg hoặc H4H18492P2 ở 30 mg/kg bằng cách tiêm dưới da. Kháng thể isotyp đối chứng không liên kết protein đã biết bất kỳ của chuột. Thể trọng của mỗi con chuột được đo trong thời gian nghiên cứu. Phần trăm mức thay đổi thể trọng từ ngày 0 được tính toán cho mỗi con chuột ở mỗi thời điểm. Fig. 6 tổng kết phần trăm mức thay đổi trung bình thể trọng của các con chuột trong mỗi nhóm xử lý. Fig. 6 tổng kết khối lượng chất béo trung bình của các con chuột trong mỗi nhóm xử lý bằng kháng thể được định lượng bằng μ CT 19 ngày trước khi xử lý bằng kháng thể và 11 ngày sau khi xử lý bằng kháng thể. Tất cả các kết quả được biểu diễn bằng giá trị trung bình $\pm$ SEM.

Như được thể hiện trong Fig. 6, việc giảm phần trăm mức thay đổi thể trọng quan sát được sau khi định liều bằng LEPR chất tiềm năng kháng thể, chứ không phải là kháng thể isotyp đối chứng. Như được thể hiện trong Fig. 6, các con chuột được xử lý bằng H4H18482P2 ở 30 mg/kg có phần trăm thể trọng giảm một cách đáng kể bắt đầu hai ngày sau khi xử lý (ngày 2), và ở các thời điểm khác so với các con chuột được tiêm kháng thể isotyp đối chứng. Các con chuột được xử lý bằng H4H18487P2 ở 30 mg/kg có phần trăm thể trọng giảm một cách đáng kể bắt đầu ở ngày 2 và ở các thời điểm khác so với các con chuột được tiêm kháng thể isotyp đối chứng. Các con chuột được xử lý bằng H4H18492P2 ở 30 mg/kg có phần trăm thể trọng giảm một cách đáng kể vào ngày 4, 5 và 17 nhưng không phải ở các thời điểm khác so với các con chuột được tiêm kháng thể isotyp đối chứng. Các con chuột được xử lý bằng H4H18482P2 ở 30 mg/kg có phần trăm thể trọng giảm một cách đáng kể bắt đầu ở ngày 6 và vào ngày tiếp theo nhưng không phải vào ngày 7, 14 và 17, so với các con chuột được tiêm H4H18492P2. Các con chuột được xử lý bằng H4H18487P2 ở 30 mg/kg có phần trăm

thể trọng giảm một cách đáng kể bắt đầu ở ngày 3 và ở các thời điểm khác, nhưng không phải vào ngày 4 và 5, so với các con chuột được tiêm H4H18492P2.

Như được thể hiện trong Fig. 7A, không có sự sai khác về thể trọng của chuột giữa các nhóm trước khi xử lý (ngày -19). Như được thể hiện trong Fig. 7B, các con chuột được xử lý bằng kháng thể H4H18482 và H4H18487, chứ không phải là H4H18492, ở 30 mg/kg có mức giảm đáng kể thể trọng của chuột về mặt thống kê 17 ngày sau khi xử lý (ngày 12) so với kháng thể isotyp đối chứng.

Sáng chế không giới hạn ở phạm vi các phương án cụ thể được đề cập trong bản mô tả này. Thực vậy, ngoài các biến đổi được đề cập trong bản mô tả này, với phần mô tả trên đây và các hình vẽ kèm theo thì các biến đổi khác nhau theo sáng chế sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các biến đổi như vậy được dự định nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 13: Hiệu quả của kháng thể kháng LEPR theo sáng chế đối với quá trình truyền tín hiệu LEPR của khí

Để đánh giá quá trình hoạt hóa phiên mã của thụ thể leptin của khí, dòng tế bào ổn định được phát triển. Các tế bào IMR-32 (ATCC u nguyên bào thần kinh ở người - human Neuroblastoma ATCC) được tạo ra để biểu hiện ổn định miền ngoại bào của LEPR của khí đuôi dài *Macaca fascicularis* (MfLEPR; axit amin 22 đến 837 có số truy nhập XP_005543194.1 với threonin ở vị trí 827 được thay đổi thành alanin) dung hợp với miền xuyên màng và bào tương của LEPR ở người (hLEPR; axit amin 840 đến 1165 có số truy nhập NP_002294.2) cùng với gen chỉ thị luciferaza (STAT3-Luc; SABiosciences, # CLS-6028L). Dòng tế bào thu được, sau đây được gọi là IMR-32/STAT3-Luc/MfLEPR được phân lập và duy trì trong môi trường MEM-Earl được bổ sung 10% FBS, NEAA, 1ug/mL Puromyxin, 100ug/mL Hygromyxin B và penixilin/Streptomycin/L-Glutamin.

Thử nghiệm sinh học được thực hiện để đo hiệu quả của kháng thể kháng LEPR theo sáng chế đối với quá trình truyền tín hiệu LEPR của khí khi không có mặt của leptin. Đối với thử nghiệm sinh học, các tế bào IMR-32/STAT3-Luc/MfLEPR được đặt vào đĩa ở mật độ 10.000 tế bào/giếng trong đĩa 96 giếng trong FBS 0,1% trong Optimem với penixilin/Streptomycin (dung dịch đệm thử nghiệm) và được ủ qua đêm ở 37°C trong CO₂ 5%. Ngày tiếp theo, leptin người (hLeptin), kháng thể kháng LEPR

hoặc kháng thể isotyp đối chứng được pha loãng liên tiếp từ 50nM đến 0,8pM trong dung dịch đệm thử nghiệm (cộng với mẫu chỉ chứa dung dịch đệm không chứa phân tử thử nghiệm) và được thêm vào các tế bào này. Sau 5,5 giờ ở 37°C trong CO₂ 5%, hoạt tính luciferaza được đo bằng chất phản ứng OneGlo™ (Promega, # E6031) và thiết bị đọc đĩa nhiều nhãn dán Victor™ X (Perkin Elmer). Các kết quả này được phân tích bằng cách sử dụng sự hồi quy phi tuyến tính (logistic 4 thông số) bằng phần mềm Prism™6 (GraphPad) để thu được giá trị EC₅₀. Phần trăm mức hoạt hóa kháng thể được tính toán là khoảng RLU tối đa đạt được bằng kháng thể so với phần trăm mức hoạt hóa kháng thể có khoảng RLU tối đa đạt được bằng hLeptin.

Như được trình bày trong Bảng 17, khi không có mặt hLeptin, đã cho thấy tất cả các kháng thể kháng LEPR được thử nghiệm hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu LEPR của khi ở các tế bào IMR-32/STAT3-Luc/mfLEPR với giá trị EC₅₀ nằm trong khoảng từ 266pM đến 368pM và mức hoạt hóa tối đa nằm trong khoảng từ 76% đến 82% khi mức hoạt hóa 100% thu được bằng hLeptin. hLeptin đã hoạt hóa với giá trị EC₅₀ bằng 333pM. Đã không chứng minh được kháng thể isotyp đối chứng kích thích các tế bào IMR-32/STAT3-Luc/mfLEPR ở mức đo được bất kỳ.

Bảng 17: Quá trình hoạt hóa LEPR của khi đuôi dài *Macaca fascicularis* bằng kháng thể kháng LEPR

Leptin hoặc kháng thể	EC ₅₀ (M)	% hoạt hóa
Leptin người	3,33E-11	100
H4H16650P2	2,66E-10	82
H4H16679P2	2,49E-10	80
H4H17319P2	3,65E-10	76
H4H17321P2	3,68E-10	78
Kháng thể isotyp đối chứng	Không hoạt hóa	Không hoạt hóa

Ví dụ 14: Quyết định kháng nguyên liên kết với miền ngoại bào của LEPR ở người có chiều dài đầy đủ bằng cách sử dụng tín hiệu Luminex MFI

Để xác định quyết định kháng nguyên của LEPR ở người mà kháng thể kháng LEPR theo sáng chế liên kết, phân tích trên cơ sở phép đếm tế bào theo dòng chảy Luminex FLEXMAP (FM3DD, LuminexCorp) được sử dụng để xác định đặc điểm sự

tương tác của kháng thể kháng LEPR với miền protein LEPR tái tổ hợp ở người. Đối với thử nghiệm này, khoảng 3 triệu vi cầu carboxyl hóa Microplex^R (Luminex, Cat# LC1000A) được rửa, tạo xoáy và nghiền bằng sóng âm trong NaPO₄ 0,1 M, pH 6,2 (dung dịch đệm hoạt hóa) và sau đó ly tâm để loại bỏ dịch nổi bề mặt. Vi cầu được tái tạo huyền phù trong 120 μ L dung dịch đệm hoạt hóa và các nhóm carboxylat (-COOH) được hoạt hóa bằng cách bổ sung 15 μ L 50 mg/mL N-hydroxysuccinimit (NHS, Thermo Scientific, Cat# 24500) tiếp theo là bổ sung 15 μ L 50 mg/mL 1-ethyl-3-[3-nhì phenylaminopropyl]carbodiimit (EDC, ThermoScientific, Cat# 22980) ở 25°C. Sau 10 phút, độ pH của dung dịch phản ứng được giảm đến 5,0 bằng cách bổ sung 600 μ L 50 mM MES, pH 5 (dung dịch đệm liên hợp), và vi cầu này được tạo xoáy, và ly tâm để loại bỏ dịch nổi bề mặt. Các giọt đã được hoạt hóa được trộn ngay với 500 μ L 20 μ g/mL kháng thể kháng myc đơn dòng với IgG của chuột hoặc IgG ở người, trong dung dịch đệm ngẫu hợp và được ủ trong hai giờ ở 25°C. Phản ứng ngẫu hợp được làm lạnh đột ngột bằng cách bổ sung 50 μ L 1M Tris-HCl, pH 8,0 và vi cầu được tạo xoáy mạnh, ly tâm, và được rửa bốn lần bằng 1 mL DPBS, để loại bỏ protein không ngẫu hợp và các thành phần phản ứng khác.

Protein LEPR được biểu hiện tạm thời, bao gồm miền ngoại bào LEPR ở người được biểu hiện bằng nhãn dán myc-myc hexahistidin đầu C (LEPR-MMH ở người, SEQ ID NO: 113), CRH1 LEPR ở người (D1) được biểu hiện bằng nhãn dán myc-myc hexahistidin đầu C (CRH1 LEPR(D1)-MMH ở người, axit amin 1-208 có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 113 với nhãn dán myc-myc hexahistidin, axit amin 209-236), miền CRH1 LEPR ở người (D1,D2) được biểu hiện bằng nhãn dán myc-myc hexahistidin đầu C (CRH1 LEPR (D1,D2)-MMH ở người, axit amin 1-318 có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 113 với nhãn dán myc-myc hexahistidin, axit amin 319-346), miền CRH1 LEPR-Ig ở người (D1,D2,D3) được biểu hiện bằng nhãn dán myc-myc hexahistidin đầu C (CRH1 LEPR (D1,D2,D3)-MMH ở người, axit amin 1-278 có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 113 với nhãn dán myc-myc hexahistidin, axit amin 279-306), miền CRH1 LEPR-Ig (D2,D3) ở người được biểu hiện bằng nhãn dán myc-myc hexahistidin đầu C (CRH1 LEPR-Ig (D2,D3)-MMH ở người, axit amin 1-198 có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 113 với nhãn dán myc-myc hexahistidin, axit amin 199-226), miền LEPR Ig (D3) ở người được biểu hiện bằng nhãn dán myc-myc hexahistidin đầu C (LEPR Ig (D3)-MMH ở người, axit

amin 1-88 có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 113 với nhãn dán myc-myc hexahistidin, axit amin 89-116), miền LEPR CRH2 ở người được biểu hiện bằng nhãn dán myc-myc hexahistidin đầu C (LEPR CRH2-MMH ở người, axit amin 1-207 có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 113 với nhãn dán myc-myc-hexahistidin, axit amin 208-235), miền FNIII LEPR ở người được biểu hiện bằng nhãn dán myc-myc hexahistidin đầu C (FNIII-MMH LEPR ở người, axit amin 1-204 có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 113 với nhãn dán myc-myc hexahistidin, axit amin 205-232), và miền Ig-CRH2-FNIII LEPR ở người được biểu hiện bằng nhãn dán myc-myc hexahistidin đầu C (LEPR Ig-CRH2-FNIII-MMH ở người, axit amin 1-510 có trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 113 với nhãn dán myc-myc-hexahistidin, axit amin 511-538), được tạo huyền phù trong môi trường CHO-S-SFM II không chứa huyết thanh (Thermo Fisher, Cat # 31033020) và sau đó được gạn sạch bằng cách ly tâm. Lượng nhỏ vi cầu với kháng thể đơn dòng kháng myc cố định, được tạo ra như được mô tả trên đây, được bổ sung riêng rẽ vào 1 mL mỗi dịch nổi bề mặt protein trong số các dịch nổi bề mặt protein này. Vi cầu được trộn nhẹ, ủ trong hai giờ ở 25°C, được rửa hai lần bằng 1 mL DBPS, ly tâm để loại bỏ dịch nổi bề mặt và tái tạo huyền phù cuối cùng trong 1 mL dung dịch đệm DPBS. 48 μ L vi cầu liên hợp IgG kháng myc từ các phản ứng riêng rẽ với LEPR ở người có chiều dài đầy đủ và với mỗi protein của miền LEPR ở người được rút ra và được trộn cùng nhau trong 3,6 mL PBS + 20mg/mL BSA+0,05% natri azit (dung dịch đệm phong bế).

Từ bể đã trộn này, 75 μ L vi cầu được đặt vào mỗi giếng trên đĩa lọc 96 giếng (Millipore, số danh mục MSBVN1250) và được trộn với 25 μ L kháng thể đơn dòng LEPR kháng người riêng rẽ (0,5 hoặc 5 μ g/mL), được ủ trong hai giờ ở 25°C và sau đó được rửa hai lần bằng 200 μ L DPBS với Tween 20 0,05% (dung dịch đệm rửa). Để dò và định lượng lượng kháng thể kháng LEPR đã liên kết với các vi cầu riêng rẽ, hoặc 100 μ L 2,5 μ g/mL kappa kháng người F(ab')₂ dê liên hợp R-Phycoerythrin (Southern Biotech, Cat# 2063-09) trong dung dịch đệm phong bế hoặc 100 μ L 1,25 μ g/mL IgG kháng chuột dê mảnh R-Phycoerythrin AffiniPure F(ab')₂, mảnh đặc hiệu F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch, số danh mục: 115-116-072) trong dung dịch đệm phong bế, được bổ sung và được ủ trong 30 phút ở 25°C. Sau 30 phút, các mẫu được rửa hai lần bằng 200 μ L dung dịch đệm rửa và tái tạo huyền phù trong 150 μ L dung dịch đệm rửa. Mật độ phát huỳnh quang trung bình (MFI) của vi cầu được đo trong thiết bị phân tích

Luminex.

Bảng 18: Tín hiệu Luminex MFI của kháng thể kháng LEPR liên kết với miền ngoại bào của LEPR ở người có chiều dài đầy đủ được bắt giữ bằng nhãn dán myc và miền LEPR ở người đã phân lập

Kháng thể	CRH1 (D1)	CRH1 (D1,D2)	CRH1-Ig (D1,D2,D3)	CRH1-Ig (D2,D3)	Ig (D3)	CRH2	FNIII	Ig-CRH2- FNIII	Miền ngoại bào có chiều dài đầy đủ	Vị trí liên kết chắc chắn
H4H18445P2	12	30	22	40	19	17	230	14544	6573	FNIII
H4H18446P2	17	682	205	645	25	65	32	16852	10536	Ig-CRH2- FNIII
H4H18482P2	13	40	21	52	27	23	167	15316	7311	Ig-CRH2- FNIII
H4H18487P2	12	51	29	62	22	27	174	16320	7329	Ig-CRH2- FNIII
H4H18417P2	10	16048	3334	5502	17	39	14	37	4887	CRH1 D2
H4H18438P2	13	18931	6572	8884	30	165	25	468	6251	CRH1 D2
H4H18492P2	11	19371	6354	8685	19	18	16	186	6382	CRH1 D2
H4H18449P2	20	2934	2056	42	24	15	13	43	7976	CRH1(D1-2)
H4H16650P2	8	4722	2562	74	10	16	6	110	7603	CRH1(D1-2)
H4H16679P2	12	4388	2797	34	14	33	10	42	7507	CRH1(D1-2)
H4H17319P2	8	1246	938	14	8	91	20	8	3305	CRH1(D1-2)
H4H17321P2	9	2649	1752	15	7	116	40	14	4696	CRH1(D1-2)
MAb so sánh	-14	19	-57	27	10	9404	73	7112	3908	CRH2

Kết quả về phân tích trên cơ sở Luminex được nêu trong Bảng 18. Cường độ tín hiệu Luminex MFI chỉ ra rằng 12 kháng thể kháng LEPR theo sáng chế đã liên kết với miền ngoại bào LEPR ở người hoàn chỉnh. Kháng thể kháng LEPR H4H18417P2, H4H18438P2, và H4H18492P2, đã liên kết với quyết định kháng nguyên trong miền CRH1 D2 của LEPR ở người. Kháng thể kháng LEPR H4H18449P2, H4H16650P và H4H16679P, đã liên kết với quyết định kháng nguyên trong miền CRH1(D1-2) của LEPR ở người. Kháng thể kháng LEPR MAb so sánh, đã liên kết với quyết định kháng nguyên trong CRH2 miền của LEPR ở người. Kháng thể kháng LEPR H4H18445P2 đã liên kết với quyết định kháng nguyên trong miền FNIII của LEPR ở người. Kháng thể kháng LEPR H4H18446P2, H4H18482P2 và H4H18487P2, đã liên kết với quyết định kháng nguyên trong miền Ig-CRH2-FNIII của LEPR ở người.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với thụ thể leptin người (LEPR) bao gồm:

vùng xác định hỗ trợ (CDR) chuỗi nhẹ của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10; và

CDR chuỗi nặng của vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 26 hoặc SEQ ID NO: 34.

2. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với thụ thể leptin người (LEPR) bao gồm:

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

vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 26 hoặc SEQ ID NO: 34.

3. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với thụ thể leptin người (LEPR) bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10; và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

4. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 3, là kháng thể.

5. Kháng thể theo điểm 4, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được liên kết với miền hằng định chuỗi nặng IgG1 của người và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết với miền hằng định chuỗi nhẹ kappa của người.

6. Kháng thể theo điểm 4, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được liên kết với miền hằng định chuỗi nặng IgG4 của người và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết với miền hằng định chuỗi nhẹ kappa của người.

7. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với thụ thể leptin người (LEPR) bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10; và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 26.

8. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 7, là

kháng thể.

9. Kháng thể theo điểm 8, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được liên kết với miền hằng định chuỗi nặng IgG1 của người và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết với miền hằng định chuỗi nhẹ kappa của người.

10. Kháng thể theo điểm 8, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được liên kết với miền hằng định chuỗi nặng IgG4 của người và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết với miền hằng định chuỗi nhẹ kappa của người.

11. Kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết với thụ thể leptin người (LEPR) bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10; và vùng biến đổi chuỗi nặng chứa trình tự axit amin như trong SEQ ID NO: 34.

12. Kháng thể hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó theo điểm 11, là kháng thể.

13. Kháng thể theo điểm 12, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được liên kết với miền hằng định chuỗi nặng IgG1 của người và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết với miền hằng định chuỗi nhẹ kappa của người.

14. Kháng thể theo điểm 12, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng được liên kết với miền hằng định chuỗi nặng IgG4 của người và vùng biến đổi chuỗi nhẹ được liên kết với miền hằng định chuỗi nhẹ kappa của người.

15. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 4 và chất mang dược dụng hoặc chất pha loãng.

16. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 8 và chất mang dược dụng hoặc chất pha loãng.

17. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 12 và chất mang dược dụng hoặc chất pha loãng.

18. Kháng thể theo điểm 4, trong đó kháng thể này được kết hợp với một hoặc nhiều thành phần hoạt tính trị liệu bổ sung.

19. Kháng thể theo điểm 8, trong đó kháng thể này được kết hợp với một hoặc nhiều thành phần hoạt tính trị liệu bổ sung.

20. Kháng thể theo điểm 12, trong đó kháng thể này được kết hợp với một hoặc nhiều thành phần hoạt tính trị liệu bổ sung.

21. Thiết bị phân phối dạng bút chứa được phẩm theo điểm 15.

22. Thiết bị phân phối dạng bút chứa được phẩm theo điểm 16.

23. Thiết bị phân phối dạng bút chứa được phẩm theo điểm 17.

24. Kháng thể theo điểm 4, trong đó kháng thể này được kết hợp với leptin người tái tổ hợp, alirocumab, evolocumab, bococizumab, lodelcizumab, ralpancizumab, atorvastatin, rosuvastatin, cerivastatin, pitavastatin, fluvastatin, simvastatin, lovastatin, pravastatin, ezetimib, insulin, metformin, dapagliflozin, canagliflozin, empagliflozin, extendin-4, exenatit, liraglutit, lixisenatit, albiglutit, dulaglutit, kháng thể kháng GCG, kháng thể kháng GCGR, kháng thể kháng ANGPTL3, kháng thể kháng ANGPTL4, kháng thể kháng ANGPTL8, phentermin, orlistat, topiramat, bupropion, topiramat và phentermine, bupropion và naltrexon, bupropion và zonisamit, pramlintit và metrelepin, lorcaserin, cetilistat, tesofensin hoặc velneperit.

25. Kháng thể theo điểm 8, trong đó kháng thể này được kết hợp với leptin người tái tổ hợp, alirocumab, evolocumab, bococizumab, lodelcizumab, ralpancizumab, atorvastatin, rosuvastatin, cerivastatin, pitavastatin, fluvastatin, simvastatin, lovastatin, pravastatin, ezetimib, insulin, metformin, dapagliflozin, canagliflozin, empagliflozin, extendin-4, exenatit, liraglutit, lixisenatit, albiglutit, dulaglutit, kháng thể kháng GCG, kháng thể kháng GCGR, kháng thể kháng ANGPTL3, kháng thể kháng ANGPTL4, kháng thể kháng ANGPTL8, phentermine, orlistat, topiramat, bupropion, topiramat và phentermine, bupropion và naltrexon, bupropion và zonisamit, pramlintit và metrelepin, lorcaserin, cetilistat, tesofensin hoặc velneperit.

26. Kháng thể theo điểm 12, trong đó kháng thể này được kết hợp với leptin người tái tổ hợp, alirocumab, evolocumab, bococizumab, lodelcizumab, ralpancizumab, atorvastatin, rosuvastatin, cerivastatin, pitavastatin, fluvastatin, simvastatin, lovastatin, pravastatin, ezetimib, insulin, metformin, dapagliflozin, canagliflozin, empagliflozin, extendin-4, exenatit, liraglutit, lixisenatit, albiglutit, dulaglutit, kháng thể kháng GCG, kháng thể kháng GCGR, kháng thể kháng

ANGPTL3, kháng thể kháng ANGPTL4, kháng thể kháng ANGPTL8, phentermine, orlistat, topiramate, bupropion, topiramate và phentermine, bupropion và naltrexone, bupropion và zonisamide, pramlintide và metrelepin, lorcaserin, cetilistat, tesofensin hoặc velneperit.

27. Kháng thể theo điểm 4, trong đó kháng thể này là kháng thể đặc hiệu kép.
28. Kháng thể theo điểm 8, trong đó kháng thể này là kháng thể đặc hiệu kép,
29. Kháng thể theo điểm 12, trong đó kháng thể này là kháng thể đặc hiệu kép.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP LIÊN KẾT VỚI THỤ THỂ LEPTIN NGƯỜI VÀ ĐƯỢC PHÂM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 10178W001

<150> 62/240,021

<151> 2015-10-12

<150> 62/359,757

<151> 2016-07-08

<150> 62/375,495

<151> 2016-08-16

<150> 62/393,143

<151> 2016-09-12

<160> 120

<170> FastSEQ cho hệ điều hành Windows phiên bản 4.0

<210> 1

<211> 357

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 1

```
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaagtc cctgagactc 60
tcctgtgtag cgtctggatt caccttcagt tccgatgcca tgtactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggaatg ggtggcagtt atttattatg atggaaatta tcaatactat 180
gaagactccg ttaagggtcg attcaccatc tccagagaca attcccagaa cacgctggat 240
ctgcaaatga acagcctgag agtcgacgac acggctgtat atttctgtgc gcgtctcaac 300
tgggattact ggtatctcga tctctggggc cgtggcaccc tggtcactgt ctcctca 357
```

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 2

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

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

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 3
 ggattcacct tcagttccga tgcc

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 4
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asp Ala
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 5
 atttattatg atggaaatta tcaa

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 6
 Ile Tyr Tyr Asp Gly Asn Tyr Gln
 1 5

<210> 7

<211> 36

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 7

gcgcgtctca actgggatta ctggtatctc gatctc

36

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 8

Ala	Arg	Leu	Asn	Trp	Asp	Tyr	Trp	Tyr	Leu	Asp	Leu
1				5					10		

<210> 9

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 9

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

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 10

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

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

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 11
 cagagcatta gcagctat

18

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 12
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 13
 gctgcatcc

9

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 14
 Ala Ala Ser
 1

<210> 15
 <211> 30
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 15

caacagagtt acagtacccc tccgatcacc

30

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 16

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr

1

5

10

<210> 17

<211> 357

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 17

caggtgcagc tgggtggagtc cgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtacag cgtctggatt caccttcagt agttatgcc a tgtactgggt cgc ccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgtcagtt atatactatg atggaagtta taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatgg acagcctgag agccgaggac acggctgtct attactgtgc gagttataac 300
tggaactact ggtacttcga tttctggggc cgtggcacc tggtcactgt ctcctca 357

<210> 18

<211> 119

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

				85					90					95			
Ala	Ser	Tyr	Asn	Trp	Asn	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Arg	Gly		
			100					105					110				
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
			115														

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 19
 ggattcacct tcagtagtta tgcc

24

<210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 20
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 21
 atatactatg atggaagtta taaa

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 22
 Ile Tyr Tyr Asp Gly Ser Tyr Lys
 1 5

<210> 23
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 23

gcgagttata actggaacta ctggtacttc gatttc

36

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 24

Ala Ser Tyr Asn Trp Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Phe

1

5

10

<210> 25

<211> 357

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 25

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaagc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt acatatgcca tgtactgggt cgcagact 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggctgtt ttatactctg atggaagtaa taaatactat 180
 atagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca cttccacgaa cactctgtat 240
 ctgcaaata gaagcctgcg agccgacgac tcggctctat attactgtgc gcgtctcaac 300
 tgggattact ggtacttcga tctctggggc cgtggcacc tggtcactgt ctcctca 357

<210> 26

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 26

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

Ala Arg Leu Asn Trp Asp Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 27
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 27
 ggattcacct tcagtacata tgcc 24

<210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 28
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala
 1 5

<210> 29
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 29
 ttataactctg atggaagtaa taaa 24

<210> 30
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 30
 Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5

<210> 31
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 31

gcgcgtctca actgggatta ctggtacttc gatctc

36

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 32

Ala Arg Leu Asn Trp Asp Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu

1

5

10

<210> 33

<211> 357

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 33

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgaag cgtctggatt cagcagcagt gacaatgcca tgtactgggt cccagggt 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtgtcagtt atatatcatg atggaagtta taaatactat 180
 gaagactccg tgaagggccg attcaccatc gccagagaca attccaagaa cacgctttat 240
 ttgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtat attactgtgc gaggtataac 300
 tggaaccact ggtacttcga tgtctggggc cgtggcacc cgtggtcactgt ctcctca 357

<210> 34

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 34

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

Ala Arg Tyr Asn Trp Asn His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 35
 ggattcagca gcagtgacaa tgcc

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

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

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 37
 atatatcatg atggaagtta taaa

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 38
 Ile Tyr His Asp Gly Ser Tyr Lys
 1 5

<210> 39
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 39

gcgaggtata actggaacca ctggtacttc gatgtc

36

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 40

Ala Arg Tyr Asn Trp Asn His Trp Tyr Phe Asp Val

1

5

10

<210> 41

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 41

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctatggca tgcactgggt cgcaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtgtcagtt atatcatatg acgaaagtaa taagtactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatt tctagagaca attccaagaa cgcgctgtat 240
 ttacaaatga acagcctgag aaatgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgg 300
 ccttttggat tggttaccgg atggttcgac ccctggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 42

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 42

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

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

<210> 43
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 43
 ggattcacct tcagtaccta tggc

24

<210> 44
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 44
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly
 1 5

<210> 45
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 45
 atatcatatg acgaaagtaa taag

24

<210> 46
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 46
 Ile Ser Tyr Asp Glu Ser Asn Lys
 1 5

<210> 47
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 47
 gcgagagatc ggccttttgg attggttacc ggatgggttcg acccc 45

<210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 48
 Ala Arg Asp Arg Pro Phe Gly Leu Val Thr Gly Trp Phe Asp Pro
 1 5 10 15

<210> 49
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 49
 caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgtctggatt cagtttcaat acctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtgacaatt atatggtatg atggaagtat taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attattgtgc gagagggtgga 300
 tatagtggct acctctactt tgactacttg ggccaggga ccttggtcac cgtctcctca 360

<210> 50
 <211> 120
 <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 Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 51
 ggattcagtt tcaataccta tggc

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

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

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 53
 atatggtatg atggaagtat taaa

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 54

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Ile Lys
1 5

<210> 55
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 55
gcgagagggtg gatatagtggt ctacctctac tttgactac 39

<210> 56
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 56
Ala Arg Gly Gly Tyr Ser Gly Tyr Leu Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 57
<211> 372
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 57
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggttg ctccatcagc agcgggtggtg actactggag ctggatccgc 120
cagctccag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcgctac 180
tataatccgt cctcaagag tcgaggtacc atatcaatag acacgtctaa gaaccagttc 240
tcctgaagc tgacctctgt gactgccgcg gacacggccg tatatttctg tgtgaaatta 300
cgatttttgg agtggttctt ggggggctgg ttcggccccct ggggccaggg aaccctggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 58
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 58
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

<210> 59
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 59
 ggtggctcca tcagcagcgg tgggtgactac

30

<210> 60
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 60
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asp Tyr
 1 5 10

<210> 61
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 61
 atctattaca gtgggagcgc c

21

<210> 62
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 62

Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ala

1

5

<210> 63

<211> 48

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 63

gtgaaattac gattttttgga gtggttcttg gggggctggt tcggcccc

48

<210> 64

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 64

Val Lys Leu Arg Phe Leu Glu Trp Phe Leu Gly Gly Trp Phe Gly Pro

1

5

10

15

<210> 65

<211> 351

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 65

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc aactatggca tgacctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg gcctggaatg ggtctcagct attactgggtg gtggtggtag cacatactac 180
 tcaaactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacggtgtat 240
 ctgcgaatga acagtgtgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaatataag 300
 tggaacttcg tggacgactg gggccaggga accacgggtca ccgtctcctc a 351

<210> 66

<211> 117

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 66
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asn 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 Arg Met Asn Ser Val Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Lys Trp Asn Phe Val Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 67
 ggattcacct ttagcaacta tggc

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 68
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly
 1 5

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 69
 attactggtg gtggtggttag caca

24

<210> 70
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

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

<210> 71
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 71
 gcgaaatata agtggaactt cgtggacgac 30

<210> 72
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 72
 Ala Lys Tyr Lys Trp Asn Phe Val Asp Asp
 1 5 10

<210> 73
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 73
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgttg cctctggatt caccttcaat aaatacgaca tgcactgggt cgcctaaact 120
 actggaaaag gtctagagtg ggtctcaggt attgatactg atggtagacac atactatcca 180
 ggctccgtga agggccgatt caccatctcc agagaaaatg ccgagaactc cctgtatctt 240
 caaatgaacg gcctgagagt cggggacacg gctgtgtatt actgtgcaag atggccttgg 300
 agtggtttct atggtgcttt tgatatctgg ggccaaggga caatgggtcac cgtctcttca 360

<210> 74
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 74

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

<210> 75

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 75

ggattcacct tcaataaata cgac

24

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 76

Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Lys	Tyr	Asp
1				5			

<210> 77

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 77

attgatactg atggtgacac a

21

<210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 78

Ile Asp Thr Asp Gly Asp Thr

1

5

<210> 79

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 79

gcaagatggc cttggagtgg tttctatggt gcttttgata tc

42

<210> 80

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 80

Ala Arg Trp Pro Trp Ser Gly Phe Tyr Gly Ala Phe Asp Ile

1

5

10

<210> 81

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 81

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtaatt actactggaa ctggatccgc 120
caacagccag gagagggcct ggagtggatt gcttacatct atcacaatgg ggtcaccaac 180
ttcaatccgt ccctcaagag tcgacttact atatcagtag acacgtctaa gactcagttc 240
tccttgaagt tgaggctctgt gactgccgcg gacacggccg tttattactg tgcgagatca 300
ggcagctggt tcgagaactg gtacttcgat ctctggggcc gtggcaccct ggtcactgtc 360
tcctca 366

<210> 82
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 82
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30
 Asn Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Gln Pro Gly Glu Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Ala Tyr Ile Tyr His Asn Gly Val Thr Asn Phe Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Thr Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Ser Gly Ser Trp Phe Glu Asn Trp Tyr Phe Asp Leu Trp
 100 105 110
 Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 83
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 83
 ggtggctcca tcagcagtg taattactac

30

<210> 84
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 84
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Asn Tyr Tyr
 1 5 10

<210> 85
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 85

atctatcaca atggggtcac c

21

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 86

Ile Tyr His Asn Gly Val Thr

1

5

<210> 87

<211> 42

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 87

gcgagatcag gcagctgggt cgagaactgg tacttcgata tc

42

<210> 88

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 88

Ala Arg Ser Gly Ser Trp Phe Glu Asn Trp Tyr Phe Asp Leu

1

5

10

<210> 89

<211> 324

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 89

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatcca 180
 gacaggttca gtggcagtggt gtctggggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtta ttactgtcag cagtatggta gctcaccttg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaa 324

<210> 90
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 90
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> 91
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

<400> 91
cagagtgtta gcagcagcta c

21

<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tổng hợp

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

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

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 93

ggtgcatcc

9

<210> 94

<211> 3

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 94

Gly Ala Ser

1

<210> 95

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 95

cagcagtatg gtagctcacc ttggacg

27

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 96

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1

5

<210> 97

<211> 360

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 97

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt aattcctact ggagctggat ccggcagccc 120
 ccagggaagg gactggagtg gattggatat gtctattccc gtgggaacac caagtacaac 180

ccctccctca cgagtcgagt caccatgtca tttagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aaactgaggt ctgtgaccgc cgcagacacg gccgtgtatt actgtgcgag aagcagcagc 300
 tggtagagg actggtactt cgatctctgg ggccgtggca ccctgggtcac tgtctcctca 360

<210> 98
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 98
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Ser
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Val Tyr Ser Arg Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Pro Ser Leu Thr
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Met Ser Phe Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ser Ser Ser Trp Tyr Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg
 100 105 110
 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
 ggtggctcca tcagtaattc ctac

24

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

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 100
 Gly Gly Ser Ile Ser Asn Ser Tyr
 1 5

<210> 101
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 101
 gtctattccc gtgggaacac c

21

<210> 102
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 102
 Val Tyr Ser Arg Gly Asn Thr
 1 5

<210> 103
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 103
 gcgagaagca gcagctggta cgaggactgg tacttcgac tc

42

<210> 104
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 104
 Ala Arg Ser Ser Ser Trp Tyr Glu Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10

<210> 105
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 105

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcaggg ctgtttaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgatg tctatggtag gtccttcaga ggttattatt ggagttggat ccgccagccc 120
 ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcagttata gtggtttcac caattacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt catcatatca atagatacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagatgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtttatt actgtgagag agttacctat 300
 ggttatggga cctttgatta ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 106

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 106

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

<210> 107

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 107

ggtgggtcct tcagaggcta ttat

24

<210> 108

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tổng hợp

<400> 108

Gly Gly Ser Phe Arg Gly Tyr Tyr

1

5

<210> 109
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 109
 atcagttata gtggtttcac c

21

<210> 110
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 110
 Ile Ser Tyr Ser Gly Phe Thr
 1 5

<210> 111
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 111
 gcgagagtta cctatgggta tgggaccttt gattat

36

<210> 112
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tổng hợp

<400> 112
 Ala Arg Val Thr Tyr Gly Tyr Gly Thr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 113
 <211> 1165
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hLEPR Accession No P48357

<400> 113

```

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

```

Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile
 420 425 430
 Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg
 435 440 445
 Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu
 450 455 460
 Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His
 465 470 475 480
 Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr
 485 490 495
 Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp
 500 505 510
 Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys
 515 520 525
 Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys
 530 535 540
 Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys
 545 550 555 560
 Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu
 565 570 575
 Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys
 580 585 590
 Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala
 595 600 605
 Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn
 610 615 620
 Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met
 625 630 635 640
 Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys
 645 650 655
 Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser
 660 665 670
 Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn
 675 680 685
 Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu
 690 695 700
 Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile
 705 710 715 720
 Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser
 725 730 735
 Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser
 740 745 750
 Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met
 755 760 765
 Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys
 770 775 780
 Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His
 785 790 795 800
 Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met
 805 810 815
 Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp
 820 825 830
 Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val Ile Val Pro Val
 835 840 845
 Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser His
 850 855 860

Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro Asn Pro Lys Asn
 865 870 875 880
 Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Pro Glu Thr Phe Glu
 885 890 895
 His Leu Phe Ile Lys His Thr Ala Ser Val Thr Cys Gly Pro Leu Leu
 900 905 910
 Leu Glu Pro Glu Thr Ile Ser Glu Asp Ile Ser Val Asp Thr Ser Trp
 915 920 925
 Lys Asn Lys Asp Glu Met Met Pro Thr Thr Val Val Ser Leu Leu Ser
 930 935 940
 Thr Thr Asp Leu Glu Lys Gly Ser Val Cys Ile Ser Asp Gln Phe Asn
 945 950 955 960
 Ser Val Asn Phe Ser Glu Ala Glu Gly Thr Glu Val Thr Tyr Glu Asp
 965 970 975
 Glu Ser Gln Arg Gln Pro Phe Val Lys Tyr Ala Thr Leu Ile Ser Asn
 980 985 990
 Ser Lys Pro Ser Glu Thr Gly Glu Glu Gln Gly Leu Ile Asn Ser Ser
 995 1000 1005
 Val Thr Lys Cys Phe Ser Ser Lys Asn Ser Pro Leu Lys Asp Ser Phe
 1010 1015 1020
 Ser Asn Ser Ser Trp Glu Ile Glu Ala Gln Ala Phe Phe Ile Leu Ser
 1025 1030 1035 1040
 Asp Gln His Pro Asn Ile Ile Ser Pro His Leu Thr Phe Ser Glu Gly
 1045 1050 1055
 Leu Asp Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly Asn Phe Pro Glu Glu Asn Asn
 1060 1065 1070
 Asp Lys Lys Ser Ile Tyr Tyr Leu Gly Val Thr Ser Ile Lys Lys Arg
 1075 1080 1085
 Glu Ser Gly Val Leu Leu Thr Asp Lys Ser Arg Val Ser Cys Pro Phe
 1090 1095 1100
 Pro Ala Pro Cys Leu Phe Thr Asp Ile Arg Val Leu Gln Asp Ser Cys
 1105 1110 1115 1120
 Ser His Phe Val Glu Asn Asn Ile Asn Leu Gly Thr Ser Ser Lys Lys
 1125 1130 1135
 Thr Phe Ala Ser Tyr Met Pro Gln Phe Gln Thr Cys Ser Thr Gln Thr
 1140 1145 1150
 His Lys Ile Met Glu Asn Lys Met Cys Asp Leu Thr Val
 1155 1160 1165

<210> 114

<211> 846

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hLEPR.mmh

aa 1-818: F22-D839 của P48357

aa 819-846: nhân gien myc-myc-hexahistidin

<400> 114

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

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

			485				490				495				
Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Asp	Ser	Pro	Pro	Thr	Cys	Val	Leu	Pro	Asp	Ser
			500				505			510					
Val	Val	Lys	Pro	Leu	Pro	Pro	Ser	Ser	Val	Lys	Ala	Glu	Ile	Thr	Ile
			515				520	525			525				
Asn	Ile	Gly	Leu	Leu	Lys	Ile	Ser	Trp	Glu	Lys	Pro	Val	Phe	Pro	Glu
			530				535	540			540				
Asn	Asn	Leu	Gln	Phe	Gln	Ile	Arg	Tyr	Gly	Leu	Ser	Gly	Lys	Glu	Val
			545				550	555			560				
Gln	Trp	Lys	Met	Tyr	Glu	Val	Tyr	Asp	Ala	Lys	Ser	Lys	Ser	Val	Ser
			565				570			575					
Leu	Pro	Val	Pro	Asp	Leu	Cys	Ala	Val	Tyr	Ala	Val	Gln	Val	Arg	Cys
			580				585			590					
Lys	Arg	Leu	Asp	Gly	Leu	Gly	Tyr	Trp	Ser	Asn	Trp	Ser	Asn	Pro	Ala
			595				600	605			605				
Tyr	Thr	Val	Val	Met	Asp	Ile	Lys	Val	Pro	Met	Arg	Gly	Pro	Glu	Phe
			610				615	620			620				
Trp	Arg	Ile	Ile	Asn	Gly	Asp	Thr	Met	Lys	Lys	Glu	Lys	Asn	Val	Thr
			625				630	635			640				
Leu	Leu	Trp	Lys	Pro	Leu	Met	Lys	Asn	Asp	Ser	Leu	Cys	Ser	Val	Gln
			645				650			655					
Arg	Tyr	Val	Ile	Asn	His	His	Thr	Ser	Cys	Asn	Gly	Thr	Trp	Ser	Glu
			660				665			670					
Asp	Val	Gly	Asn	His	Thr	Lys	Phe	Thr	Phe	Leu	Trp	Thr	Glu	Gln	Ala
			675				680			685					
His	Thr	Val	Thr	Val	Leu	Ala	Ile	Asn	Ser	Ile	Gly	Ala	Ser	Val	Ala
			690				695	700			700				
Asn	Phe	Asn	Leu	Thr	Phe	Ser	Trp	Pro	Met	Ser	Lys	Val	Asn	Ile	Val
			705				710	715			720				
Gln	Ser	Leu	Ser	Ala	Tyr	Pro	Leu	Asn	Ser	Ser	Cys	Val	Ile	Val	Ser
			725				730			735					
Trp	Ile	Leu	Ser	Pro	Ser	Asp	Tyr	Lys	Leu	Met	Tyr	Phe	Ile	Ile	Glu
			740				745			750					
Trp	Lys	Asn	Leu	Asn	Glu	Asp	Gly	Glu	Ile	Lys	Trp	Leu	Arg	Ile	Ser
			755				760	765			765				
Ser	Ser	Val	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Ile	His	Asp	His	Phe	Ile	Pro	Ile	Glu
			770				775	780			780				
Lys	Tyr	Gln	Phe	Ser	Leu	Tyr	Pro	Ile	Phe	Met	Glu	Gly	Val	Gly	Lys
			785				790	795			800				
Pro	Lys	Ile	Ile	Asn	Ser	Phe	Thr	Gln	Asp	Asp	Ile	Glu	Lys	His	Gln
			805				810			815					
Ser	Asp	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Gly	Gly	Glu	Gln
			820				825			830					
Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	His	His	His	His	His	His		
			835				840			845					

```
<210> 115
<211> 1051
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

```
<220>
<223> hLEPR.mFc
      aa 1-818: F22-D839 của P48357
      aa 819-1051: IgG2a chuột nhà (E98-K330 của P01863)
```

<400> 115

Phe	Asn	Leu	Ser	Tyr	Pro	Ile	Thr	Pro	Trp	Arg	Phe	Lys	Leu	Ser	Cys
1				5					10					15	
Met	Pro	Pro	Asn	Ser	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Phe	Leu	Leu	Pro	Ala	Gly	Leu
			20					25					30		
Ser	Lys	Asn	Thr	Ser	Asn	Ser	Asn	Gly	His	Tyr	Glu	Thr	Ala	Val	Glu
		35					40					45			
Pro	Lys	Phe	Asn	Ser	Ser	Gly	Thr	His	Phe	Ser	Asn	Leu	Ser	Lys	Thr
	50					55					60				
Thr	Phe	His	Cys	Cys	Phe	Arg	Ser	Glu	Gln	Asp	Arg	Asn	Cys	Ser	Leu
65					70					75					80
Cys	Ala	Asp	Asn	Ile	Glu	Gly	Lys	Thr	Phe	Val	Ser	Thr	Val	Asn	Ser
			85						90					95	
Leu	Val	Phe	Gln	Gln	Ile	Asp	Ala	Asn	Trp	Asn	Ile	Gln	Cys	Trp	Leu
			100					105					110		
Lys	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu	Phe	Ile	Cys	Tyr	Val	Glu	Ser	Leu	Phe	Lys
		115					120					125			
Asn	Leu	Phe	Arg	Asn	Tyr	Asn	Tyr	Lys	Val	His	Leu	Leu	Tyr	Val	Leu
	130					135					140				
Pro	Glu	Val	Leu	Glu	Asp	Ser	Pro	Leu	Val	Pro	Gln	Lys	Gly	Ser	Phe
145					150					155					160
Gln	Met	Val	His	Cys	Asn	Cys	Ser	Val	His	Glu	Cys	Cys	Glu	Cys	Leu
				165					170					175	
Val	Pro	Val	Pro	Thr	Ala	Lys	Leu	Asn	Asp	Thr	Leu	Leu	Met	Cys	Leu
			180					185					190		
Lys	Ile	Thr	Ser	Gly	Gly	Val	Ile	Phe	Gln	Ser	Pro	Leu	Met	Ser	Val
		195					200					205			
Gln	Pro	Ile	Asn	Met	Val	Lys	Pro	Asp	Pro	Pro	Leu	Gly	Leu	His	Met
	210					215					220				
Glu	Ile	Thr	Asp	Asp	Gly	Asn	Leu	Lys	Ile	Ser	Trp	Ser	Ser	Pro	Pro
225					230					235					240
Leu	Val	Pro	Phe	Pro	Leu	Gln	Tyr	Gln	Val	Lys	Tyr	Ser	Glu	Asn	Ser
			245						250					255	
Thr	Thr	Val	Ile	Arg	Glu	Ala	Asp	Lys	Ile	Val	Ser	Ala	Thr	Ser	Leu
			260					265					270		
Leu	Val	Asp	Ser	Ile	Leu	Pro	Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Val	Gln	Val	Arg
		275					280					285			
Gly	Lys	Arg	Leu	Asp	Gly	Pro	Gly	Ile	Trp	Ser	Asp	Trp	Ser	Thr	Pro
	290					295					300				
Arg	Val	Phe	Thr	Thr	Gln	Asp	Val	Ile	Tyr	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Leu
305					310					315					320
Thr	Ser	Val	Gly	Ser	Asn	Val	Ser	Phe	His	Cys	Ile	Tyr	Lys	Lys	Glu
			325						330					335	
Asn	Lys	Ile	Val	Pro	Ser	Lys	Glu	Ile	Val	Trp	Trp	Met	Asn	Leu	Ala
		340						345					350		
Glu	Lys	Ile	Pro	Gln	Ser	Gln	Tyr	Asp	Val	Val	Ser	Asp	His	Val	Ser
	355						360					365			
Lys	Val	Thr	Phe	Phe	Asn	Leu	Asn	Glu	Thr	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Phe
	370					375					380				
Thr	Tyr	Asp	Ala	Val	Tyr	Cys	Cys	Asn	Glu	His	Glu	Cys	His	His	Arg
385					390					395					400
Tyr	Ala	Glu	Leu	Tyr	Val	Ile	Asp	Val	Asn	Ile	Asn	Ile	Ser	Cys	Glu
			405						410					415	
Thr	Asp	Gly	Tyr	Leu	Thr	Lys	Met	Thr	Cys	Arg	Trp	Ser	Thr	Ser	Thr
			420					425					430		

Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser
 435 440 445
 Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro
 450 455 460
 Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln
 465 470 475 480
 Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His
 485 490 495
 Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser
 500 505 510
 Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile
 515 520 525
 Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu
 530 535 540
 Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val
 545 550 555 560
 Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser
 565 570 575
 Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys
 580 585 590
 Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala
 595 600 605
 Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe
 610 615 620
 Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr
 625 630 635 640
 Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln
 645 650 655
 Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu
 660 665 670
 Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala
 675 680 685
 His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala
 690 695 700
 Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val
 705 710 715 720
 Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser
 725 730 735
 Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu
 740 745 750
 Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser
 755 760 765
 Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu
 770 775 780
 Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys
 785 790 795 800
 Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln
 805 810 815
 Ser Asp Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys
 820 825 830
 Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 835 840 845
 Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr
 850 855 860
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser
 865 870 875 880

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

<210> 116

<211> 1045

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hLEPR.hFc

aa 1-818: F22-D839 của P48357

aa 819-1045: nhãn gắn IgG1 người (D104-K330 của P01857)

<400> 116

Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu
 20 25 30
 Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu
 35 40 45
 Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr
 50 55 60
 Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu
 65 70 75 80
 Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser
 85 90 95
 Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu
 100 105 110
 Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys
 115 120 125
 Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu
 130 135 140
 Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe
 145 150 155 160
 Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu

				165					170					175			
Val	Pro	Val	Pro	Thr	Ala	Lys	Leu	Asn	Asp	Thr	Leu	Leu	Met	Cys	Leu		
			180					185					190				
Lys	Ile	Thr	Ser	Gly	Gly	Val	Ile	Phe	Gln	Ser	Pro	Leu	Met	Ser	Val		
		195					200					205					
Gln	Pro	Ile	Asn	Met	Val	Lys	Pro	Asp	Pro	Pro	Leu	Gly	Leu	His	Met		
	210					215					220						
Glu	Ile	Thr	Asp	Asp	Gly	Asn	Leu	Lys	Ile	Ser	Trp	Ser	Ser	Pro	Pro		
225					230					235					240		
Leu	Val	Pro	Phe	Pro	Leu	Gln	Tyr	Gln	Val	Lys	Tyr	Ser	Glu	Asn	Ser		
				245					250					255			
Thr	Thr	Val	Ile	Arg	Glu	Ala	Asp	Lys	Ile	Val	Ser	Ala	Thr	Ser	Leu		
			260					265					270				
Leu	Val	Asp	Ser	Ile	Leu	Pro	Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Val	Gln	Val	Arg		
		275					280					285					
Gly	Lys	Arg	Leu	Asp	Gly	Pro	Gly	Ile	Trp	Ser	Asp	Trp	Ser	Thr	Pro		
	290					295					300						
Arg	Val	Phe	Thr	Thr	Gln	Asp	Val	Ile	Tyr	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Leu		
305					310					315					320		
Thr	Ser	Val	Gly	Ser	Asn	Val	Ser	Phe	His	Cys	Ile	Tyr	Lys	Lys	Glu		
				325					330					335			
Asn	Lys	Ile	Val	Pro	Ser	Lys	Glu	Ile	Val	Trp	Trp	Met	Asn	Leu	Ala		
			340					345					350				
Glu	Lys	Ile	Pro	Gln	Ser	Gln	Tyr	Asp	Val	Val	Ser	Asp	His	Val	Ser		
		355					360					365					
Lys	Val	Thr	Phe	Phe	Asn	Leu	Asn	Glu	Thr	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Phe		
	370					375					380						
Thr	Tyr	Asp	Ala	Val	Tyr	Cys	Cys	Asn	Glu	His	Glu	Cys	His	His	Arg		
385					390					395					400		
Tyr	Ala	Glu	Leu	Tyr	Val	Ile	Asp	Val	Asn	Ile	Asn	Ile	Ser	Cys	Glu		
				405					410					415			
Thr	Asp	Gly	Tyr	Leu	Thr	Lys	Met	Thr	Cys	Arg	Trp	Ser	Thr	Ser	Thr		
			420					425					430				
Ile	Gln	Ser	Leu	Ala	Glu	Ser	Thr	Leu	Gln	Leu	Arg	Tyr	His	Arg	Ser		
		435					440					445					
Ser	Leu	Tyr	Cys	Ser	Asp	Ile	Pro	Ser	Ile	His	Pro	Ile	Ser	Glu	Pro		
	450					455					460						
Lys	Asp	Cys	Tyr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gly	Phe	Tyr	Glu	Cys	Ile	Phe	Gln		
465					470				475						480		
Pro	Ile	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	Tyr	Thr	Met	Trp	Ile	Arg	Ile	Asn	His		
				485					490					495			
Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	Asp	Ser	Pro	Pro	Thr	Cys	Val	Leu	Pro	Asp	Ser		
			500					505					510				
Val	Val	Lys	Pro	Leu	Pro	Pro	Ser	Ser	Val	Lys	Ala	Glu	Ile	Thr	Ile		
		515					520					525					
Asn	Ile	Gly	Leu	Leu	Lys	Ile	Ser	Trp	Glu	Lys	Pro	Val	Phe	Pro	Glu		
	530					535					540						
Asn	Asn	Leu	Gln	Phe	Gln	Ile	Arg	Tyr	Gly	Leu	Ser	Gly	Lys	Glu	Val		
545					550					555					560		
Gln	Trp	Lys	Met	Tyr	Glu	Val	Tyr	Asp	Ala	Lys	Ser	Lys	Ser	Val	Ser		
				565					570					575			
Leu	Pro	Val	Pro	Asp	Leu	Cys	Ala	Val	Tyr	Ala	Val	Gln	Val	Arg	Cys		
			580					585					590				
Lys	Arg	Leu	Asp	Gly	Leu	Gly	Tyr	Trp	Ser	Asn	Trp	Ser	Asn	Pro	Ala		
	595						600					605					
Tyr	Thr	Val	Val	Met	Asp	Ile	Lys	Val	Pro	Met	Arg	Gly	Pro	Glu	Phe		

610	615	620
Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr		
625	630	635
Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln		640
	645	650
Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu		655
	660	665
Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala		670
	675	680
His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala		685
	690	695
Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val		700
705	710	715
Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser		720
	725	730
Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu		735
	740	745
Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser		750
	755	760
Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu		765
	770	775
Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys		780
785	790	795
Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln		800
	805	810
Ser Asp Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		815
	820	825
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		830
	835	840
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		845
	850	855
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		860
865	870	875
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		880
	885	890
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		895
	900	905
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		910
	915	920
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		925
	930	935
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		940
945	950	955
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		960
	965	970
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		975
	980	985
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		990
	995	1000
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		1005
	1010	1015
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		1020
1025	1030	1035
Leu Ser Pro Gly Lys		1040
	1045	

<210> 117
 <211> 844
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> MFLEPR.mmh
 aa 1-816: F22-D837 khi đuôi dài *Macaca fascicularis* với
 sự thay thế T827A từ XP_005543194.1
 aa 817-844: nhãn gắn myc-myc-hexahistidin

<400> 117
 Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu
 20 25 30
 Ser Lys Asn Thr Ser Asn Leu Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu
 35 40 45
 Phe Asn Ser Ser Asp Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe
 50 55 60
 His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala
 65 70 75 80
 Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Ser Val
 85 90 95
 Phe Gln Gln Met Gly Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly
 100 105 110
 Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Pro
 115 120 125
 Phe Lys Asn Tyr Lys His Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu
 130 135 140
 Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met
 145 150 155 160
 Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu Arg Cys Glu Cys Leu Val Pro
 165 170 175
 Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile
 180 185 190
 Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser Pro Leu Met Ser Val Gln Pro
 195 200 205
 Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu Arg Met Glu Ile
 210 215 220
 Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val
 225 230 235 240
 Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Glu Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr
 245 250 255
 Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val
 260 265 270
 Asp Gly Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Gly Lys
 275 280 285
 Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro His Val
 290 295 300
 Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser
 305 310 315 320
 Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Asn Glu Asn Lys
 325 330 335
 Ile Val Ser Ser Lys Lys Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys

			340					345					350			
Ile	Pro	Gln	Ser	Gln	Tyr	Asp	Val	Val	Ser	Asp	His	Val	Ser	Lys	Val	
		355					360					365				
Thr	Phe	Phe	Asn	Leu	Asn	Glu	Thr	Lys	Pro	Arg	Gly	Lys	Phe	Thr	Tyr	
	370					375					380					
Asp	Ala	Val	Tyr	Cys	Cys	Asn	Glu	His	Glu	Cys	His	His	Arg	Tyr	Ala	
385					390					395					400	
Glu	Leu	Tyr	Val	Ile	Asp	Val	Asn	Ile	Asn	Ile	Ser	Cys	Glu	Thr	Asp	
				405					410						415	
Gly	His	Leu	Thr	Lys	Met	Thr	Cys	Arg	Trp	Ser	Thr	Asn	Thr	Ile	Gln	
			420					425					430			
Ser	Leu	Ala	Gly	Ser	Thr	Leu	Gln	Leu	Arg	Tyr	Arg	Arg	Ser	Ser	Leu	
		435					440					445				
Tyr	Cys	Phe	Asp	Ile	Pro	Ser	Ile	His	Pro	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Asp	
	450					455					460					
Cys	Tyr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gly	Phe	Tyr	Glu	Cys	Val	Phe	Gln	Pro	Ile	
465					470					475					480	
Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	Tyr	Thr	Met	Trp	Ile	Arg	Ile	Asn	His	Pro	Leu	
				485					490					495		
Gly	Ser	Leu	Asp	Ser	Pro	Pro	Thr	Cys	Val	Leu	Pro	Asp	Ser	Val	Val	
			500					505					510			
Lys	Pro	Leu	Pro	Pro	Ser	Ser	Val	Lys	Ala	Glu	Ile	Ile	Lys	Asn	Ile	
		515					520					525				
Gly	Leu	Leu	Lys	Ile	Ser	Trp	Glu	Lys	Pro	Val	Phe	Pro	Glu	Asn	Asn	
	530					535					540					
Leu	Gln	Phe	Gln	Ile	Arg	Tyr	Gly	Leu	Ser	Gly	Lys	Glu	Ile	Gln	Trp	
545					550					555					560	
Lys	Met	Tyr	Asp	Val	Tyr	Asp	Ala	Lys	Ser	Lys	Ser	Val	Ser	Leu	Pro	
				565					570					575		
Val	Pro	Asp	Phe	Cys	Ala	Val	Tyr	Ala	Val	Gln	Val	Arg	Cys	Lys	Arg	
			580					585					590			
Ser	Asp	Gly	Leu	Gly	Leu	Trp	Ser	Asn	Trp	Ser	Asn	Pro	Ala	Tyr	Thr	
		595					600					605				
Val	Val	Met	Asp	Ile	Lys	Val	Pro	Met	Arg	Gly	Pro	Glu	Phe	Trp	Arg	
	610					615					620					
Ile	Ile	Asn	Gly	Asp	Thr	Met	Lys	Lys	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Leu	Leu	
625					630					635					640	
Trp	Lys	Pro	Leu	Met	Lys	Asn	Asp	Ser	Leu	Cys	Ser	Val	Gln	Arg	Tyr	
				645					650					655		
Val	Ile	Asn	His	His	Thr	Ser	Cys	Asn	Gly	Thr	Trp	Ser	Glu	Asp	Val	
			660					665					670			
Gly	Asn	His	Thr	Lys	Phe	Thr	Phe	Leu	Trp	Thr	Glu	Gln	Ala	His	Thr	
	675						680					685				
Val	Thr	Val	Leu	Ala	Ile	Asn	Ser	Ile	Gly	Ala	Ser	Val	Ala	Asn	Phe	
	690					695										

```

785              790              795              800
Ile Ile Asn Ser Phe Ala Gln Asp Asn Thr Glu Lys His Gln Asn Asp
              805              810              815
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu
              820              825              830
Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
              835              840

```

<210> 118

<211> 846

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mLEPR.mmh

aa 1-818: LEPR chuột nhà (L22-G839 của NP_666258.2)

aa 817-846: nhãn gắn myc-myc-hexahistidin

<400> 118

```

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

```

```

Arg Leu Asp Gly Ser Gly Val Trp Ser Asp Trp Ser Ser Pro Gln Val
 290                               295                 300
Phe Thr Thr Gln Asp Val Val Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser
 305                               310                 315                 320
Val Gly Ser Asn Ala Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Asn Glu Asn Gln
                               325                 330                 335
Ile Ile Ser Ser Lys Gln Ile Val Trp Trp Arg Asn Leu Ala Glu Lys
                               340                 345                 350
Ile Pro Glu Ile Gln Tyr Ser Ile Val Ser Asp Arg Val Ser Lys Val
                               355                 360                 365
Thr Phe Ser Asn Leu Lys Ala Thr Arg Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr
 370                               375                 380
Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu Gln Ala Cys His His Arg Tyr Ala
 385                               390                 395                 400
Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp
                               405                 410                 415
Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg Trp Ser Pro Ser Thr Ile Gln
                               420                 425                 430
Ser Leu Val Gly Ser Thr Val Gln Leu Arg Tyr His Arg Arg Ser Leu
                               435                 440                 445
Tyr Cys Pro Asp Ser Pro Ser Ile His Pro Thr Ser Glu Pro Lys Asn
 450                               455                 460
Cys Val Leu Gln Arg Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Val Phe Gln Pro Ile
 465                               470                 475                 480
Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu
                               485                 490                 495
Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val
                               500                 505                 510
Lys Pro Leu Pro Pro Ser Asn Val Lys Ala Glu Ile Thr Val Asn Thr
                               515                 520                 525
Gly Leu Leu Lys Val Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn
 530                               535                 540
Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Ile Gln Trp
 545                               550                 555                 560
Lys Thr His Glu Val Phe Asp Ala Lys Ser Lys Ser Ala Ser Leu Leu
                               565                 570                 575
Val Ser Asp Leu Cys Ala Val Tyr Val Val Gln Val Arg Cys Arg Arg
 580                               585                 590
Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Ser Pro Ala Tyr Thr
 595                               600                 605
Leu Val Met Asp Val Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg
 610                               615                 620
Lys Met Asp Gly Asp Val Thr Lys Lys Glu Arg Asn Val Thr Leu Leu
 625                               630                 635                 640
Trp Lys Pro Leu Thr Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Arg Arg Tyr
                               645                 650                 655
Val Val Lys His Arg Thr Ala His Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val
                               660                 665                 670
Gly Asn Arg Thr Asn Leu Thr Phe Leu Trp Thr Glu Pro Ala His Thr
 675                               680                 685
Val Thr Val Leu Ala Val Asn Ser Leu Gly Ala Ser Leu Val Asn Phe
 690                               695                 700
Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val Ser Ala Val Glu Ser
 705                               710                 715                 720
Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Ser Ser Ser Cys Val Ile Leu Ser Trp Thr
                               725                 730                 735

```

```

Leu Ser Pro Asp Asp Tyr Ser Leu Leu Tyr Leu Val Ile Glu Trp Lys
              740              745              750
Ile Leu Asn Glu Asp Asp Gly Met Lys Trp Leu Arg Ile Pro Ser Asn
              755              760              765
Val Lys Lys Phe Tyr Ile His Asp Asn Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr
              770              775              780
Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Val Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys
785              790              795              800
Ile Ile Asn Gly Phe Thr Lys Asp Ala Ile Asp Lys Gln Gln Asn Asp
              805              810              815
Ala Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln
              820              825              830
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His
              835              840              845

```

<210> 119

<211> 846

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> rLEPR.mmh

aa 1-818: LEPR chuột cống (L22-G839 của NP_036728.1)

aa 819-846: nhân gien myc-myc-hexahistidin

<400> 119

```

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

```

225					230					235				240	
Ala	Pro	Phe	Pro	Leu	Gln	Tyr	Gln	Val	Lys	Tyr	Leu	Glu	Asn	Ser	Thr
				245					250				255		
Ile	Val	Arg	Glu	Ala	Ala	Glu	Ile	Val	Ser	Asp	Thr	Ser	Leu	Val	
			260					265					270		
Asp	Ser	Val	Leu	Pro	Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Val	Gln	Val	Arg	Ser	Lys
		275					280					285			
Arg	Leu	Asp	Gly	Ser	Gly	Val	Trp	Ser	Asp	Trp	Ser	Leu	Pro	Gln	Leu
	290					295					300				
Phe	Thr	Thr	Gln	Asp	Val	Met	Tyr	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Leu	Thr	Ser
305					310				315					320	
Val	Gly	Ser	Asn	Ala	Ser	Phe	Cys	Cys	Ile	Tyr	Lys	Asn	Glu	Asn	Gln
				325					330					335	
Thr	Ile	Ser	Ser	Lys	Gln	Ile	Val	Trp	Trp	Met	Asn	Leu	Ala	Glu	Lys
			340					345					350		
Ile	Pro	Glu	Thr	Gln	Tyr	Asn	Thr	Val	Ser	Asp	His	Ile	Ser	Lys	Val
		355					360					365			
Thr	Phe	Ser	Asn	Leu	Lys	Ala	Thr	Arg	Pro	Arg	Gly	Lys	Phe	Thr	Tyr
	370					375					380				
Asp	Ala	Val	Tyr	Cys	Cys	Asn	Glu	Gln	Ala	Cys	His	His	Arg	Tyr	Ala
385					390				395					400	
Glu	Leu	Tyr	Val	Ile	Asp	Val	Asn	Ile	Asn	Ile	Ser	Cys	Glu	Thr	Asp
				405				410						415	
Gly	Tyr	Leu	Thr	Lys	Met	Thr	Cys	Arg	Trp	Ser	Pro	Ser	Thr	Ile	Gln
			420					425					430		
Ser	Leu	Val	Gly	Ser	Thr	Val	Gln	Leu	Arg	Tyr	His	Arg	Arg	Ser	Leu
		435					440					445			
Tyr	Cys	Pro	Asp	Asn	Pro	Ser	Ile	Arg	Pro	Thr	Ser	Glu	Leu	Lys	Asn
	450					455					460				
Cys	Val	Leu	Gln	Thr	Asp	Gly	Phe	Tyr	Glu	Cys	Val	Phe	Gln	Pro	Ile
465					470				475					480	
Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	Tyr	Thr	Met	Trp	Ile	Arg	Ile	Asn	His	Ser	Leu
				485				490						495	
Gly	Ser	Leu	Asp	Ser	Pro	Pro	Thr	Cys	Val	Leu	Pro	Asp	Ser	Val	Val
			500					505					510		
Lys	Pro	Leu	Pro	Pro	Ser	Asn	Val	Lys	Ala	Glu	Ile	Thr	Ile	Asn	Thr
		515					520					525			
Gly	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Trp	Glu	Lys	Pro	Val	Phe	Pro	Glu	Asn	Asn
		530				535					540				
Leu	Gln	Phe	Gln	Ile	Arg	Tyr	Gly	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Ile	Gln	Trp
545					550				555					560	
Lys	Thr	His	Glu	Val	Phe	Asp	Ala	Lys	Ser	Lys	Ser	Ala	Ser	Leu	Pro
				565					570					575	
Val	Ser	Asp	Leu	Cys	Ala	Val	Tyr	Val	Val	Gln	Val	Arg	Cys	Arg	Arg
			580					585					590		
Leu	Asp	Gly	Leu	Gly	Tyr	Trp	Ser	Asn	Trp	Ser	Ser	Pro	Ala	Tyr	Thr
		595					600					605			
Leu	Val	Met	Asp	Val	Lys	Val	Pro	Met	Arg	Gly	Pro	Glu	Phe	Trp	Arg
		610				615					620				
Ile	Met	Asp	Gly	Asp	Ile	Thr	Lys	Lys	Glu	Arg	Asn	Val	Thr	Leu	Leu
625					630					635				640	
Trp	Lys	Pro	Leu	Met	Lys	Asn	Asp	Ser	Leu	Cys	Ser	Val	Arg	Arg	Tyr
				645					650					655	
Val	Val	Lys	His	Arg	Thr	Ala	His	Asn	Gly	Thr	Trp	Ser	Gln	Asp	Val
			660					665					670		
Gly	Asn	Gln	Thr	Asn	Leu	Thr	Phe	Leu	Trp	Ala	Glu	Ser	Ala	His	Thr

675	680	685
Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Leu Val Asn Phe		
690	695	700
Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ala Val Gln Ser		
705	710	715
Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Ser Ser Ser Cys Val Ile Leu Ser Trp Thr		
725	730	735
Leu Ser Pro Asn Asp Tyr Ser Leu Leu Tyr Leu Val Ile Glu Trp Lys		
740	745	750
Asn Leu Asn Asp Asp Asp Gly Met Lys Trp Leu Arg Ile Pro Ser Asn		
755	760	765
Val Asn Lys Tyr Tyr Ile His Asp Asn Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr		
770	775	780
Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Val Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys		
785	790	795
Ile Ile Asn Gly Phe Thr Lys Asp Asp Ile Ala Lys Gln Gln Asn Asp		
805	810	815
Ala Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln		
820	825	830
Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His		
835	840	845

<210> 120

<211> 1045

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> mLEPR.hFc

aa 1-818: LEPR chuột nhà (L22-G839 của NP_666258.2)

aa 819-1045: nhãn gắn IgG1 người (D104-K330 của P01857)

<400> 120

Leu Asn Leu Ala Tyr Pro Ile Ser Pro Trp Lys Phe Lys Leu Phe Cys		
1	5	10
Gly Pro Pro Asn Thr Thr Asp Asp Ser Phe Leu Ser Pro Ala Gly Ala		
20	25	30
Pro Asn Asn Ala Ser Ala Leu Lys Gly Ala Ser Glu Ala Ile Val Glu		
35	40	45
Ala Lys Phe Asn Ser Ser Gly Ile Tyr Val Pro Glu Leu Ser Lys Thr		
50	55	60
Val Phe His Cys Cys Phe Gly Asn Glu Gln Gly Gln Asn Cys Ser Ala		
65	70	75
Leu Thr Asp Asn Thr Glu Gly Lys Thr Leu Ala Ser Val Val Lys Ala		
85	90	95
Ser Val Phe Arg Gln Leu Gly Val Asn Trp Asp Ile Glu Cys Trp Met		
100	105	110
Lys Gly Asp Leu Thr Leu Phe Ile Cys His Met Glu Pro Leu Pro Lys		
115	120	125
Asn Pro Phe Lys Asn Tyr Asp Ser Lys Val His Leu Leu Tyr Asp Leu		
130	135	140
Pro Glu Val Ile Asp Asp Ser Pro Leu Pro Pro Leu Lys Asp Ser Phe		
145	150	155
Gln Thr Val Gln Cys Asn Cys Ser Leu Arg Gly Cys Glu Cys His Val		
165	170	175

Pro	Val	Pro	Arg	Ala	Lys	Leu	Asn	Tyr	Ala	Leu	Leu	Met	Tyr	Leu	Glu
			180					185					190		
Ile	Thr	Ser	Ala	Gly	Val	Ser	Phe	Gln	Ser	Pro	Leu	Met	Ser	Leu	Gln
		195					200					205			
Pro	Met	Leu	Val	Val	Lys	Pro	Asp	Pro	Pro	Leu	Gly	Leu	His	Met	Glu
		210				215					220				
Val	Thr	Asp	Asp	Gly	Asn	Leu	Lys	Ile	Ser	Trp	Asp	Ser	Gln	Thr	Met
225					230					235					240
Ala	Pro	Phe	Pro	Leu	Gln	Tyr	Gln	Val	Lys	Tyr	Leu	Glu	Asn	Ser	Thr
				245					250					255	
Ile	Val	Arg	Glu	Ala	Ala	Glu	Ile	Val	Ser	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu	Val
			260					265					270		
Asp	Ser	Val	Leu	Pro	Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Val	Gln	Val	Arg	Ser	Lys
		275					280					285			
Arg	Leu	Asp	Gly	Ser	Gly	Val	Trp	Ser	Asp	Trp	Ser	Ser	Pro	Gln	Val
	290					295					300				
Phe	Thr	Thr	Gln	Asp	Val	Val	Tyr	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Leu	Thr	Ser
305					310					315					320
Val	Gly	Ser	Asn	Ala	Ser	Phe	His	Cys	Ile	Tyr	Lys	Asn	Glu	Asn	Gln
				325					330					335	
Ile	Ile	Ser	Ser	Lys	Gln	Ile	Val	Trp	Trp	Arg	Asn	Leu	Ala	Glu	Lys
			340					345					350		
Ile	Pro	Glu	Ile	Gln	Tyr	Ser	Ile	Val	Ser	Asp	Arg	Val	Ser	Lys	Val
		355					360					365			
Thr	Phe	Ser	Asn	Leu	Lys	Ala	Thr	Arg	Pro	Arg	Gly	Lys	Phe	Thr	Tyr
	370					375					380				
Asp	Ala	Val	Tyr	Cys	Cys	Asn	Glu	Gln	Ala	Cys	His	His	Arg	Tyr	Ala
385					390					395					400
Glu	Leu	Tyr	Val	Ile	Asp	Val	Asn	Ile	Asn	Ile	Ser	Cys	Glu	Thr	Asp
				405					410					415	
Gly	Tyr	Leu	Thr	Lys	Met	Thr	Cys	Arg	Trp	Ser	Pro	Ser	Thr	Ile	Gln
			420					425					430		
Ser	Leu	Val	Gly	Ser	Thr	Val	Gln	Leu	Arg	Tyr	His	Arg	Arg	Ser	Leu
		435					440					445			
Tyr	Cys	Pro	Asp	Ser	Pro	Ser	Ile	His	Pro	Thr	Ser	Glu	Pro	Lys	Asn
	450					455					460				
Cys	Val	Leu	Gln	Arg	Asp	Gly	Phe	Tyr	Glu	Cys	Val	Phe	Gln	Pro	Ile
465					470					475					480
Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	Tyr	Thr	Met	Trp	Ile	Arg	Ile	Asn	His	Ser	Leu
				485					490					495	
Gly	Ser	Leu	Asp	Ser	Pro	Pro	Thr	Cys	Val	Leu	Pro	Asp	Ser	Val	Val
			500					505					510		
Lys	Pro	Leu	Pro	Pro	Ser	Asn	Val	Lys	Ala	Glu	Ile	Thr	Val	Asn	Thr
		515					520					525			
Gly	Leu	Leu	Lys	Val											

Lys Met Asp Gly Asp Val Thr Lys Lys Glu Arg Asn Val Thr Leu Leu
 625 630 635 640
 Trp Lys Pro Leu Thr Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Arg Arg Tyr
 645 650 655
 Val Val Lys His Arg Thr Ala His Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val
 660 665 670
 Gly Asn Arg Thr Asn Leu Thr Phe Leu Trp Thr Glu Pro Ala His Thr
 675 680 685
 Val Thr Val Leu Ala Val Asn Ser Leu Gly Ala Ser Leu Val Asn Phe
 690 695 700
 Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser Lys Val Ser Ala Val Glu Ser
 705 710 715 720
 Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Ser Ser Ser Cys Val Ile Leu Ser Trp Thr
 725 730 735
 Leu Ser Pro Asp Asp Tyr Ser Leu Leu Tyr Leu Val Ile Glu Trp Lys
 740 745 750
 Ile Leu Asn Glu Asp Asp Gly Met Lys Trp Leu Arg Ile Pro Ser Asn
 755 760 765
 Val Lys Lys Phe Tyr Ile His Asp Asn Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr
 770 775 780
 Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Val Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys
 785 790 795 800
 Ile Ile Asn Gly Phe Thr Lys Asp Ala Ile Asp Lys Gln Gln Asn Asp
 805 810 815
 Ala Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 820 825 830
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 835 840 845
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 850 855 860
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 865 870 875 880
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 885 890 895
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 900 905 910
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 915 920 925
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 930 935 940
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 945 950 955 960
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 965 970 975
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 980 985 990
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 995 1000 1005
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 1010 1015 1020
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 1025 1030 1035 1040
 Leu Ser Pro Gly Lys
 1045

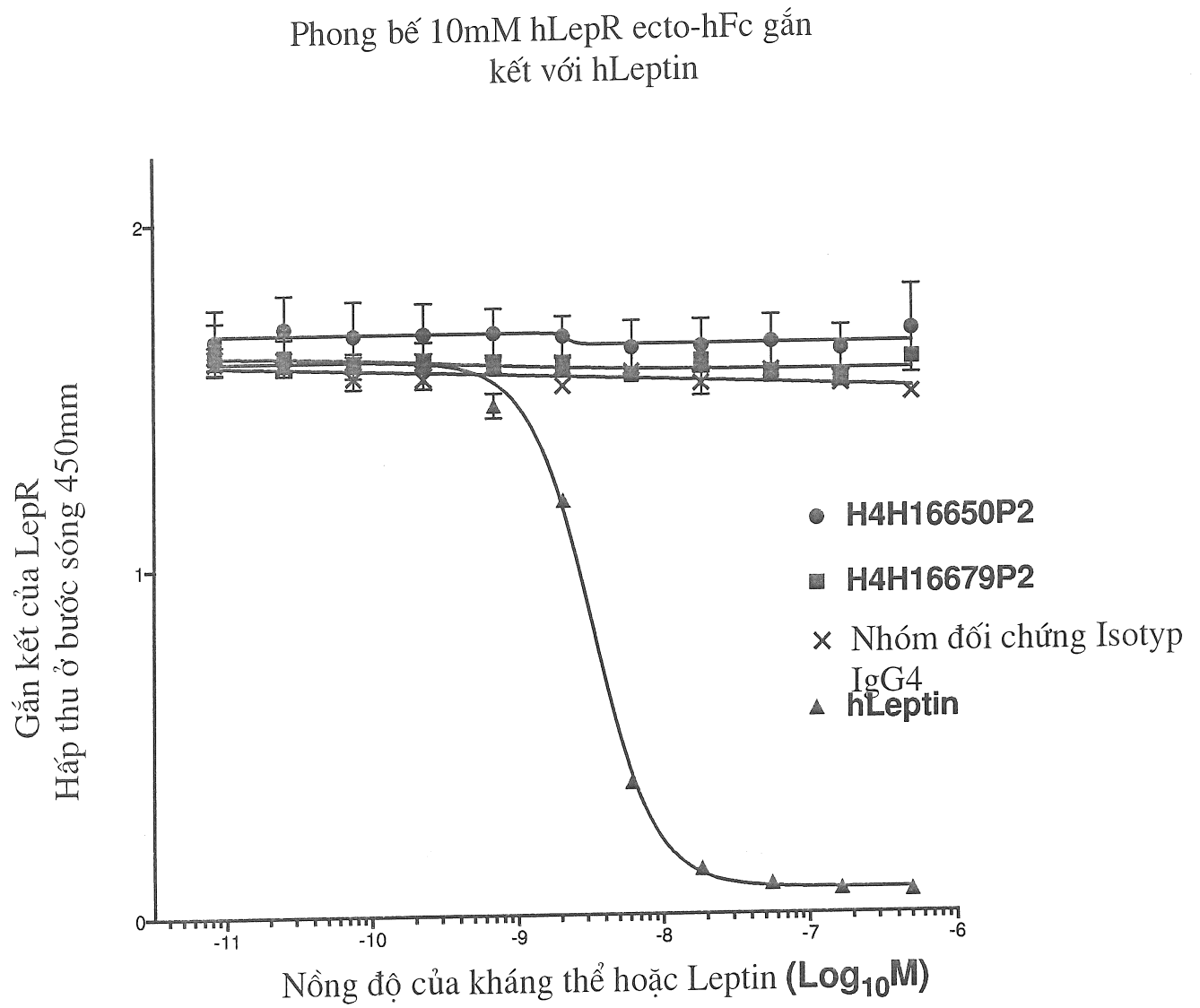


FIG. 1

FIG. 2A

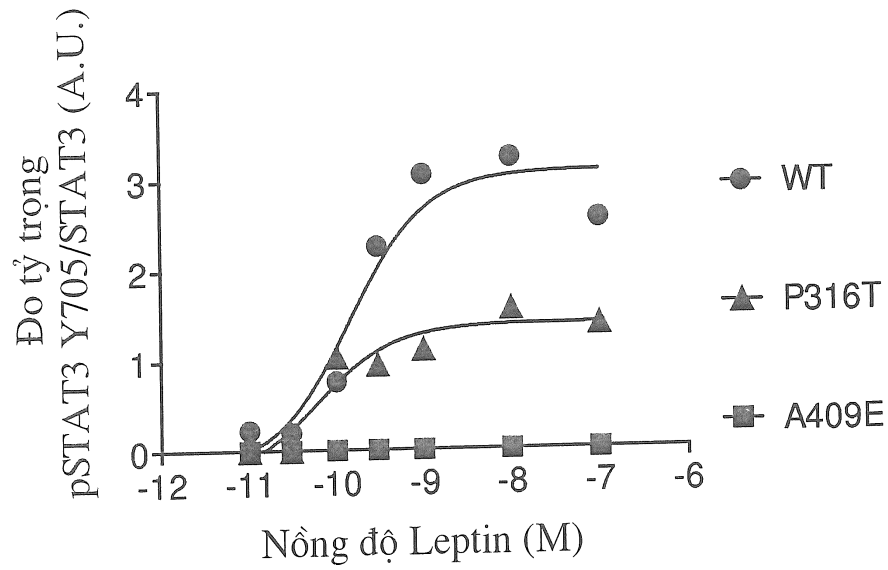


FIG. 2B

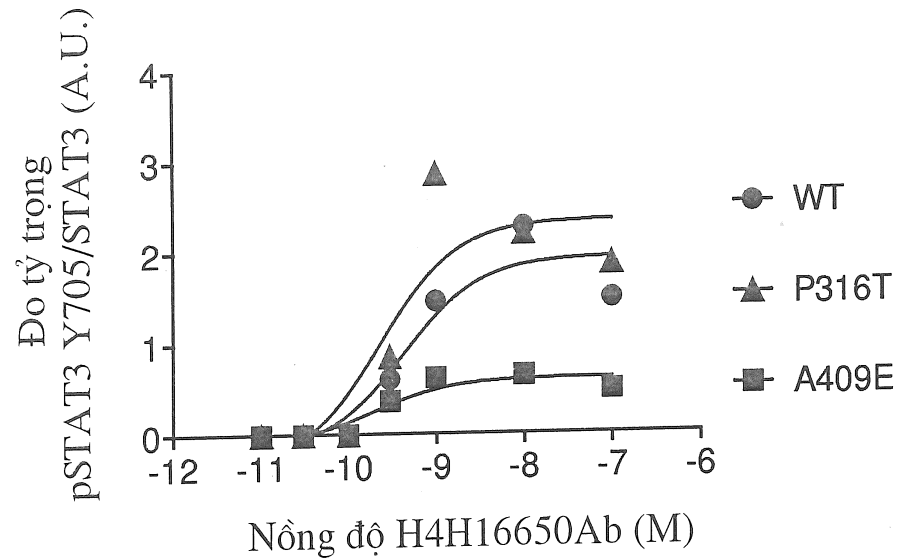
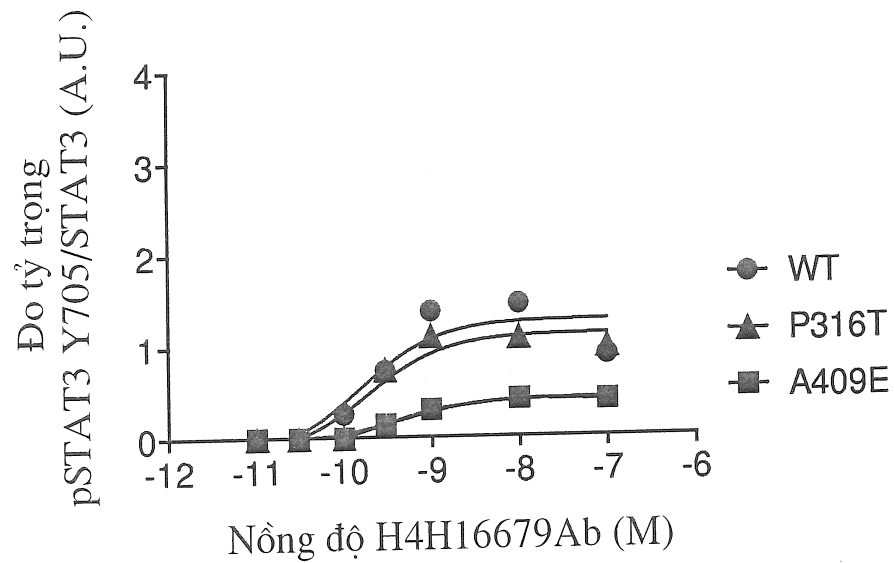


FIG. 2C



pSTAT3 Y705/STAT3

Mức hấp thu thức ăn hàng ngày

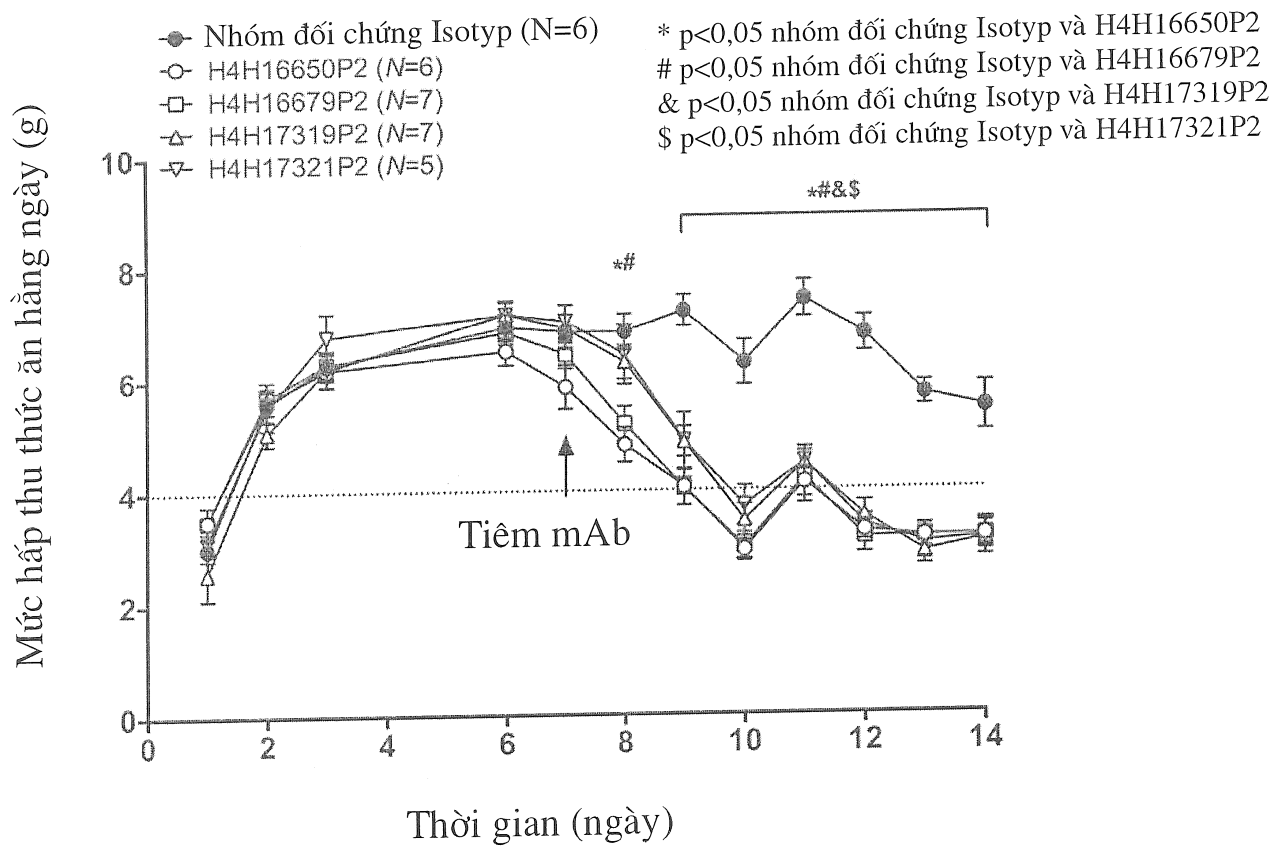


FIG. 3

% mức thay đổi thể trọng (từ quá trình tiên phân
phối ADN theo thủy động lực (HDD))

Mức thay đổi thể trọng

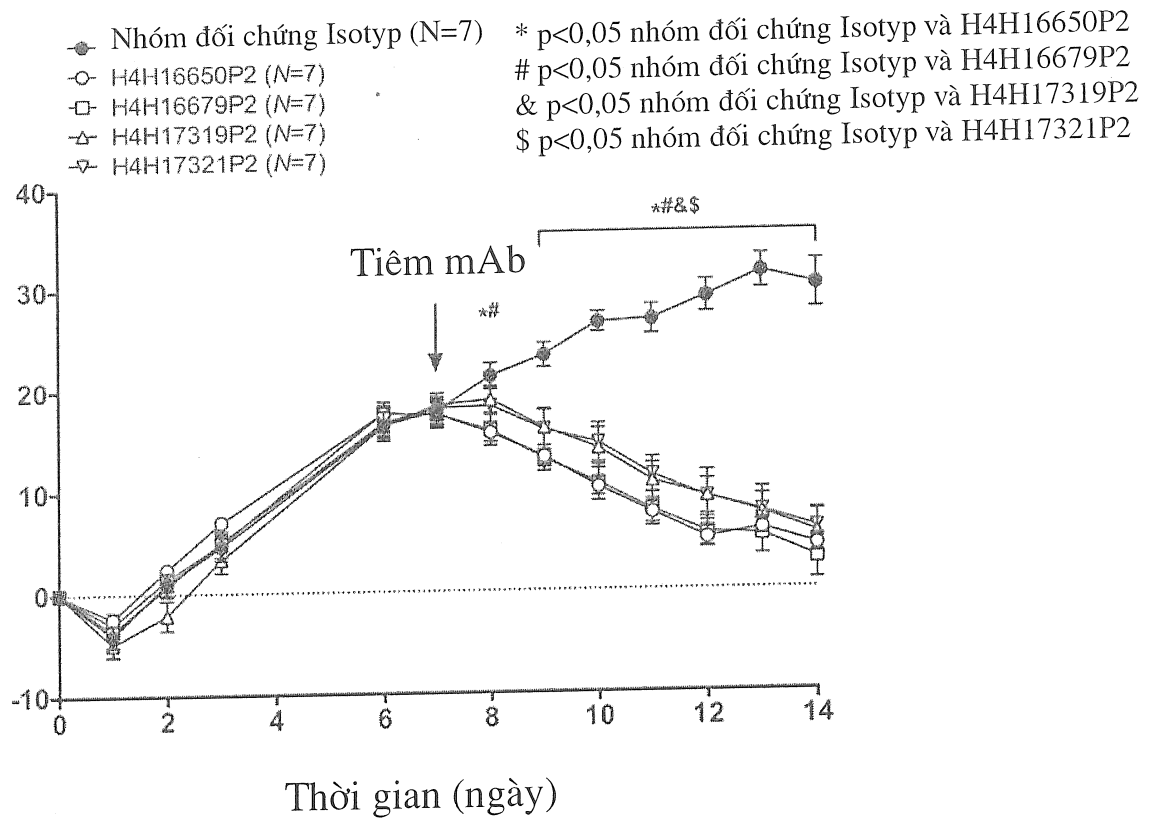
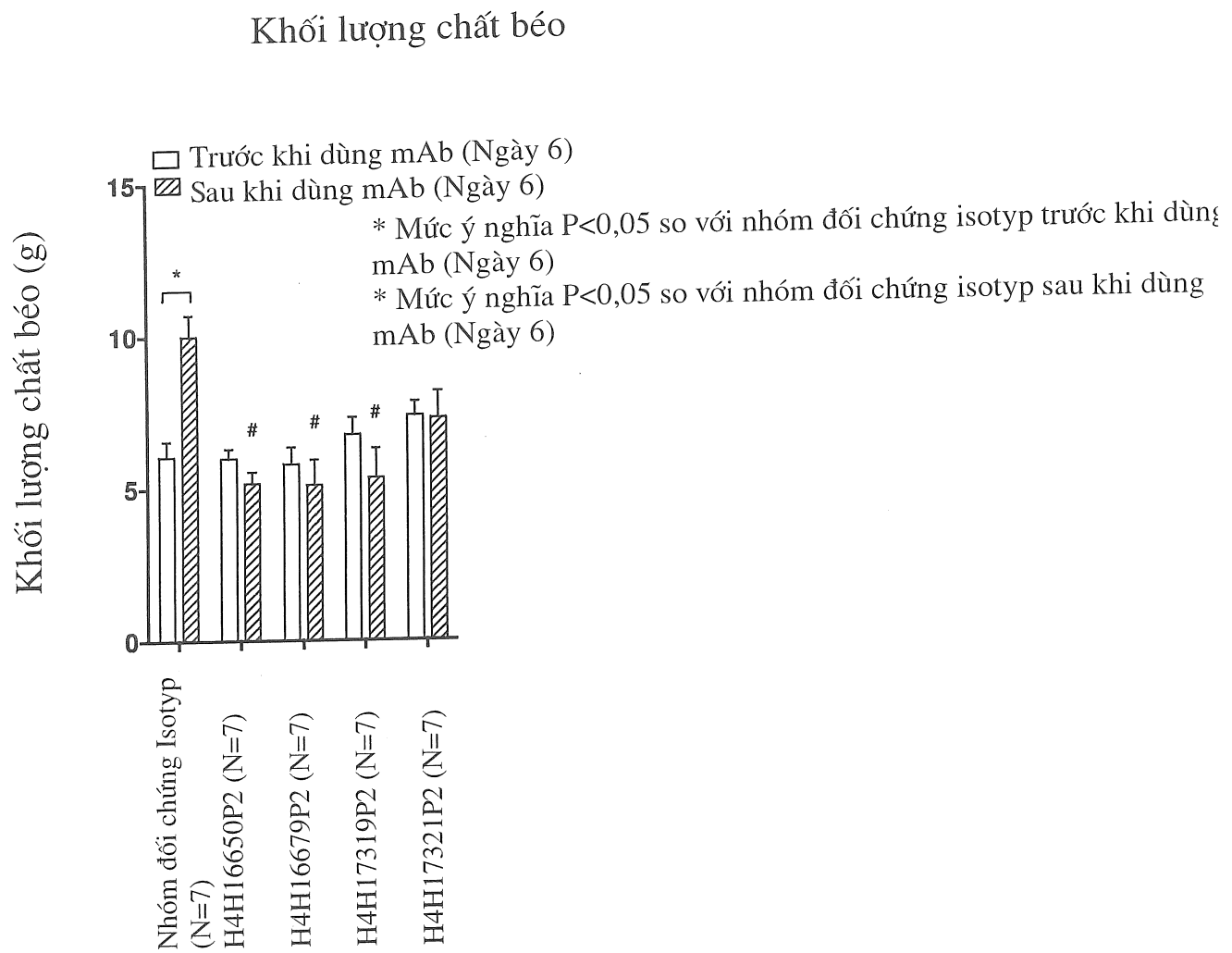
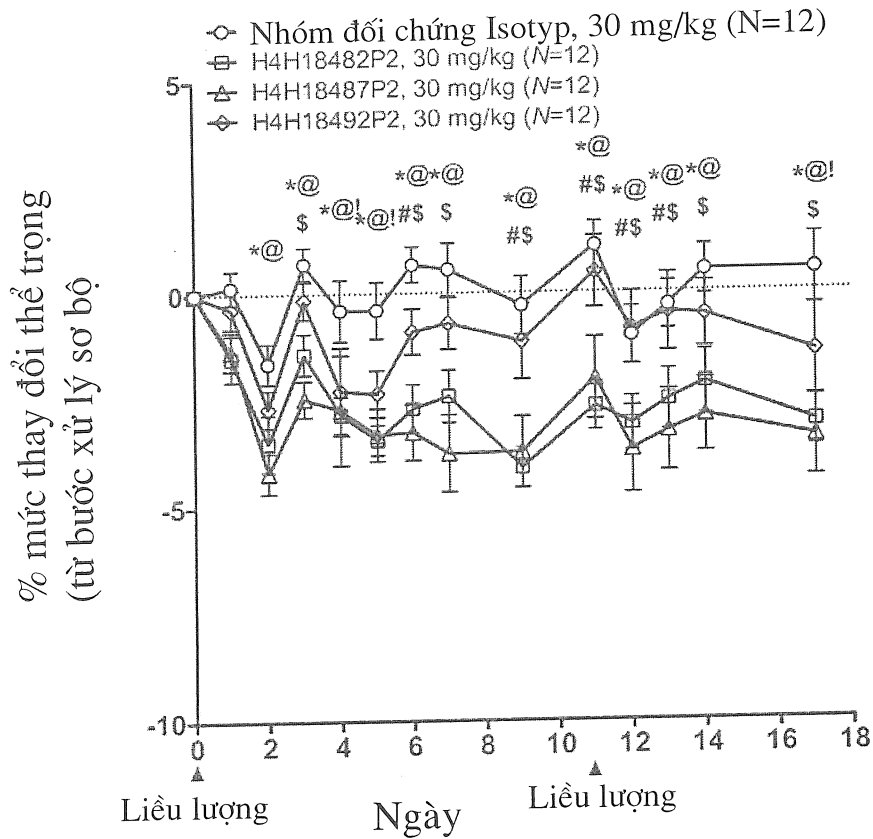


FIG. 4

**FIG. 5**

% mức thay đổi thể trọng

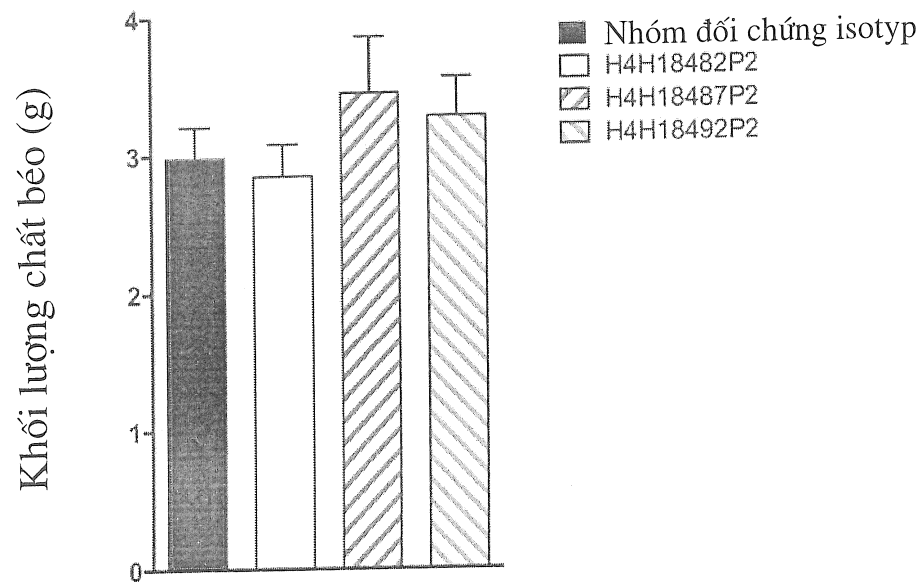


* $p < 0,05$ nhóm đối chứng Isotyp và H4H18482P2
 @ $p < 0,05$ nhóm đối chứng Isotyp và H4H18487P2
 ! $p < 0,05$ nhóm đối chứng Isotyp và H4H18492P2
 # $p < 0,05$ H4H18492P2 và H4H18482P2
 \$ $p < 0,05$ H4H18492P2 và H4H18487P2

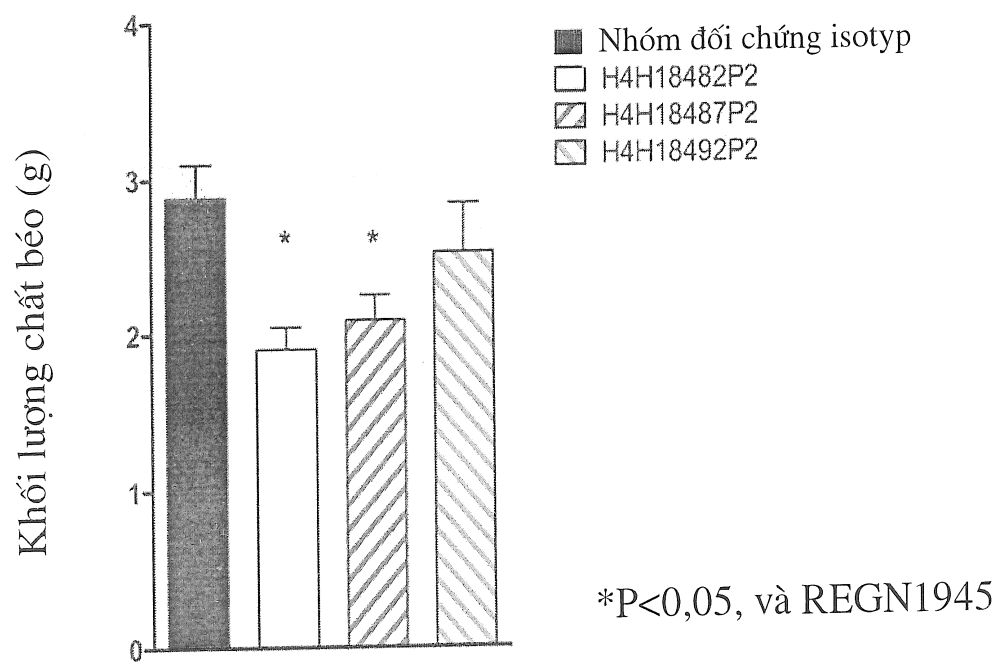
FIG. 6

FIG. 7A

Khối lượng chất béo trước khi
định liều mAb (ngày -19)

**FIG. 7B**

Khối lượng chất béo sau khi định
liều mAb (ngày 17)



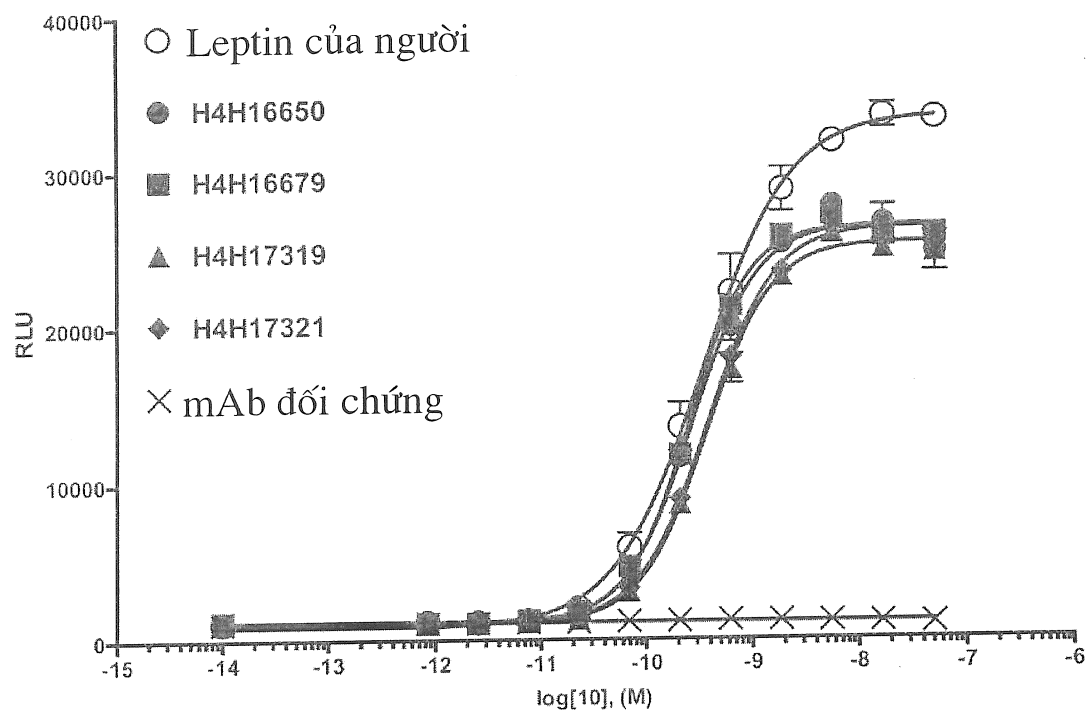


FIG. 8